

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

Renato Nascimento da Costa

Avaliação da implementação da pesquisa de anticorpos irregulares com hemácias tratadas com enzima nos exames pré-transfusionais de pacientes com neoplasia maligna de mama do Instituto Nacional do Câncer

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

Avaliação da implementação da pesquisa de anticorpos irregulares com hemácias tratadas com enzima nos exames pré-transfusionais de pacientes com neoplasia maligna de mama do Instituto Nacional do Câncer

RENATO NASCIMENTO DA COSTA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues

- RIBEIRÃO PRETO, SP – 2017 –

RENATO NASCIMENTO DA COSTA

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues

Avaliação da implementação da pesquisa de anticorpos irregulares com hemácias tratadas com enzima nos exames pré-transfusionais de pacientes com neoplasia maligna de mama do Instituto Nacional do Câncer

- RIBEIRÃO PRETO, SP – 2017 –

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Da Costa, Renato Nascimento

Avaliação da implementação da pesquisa de anticorpos irregulares com hemácias tratadas com enzima nos exames pré-transfusionais de pacientes com neoplasia maligna de mama do Instituto Nacional do Câncer

Número de folhas: 80

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues

1. Aloimunização eritrocitária 2. Câncer de mama 3. Teste enzimático

FOLHA DE APROVAÇÃO

Da Costa, Renato Nascimento

Avaliação da implementação da pesquisa de anticorpos irregulares com hemácias tratadas com enzima nos exames pré-transfusionais de pacientes com neoplasia maligna de mama do Instituto Nacional do Câncer

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido tantas coisas maravilhosas em minha vida: saúde, um bom lar, uma boa família e muitas bênçãos e vitórias.

Aos meus pais, Pedro e Fátima, a minha irmã Aline e a toda minha família, pelo companheirismo, amor e compreensão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues e *co orientadora: Dra. Flávia Leite Souza Santos* por todo auxílio e atenção, além das várias observações e críticas construtivas, desde a elaboração do projeto até a conclusão do trabalho.

À colaboradora Msc. Margarida de Oliveira Pinho, por toda a paciência e boa vontade, me auxiliando sempre, especialmente pela colaboração para realização dos exames do Laboratório de Imunohematologia (LI) do Instituto Nacional do Câncer – INCA.

Aos funcionários do LI-INCA, principalmente à Simone Peniche e Bárbara Gadelha pela paciência, simpatia, amizade e cortesia.

À Dra. Iara Motta, chefe do serviço de Hemoterapia do Hospital do Câncer I, e Dra Elizabeth Celso, responsável técnica da agência transfusional do Hospital do Câncer III, pela acreditação dada ao meu crescimento profissional e permissão para realização desse trabalho.

RESUMO

A aloimunização contra antígenos eritrocitários decorre normalmente de gestações ou transfusões prévias e torna-se um problema mais frequente entre pacientes submetidos à transfusão, até mesmo entre pacientes transfundidos de forma esporádica, como nos casos de pacientes com câncer de mama. A detecção de anticorpos irregulares deve ser realizada com técnica sensível, capaz de detectar os anticorpos de maior relevância clínica. A falha na detecção de um aloanticorpo pode levar a reação transfusional hemolítica aguda ou tardia de intensidade variável que podem agravar ainda mais a condição clínica do receptor. Atualmente no Hospital do Câncer III, a detecção de anticorpo irregular é realizada na técnica em gel-teste na fase de antiglobulina humana. O presente trabalho teve como objetivos avaliar o impacto da implantação da técnica enzimática na pesquisa de anticorpos irregulares (P.A.I) na rotina pré-transfusional em associação à técnica utilizada na rotina, e estudar o perfil de aloimunização em portadores do câncer de mama atendidos nesse serviço. Entre junho de 2015 e maio de 2016, 429 amostras de sangue de pacientes com câncer de mama coletadas para testes pré-transfusionais foram submetidas à P.A.I pelas metodologias em Liss\AGH e Nacl\Enzima. Quando a P.A.I resultava positiva, a identificação do anticorpo era realizada utilizando a técnica correspondente. A frequência de aloimunização encontrada pela técnica de Liss/AGH foi de 1,86% (8/429), enquanto a técnica enzimática revelou uma taxa de aloimunização de 7,6% (32/421) e com associação dos resultados de ambas técnicas obtivemos 9,32% (40/429). Assim como na literatura, os anticorpos dos sistemas Rh foram os mais frequentes. A rotina institucional apresentou o Anti-D como predominante em 5 amostras (41,6%), seguido por 2 Anti-E (16,6%), 2 Anti-C (16,6%), 1 Anti-Lea (8,4%) , 1 Anti-Jka (8,4%) e 1 Anti-S (8,40). Enquanto que em enzima, o Anti-E foi o mais predominante em 13 amostras (35%), seguido por 9 (24%) autoanticorpos públicos, 7 Anti-Lea (19%), 4 Anti-D (11%), 1 Anti-C (2,75%), 1 Anti-Cw (2,75%), 1 Anti-K (2,75%) e 1 Anti- Dia (2,75%). Para comparar proporções do perfil de aloimunização desses pacientes, foram utilizados os testes Qui-quadrado e Teste G, com valores de $p < 0,10$ considerados significantes. Foram observadas diferenças significantes entre aloimunizados e não aloimunizados quanto à cor da pele, classificação RhD, histórico transfusional e tempo de incidência de aloanticorpo. Observamos que a aloimunização não está correlacionada ao número de transfusões de concentrados de hemácias na Instituição e sim pelo histórico transfusional. Antecedentes transfusionais foram identificados em 27,5% dos aloimunizados e 14% dos não aloimunizados ($p = 0.0398$). O predomínio de RhD

positivo foi verificado tanto nos aloimunizados quanto nos grupos dos não aloimunizados com percentuais de 75% e 90%, respectivamente (p) = 0.0147. De acordo com a estimativa do tempo para geração de aloanticorpos, todas as aloimunizadas (100%) apresentaram resultado considerado longo, sendo superior a 72 horas. Dentre as não aloimunizadas o mesmo tempo apresentou-se em 41 (82%) das pacientes (p) = 0.0583, demonstrando que a técnica enzimática pode ser utilizada com o intuito de se detectar aloanticorpos em reduzido intervalo de tempo pós-exposição a antígenos eritrocitários. Diante desses fatos, propomos a aplicação da fenotipagem eritrocitária para os antígenos dos sistemas Kell e Rh, para os indivíduos portadores do câncer de mama. Também propomos a ampliação deste projeto na rotina pré-transfusional sobre os demais grupos de pacientes oncológicos tratados pelo INCA. Tal medida certamente contribuirá para reduzir o risco de transfusões fenótipo incompatíveis que poderiam acarretar reações transfusionais hemolíticas ou transfusões ineficazes.

Palavras chave: Aloimunização eritrocitária. Câncer de mama. Teste enzimático.

ABSTRACT

The alloimmunization from erythrocyte antigens usually happens from previous pregnancies or transfusions and becomes a frequent problem among patients undergoing transfusion, even among those transfused sporadically, as in the cases of patients with breast cancer. The detection of irregular antibodies should be performed with sensitive technique capable of detecting the most clinically relevant antibodies. The failure of detecting an alloantibody can provoke acute or delayed hemolytic transfusion reaction of varying intensity that can further worsen the clinical condition of the recipient. Currently in the Cancer Hospital III, irregular antibody detection is performed in the gel-test technique at the stage of human antiglobulin. This study aimed to evaluate the impact of enzymatic technique implementation in irregular antibody screening (PAI) in the pre-transfusion routine in association with the technique used in routine, and study the alloimmunization profile in patients with breast cancer treated in this service. Between June 2015 and May 2016 XXX blood samples (serum? Plasma?) Of patients with breast cancer collected for pre-transfusion tests were submitted to the P.A.I methodologies Liss \ AGH and NaCl \ enzyme. When P.A.I resulted positive, identification of the antibody was carried out using the corresponding technique. The frequency of alloimmunization found by the technique Liss / AGH was 1.86% (8/429), whereas the enzymatic technique revealed an alloimmunization rate of 7.6% (32/421) and association of the results of both techniques was 9.32% (40/429). As found in literature, the antibodies of the Rh systems were the most frequent. The institutional routine presented anti-D as prevalent in 5 samples (41.6%), followed by anti-E 2 (16.6%) 2 Anti-C (16.6%) 1 Anti-Lea (8, 4%), anti-Jka 1 (8.4%) and anti-S 1 (8.40). While in enzyme technique, Anti-E was the most predominant in 13 samples (35%), followed by 9 (24%) hot public autoantibodies 7 Anti-Lea (19%) 4 Anti-D (11%), 1 Anti-C (2.75%), Anti-Cw 1 (2.75%) 1 Anti-K (2.75%) and Anti Day 1 (2.75%). To compare alloimmunization profile proportions of these patients, the Chi-square test and test G were used, with $p < 0.10$ considered significant. Significant differences were observed between alloimmunized and not alloimmunized as ethnicity, RhD classification, transfusional historic and time of incidence of alloantibodies. We note that alloimmunization is not correlated to the number of red cell concentrate transfusions in the institution but by transfusional historic. Past transfusions have been identified in 27.5% of alloimmunized and 14% of non-alloimmunized ($p = 0.0398$ patients. The prevalence of RhD positive was observed in both groups alloimmunized and non-alloimmunized with 75% and 90%, respectively ($p = 0.0147$). According to the estimated time for the generation of alloantibodies, all isoimmunized (100%) had

results considered long, and more than 72 hours. Among the non-alloimmunized, 41 (82%) patients ($p = 0.0583$) presented the same time, indicating that the enzymatic technique can be used in order to detect alloantibodies in a reduced post-exposure interval to erythrocyte antigens. Given these facts, we propose the application of phenotyping erythrocyte to the antigens of the Kell and Rh systems, for all individuals of breast cancer. We also propose the extension of this project in the pre-transfusion routine on other groups of cancer patients treated by INCA. This measure will certainly help to reduce the risk of transfusion incompatible phenotype that could cause hemolytic transfusion reactions or ineffective transfusions.

Key words: erythrocyte Alloimmunization. Breast cancer. Enzyme test.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ilustração esquemática de expressão dos antígenos eritrocitários _____ 17
- Figura 2** - Perfil antigênico das hemácias de triagem: diagrama para triagem de anticorpos. _____ 21
- Figura 3** . Perfil antigênico das hemácias de identificação de anticorpos: diagrama para identificação de anticorpos irregulares _____ 22
- Figura 4** – Exemplo de suspensão de Hemácias I - II – III não papainizadas/ suspensão de hemácias IP- IIP- IIIP papainizadas _____ 36
- Figura 5** - PAI na técnica em cartão-gel LISS/AGH e enzimático (Cartão “Liss\AGH” contendo reagente poliespecífico AGH (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal e cartão-gel neutro contendo NaCl a 0,9%) _____ 37
- Figura 6** - Exemplo de suspensão de hemácias I – II para técnica em tubo _____ 37
- Figura 7** - PAI na técnica em tubo _____ 38
- Figura 8** - Exemplo de painel de Hemácias não papainizado/ painel de hemácias papainizado _____ 38
- Figura 9** - IAI na técnica de cartão – gel centrifugação em LISS\AGH _____ 39
- Figura 10** – IAI na técnica de cartão – gel centrifugação em meio enzimático _____ 39
- Figura 11** - Painel de Hemácias – utilizado na IAI de metodologia em tubo _____ 40
- Figura 12** - Técnica de IAI em tubo _____ 40
- Figura 13** - Distribuição de 429 pacientes atendidos na AT - HCIII, segundo o resultado da PAI em LISS/AGH; Rio de Janeiro, 2015 a 2016 _____ 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Distribuição dos 429 pacientes de acordo com a aplicação dos testes de triagem em Liss/Coombs e Nacl/enzima. _____ 44
- Tabela 2:** Distribuição do percentual e especificidade de aloanticorpos eritrocitários, segundo a rotinal institucional, técnica enzimática e associação dos resultados das técnicas da rotina e enzima _____ 44
- Tabela 3:** Distribuição dos 9 exemplares de autoanticorpos de acordo com a sua especificidade; e ausência ou presença de aloanticorpos _____ 45
- Tabela 4:** Distribuição dos 429 pacientes do HCIII, segundo faixa etária e etnia_____ 46
- Tabela 5 -** Distribuição dos 429 pacientes do HCIII, segundo a classificação sanguínea ABO e RhD _____ 47
- Tabela 6 -** Distribuição dos 429 pacientes do HCIII, o histórico e número de transfusões _____ 48
- Tabela 7 -** Distribuição dos 429 pacientes do HCIII, de acordo com o histórico e número de gestações _____ 50
- Tabela 8 -** Distribuição dos pacientes do HCIII, de acordo com o tempo decorrido entre a última gestação e transfusão para com primeiro Pai realizado no estudo para análise da prevalência e incidência de aloanticorpos _____ 51
- Tabela 9 -**Distribuição dos 429 pacientes do HCIII, de acordo com o estadiamento_ 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGH – Antiglobulina humana

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AT – Agência Transfusional

Biopeg - polietilenoglicol

C.D.C. - Centros para Controle de Doenças

C.E.P. - Comitê de Ética em Pesquisa

EDTA - ácido etilenodiamino tetra acético

HCI – Hospital do Câncer I

HCIII – Hospital do Câncer III

Hemácias-teste I e II - reagentes comerciais compostos por suspensão de hemácias a 0,8% (grupo O positivo) recobertas, cada uma, por vários antígenos eritrocitários diferentes, informados em tabela específica.

Hemácias- teste I, II e III - reagentes comerciais compostos por suspensão de hemácias a 0,8% (grupo O positivo) recobertas, cada uma, por vários antígenos eritrocitários em tabela específica.

IAI – Identificação do anticorpo irregular

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LI – Laboratório de Imunohematologia

LISS – (low ionic strength saline) - reagente de baixa força iônica – diminui a força iônica do meio de suspensão das hemácias, facilitando a sensibilização.

M.S. – Ministério da Saúde

NAACLS - Agência Credenciadora Nacional Para Ciência Clínica Laboratorial

NAPE – Núcleo de apoio à Pesquisa

P.A.I - Pesquisa de Anticorpos Irregulares

PC – Prova de compatibilidade ou prova cruzada

Painel de Hemácias – painel de 11 hemácias diferentes (grupo O positivo) recobertas, cada uma, por vários antígenos eritrocitários diferentes, informados em tabela específica.

SUS – Sistema único de Saúde

TCLE – Termo de consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	16
2. JUSTIFICATIVA -----	26
3. HIPÓTESE -----	28
4. OBJETIVOS -----	29
5. METODOLOGIA -----	30
6. RESULTADOS -----	43
7. DISCUSSÃO -----	54
8. CONCLUSÃO -----	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	70
10. APÊNDICE -----	75
11. ANEXOS -----	79

1. Introdução

1.1 Antígenos eritrocitários

O maior objetivo na prática de medicina transfusional nas últimas décadas foi reduzir o risco de aloimunização nos processos de transfusão, principalmente em pacientes com transfusões frequentes, essa necessidade é diretamente proporcional à incidência de doenças hematológicas, distúrbios de coagulação, medula óssea e diferentes tipos de cânceres, sendo estes pacientes conhecidos por politransfundidos, devido à necessidade de receber diversas transfusões durante a vida, advindas derivadas de diferentes doadores. Com o aumento da necessidade dessas transfusões e a maior preocupação com a aloimunização e suas reações adversas, a área de Imunohematologia enfatizou-se no levantamento de dados das frequências genotípicas e fenotípicas dos doadores e pacientes em níveis regionais. (COZAC, 2009)

A descoberta dos antígenos eritrocitários foi considerada um dos avanços mais importantes nas pesquisas da área médica, na primeira metade do século XX. Borges et al. (2013) definiram que os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados por antígenos na membrana eritrocitária, com características funcionais e polimórficas definidas. Cada um desses antígenos possui uma ou várias funções biológicas, que podem ser: estrutural, transporte, estrutural e transporte, função de receptor/adesão, enzimática ou elementos do complemento. Em Girello e Kühn (2002) explica-se que os antígenos eritrocitários são estruturas genéticas e definidas por sequência de aminoácidos específicos ou por carboidratos ligados a essas proteínas ou lipídios, ou seja, cuja natureza pode ser protéica, glicoprotéica ou glicolipídica.

Até hoje, existem catalogados 346 antígenos eritrocitários, sendo que 308 estão agrupados em 36 diferentes sistemas e o restante em coleções ou séries de baixa e alta frequência (ISBT, 2016).

Os antígenos eritrocitários são clinicamente significantes na medicina transfusional, por serem altamente imunogênicos e pela possibilidade de causarem reações transfusionais, aloimunizações, anemias hemolíticas

autoimunes, doença hemolítica do feto e recém-nascido (DHFRN). De acordo com Lorenzi (2006), os antígenos eritrocitários que apresentam maior importância na medicina transfusional estão designados nos seguintes sistemas sanguíneos: Rh (D, C, c,E, e cw), Kell (K (Kell), k (celano), Kpa, Kpb), Duffy (Fya, Fyb), Kidd (Jka, Jkb), Lewis (Lea, Leb), P (P1), MNS (M,N,S,s), Lutheran (Lua, Lub) e Diego (Dia, Dib). A Figura 1 ilustra a membrana eritrocitária com os respectivos antígenos.

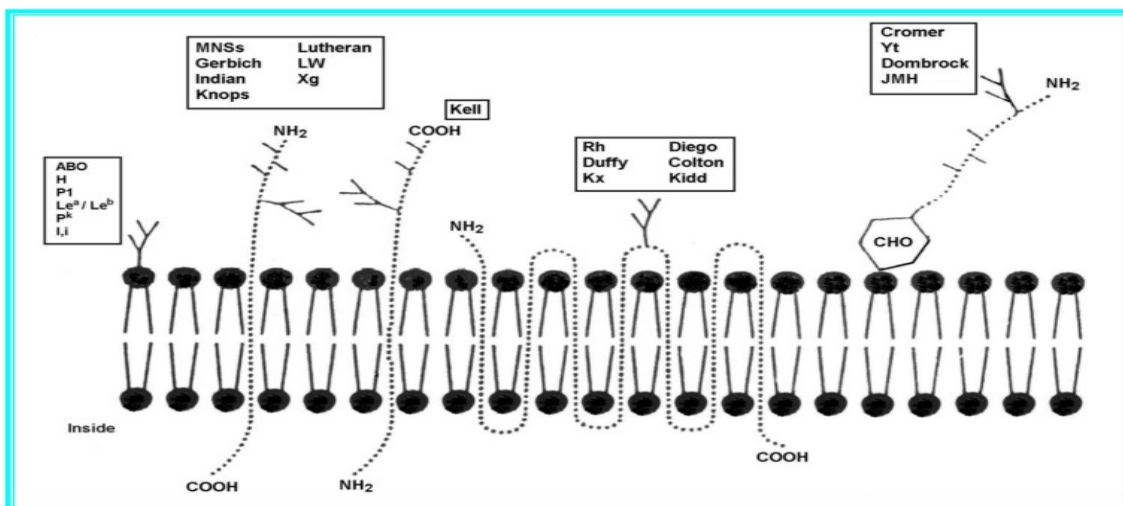


Figura 1. Ilustração esquemática de expressão dos antígenos eritrocitários.

Fonte: Oliveira M., Ribeiro F.C., Vizzoni A.G. Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia - Rio de Janeiro: EPSJV, 2013.

1.2 Aloimunização e Anticorpos irregulares

Quando um indivíduo é exposto a eritrócitos alogênicos, com fenótipo diferente, através de transfusões sanguíneas, gestações, transplantes de órgãos/tecidos ou enxerto, pode ocorrer a aloimunização, que consiste na resposta imune do organismo aos antígenos estranhos, através da produção de aloanticorpos contra epítomos específicos de cada antígeno. Além da exposição antigênica, a resposta imune depende também de outros fatores como a imunogenicidade do antígeno, a dose e via de administração dos mesmos, e da predisposição genética do próprio receptor. A probabilidade de ocorrer a aloimunização é diretamente proporcional ao poder sensibilizante do

antígeno e também à probabilidade de ser exposto ao mesmo, que por sua vez está diretamente relacionada à prevalência do antígeno na população. (NOVARETTI,2007)

Certos indivíduos, ao serem expostos a mínimos volumes de hemácias alogênicas são aloimunizados e são conhecidos como “respondedores”. Outros, no entanto, mesmo ao serem expostos sucessivamente a diversas transfusões, não desenvolvem anticorpos antieritrocitários e são denominados “não respondedores”. (HAMENNING, 2006)

Após a primeira exposição ao antígeno estranho, ocorre a resposta imune primária, com produção de anticorpos principalmente da classe IgM (Imunoglobulina M). Os anticorpos são detectados semanas ou meses após a transfusão, mas seus títulos podem baixar a níveis indetectáveis posteriormente. Ao ser exposto pela segunda vez ao antígeno estranho, o indivíduo desenvolverá a resposta imune secundária, com produção de anticorpos da classe IgG (Imunoglobulina G). O tempo para a resposta secundária varia de 48 a 72 horas, atingindo seu pico máximo de sete a 10 dias após a transfusão. Na resposta imune secundária, ou reação anamnésica, o título dos anticorpos aumenta rapidamente, pois os mesmos agora são produzidos por clones de células de memória (linfócitos B) desenvolvidos após a primeira exposição. Durante essa nova resposta imunológica, os aloanticorpos têm maior avidéz pelo antígeno, requerendo doses antigênicas bem menores para que sejam produzidos. A aloimunização eritrocitária secundária pode gerar complicações graves, como as reações transfusionais hemolíticas tardias. Essas reações transfusionais são a segunda causa mais frequente de morte relacionada à transfusão (GIRELLO, 2013).

Anticorpos formados contra antígenos de hemácias considerados de ocorrência natural, são encontrados no soro de indivíduos que nunca foram expostos a antígenos de hemácias por transfusão, vacina ou gestação. Esses anticorpos são aglutininas frias da classe IgM, reagem melhor à temperatura ambiente ou abaixo dela, não atravessam a barreira placentária, são capazes de ativar o sistema complemento, e quando ativas à 37°C podem ser

hemolíticas. Podemos citar como exemplo de anticorpos naturais, os anticorpos dos sistemas: ABO, Hh, li, Lewis, MN e P. (DUARTE et al., 2012)

Os anticorpos considerados imunes são aqueles encontrados no soro de indivíduos que já foram expostos a antígenos de hemácias, seja por transfusão, vacina ou gestação. Esses anticorpos são da classe IgG, reagem melhor a 37°C, necessitam de globulina anti-humana para a sua detecção e são capazes de atravessar a barreira placentária. (DUARTE et al., 2012)

Os anticorpos podem ainda serem classificados de acordo com o estímulo antigênico em: anticorpos regulares e irregulares. Os anticorpos regulares têm sua ocorrência esperada, como no caso dos anticorpos do sistema ABO. Já os anticorpos irregulares não têm sua ocorrência esperada, sendo formados apenas por aloimunização por transfusão incompatível ou gestação e são dirigidos contra qualquer epítipo dos 346 antígenos expressos na membrana dos eritrócitos. (GIRELLO. L.A., 2013).

1.3 Testes pré-transfusionais

O conjunto de exames realizados antes de uma transfusão é conhecido como testes pré-transfusionais. Todo candidato a receber transfusão deve ter uma amostra de seu sangue colhido para que seja testada a presença de antígenos e anticorpos presentes em suas hemácias e em seu soro/plasma, respectivamente. De acordo com a Portaria nº 158 de 04 de fevereiro de 2016 do Ministério da Saúde, são obrigatórias a realização da tipagem para o sistema ABO e RhD (antígeno D do sistema Rh), a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) e a prova cruzada.

A tipagem ABO/Rh é utilizada para determinação do grupo sanguíneo, através da tipagem direta, a qual pesquisa os antígenos ABO nas hemácias, e a tipagem reversa, a qual pesquisa o anticorpo correspondente presente no soro. A PAI é utilizada para identificação de anticorpos irregulares, através da utilização de hemácias comerciais testadas com o soro/plasma do indivíduo. Tais anticorpos podem estar presentes no soro devido a gestação incompatível ou transfusão de hemácias com fenótipo incompatível. A Prova Cruzada (PC), tem como princípio a pesquisa do anticorpo existente no soro do paciente

(receptor) em relação à presença ou não do antígeno na hemácia do doador (bolsa). É utilizada para verificar a compatibilidade entre doador e receptor. (BRASIL MS, 2016)

Após o desenvolvimento do soro de Coombs, atualmente conhecido como anti-globulina humana (AGH) em 1945 por Robin Coombs e colaboradores, muitos anticorpos incompletos (incapazes de aglutinar em salina) e até então não diagnosticados nos soros dos pacientes, passaram a ser reconhecidos. A partir da identificação de novos anticorpos, os seus respectivos antígenos também foram descritos. Portanto, o surgimento da antiglobulina humana foi um marco na imunohematologia, tornando possível o reconhecimento de novos anticorpos e antígenos eritrocitários, sendo até hoje técnica fundamental aplicada à rotina transfusional. (ISBT, 2016)

Seria inviável na rotina transfusional conhecer o perfil eritrocitário de todo candidato a receber transfusões. Além disso, nenhum outro antígeno tem a importância do sistema ABO e do antígeno D a ponto de tornar a sua tipagem obrigatória. No entanto, a pesquisa de anticorpos irregulares é obrigatória em todo indivíduo submetido a uma transfusão. Dessa forma, uma vez identificado o anticorpo no soro/plasma, a unidade transfundida deve ser negativa para o respectivo antígeno. (ISBT, 2016)

1.4 Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares

A detecção e a identificação dos anticorpos são as duas áreas mais interessantes em toda a imuno-hematologia. Na maioria das amostras de sangue testadas em um laboratório de imunohematologia é feita uma triagem de anticorpos no soro dos pacientes. Em geral, essa detecção de anticorpo compreende a triagem do soro do paciente testado contra duas ou três hemácias fenotipadas do grupo O de um reagente de avaliação. As hemácias reagentes também são referidas como painel de triagem ou seleção. Elas são sempre do grupo O (para que possíveis anticorpos anti-A e anti-B dos indivíduos a serem testados não interfiram na detecção dos anticorpos) e contêm os antígenos mais comumente encontrados e clinicamente importantes. As hemácias usadas na pesquisa devem expressar os seguintes antígenos: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P1, Lea, Leb, K, k, Fya, Fyb, Jka e Jkb. A necessidade de testar

outros antígenos dependerá da importância clínica e da frequência do antígeno/anticorpo na população. Um exemplo, é a inclusão recente de hemácias Diego a positivas pelos fabricantes nos kits comerciais de hemácias para triagem e identificação de anticorpos no Brasil. O antígeno, que em populações caucasianas é considerado de baixa frequência, está presente em até 54% da população de índios Kainganges (região Sul do Brasil) e o anticorpo Anti-Dia é descrito em 3,6% dos pacientes politransfundidos (Manual Técnico AABB) (OLIVEIRA M. et al, 2013). Essas células são encontradas por meio de teste de fabricação comercial. Um diagrama relacionando a constituição antigênica de cada célula de avaliação é fornecido com cada exemplar pelo fabricante. (Figura 2)

Sistemas	Rh					Kell		MNS				Kidd		Duffy		Lewis		P		Lutheran	
Células	D	C	E	c	e	K	k	M	N	S	s	Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	Lu ^a	Lu ^b	
I	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+
II	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+

■ Antígenos destruídos pelo tratamento com enzimas proteolíticas.

Figura 2 : Perfil antigênico das hemácias de triagem: diagrama para triagem de anticorpos

Fonte: Oliveira M., Ribeiro F.C., Vizzoni A.G. Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia - Rio de Janeiro: EPSJV, 2013.

Grande parte dos anticorpos irregulares de significância clínica, são da classe IgG. Ou seja, apesar de sensibilizarem a hemácia in vitro, são incapazes de provocar a aglutinação. Para que a aglutinação ocorra, é necessário revelar a reação usando a AGH. A AGH é um anticorpo dirigido contra a porção Fc de outro anticorpo IgG, que forma uma ponte entre essas estruturas e dá origem a uma malha que aproxima as hemácias sensibilizadas e leva à aglutinação. Por essa razão, a PAI deve sempre ser levada a fase de AGH (ou teste indireto da antiglobulina), caso contrário muitos anticorpos podem não ser detectados. (GIRELLO. L.A., 2013)

Havendo aglutinação com uma das hemácias da triagem, o anticorpo

deve ser identificado. O primeiro passo é a reação do plasma/soro com um conjunto maior de hemácias fenotipadas, conhecido como painel de hemácias, que vai auxiliar na identificação do anticorpo irregular (IAI) (Figura 3). O número de hemácias em cada painel varia de acordo com fabricante e pode conter de 10 a 30 suspensões de hemácias com diferentes fenótipos de indivíduos de grupo sanguíneo O. As hemácias do painel são incubadas com o soro/plasma do indivíduo, sendo também levada a fase de AGH.

Sistemas	Rh					Kell		MNS				Kidd		Duffy		Lewis		P	Lutheran	
	D	C	E	c	e	K	k	M	N	S	s	Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	Lu ^a	Lu ^b
1	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+
2	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+
3	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+
4	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+
5	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+
6	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	0	+
7	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+
8	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+
9	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+
10	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+
11	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+

■ Antígenos destruídos pelo tratamento com enzimas proteolíticas.

Figura 3. Perfil antigênico das hemácias de identificação de anticorpos:

Diagrama para identificação de anticorpos irregulares

Fonte: Oliveira M., Ribeiro F.C., Vizzoni A.G. Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia - Rio de Janeiro: EPSJV, 2013.

A avaliação e a interpretação dos resultados do painel devem ser realizadas utilizando-se diagrama elaborado da forma acima, procurando-se assegurar a identificação apropriada sem que as especificidades passem despercebidas ou possam estar encobertas por outros anticorpos. É fundamental a aplicação de um autocontrole, no qual as hemácias do indivíduo são testadas com seu próprio soro, avaliando a presença de auto-anticorpo (ou anticorpo sensibilizando hemácia recentemente transfundida). (OLIVEIRA M. et al, 2013)

Os anticorpos são excluídos quando há ausência de reatividade do soro do paciente com uma célula portadora do antígeno correspondente. Atenção especial deve ser dada às células heterozigotas, pois determinados anticorpos podem apresentar efeito de dose e não reagir com as hemácias teste. Sempre que possível, deve ser feita a fenotipagem do paciente; a ausência no paciente do antígeno correspondente ao anticorpo identificado demonstra que os resultados de identificação estão corretos.

1.5 Potencializadores

A sensibilidade dos testes para PAI e IAI pode ser melhorada por adição de substâncias ao meio que modificam a etapa de fixação dos anticorpos durante a incubação. Essas substâncias são denominadas de potencializadores de reação.

Os testes para PAI e IAI podem ser feitos sem adição de qualquer meio potencializador, mas essas substâncias agilizam a interação antígeno-anticorpo, promovendo uma diminuição do tempo de incubação e também fortalecendo reações fracas. São exemplos de potencializadores comumente utilizados em imunohematologia: substâncias macromoleculares como a albumina bovina, Dextran, Ficol e o polietilenoglicol (BIOPEG/PEG), que são moléculas que aumentam a constante dielétrica do meio, favorecendo a aglutinação; soluções de baixa força iônica denominadas de LISS, que agem diminuindo a força iônica do meio, aumentando a acessibilidade do anticorpo à membrana eritrocitária; e as enzimas proteolíticas, que podem promover que alguns anticorpos têm suas reatividades aumentadas pelo tratamento enzimático das hemácias-teste. (TAKESHITA A. et al., 2014; ZAMAN et al., 2014)

As enzimas proteolíticas apresentam a capacidade de retirar da superfície da hemácia fragmentos polipeptídicos de sialoglicoprotéínas membranares, diminuindo o potencial dielétrico do meio e aumenta a afinidade do anticorpo para com seu antígeno correspondente, por uma reestruturação na distribuição dos antígenos eritrocitários. As enzimas proteolíticas mais utilizadas em testes sorológicos são: bromelina, papaína, ficina e tripsina. (TAKESHITA A. et al., 2014; ZAMAN et al., 2014)

São especialmente indicadas como método acessório de identificação em casos de mistura de anticorpos, ou mesmo em caso de anticorpos importante clinicamente, mas em baixos títulos, e que podem ter sua afinidade aumentada pela utilização de hemácias tratadas por enzimas. O auxílio à identificação da especificidade de anticorpos está relacionado à suas ações diferentes sobre determinados antígenos eritrocitários. Hemácias tratadas com enzimas terão os antígenos M, N, S, s, Fy^a, Fy^b, Xg^a, JMH, Ch e Rg enfraquecidos/destruídos e reagirão mais fracamente ou não reagirão com os anticorpos do soro testado. Por outro lado, os antígenos dos sistemas Rh, Kell, P, I, Kidd e Lewis não são destruídos e reagem mais fortemente com seus anticorpos. É importante ressaltar que cada tipo de enzima pode ter ações diferentes sobre diferentes antígenos. (GIRELLO. L.A., 2013)

Como desvantagem, podemos citar a exacerbação da reatividade de anticorpos sem importância clínica pela exposição de determinantes antigênicos residuais. Pode haver também interferência na técnica por autoanticorpos frios\quentes e rouleaux.(GIRELLO. L.A., 2013)

1.6 Hospital do Câncer III e sua rotina transfusional

No estado do Rio de Janeiro, o Hospital do Câncer III (HCIII) desempenha um importante papel na prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer de mama, além de participar ativamente dos programas de pesquisa e treinamento desenvolvidos no Instituto Nacional do Câncer (INCA).

O câncer de mama é a patologia oncológica que mais afeta as mulheres. Cerca de 1,4 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano no mundo . Sua incidência é quatro vezes maior em países desenvolvidos que em países subdesenvolvidos. No entanto, em muitos países de baixa e média renda, a incidência está aumentando em um ritmo mais rápido que em países desenvolvidos. Estima-se o diagnóstico de 580mil casos novos de câncer no Brasil no ano de 2016 e contribuindo para esse número, são previstos 57mil casos de Câncer de mama. (INCA, 2016).

O HCIII conta em sua estrutura com uma agência transfusional (AT) que garante o suporte hemoterápico às pacientes com câncer de mama.

Anualmente, a AT atende a aproximadamente mil e quatrocentas reservas cirúrgicas e realiza, em média, oitocentas transfusões. Os testes pré-transfusionais realizados no Instituto obedecem às orientações determinadas pela Portaria nº 158 de 04 de fevereiro de 2016 em relação aos procedimentos obrigatórios (tipagem ABO\RhD, PAI e PC). A partir do momento que se é detectado um P.A.I positivo, a amostra é direcionada ao HCI para ser feita a identificação da especificidade do anticorpo irregular. A transfusão fenótipo compatível está resguardada a partir do momento que houver histórico ou identificação de anticorpo irregular, não apresentando rotina de fenotipagem eritrocitária de doadores e pacientes no HCIII. Como o perfil de comportamento de anticorpos irregulares ainda não é bem conhecido nesse grupo de paciente, a proposta deste projeto é estudar o impacto do uso de hemácias tratadas com enzima na triagem de anticorpos irregulares de pacientes com neoplasia maligna da mama atendidos no HCIII do INCA e avaliar o perfil de aloimunização desta população.

2. Justificativa

A aloimunização contra antígenos eritrocitários é um problema cada vez mais comum em pacientes submetidos à transfusão, até mesmo naqueles pacientes transfundidos de forma esporádica, como nos casos de pacientes com câncer de mama. O índice de aloimunização nas diferentes populações de pacientes é alvo cada vez maior de estudos uma vez que, com o envelhecimento da população e a maior incidência de doenças degenerativas, muitos indivíduos aloimunizados ainda serão transfundidos no futuro. (DUARTE,2012; SANTOS, 2005).

Sabendo-se que os anticorpos irregulares ocorrem em aproximadamente 0,3 a 2% da população geral, a triagem e identificação dos anticorpos são indispensáveis para adequada seleção de sangue para transfusão. As informações relativas à idade, sexo, raça, história clínica, transfusional e gestacional podem oferecer pistas para os estudos de identificação destes anticorpos. (HAMENNING,2006; GIRELLO., 2007). A chance de encontrar anticorpo irregular no soro de receptores aumenta, principalmente no sexo feminino devido a chance de exposição prévia à gestação, fator ausente no sexo masculino. Estudo retrospectivo realizado por Costa R.N. (2013) em pacientes do sexo feminino com câncer de mama no Hospital do Câncer III, foram identificados anticorpos irregulares em 1,25% das 2396 pacientes avaliadas. Outro estudo realizado na mesma instituição, envolvendo pacientes do sexo feminino com câncer ginecológico (exceto câncer de mama), a prevalência de anticorpos irregulares variou de 5,15% para 6,5%, dentro de um período de 4 anos (Bittencout L.P., 2012).

A detecção de anticorpos irregulares deve ser realizada com técnica sensível, capaz de detectar os anticorpos de maior relevância clínica. A falha na detecção de um anticorpo de importância clínica pode levar a reação transfusional hemolítica aguda ou tardia com intensidades que podem variar de leve a grave e prejudicar ainda mais a condição clínica do receptor. Muitos anticorpos irregulares desaparecem com o passar do tempo (42% desaparecem ao longo de 5 anos) e podem reaparecer após um novo estímulo antigênico. (HAMENNING, 2006). Tal comportamento é constatado por Alves et

al. (2012) em estudo com pacientes atendidos na emergência que tiveram os títulos de seus anticorpos contra antígenos do sistema Rh e Kell acompanhados até a negatização na triagem em Liss/AGH após 15 meses. Além dos títulos baixos, a presença de autoanticorpo também pode mascarar a presença de aloanticorpo de importância clínica.

Pelo fato de destruir alguns sistemas, a técnica em enzima sempre será realizada em paralelo com a técnica em AGH. Na maioria dos serviços, a técnica enzimática é utilizada somente na etapa de IAI, não sendo utilizada como rotina de triagem.

O HCIII atende principalmente a população feminina, sendo de grande interesse o uso de técnicas de triagem capazes de potencializar a identificação de anticorpos de significância clínica. Atualmente a técnica aplicada à PAI na AT-HCIII é a incubação a 37°C, sendo levado a fase de AGH com leitura de reação por gel centrifugação. Com a técnica atual de triagem a frequência de anticorpos irregulares é de 1,25%, do total de 2396 pacientes avaliadas no período entre 2011 a 2013. Entre os anticorpos encontrados 61% são do sistema Rh, 8 % do sistema Kell, 5,5% do sistema Lewis, 5,5% do sistema Diego e 2,8% do sistema Kidd. Estes resultados demonstram que aproximadamente 83% dos anticorpos irregulares identificados neste grupo de pacientes, podem apresentar aumento de reatividade em meio enzimático (Costa.R.N.,2013). Considerando a predominância nessa população de anticorpos que intensificam em enzima, além de tratar-se de um grupo com maior probabilidade de exposição prévia a antígenos eritrocitários (gestação), o presente estudo visa analisar o impacto da implementação de técnica em enzimática na PAI, em adição à técnica atual .

3. HIPÓTESE

A hipótese levantada para o presente estudo é:

1. A utilização da técnica enzimática em associação à técnica de Liss/AGH elevará a sensibilidade da pesquisa de anticorpos irregulares realizada nos pacientes com câncer de mama do HcIII.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto da utilização da técnica de hemácias tratadas com enzima na sensibilidade da pesquisa de anticorpos irregulares em pacientes com neoplasia maligna de mama no HCIII

4.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a frequência de anticorpos irregulares encontrados na PAI realizada com a técnica de Liss/AGH a 37°C.
2. Avaliar a frequência de anticorpos irregulares encontrados na PAI realizada com a técnica enzimática a 37°C.
3. Comparar as duas técnicas, Liss/AGH e enzima, e avaliar a capacidade de detecção de anticorpos irregulares quando ambas são aplicadas em conjunto
4. Descrever o perfil de aloimunização encontrado entre os pacientes com câncer de mama do HCIII

5. Metodologia

5.1. Comitê de Ética em Pesquisa

O trabalho foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Instituto Nacional do Câncer (CAAE:41619415.9.0000.5440)

5.2. Material

Trata-se de um estudo experimental, comparativo, aberto, e prospectivo, com premissas vinculadas à aloimunização eritrocitária, sendo sua análise aplicada em período datado de um ano (junho/ 2015 a maio/2016).

O estudo foi desenvolvido na agência transfusional do hospital do Câncer III, unidade hospitalar do INCA, localizado no município do Rio de Janeiro – RJ. O HCIII, localizado na zona norte do Município do Rio de Janeiro, presta assistência médico-hospitalar gratuita pelo Sistema único de saúde (SUS); e conta com 52 leitos ativos destinados exclusivamente ao diagnóstico e tratamento do câncer de mama. O HCIII foi escolhido por se tratar da Unidade do SUS que atende maior número de pacientes com neoplasia mamária-no Município.

Os participantes deste estudo foram os pacientes atendidos pela AT-HCIII que apresentaram como diagnóstico de base o câncer de mama. O critério de inclusão para participação no estudo foi as pacientes do sexo feminino desta Instituição, atendidas pelos setores de Quimioterapia, Oncologia Clínica, Mastologia e Centro Cirúrgico. Como critério de exclusão, os pacientes do sexo masculino, as pacientes do sexo feminino que não dessem continuidade ao tratamento na instituição e quando houvesse relato ou suspeita de uso da imunoprofilaxia por Anti-D.

Para este estudo foi realizado o cálculo amostral com margem de erro de 10%, obtendo-se uma numeração absoluta para tamanho da população estatística pelo somatório da média anual de transfusões e reservas cirúrgicas ($800 + 1400 = 2200$), respectivamente, e foi estimado em 400 indivíduos o tamanho mínimo da amostra, tendo como base a teoria amostral de Cochran(1977).

O material escolhido para análise foi amostras de sangue periférico das pacientes selecionadas. A coleta foi realizada pelo técnico do serviço de hemoterapia da AT-HCIII ou pelo enfermeiro da unidade em que a paciente estava internada. Foram utilizadas seringas e agulhas estéreis e descartáveis ou tubos com vácuo adaptados a agulhas estéreis. As amostras de sangue periférico foram obtidas por punção venosa principalmente da mediana cubital, mediana cefálica ou veia longitudinal, em 2 tubos de 5 mL contendo ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA).

5.3. Processamento das amostras

Todas as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos na AT-HCIII.

Foram utilizadas para testagem amostras de até 72 horas de coleta. As amostras poderiam ser armazenadas em geladeira 2 – 6°C. Após esse período, a amostra de sangue total pôde ser alíquotada em 2 tubos de hemólise, separando o concentrado de hemácias em suspensão em salina fisiológica 0,9% NaCl sendo acondicionado em geladeira 2-6°C e em outro tubo o congelamento do plasma em freezer em temperatura igual ou inferior a -20°C.

Não foram utilizadas para testagem amostras que ultrapassassem o tempo total de 7 dias de coleta, tal como amostras coaguladas, hemolisadas e lipêmicas.

O descarte de sangue total, componentes e resíduos de laboratório foi feita de acordo o disposto no Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS), sendo respeitadas as demais normas técnico-sanitárias pertinentes editadas pela ANVISA e outros órgãos reguladores. (MS-BRASIL,2014)

5.4. Pesquisa de anticorpo irregular – AT-HCIII

Após a centrifugação do sangue total; as hemácias foram utilizadas para o autocontrole e o soro obtido para fazer o autocontrole e a triagem de rotina da PAI, a partir da técnica de gel centrifugação com cartão Liss/AGH e suspensão de hemácias de triagem I-II-III.

Todas as amostras que apresentassem PAI positiva em técnica de Liss\AGH e/ou enzima seguiram o protocolo atual da Instituição, sendo transportadas ao laboratório de Imunohematologia (LI) do Hospital do Câncer – I (HCI) para ser realizada a identificação de especificidade do anticorpo irregular. (Fluxograma 1). Esta liberação foi realizada vide aprovação da responsável técnica da AT-HCIII.

5.5 Transporte das amostras

As amostras da AT-HCIII ao LI no HCl foram transportadas, sob temperaturas adequadas de armazenamento, em caixa térmica equipada com termômetro e mapa de registro de temperatura com horário de saída e chegada da amostra. Foi feita inspeção do aspecto de cada unidade no momento do envio e chegada. Caso houvesse identificação de não conformidade, a amostra envolvida foi descartada.

O transporte foi realizado por meios próprios do responsável pelo projeto, utilizando caixas térmicas contendo gelo reciclável em quantidade apropriada para cada tipo de alíquota transportada.

As caixas térmicas que transportaram as alíquotas de hemácias em suspensão de NaCl 0,9% deveriam apresentar temperatura interna de 1 a 10°C com a presença de 1,5 Kg de gelo (duas barras) com isolamento do gelo reciclável da amostra. As alíquotas congeladas de plasma deveriam ser transportadas de maneira que mantivesse o congelamento, a temperaturas de 1 a 10°C com a presença de 3 Kg de gelo (4 barras), distribuídos por cima e por baixo das amostras, mas não em contato com as mesmas.

5.6. Testes Imunohematológicos. LI – HCl

A técnica enzimática foi realizada para complementação da investigação do anticorpo irregular, a partir do uso de 3 hemácias tratadas em enzima (papaína).em amostras pré-transfusionais com requisições já atendidas, ou seja, após liberação de bolsas compatibilizadas na fase de AGH e da preparação finalizada de reservas cirúrgicas. A conduta transfusional não dependeu do resultado da pesquisa de anticorpos na técnica enzimática, o que não causou qualquer tipo de modificação na rotina transfusional durante a execução do projeto.

As alíquotas de soro\plasma foram descongeladas em banho-maria, em temperatura de 37°C durante 15 minutos. Este soro\plasma foi utilizado na incubação de abertura de painéis de hemácias não papainizadas em cartão-gel Liss\AGH e de hemácias papainizadas em cartão-gel NaCl\Neutro, de acordo com o resultado obtido na triagem inicial.

As amostras que apresentaram pesquisa de anticorpos irregulares positiva unicamente em enzima 37°C com posterior abertura de painel de hemácias enzimático com resultado inconclusivo em gel, ou seja, onde não foi possível determinar a especificidade do anticorpo, foi realizada P.A.I. a 37°C com suspensão de hemácias papainizadas I-II-III por metodologia em tubo. Se o resultado apresentar-se positivo será feita abertura de painel de hemácias papainizado em tubo.

Caso o resultado fosse negativo, foi realizada pesquisa de roulex com leitura em microscópio em 40x e P.A.I. a 4°C com suspensão de hemácias de triagem I-II-III em cartão NaCl neutro, em busca de aglutininas frias ou autoaglutininas frias que possam estar interferindo na metodologia enzimática em gel.

Caso houvesse positividade, foi realizada abertura de painel de hemácias a 4°C incubando-se o soro da paciente com painel de hemácias não-papainizadas em gel NaCl neutro em geladeira por 30 minutos.

As amostras de hemácias em suspensão de NaCl 0,9% dos pacientes foram utilizadas na fenotipagem eritrocitária pela técnica de gel-teste utilizando cartões contendo reagentes monoclonais ou policlonais para confirmação da especificidade do anticorpo identificado.

5.7. Biossegurança

Todo material biológico foi considerado de risco e manuseado com cuidado. As organizações regulamentadoras como os Centros para Controle de Doenças (CDC) e a Agência Credenciadora Nacional Para Ciência Clínica Laboratorial (NAACLS) rotineiramente publicam padrões para o manuseio de material de risco. Cada laboratório foi responsável por manter-se atualizado com respeito às diretrizes estabelecidas. (MS- BRASIL, 2014)

O serviço de hemoterapia dos HCI e HCIII disponibilizaram os equipamentos de proteção individual e coletiva necessários para a segurança dos profissionais envolvidos no projeto.

5.8. Instrumento

5.8.1. Coleta e análise de dados

Aquelas pacientes que após avaliação de triagem se enquadraram com resultados positivos no PAI, foram convidadas a participar do presente estudo a partir de abordagem ambulatorial, sendo feita pessoalmente pelo responsável pelo projeto, após atendimento de consulta marcada e prevista em ferramenta digital da INTRANET. Foi realizada, então, uma entrevista formal em sala privativa da AT do HCIII com acompanhamento do responsável pelo projeto.

Em caso de aceitação, todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A), mantendo-se em 3 vias: o original no prontuário, uma cópia para arquivo da pesquisa e uma cópia para a paciente participante. Caso o sujeito não estivesse em condições de ser esclarecido e assinar o termo, isso foi feito por algum parente ou responsável pelo mesmo, autorizando a realização do procedimento.

Na entrevista, foi realizado o preenchimento do questionário (Apêndice B) para fins de pesquisa e cadastramento da paciente no projeto. As respostas do questionário foram obtidas de acordo com informações coletadas com a paciente e pelo uso dos mapas de trabalho da AT e ferramentas digitais como: Hemote Plus, Connect e Matrix Diagnosis da Instituição.

O histórico obstétrico foi representado pelas seguintes variáveis: número de gestações anteriores, número de abortos anteriores, se a paciente tem conhecimento do seu grupo sanguíneo e período de menarca e menopausa, se recebeu imunoglobulina anti-Rh(D) nos últimos 3 meses. As variáveis número de gestações e abortos serão categorizadas em uma, duas, três ou mais.

O histórico transfusional foi representado pelas seguintes variáveis: número de transfusões externas e internas e seus respectivos hemocomponentes envolvidos. As variáveis número de transfusões externas e internas serão categorizadas em uma, duas, três ou mais.

Foi necessário uso dos prontuários físicos para complementação da coleta de dados, este feito a partir de autorização prévia do responsável pelo arquivo médico do HCIII e aprovação do projeto pelo Núcleo de apoio à Pesquisa – Nape - INCA.

A análise estatística foi realizada por meio do programa Bioestat (versão 5.0, 2015). As variáveis ordinais e nominais referentes ao objetivo específico 4 foram comparadas pelo teste do qui-quadrado de Pearson (χ^2) ou teste G,

quando indicado. Um modelo de regressão logística foi elaborado, visando a identificar as variáveis associadas de maneira independente ao desfecho estudado. Nesse modelo, foram incluídas somente as variáveis cujo valor de p foi menor que 0,1 na análise univariada. Para efeito de interpretação, o limite de erro tipo I foi de 10% ($p \leq 0,1$). Para os objetivos específicos 1 e 2, foram demonstrados pela frequência relativa dos dados obtidos em cálculo percentual. Os resultados, posteriormente, foram comparados aos relatos da literatura.

Foi mantida a confidencialidade de todos os dados extraídos.

O modelo laboratorial de acompanhamento de testes realizados está conforme no apêndice C.

5.9. Procedimento

As atividades realizadas estão de acordo com os procedimentos operacionais a seguir:

5.9.1 Preparação das amostras de sangue

a) Suspensão de hemácias para auto-controle (AC)

Preparar a suspensão de hemácias a 0,8% em LISS com a seguinte técnica:

1. Colocar em um tubo de hemólise suspensão de 1,0 ml de LISS.
2. Adicionar 10- 12,5 uL de concentrado de hemácias do paciente.
3. Homogeneizar.

5.9.2 Técnicas empregadas

a) Auto-controle (AC) – Metodologia em Gel

1. Identificar os microtubos do Cartão “Liss\AGH” com o nome ou número do paciente.
2. Retirar o lacre de alumínio dos microtubos a serem utilizados, mantendo o Cartão na posição vertical.
3. Pipetar 50 uL da suspensão de hemácias nos microtubos correspondentes.

4. Pipetar 25 uL do soro ou plasma do paciente nos microtubos correspondentes.
 5. Incubar o Cartão por 15 minutos à 37 graus Celsius em incubadora.
 6. Centrifugar o Cartão durante 10 minutos a 1000 rpm em centrífuga.
 7. Ler e anotar os resultados
- b) Pesquisa de anticorpos irregulares – Metodologia em Gel
1. Identificar o Cartão “Liss\AGH”\ “Neutro” com o nome ou número do paciente.
 2. Retirar o lacre de alumínio dos microtubos a serem utilizados, mantendo o Cartão em posição vertical.
 3. Pipetar 50 uL de cada hemácia teste nos microtubos correspondentes (identificados com os correspondentes números das hemácias).
 4. Adicionar 25 uL de soro ou plasma do paciente em cada microtubo.
 5. Incubar o Cartão por 15 minutos à 37 graus Celsius em incubadora.
 6. Centrifugar o Cartão durante 10 minutos a 1000 rpm em centrífuga.
 7. Ler e anotar os resultados das reações.



Figura 4 – Exemplo de suspensão de Hemácias I - II - III não papainizadas (à esquerda) / suspensão de hemácias IP- IIP- IIIP papainizadas (à direita)

Fonte: Hospital do Câncer III

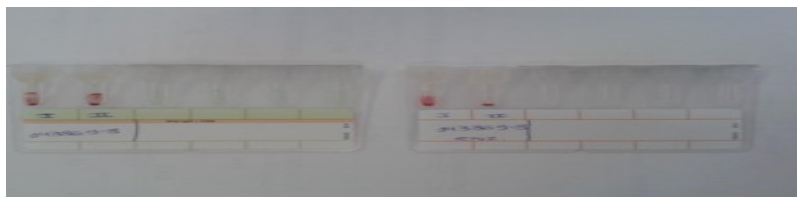


Figura 5. PAI na técnica em cartão-gel LISS/AGH e enzimático (Cartão “Liss\AGH” contendo reagente poliespecífico AGH (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal e cartão-gel neutro contendo NaCl a 0,9%)

Fonte: Hospital do Câncer I

- c) Pesquisa de anticorpos irregulares – Metodologia em tubo
1. Identificar 2 tubos I e II.
 2. Adicione 2 (100 uL) gotas do plasma/ soro a ser testado em cada tubo.
 3. Adicione uma gota de cada reativo ao tubo correspondente (suspensão I e II).
 4. Incube os tubos a 4°C na geladeira durante 30 minutos.
 5. Centrifugue os tubos por 15 segundos em 3400 rpm.
 6. Ressuspenda suavemente o botão de hemácias formado para leitura macroscópica.



Figura 6. Exemplo de suspensão de hemácias I – II para técnica em tubo

Fonte: Hospital do Câncer III

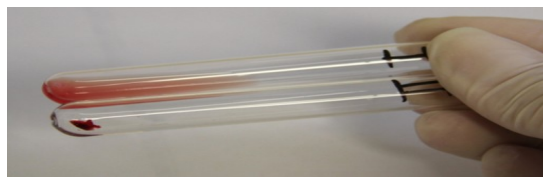


Figura 7. PAI na técnica em tubo

Fonte: Hospital do Câncer III

- d) Identificação de anticorpos irregulares – Metodologia em Gel
1. Identificar 2 Cartões “Liss\AGH” / “Neutro” com o nome ou número do paciente.
 2. Retirar o laque do alumínio dos microtubos a serem utilizados, mantendo o Cartão na posição vertical.
 3. Pipetar 50 uL de cada hemácia teste do Painel nos microtubos correspondentes numerados de 1 a 11.
 4. Adicionar 25 uL de soro ou plasma do paciente nos 11 microtubos.
 5. Incubar o Cartão por 15 minutos à 37 graus Celsius em incubadora.
 6. Centrifugar o Cartão durante 10 minutos a 1000 rpm em centrífuga.
 7. Ler e anotar os resultados das reações.



Figura 8 – Exemplo de painel de Hemácias não papainizado (à esquerda) / painel de hemácias papainizado (à direita)

Fonte: Hospital do Câncer I

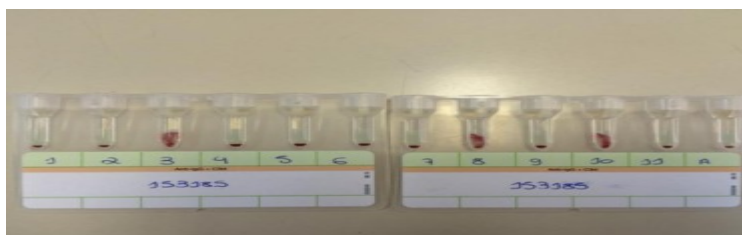


Figura 9. IAI na técnica de cartão – gel centrifugação em LISS\AGH

Fonte: Hospital do Câncer I

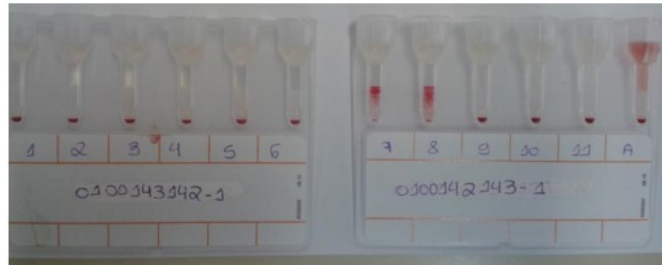


Figura 10. IAI na técnica em gel – centrifugação em meio enzimático

Fonte: Hospital do Câncer 1

- e) Identificação de anticorpos irregulares – Metodologia em tubo
1. Identificar 11 tubos de 1 a 11.
 2. Adicione 2 (100 uL) gotas do plasma/ soro a ser testado em cada tubo.
 3. Adicione uma gota de cada reagente ao tubo correspondente (suspensão 1 a 11 respectivamente).
 4. Adicione 2 gotas de Biopeg em cada tubo e homogeneizar bem.
 5. Incube os tubos a 37°C durante 15 minutos.
 6. Lavar o conteúdo dos tubos 1 a 11 com solução salina de 3 a 4 vezes.
 7. Centrifugue os tubos por 1 minuto em 3400 rpm.
 8. Desprezar o sobrenadante secando a borda dos tubos em papel absorvente.
 9. Adicionar 2 gotas de soro de Coombs a cada tubo. Homogeneizar bem.
 10. Ressuspenda suavemente o botão de hemácias formado para leitura macroscópica.
 11. Pingar as hemácias reagentes de Controle de Coombs em todas as reações negativas e centrifugar. A leitura deverá ser positiva para validar o teste.



Figura 11. Painel de Hemácias – utilizado na IAI de metodologia em tubo

Fonte: Hospital do Câncer I

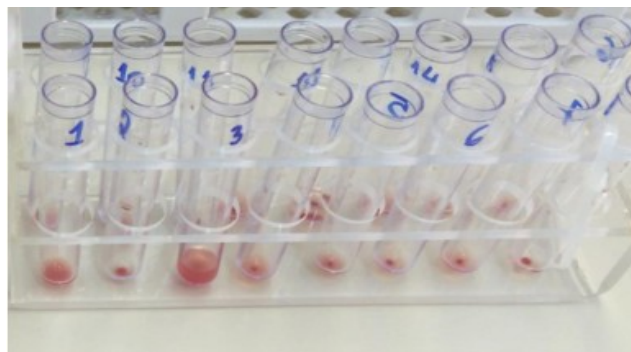


Figura 12. Técnica de IAI em tubo

- f) Pesquisa de rouleaux
1. Identificar tubo unitário R (rouleaux).
 2. Adicionar no tubo 50 uL de concentrado de hemácias e 50 uL de soro/plasma do paciente e homogeneizar bem.
 3. Em uma lâmina de vidro, pingue 50 uL da suspensão preparada.
 4. Arraste com outra lâmina de vidro uma sobre a outra, de extremidade a outra para realizar um esfregaço.
 5. Leve ao microscópio e faça leitura sobre 40X de ampliação.

5.10 Interpretação dos resultados

5.10.1 Princípio

Positivo: Células aglutinadas formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel.

Negativo: Botão compacto de células no fundo do microtubo.

5.10.2. Pesquisa de anticorpos irregulares e autocontrole

- Uma reação negativa indica ausência de anticorpos irregulares detectáveis no soro ou plasma do paciente
- Uma reação positiva indica presença de anticorpos irregulares.
- De acordo com o padrão da reação e a configuração antigênica, o anticorpo presente pode ser indicado.
- Reações positivas com uma ou mais hemácias-teste e um autocontrole negativo indicam presença de um anticorpo específico.
- Reação positiva com todas as hemácias teste e um autocontrole positivo podem ser devido a auto-anticorpo ou a reações inespecíficas.
- Em caso de reação positiva com todas as hemácias-teste e autocontrole positivo, mas com uma ou mais das hemácias-teste com reação positiva mais forte do que o autocontrole, a amostra do paciente deve ser submetida a outros testes, para investigar a possibilidade de presença concomitante de aloanticorpo.

5.10.3. Identificação de anticorpos irregulares

- Uma reação positiva indica presença de anticorpos irregulares.
- De acordo com o padrão de reação e a configuração antigênica, o anticorpo presente pode, na maioria dos casos, ser identificado (o autocontrole deve ser negativo).

- Reações positivas com todas as hemácias-teste do painel e um autocontrole negativo, pode ser devido a reações inespecíficas ou pode indicar presença de um aloanticorpo contra antígeno de alta frequência.
- Reações positivas com todas as hemácias-teste do painel e um autocontrole positivo, pode ser devido a auto-anticorpos ou a reações inespecíficas.
- Reação positiva com todas as hemácias-teste do painel e um autocontrole positivo, mas com uma ou mais hemácias-teste com reação positiva mais forte do que o autocontrole, pode indicar presença concomitante de um aloanticorpo.

6. Resultados

No período de junho de 2015 a maio de 2016 foram obtidas amostras sanguíneas de 429 pacientes portadores de câncer de mama, atendidos pela agência transfusional do HCIII pertencente ao INCA. As amostras foram provenientes de exames imunohematológicos pré-transfusionais, sendo 112 solicitações transfusionais e 317 reservas cirúrgicas. Do total, 8 (1,86%) apresentaram Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) positiva em técnica de Liss\AGH na rotina.

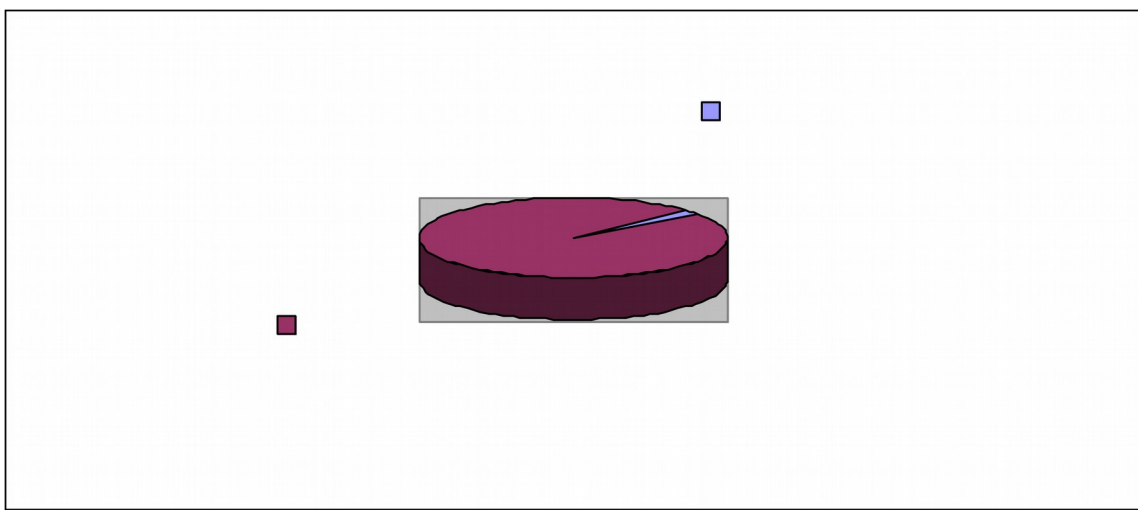


Figura 13 - Distribuição de 429 pacientes atendidos na AT - HCIII, segundo o resultado da PAI em LISS/AGH; Rio de Janeiro, 2015 a 2016.

Fonte: Hospital do Câncer III-RJ.

A identificação da especificidade dos anticorpos irregulares em Liss/AGH possibilitou a determinação de um total de 10 aloanticorpos, sendo o Anti-D o mais predominante em 4 amostras (40%), seguido por 2 Anti-E (20%), 1 Anti-C (10%), 1 Anti-lea (10%), 1 Anti-Jka (10%) e 1 Anti-S (10%). De acordo com o protocolo da Instituição, a partir de positividade em Liss/AGH, a técnica enzimática deverá ser aplicada, demonstrando que 7 (87,5%) das 8 amostras foram positivas em ambos os métodos. A triagem enzimática possibilitou a identificação de mais 2 aloanticorpos: um de especificidade Anti-D e ou outro de Anti-C. A rotina institucional apresentou um resultado final de 12 aloanticorpos identificados, distribuídos em: 2 Anti-D ((25%), 2 Anti-D+C (25%), 1 Anti-D+E (12,5%), 1 Anti-E +Jka (12,5%), 1 Anti-S (12,5%) e 1 Anti-Lea (12,5%). Dentre os aloimunizados, 2 (25%) apresentaram aloanticorpos isolados e seis (75%) desenvolveram mais de um aloanticorpo.

Todas as 421 amostras que apresentaram resultado negativo para triagem de P.A.I em Liss/AGH, foram submetidas a testagem complementar com hemácias papainizadas, apresentando uma incidência de positividade em 32 (7,6%) amostras.

Tabela 1: distribuição dos 429 pacientes de acordo com a aplicação dos testes de triagem em Liss/Coombs e Nacl/enzima. Rio de Janeiro, 2015 a 2016.

LISS/AGH	NACL/ ENZIMA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	8	0	8
Negativo	32	389	421
Total	40	389	429

Fonte: Hospital do Câncer III-RJ.

A identificação de especificidade de anticorpos irregulares pela técnica enzimática de terminou ao todo 37 anticorpos, sendo o Anti-E o mais predominante em 13 amostras (35%), seguido por 9 (24%) autoanticorpos públicos quentes, 7 Anti-Lea (19%), 4 Anti-D (11%), 1 Anti-C (2,75%), 1 Anti-Cw (2,75%), 1 Anti-K (2,75%) e 1 Anti-Dia (2,75%).

Tabela 2: Distribuição do percentual e especificidade de aloanticorpos eritrocitários, segundo a rotinal institucional, técnica enzimática e associação dos resultados das técnicas da rotina e enzima. Rio de Janeiro, 2015 a 2016.

ALONTCORPOS	Rotina INCA	Nacl/Enzima	Associação
Anti-D	5 (41,6%)	4 (11%)	9 (18,7%)
ANTI-E	2 (16,6%)	13 (35%)	15 (31,2%)
ANTI-C	2 (16,6%)	1 (2,75%)	3 (6,2%)
ANTI-cw	0 (0,0%)	1 (2,75%)	1 (2,12%)
ANTI-K	0 (0,0%)	1 (2,75%)	1 (2,12%)
ANTI-lea	1 (8,4%)	7 (19%)	7 (14,6%)
Anti-Jka	1 (8,4%)	0 (0,0%)	1 (2,12%)
Anti-Dia	0 (0,0%)	1 (2,75%)	1 (2,12%)
Anti-S	1 (8,4%)	0 (0,0%)	1 (2,12%)
Autoanticorpo	0 (0,0%)	9 (24,3%)	9 (18,7%)
TOTAL	12 (100%)	37 (100%)	48 (100%)

. Fonte: Hospital do Câncer III-RJ

Os 9 exemplares que apresentaram autoanticorpos foram distribuídos de acordo sua especificidade em: 2 Autoanti-e e 7 autopúblicos quentes. Após técnica de

adsorção com hemácias compatíveis aos fenótipos dos pacientes foi, verificado a identificação de 2 aloanticorpos mascarados: 1 Anti-K e 1 Anti-C.

Tabela 3: Distribuição dos 9 exemplares de autoanticorpos de acordo com a sua especificidade; e ausência ou presença de aloanticorpos. Rio de Janeiro, 2015 a 2016.

AUTOANTICORPOS	COM	SEM	TOTAL
	ALOANTICORPOS	ALOANTICORPOS	
COM	01	01	02 (22,3%)
ESPECIFICIDADE	(Auto anti-e + aloanti-C)	(autoanti-e)	
SEM	01	06	07 (77,7%)
ESPECIFICIDADE	(autopúblico quente + aloanti-K)	(autopúblico quente)	
TOTAL	02 (100%)	07 (100%)	09 (100%)

Fonte: Hospital do Câncer III-RJ

Os 429 pacientes estudados (40 aloimunizados e 389 não aloimunizados) foram analisados agrupadamente quanto à faixa etária e cor da pele; ao tipo sanguíneo (classificação ABO e RhD); ao histórico transfusional e número de transfusões; ao histórico gestacional, número de gestações ; ao tempo entre a identificação do anticorpo e a última gestação e o aparecimento do anticorpo irregular no método de Liss/AGH, inicialmente identificado em método NaCl/enzima

6.1. FAIXA ETÁRIA E COR DA PELE DOS PACIENTES

Analisando a faixa etária dos pacientes estudados, 147 (34,2%) tinham entre 18 e 49 anos, 216 (50,3%) entre 50 a 69 anos e 66 (15,5%) tinham idade igual ou superior a 70 anos. Dentre os aloimunizados, 23 (57,5%) tinham entre 50 a 69 anos e 193 (49,6%) dos não aloimunizados apresentaram-se na mesma faixa etária. Apesar da maior concentração dos aloimunizados e não aloimunizados na faixa etária intermediária (50 a 69 anos), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste Qui-quadrado; $p = 0.4314$)

Quanto à cor da pele das pacientes avaliadas, 192 (44,7%) eram da cor branca, 150 (34,9%) da cor parda, 81 (18,8%) da cor negra e 6 (1,6%) da cor amarela. Dos aloimunizados, 20 (50%) eram brancos, 9 (22,5%) eram pardos,

9 (22,5%) da cor negra e 2 (5%) da cor amarela, enquanto nos não aloimunizados estes percentuais foram de 44,2%, 36,2% e 18,5% e 1,1% respectivamente. Foi evidenciado predomínio de pacientes que auto se intitularam de cor branca, sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos comparados. (Teste Quiquadrado; $p = 0.0847$)

Tabela 4: Distribuição dos 429 pacientes do HCIII, segundo faixa etária e cor da pele; Rio de Janeiro, 2015 a 2016.

Faixa etária	Aloimunizados	Não aloimunizados	Valor de p
18 a 49 anos	10 (25%)	137 (35,2%)	
50 a 69 anos	23 (57,5%)	193 (49,6%)	
Maior ou igual 70	7 (17,5%)	59 (15,2%)	
Total	40 (100%)	389 (100%)	Tabela de Contingência = 3 x 2 Qui-Quadrado= 1.682 Graus de liberdade = 2 (p) = 0.4314
Cor da pele			
Branca	(50%) 20	(44,2%) 172	
Parda	(22,5%) 9	(36,2%) 141	
Negra	(22,5%) 9	(18,5%) 72	
Amarela	(5%) 2	(1,1%) 4	
Total	40 (100%)	389 (100%)	Tabela de Contingência = 4 x 2 Qui-Quadrado= 6.628 Graus de liberdade = 3 (p) = 0.0847

Fonte: Hospital do Câncer III - RJ

6.2. TIPO SANGUÍNEO

Quanto à classificação ABO, 189 pacientes (44%) eram O, 162 (37,7%) A, 63 (14,7%) B e 15 (3,6%) AB. Dentre os aloimunizados, o mais frequente foi o O, em dezenove pacientes (47,5%), seguido pelo A, em treze pacientes (32,5%). Dos não aloimunizados, as classificações ABO mais frequentes também foram o O (43,7%) e A

(38,3%), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de pacientes (Teste G $p = 0.8791$)

Quanto à classificação RhD, 382 (89%) eram RhD positivo e 47 (11%) RhD negativo. O predomínio de RhD positivo foi verificado tanto nos aloimunizados quanto nos grupos dos não aloimunizados com percentuais de 75% e 90%, respectivamente. Ao se comparar ambos os grupos, observamos uma diferença estatisticamente significativa (Teste G, $p = 0.0147$)

Tabela 5 - Distribuição dos 429 pacientes do HCIII, segundo a classificação sanguínea ABO e RhD; Rio de Janeiro, 2015 a 2016.

Classificação ABO	Aloimunizados	Não aloimunizados	Valor de p
O	19 (47,5%)	149 (38,3%)	
A	13 (32,5%)	193 (49,6%)	
B	6 (15%)	59 (15,2%)	
AB	2 (5%)	170 (43,7%)	
Total	40 (100%)	389 (100%)	Tabela de Contingência = 4 x 2 Graus de liberdade = 3 Teste G = 0.7119 (p) = 0.8791
Classificação RhD			
Positivo	30 (75%)	352 (90%)	
Negativo	10 (15%)	37 (10%)	
Total	40 (100%)	389 (100%)	Tabela de Contingência = 4 x 2 Graus de liberdade = 3 Teste G = 7.0675 (p) = 0.0147

Fonte: Hospital do Câncer III - RJ

6.3. HISTÓRICO TRANSFUSIONAL E NÚMERO DE TRANSFUSÕES NO HCIII

Do total de pacientes estudados, 65 (16%) tinham histórico transfusional, enquanto 364 (84%) não haviam recebido transfusões previamente. Dentre os aloimunizados, 29 (72,5%) não haviam recebido transfusões prévias e onze (27,5%) receberam transfusões de concentrados de hemácias no HCIII antes da detecção do anticorpo irregular neste estudo. Dos não aloimunizados, 335 (86%) não tinham

antecedente transfusional, determinando uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (Teste Qui-quadrado; $p = 0.0398$).

Quanto ao número de transfusões de concentrados de hemácias no HCIII, 31 pacientes (47,7%) receberam de uma a duas transfusões, 22 (33,8%) de três a quatro e 12 (18,5%) receberam mais de cinco transfusões. Dos aloimunizados, 6 (54,5%) receberam até duas transfusões, 3 (27,3%) receberam de três a quatro e 2 (18,2%) receberam mais de cinco transfusões. Dentre os não aloimunizados, estes percentuais foram, respectivamente, 46,3%, 35,2% e 18,5%. Apesar de ser verificado um predomínio de transfusão não crônica de até 2 transfusões entre os dois grupos, ao se comparar aloimunizados e não aloimunizados, não observamos uma diferença estatisticamente significativa (Teste G; $p = 0.8676$)

Tabela 6 - Distribuição dos 429 pacientes do HCIII, o histórico e número de transfusões; Rio de Janeiro, 2015 a 2016.

Histórico transfusional	Aloimunizados	Não aloimunizados	Valor de p
SIM	11 (27,5%)	54 (14%)	
NÃO	29 (72,5%)	335 (86%)	
Total	40 (100%)	389 (100%)	Tabela de Contingência = 2 x 2 Graus de liberdade = 1 Qui-quadrado = 5.232 (p) = 0.0398
Número de transfusões			
1 a 2	6 (54,5%)	25 (46,3%)	
3 a 4	3 (27,3%)	19 (35,2%)	
maior ou igual 5	2 (18,2%)	10 (18,5%)	
Total	11 (100%)	54 (100%)	Tabela de Contingência = 3 x 2 Graus de liberdade = 2 Teste G = 0.3051 (p) = 0.8676

Fonte: Hospital do Câncer III – RJ

6.4. HISTÓRICO GESTACIONAL e NÚMERO DE GESTAÇÕES

Das 429 mulheres estudadas, 387 (90,2%) tiveram histórico gestacional e 42 (9,8%) não tiveram gestações. Das aloimunizadas, 37 (92,50%) apresentaram histórico gestacional, enquanto 3 (7,50%) não tiveram gestações. Dentre as não aloimunizadas, a grande maioria (90%) teve antecedentes gestacionais, enquanto apenas 10% não referiram gestações prévias. Ao compararmos aloimunizadas e não aloimunizadas, não houve uma diferença estatisticamente significativa (Teste qui quadrado; $p = 0,8162$).

Quanto ao número de gestações das mulheres com histórico gestacional, 76 (17,7%) tiveram apenas uma gestação e 311 (72,3%) referiram ter apresentado de 2 ou mais gestações. Dentre as aloimunizadas, 5 (13,5%) tiveram única gestação e 32 (86,5%) tiveram duas a mais gestações. Os respectivos valores percentuais de 20,3% e 79,7% foram encontrados nas não aloimunizadas. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre aloimunizadas e não aloimunizadas (Teste G; $p = 0,5128$).

Tabela 7 - Distribuição dos 429 pacientes do HCIII, de acordo com o histórico e número de gestações; Rio de Janeiro, 2015 a 2016.

Histórico gestacional	Aloimunizados	Não aloimunizados	Valor de p
SIM	37 (92,5%)	350 (90%)	Tabela de Contingência = 2 x 2 Graus de liberdade = 1 Qui-quadrado = 0.262 (p) = 0.8162
NÃO	3 (7,5%)	39 (10%)	
Total	40 (100%)	389 (100%)	

Número de gestações

0	3 (7,5%)	39 (10,1%)
1	5 (12,5%)	71 (18,2%)

2 ou mais	32 (80%)	279 (71,7%)	
Total	40 (100%)	389 (100%)	Tabela de Contingência = 3 x 2 Graus de liberdade = 2 Teste G = 1.3357 (p) = 0.5128

Fonte: Hospital do Câncer III – RJ

6.5. TEMPO DE ALOIMUNIZAÇÃO: GESTAÇÃO X TRANSFUSÃO

Das 387 mulheres que apresentaram histórico gestacional foi verificado o tempo decorrido entre a última gestação e o primeiro PAI realizado neste estudo, com o intuito de analisar o tempo de prevalência de anticorpos irregulares. 52 (13,4%) decorreram de 1 a 9 anos, 82 (21,2%) entre 10 a 19 anos e 253 (65,4%) com valor igual e/ou superior a 20 anos.

Das aloimunizadas, 5 (13,6%) apresentaram tempo até 9 anos, 8 (21,6%) entre 10 e 19 anos e 24 (64,8%) para valores iguais e/ou superiores a 20 anos. Dentre as não aloimunizadas, estes percentuais foram, respectivamente, 13,5%, 21,1% e 65,4%. Apesar da maior concentração das aloimunizadas e não aloimunizadas na faixa marjoritária de tempo decorrido (> 20 anos), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste G; p = 0.9973).

Das 60 mulheres que apresentaram histórico transfusional foi verificado o tempo decorrido entre a última transfusão e o primeiro PAI realizado neste estudo com o intuito de estimar o tempo de incidência de anticorpos irregulares.

Considerando que uma resposta imune secundária pode acontecer dentro de um período de até 72 horas, as pacientes selecionadas foram distribuídas em margens de valor superior e inferior a este tempo. Das 60 mulheres estudadas, 51 (85%) apresentaram tempo superior a 72 horas e apenas 9 (15%) apresentaram tempo igual e/ou inferior. Todas as aloimunizadas (100%) apresentaram resultado superior a 72 horas. Dentre as

não aloimunizadas o mesmo tempo apresentou-se em 41 (82%) das pacientes. Ao compararmos aloimunizadas e não aloimunizadas houve uma diferença estatisticamente significativa (Teste G; $p = 0.0583$).

Tabela 8 - Distribuição dos pacientes do HCIII, de acordo com o tempo decorrido entre a última gestação e transfusão para com primeiro Pai realizado no estudo para análise da prevalência e incidência de aloanticorpos.; Rio de Janeiro, 2015 a 2016.

Tempo de prevalência (gestação)	Aloimunizados	Não aloimunizados	Valor de p
1 a 9 anos	5 (13,6%)	47 (13,5%)	
10 a 19 anos	8 (21,6%)	74 (21,1%)	
Igual ou maior 20	24 (64,8%)	229 (65,4%)	
Total	37 (100%)	350 (100%)	Tabela de Contingência = 3 x 2 Graus de liberdade = 2 Teste G = 0.0054 (p) = 0.9973
Tempo de incidência (transfusão)			
Menor 72 horas	0 (0,00%)	9 (18%)	
Igual e maior 72 horas	10 (100%)	41 (82%)	
Total	10 (100%)	50 (100%)	Tabela de Contingência = 2 x 2 Graus de liberdade = 1 Teste G = 3.5857 (p) = 0.0583

Fonte: Hospital do Câncer III - RJ

6.6. ESTADIAMENTO

Verificando o estágio da doença dos indivíduos estudados, observamos que 5 (1,4%) foram internados sem geração de estadiamento, 30 (7%) em nível

0, 71 (16,5%) em nível I, 157 (36,6%) em nível II, 155 (36%) em nível III e 11 (2,5%) em nível IV.

Dentre os aloimunizados, 1 (2,5%) apresentou-se em nível 0, 6 (15%) em nível I, 16 (40%) em nível II, 16 (40%) em nível III e 1 (2,5%) em nível IV. Dos não aloimunizados, a maior parte, apresentou-se em níveis II e III com os respectivos percentuais de 36,2% e 35,7%. Mas ao compararmos aloimunizados e não aloimunizados, não foi observada diferença estatisticamente significativa (Teste G; $p = 0.7499$)

Tabela 9 - Distribuição dos 429 pacientes do HCIII, de acordo com o estadiamento; Rio de Janeiro, 2015 a 2016.

Estadiamento	Aloimunizados	Não aloimunizados	Valor de p
0	1 (2,5%)	29 (7,45%)	
I	6 (15%)	65 (16,7%)	
II	16 (40%)	141 (36,2%)	
III	16 (40%)	139 (35,7%)	
IV	1 (2,5%)	10 (2,57%)	
Sem estadiamento	0 (0,00%)	5 (1,38%)	
Total	40 (100%)	389 (100%)	

Tabela de Contingência = 6 x 2
Graus de liberdade = 5
Teste G = 3.0119
(p) = 0.7499

7. Discussão

A incidência de anticorpos clinicamente relevantes em pacientes transfundidos ocasionalmente, como é o caso do portador do câncer de mama, não é perfeitamente conhecida. A variação na frequência de aloanticorpos antieritrocitários pode ser devido a várias razões. Alguns fatores que podem ser responsáveis pela disparidade de resultados incluem principalmente: o perfil da população estudada, os protocolos de transfusão sendo seguidas, a sensibilidade dos métodos de ensaio, e a proficiência dos funcionários do laboratório. Em estudo guiado por sugere-se que este perfil de paciente com câncer têm menores taxas de aloimunização contra antigénios eritrocitários porque eles são imunossuprimidos, podendo também, não manifestar qualquer evidência de aloimunização prévia.

Porém, dentre os aloimunizados, 30 (75%) apresentaram P.A.I. positiva antes de um possível transfusão na agência transfusional HCIII (AT-HCIII), enquanto 10 indivíduos (15%) apresentaram aloanticorpos após início das transfusões na AT-HCIII. A partir da positividade da metodologia de triagem foi observado uma distribuição em AGH de 1 paciente com histórico transfusional e 7 sem, enquanto que pela técnica enzimática a distribuição de predomínio se mantém, com 23 sem histórico transfusional e 9 com.

Durante a análise só pôde ser evidenciado desenvolvimento de aloanticorpo devido às transfusões na AT-HCIII em 4 pacientes, já que em 6 não houve acompanhamento de mais de um PAI previamente às transfusões.

Quando levamos em consideração a rotina em AGH, o percentual de aloimunizados em nosso trabalho é similar a encontrada por Costa R.N. (2013) que estudou 2396 pacientes portadores do câncer de mama, receptores de concentrado de hemácias atendidos em caráter de emergência. O autor encontrou um índice de 1,25% de aloimunização em AGH, após exclusão dos resultados inconclusivos e interferência de roulex. No atual trabalho, os pacientes com PAI positiva antes das transfusões não foram excluídos. No entanto, todos os indivíduos foram pesquisados apenas durante o período de internação, tempo geralmente insuficiente para o desenvolvimento destes aloanticorpos.

Contudo, o nosso índice de aloimunização é superior ao encontrado por Mohsin et al. (2013), que encontraram um índice de apenas 4,3% de aloimunizados, ao realizar um estudo prospectivo em 69 pacientes portadores de câncer de mama politransfundidos. A frequência de indivíduos com PAI positiva em nosso estudo também é superior a dos trabalhos de Dinardo et al. (2013), que encontraram um índice de 3% de aloimunizados em 66 pacientes com tumores sólidos, em um hospital especializado no cuidado ao câncer na cidade de São Paulo, e de Natukunda et al. (2010), que verificaram um índice de 6,1% de aloimunização (em 214 indivíduos estudados), em um hospital de Uganda. Porém, nesse último estudo, foram incluídos pacientes com doenças crônicas, como AIDS, leucemias e anemia aplástica, por exemplo. Sabe-se que pacientes com doenças e/ou condições que levam à imunodeficiência, como AIDS e quimioterapia interferem na resposta imune a estímulos antigênicos, como ficou demonstrado em um estudo de Cozac (2009), que não encontrou nenhum caso de aloimunização eritrocitária em pacientes politransfundidos portadores de Leucemia Linfóide Aguda.

Dentre os aloanticorpos encontrados em nosso estudo, uma importante observação deve ser feita. Foram detectados ao todo 8 exemplares de Anti-Lea sendo 1 a partir da técnica de AGH e 7 pela aplicação da técnica enzimática, e como não estava previsto coletas adicionais aos pacientes, só foi possível verificar as fases de reatividade em 4 destes, enquanto os outros 3 não puderam ser avaliados devido a falta de material amostral do paciente para continuação dos testes. Convém lembrar que os anticorpos irregulares encontrados de forma isolada reagindo apenas em temperatura ambiente ou 4°C, não sendo observada qualquer aglutinação a 37°C ou na fase de anti-imunoglobulina humana, podem ser considerados, dessa forma, que não possuam significância clínica. Cozac (2009) encontrou em seu trabalho um percentual de 0,24% de anticorpos do sistema Lewis. A autora afirmou que tais aloanticorpos tinham importância clínica, pois causaram reação transfusional hemolítica ou baixo incremento transfusional. Como há alguns aloanticorpos em resposta ao Sistema Lewis que podem apresentar amplitude térmica, ou seja, que podem reagir tanto em baixas temperaturas, como em temperaturas semelhante à corporal, os exemplares de Anti-Lea reagentes unicamente em

técnica enzimática foram testados em suas fases de reatividade e todos demonstraram aglutinação à 37°C. Este resultado levou a incorporação dos anticorpos para os antígenos do sistema Lewis à frequência de anticorpos irregulares detectada em nosso trabalho.

A decisão sobre o significado clínico de positividade em triagem enzimática deve ser avaliada com cuidado e pode ser de difícil interpretação. Em estudos anteriores, os autores afirmaram que o método enzimático revelou uma alta proporção de reações inespecíficas com incerto valor clínico e, por isso o método não é utilizado rotineiramente por muitos laboratórios (Shin J.W (2013), Shin J.H. et AL. (2009)). Em nosso estudo, como foi posto em consideração que a reatividade em painel de hemácias sem especificidade deveria se apresentar por 2 metodologias, sendo em gel e tubo, até a conclusão deste estudo não foi verificado resultado com estudo imunohematológico com reações inespecíficas. No entanto, não podemos aceitar completamente a opinião que toda triagem positiva somente em técnica enzimática considerada inespecífica seria insignificante. Pode existir muitas variáveis que viriam a interferir neste resultado, como por exemplo: a natureza, a concentração e tempo de tratamento da hemácia pela enzima proteolítica, anticorpos em fase de formação que podem apresentar efeito de dose, sejam eles de natureza fria (IgM) ou quente (IgG), passando-se despercebidos por olhos inexperientes; a ocorrência de um anticorpo para antígeno de baixa frequência na população, e assim este não estar contido no diagrama do painel de hemácias, pois o kit contém apenas os principais antígenos de importância na medicina transfusional.

A técnica enzimática pode gerar aumento de detecção de autoanticorpos, interferindo na leitura de identificação de aloanticorpos. Relato confirmado pelos trabalhos de Shin J.W (2013), Shin J.H. et AL. (2009), Lee J.S et AL (2006), Issitt P.D. et AL. (1993) e Garner S.F et AL. (1991). De acordo com os autores anteriores, os resultados obtidos com autoanticorpos foram contabilizados como tal ou excluídos das suas respectivas pesquisas. O diferencial do nosso estudo, foi a resolução dessa interferência pela retirada dos autoanticorpos por técnica de adsorção. A partir do momento que, cerca

de 22,5% dos pacientes apresentaram autoanticorpo IgG isolado ou em associação com aloanticorpos, após realização da técnica de adsorção com hemácias compatíveis aos fenótipos dos pacientes foi, verificado a identificação de 2 aloanticorpos: 1 Anti-K e 1 Anti-C.

Além disso, há alguns casos, descritos na literatura, de reação transfusional hemolítica aguda (Michalewska B, 2005) ou reações tardias transfusionais (Issitt P.D. et al,1993; Reisner R. et al, 1991) causadas pelos considerados anticorpos só em enzima ou pela nomenclatura em inglês "enzyme-only ". Encontramos evidências adicionais em apoio a importância do método de enzima para o rastreio de anticorpos neste estudo. Entre as 32 amostras que foram positivas pelo método enzimático, apenas uma apresentou resultado positivo e identificação por AGH até o término desse estudo. A única positividade em AGH foi verificada pela paciente N.E. proveniente de solicitação transfusional com Anti-E com efeito de dose. A paciente de cor negra, O +, 93 anos, apresentava-se em quimioterapia, com histórico de 16 gestações prévias e transfusão de 06 concentrados de hemácias na Instituição. A partir do momento que a instituição não utiliza bolsas fenotipadas na rotina de portadores do câncer de mama com P.A.I. negativo, podemos afirmar que a detecção em AGH só foi possível provavelmente devido a resposta anamnéstica contínua da paciente às bolsas transfundidas. A supressão imunológica dada pela própria característica da idade e do tratamento pode ter contribuído na manutenção de um título baixo do aloanticorpo. Cabe ressaltar que, a detecção inicial de anticorpos irregulares pela técnica enzimática determinou ao todo 13 (35%) anticorpos de especificidade Anti-E, Dado semelhante à Takeshita A. et Al. (2014), onde demonstraram que o Anti-E foi o aloanticorpo mais recentemente detectado em 151 pacientes oncológicos após receberem uma transfusão de sangue. Em 147 casos, o anti-E foi detectado apenas pelo método de enzima; enquanto que em 4 casos a detecção foi confirmada bem fracamente pelo procedimento em AGH. Assim, o método em AGH poderia falhar na detecção de alguns aloanticorpos inesperados.

Adiciona-se ao relato anterior que, Schonewille H et AL. (1999) e Alves M. (2010), conseguiram demonstrar que aloanticorpos clinicamente

significativos podem se tornar indetectáveis de acordo com o tempo em pacientes em tratamento quimioterápico ou combinada à radioterapia, embora isso não foi observado no presente estudo. Por um lado, isto pode levar a uma subestimação do número de anticorpos existentes; e por consequência transfusão de hemácias incompatíveis e uma resposta imune secundária, comprometendo o benefício da transfusão. Ao longo do presente estudo evidenciou-se que a partir da técnica enzimática, foi possível observar resposta anamnésica à transfusões prévias em 4 pacientes. Os aloanticorpos detectados apresentaram especificidade para os sistemas Rh e Kell. Isto implica que há necessidade de uso de metodologia conjunta ao AGH na detecção de aloanticorpos irregulares.

Para a identificação de anticorpos, existem diferenças significativas entre os métodos de AGH e enzima . O método de enzimático apresentou reações mais fortes, pôde detectar mais anticorpos, e tem a vantagem de discriminar anticorpos quando os anticorpos misturados estavam presentes. Assim, a utilização do método em enzima é essencial para a identificação de anticorpos. No entanto, em nosso estudo, os exemplares de anti-S e Anti-Jka foram unicamente identificados pelo método de LISS / AGH. Portanto, o método enzimático deve ser utilizado paralelamente com LISS / AGH e nunca substituí-lo.

A triagem combinada dos dois testes possibilitou uma frequência de 40 (9,32%) amostras positivas para anticorpos inesperados. Caso haja exclusão de seguimento dos exemplares contendo autoanticorpos, essa incidência cai para 23 (5,36%) amostras. Mas como após técnica de adsorção para retirada dos autoanticorpos, foram evidenciados aloanticorpos de significado clínico, adiciona-se a este achado que a proporção positiva dos métodos combinados pode ser de até sete vezes maior que o método de Liss/AGH aplicado unicamente, com resultados altamente discrepantes observados entre os dois métodos.

7.1 FAIXA ETÁRIA, COR DA PELE DOS PACIENTES E ALOIMUNIZAÇÃO

Quanto à faixa etária dos indivíduos com PAI positiva, observamos que a maior ocorrência de aloimunização foi entre os 50 e 69 anos (57,5%), seguida pelos mais jovens (18 a 49 anos) (25%). Resultado semelhante ao estudo de Shin (2013) na Coreia, onde os pacientes oncológicos aloimunizados apresentaram predominância de 75,4%, de faixa etária superior a 50 anos. Os nossos resultados são discordantes dos encontrados por Zaman, Chaurasia, Chatterjee e Thapliyal (2014), em um estudo sobre aloimunização em pacientes hematológicos e oncológicos na Índia, ao observarem que apenas 28% dos aloimunizados tinham idade superior a 50 anos, destacando, contudo, que a maioria dos pacientes incluídos na pesquisa tinha mais de 11 anos. No trabalho de Mohsin et al. (2013), os pacientes com câncer de mama correspondiam a 68% do total de pacientes analisados com tumores sólidos e demonstraram que a média de idade no grupo dos aloimunizados (95%) tinha até 49 anos. Convém citar que esse trabalho incluiu vários indivíduos oncológicos em tratamento crônico, e que, portanto, começaram a receber transfusões mais previamente e em grande quantidade, tornando-se aloimunizados mais precocemente em suas vidas.

Apesar do baixo índice de aloimunizados em idade avançada (≥ 70 anos), o nosso estudo mostra que, do total de aloimunizados, a maioria (65,8%) tinha idade igual ou superior a 50 anos, índice bastante similar ao grupo controle (64,8%), demonstrando que a idade avançada poderia estar diretamente ligada ao quadro de decaimento de título dos aloanticorpos formados, onde a grande maioria, só pôde ser identificada em técnica enzimática em nosso estudo. Sabe-se que certas características individuais podem determinar a queda do título do anticorpo após aloimunização. Segundo alguns autores citados por Cozac (2009), a persistência de aloanticorpos encontra-se relacionada, por exemplo, à ocorrência da aloimunização na fase inicial da idade adulta. Além disso, alguns estudos relacionados a vacinas demonstraram que o envelhecimento enfraquece a resposta de linfócitos T e B naive a patógenos, encurtando assim a duração da proteção imunitária, o que

deve refletir também na persistência dos aloanticorpos formados (COZAC, 2009).

Dada a miscigenação da população brasileira e a dificuldade em se classificar adequadamente as pessoas no que diz respeito a essa variável, é importante considerar a existência de um possível viés nessa classificação. Em nosso trabalho, verificamos que, do total de aloimunizados, apenas 81 indivíduos (18,8%) eram da cor negra e, dentre os não aloimunizados, os negros representaram somente 18,5%. Além disso, foi demonstrada uma predominância de 50% nos aloimunizados de origem caucasiana, com valor similar ao controle (44,7%), e significativa diferença estatística (teste qui-quadrado, $p= 0.0847$).

Ao levarmos em consideração a origem não-caucasiana, é observado uma discreta equivalência de proporção entre aloimunizados (50%), entre os não aloimunizados (55,8%) e entre o número total de indivíduos analisados (55,3%). Com estes dados podemos atribuir que a aloimunização eritrocitária é gerada a partir das diferenças entre o padrão fenotípico eritrocitário da população, seja sua exposição dada principalmente por gestação entre união de sexos, ou a partir de transfusões entre doadores e receptores.

7.2. TRATAMENTO E ALOIMUNIZAÇÃO

O fato de pacientes com câncer de mama se apresentarem aloimunizados em nosso estudo chama muito a atenção, já que tais indivíduos normalmente se tornam imunossuprimidos, devido à própria doença de base associada à quimioterapia. Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa (teste G, $p= 0.7297$), em nosso estudo, 17 (42,5%) dos aloimunizados apresentaram a quimioterapia como único e principal tratamento empregado, e 9 (22,5%) apresentaram tratamento quimioterápico combinada à radioterapia. Tal resultado é concordante ao estudo de NARVIOS (2002) nos Estados Unidos, onde foi observada perda de aloanticorpos em todos os 25 pacientes estudados. Treze (52%) dos pacientes tinha um histórico de perda de apenas um aloanticorpo, enquanto 12 (48%) pacientes tiveram perda de vários aloanticorpos. A incidência mais elevada foi observada no sistema Rh, especialmente com anticorpos anti-E. Convém citar que neste estudo, foram

incluídos pacientes aloimunizados de caráter oncohematológico e com tumores sólidos que apresentaram distintas terapias quimioterápicas e combinadas.

A ausência de aloimunização como resultado de efeitos imunossupressores da quimioterapia tem sido relatada em estudos anteriores (ESTRIN J. T., SCHOCKET I., KREGENOW R., HENRY D. H, 1999; Leonard R.C. , Untch M. , Koch F, 2005; Solh Z.; Nancy M. Heddle N. M, 2015) . A irradiação aplicada pela radioterapia sobre o sistema imunológico pode variar de sua insignificância a sua importância, dependendo da área do corpo a ser irradiada. De acordo com Dhar e Basu (2015), a radioterapia pode vir a enfraquecer o sistema imune, podendo a levar a redução da aloimunização e aumentar a necessidade de transfusão devido a supressão medular. A influência do tratamento quimioterápico é confirmada por Solh et AL. (2015), onde foi demonstrado que pacientes infantis oncológicos sem quimioterapia apresentavam uma incidência maior de aloimunização eritrocitária pós-transfusão (1,9%), em comparação os 0,6% das crianças que estavam em quimioterapia. No entanto, no estudo de Natukunda (2013), 5 (55,6%) dos 9 pacientes com tumores sólidos tornaram-se aloimunizados mesmo recebendo tratamento quimioterápico e radioterápico. Os autores, entretanto, explicam o uso apenas da técnica de gel centrifugação e Liss-Coombs no processo de triagem e identificação dos aloanticorpos. Não sendo mencionada nenhuma técnica complementar a essas metodologias, o que subjuga que o número de aloanticorpos ainda pode ser maior que os observados.

Em síntese, não podemos afirmar que o tratamento quimioterápico e/ou combinado à radioterapia promoveram a diminuição do título dos aloanticorpos detectados ao longo do estudo devido à algumas limitações declaradas a seguir: A agência transfusional não apresentava histórico de realização de P.A.I pela técnica enzimática, já que este não faz parte da rotina do hospital; o P.A.I. em Liss/AGH não faz parte dos exames de triagem das pacientes em 1º consulta, o que dificulta saber se a presença de aloanticorpos foram geradas antes da entrada na Instituição ou ao longo do seu tratamento, já que algumas pacientes já apresentavam histórico transfusional na Instituição quando se deu início ao estudo. O que pôde ser observado é que o tratamento empregado no

câncer de mama pode induzir uma resposta imune secundária de baixa intensidade. 4 pacientes, sendo 2 (50%) em quimioterapia e 2 (50%) combinada à radioterapia tornaram-se aloimunizados pós-transfusão com formação de 4 aloanticorpos (2 Anti-E, 1 Anti-C e Anti-K) . Mas apenas 1 (25%) foi detectado em AGH ,e mesmo assim,com efeito de dose, enquanto 3 (75%) foram detectados pela técnica enzimática. Este achado demonstra que a técnica enzimática é importante na detecção de aloanticorpos pós-transfusão em pacientes onde o sistema imunológico esteja suprimido.

7.3. GRUPO SANGUÍNEO

Quanto ao grupo sanguíneo ABO, não observamos qualquer correlação entre aloimunização e os diferentes tipos sanguíneos, apresentando estes os mesmos percentuais do grupo controle.

Na população brasileira, a prevalência do fenótipo RhD-negativo, é variável e heterogênea nas várias regiões do país. Em nosso estudo, o predomínio da tipagem RhD positivo foi observada tanto nos aloimunizados quanto nos não aloimunizados com percentuais de 75% e 90%, respectivamente. Resultados semelhantes a estudos realizados na Fundação Pró-sangue que demonstraram que 87,5% a 91,8% dos doadores de sangue em São Paulo são RhD positivo. No Rio de Janeiro, a frequência de doadores de sangue RhD-positivo é de 90.2%. (Castilho et AL., 2011). A diferença estatisticamente significativa sobre a positividade da tipagem RhD recai sobre a especificidade dos anticorpos irregulares identificados no presente estudo. Partindo-se do pressuposto que o antígeno D é considerado o mais imunogênico dos antígenos eritrocitários, após o sistema ABO (Castilho et AL., 2011), nosso estudo apresentou o Anti-D como o principal aloanticorpo identificado pela técnica em AGH.

7.4. HISTÓRICO TRANSFUSIONAL, NÚMERO DE TRANSFUSÕES NO HCIII E ALOIMUNIZAÇÃO

Dentre os pacientes com PAI positiva em nosso trabalho, observamos que 27,5% apresentaram histórico transfusional. Tal resultado é semelhante ao do estudo de Alves (2010), onde 29,41% dos indivíduos aloimunizados haviam

recebido transfusões previamente. No presente estudo, foi possível observar diferença estatisticamente significativa (teste qui quadrado, $p=0.0398$), a partir do momento que, o percentual de aloimunizados com antecedentes transfusionais foi superior à frequência de não aloimunizados com transfusões prévias (27,5% e 14%, respectivamente).

Dinardo et al. (2013), demonstraram que doenças oncológicas são um importante fator de risco para a aloimunização eritrocitária. Os autores também afirmaram que o número de transfusões recebidas não estava relacionado a esses achados. Porém, no caso dos tumores sólidos, acreditam que um mecanismo responsável pelo maior risco de aloimunização seria o estado aumentado de ativação imune desses pacientes, devido ao quadro de inflamação crônica que estariam sujeitos. Contudo, afirmam que os achados desse trabalho requerem confirmação por estudos futuros, além de uma melhor investigação dos possíveis mecanismos envolvidos.

Em nosso estudo, os indivíduos aloimunizados receberam entre uma e sete transfusões de concentrado de hemácias, com uma média de 3,18 transfusões por paciente, o que está de acordo com a literatura. Bordin (2007) observou em seu trabalho que os pacientes aloimunizados receberam uma média de 2,87 unidades transfundidas. Em contra partida, no estudo de Mohsin et AL. (2013), os indivíduos portadores de câncer de mama que desenvolveram aloanticorpos receberam uma média de oito unidades de concentrados de hemácias.

O surgimento de uma aloimunização é diretamente proporcional à probabilidade de ser exposto ao antígeno eritrocitário durante a transfusão sanguínea. Tal probabilidade certamente aumenta com o número de transfusões recebidas. Por outro lado, ao compararmos aloimunizados e não aloimunizados, observamos que a proporção de aloimunizados que receberam mais de 5 transfusões não foi estatisticamente significativa ($p = 0.8676$), em relação à dos não aloimunizados, já que seus valores são equivalentes (18,2% e 18,5%). Tal resultado mostra que a presença de aloimunização, em nosso estudo, não teve correlação com o número de transfusões recebidas. Os dados obtidos eram esperados, já que o perfil de terapia transfusional de pacientes

portadores do câncer de mama é considerado não crônico, ou seja, com reduzido número de transfusões. Este relato é corroborado pela predominância do número de 1 a 2 transfusões em aloimunizados (54,5%) e não aloimunizados (46,3%) no atual estudo. Resultado semelhante foi obtido em estudo retrospectivo multicêntrico de 20 anos realizado por Bordin (2007) com pacientes aloimunizados, sem doença oncohematológica, e não transfundidos cronicamente, para analisar a formação adicional de aloanticorpos dirigidos contra antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos Rhesus, Kell, Duffy, Kidd, e MNSs após novos eventos transfusionais. Foi observado que 21,4% de 653 pacientes produziram 157 novos anticorpos, e que, ao final do estudo, 33,4% dos pacientes possuíam múltiplos anticorpos. Entre 140 pacientes que formaram novos anticorpos, 80 (57%) foram sensibilizados após receberem um número mediano de duas unidades de hemácias.

Tal resultado mostra que a presença de aloimunização, em nosso estudo, não teve correlação com o número de transfusões recebidas na Instituição e sim com o histórico transfusional. Este achado reforça a possibilidade de prevalência de aloanticorpos pré-formados neste grupo de pacientes oncológicos.

7.5. ESTADIAMENTO

Quanto ao estágio do câncer, não observamos qualquer correlação entre aloimunização e o seu estadiamento, apresentando estes percentuais semelhantes do grupo controle.

7.6. HISTÓRICO GESTACIONAL

Apesar da nuliparidade ser apontada como fator de risco em mulheres para serem portadoras do câncer de mama, nosso estudo apresentou resultado discordante, demonstrando que dentre as mulheres aloimunizadas, observa-se que a grande maioria (92,5%) tinha histórico gestacional e que todas elas

tiveram até 16 gestações. Santos et al. (2007) encontraram uma frequência semelhante de mulheres aloimunizadas com histórico gestacional (93,33%), apesar do número de gestações não ser informado.

Já no estudo de Natukunda (2013) e Alves (2010), apenas 62,5% das mulheres que produziram aloanticorpos tiveram gestações anteriores. Porém, em nosso trabalho, um fato chama bastante à atenção. Enquanto 92,5% das aloimunizadas afirmaram histórico gestacional, este fato era referido por 90,2% das não aloimunizadas, sem diferença estatística significativa ($p = 0,8135$). Tal resultado é exatamente o oposto do que se esperava, pois as gestações são uma importante causa de aloimunização nas mulheres (Novaretti, 2007; Cozac, 2009; Castilho et al., 2011; Bittencourt et al., 2012, Borges et al., 2013; Girello, 2013; Moshin et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Zaman et al., 2014). O resultado encontrado foi provavelmente devido à pequena amostra de pacientes aloimunizadas (40), quando comparada às não aloimunizadas (389), pois se ao invés de 37 aloimunizadas com histórico gestacional, tivéssemos 39, a significância estatística tornar-se-ia significativa (Teste G, $p = 0,0715$). Portanto, consideramos este resultado casual e, acreditamos que careça de consistência prática.

Por outro lado, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, observamos que 86,5% das pacientes que desenvolveram aloanticorpos tiveram de 2 ou mais gestações, enquanto 20,3% das não aloimunizadas referiram apenas uma gestação. Segundo Dinardo, Ito, Sampaio e Júnior (2013), quanto maior o número de gestações, maior o risco de aloimunização materno-fetal.

7.7. TEMPO DE ALOIMUNIZAÇÃO: GESTAÇÃO X TRANSFUSÃO

Em todos os 4 pacientes que apresentaram aloimunização pós transfusão, verificamos que o tempo para produção de aloanticorpos variou de cinco dias a um mês, com uma média de 21 dias, decorrendo do tempo entre a primeira transfusão de concentrados de hemácias e a identificação da aloimunização. No entanto, há a possibilidade do número de aloimunizados ter

sido maior do que a encontrada, já que as pesquisas de aloanticorpos só puderam ser realizadas a partir do momento que houvesse nova solicitação transfusional ou reserva cirúrgica.

Estes nossos resultados estão de acordo com estudo citado por Bordin (2007) que descreveu resultados sobre aloimunização eritrocitária em pacientes com condições clínicas agudas que foram transfundidos com concentrados de hemácias. Utilizando a técnica de gel centrifugação e AGH, os investigadores detectaram aloanticorpos eritrocitários em 120 indivíduos (taxa de aloimunização = 2,1%) O tempo médio de detecção dos aloanticorpos eritrocitários foi de 20 dias.

Recentemente, um estudo retrospectivo multicêntrico internacional citado por Bordin (2007), analisou os fatores que podem influenciar a taxa e a especificidade de aloanticorpos eritrocitários, enfatizando especialmente o tempo de intervalo entre a transfusão e a detecção do anticorpo. Entre todos os pacientes sensibilizados, novos anticorpos foram detectados dentro de 14 dias após transfusão em 299 indivíduos (16,8%), e após 14 dias em 1.479 pacientes (8,2%). Um subgrupo (50%) dos receptores de transfusão foi novamente testado para aloimunização devido à nova indicação transfusional, e 11 entre os 2.932 pacientes (0,4%) retestados até três dias após a transfusão desenvolveram novos anticorpos.

A partir desses resultados, nosso trabalho utilizou o período decorrido entre a última transfusão e o primeiro P.A.I. realizado pelo estudo como uma forma de se obter uma estimativa de tempo de incidência de aloanticorpos em pacientes com câncer de mama, com significativa diferença estatística. Nas pacientes aloimunizadas, verificamos que o tempo observado variou entre 5 dias a 8 meses, enquanto que nas não aloimunizadas o tempo observado variou entre 1 dia a 24 meses.

Todavia, casos de aloimunização precoce já têm sido descritos na literatura. No estudo de Santos et al. (2007), o tempo para produção de aloanticorpos variou de três a 97 dias, sendo 20,88 dias o tempo médio. Convém citar que, neste trabalho, as coletas foram realizadas apenas durante o período de internação dos indivíduos. Os autores não explicam o motivo de

vários indivíduos terem desenvolvido seus aloanticorpos tão precocemente. Porém, foi constatado nesse estudo que 93,33% das mulheres aloimunizadas tinham histórico gestacional, o que provavelmente pode ter influenciado nesses resultados. Schonewille et al. (2006) observaram que 16,8% dos pacientes se tornaram aloimunizados em até 14 dias após as transfusões e 2,3% produziram aloanticorpos em no máximo três dias. Os autores afirmaram que tais achados sugerem uma resposta imune secundária. Contudo, não demonstraram, dentre os aloimunizados, o número de indivíduos com ou sem antecedentes transfusionais, apesar de terem informado no estudo que levantaram o histórico transfusional dos pacientes pesquisados. Ainda nesse mesmo trabalho, dentre os aloanticorpos que surgiram nas duas primeiras semanas, constatou-se que a maior parte (42,8%) era anti-E. Tal resultado está de acordo com nosso trabalho, onde dois (50%) dos dois indivíduos aloimunizados precocemente desenvolveram o aloanticorpo em questão.

Schonewille, Haak e Van Zijl (1999), em um estudo amplo e retrospectivo, em um período de 20 anos, em um hospital da Holanda, observaram que, ao longo do tempo, houve uma queda na porcentagem de anticorpos detectáveis, após sua primeira detecção. No entanto, o tempo de persistência da maioria dos anticorpos foi bastante longo, pois aproximadamente 25% de todos os anticorpos encontrados ainda eram detectáveis após 192 meses. Afirmaram que anticorpos de baixos títulos (como no presente estudo, já que a maioria foi detectável pela técnica enzimática), se tornaram indetectáveis mais rapidamente, em comparação aos de altos títulos, normalmente verificados em AGH.

Schonewille et al. (2006), assim como no estudo previamente citado (SCHONEWILLE; HAAK; VAN ZIJL, 2000), demonstraram que vários aloanticorpos ainda estavam presentes por mais de cinco anos após sua detecção. No atual estudo, excluindo as pacientes com autoanticorpos, ao verificarmos as 22 pacientes aloimunizadas que apresentaram unicamente histórico gestacional, observamos que a persistência de aloanticorpos variou entre 2 a 57 anos com uma média de 25,4 anos. A partir da técnica em AGH, o Anti-D foi o principal aloanticorpo detectado em 4 (66,6%) pacientes. Na

técnica em AGH, a persistência variou entre 15 a 42 anos, com uma média de 30 anos. Enquanto que na técnica enzimática, o Anti-E foi o principal aloanticorpo detectado em 8 (50%) pacientes com variação de persistência entre 2 a 57 anos, com uma média de 23,5 anos, semelhante ao valor total de aloimunizados. Tais resultados demonstram que a técnica enzimática pode ser utilizada com o intuito de se detectar aloanticorpos em reduzido intervalo de tempo pós-exposição a antígenos eritrocitários.

No atual estudo não foi encontrado paciente aloimunizada que apresentasse unicamente histórico transfusional.

8. Conclusão

O presente estudo, realizado em mulheres portadoras do câncer de mama, a partir da triagem combinada dos testes de Liss/AGH e enzimático, mostrou uma frequência considerável de aloimunização eritrocitária (9,32%). Adiciona-se a este achado que a aplicação do método enzimático na rotina de pesquisa de anticorpos irregulares proporcionou um índice de positividade até sete vezes maior que o método de Liss/AGH aplicado unicamente.

A maioria das aloimunizadas apresentou aloanticorpos de significância clínica (sistemas Rh), em plena concordância com a literatura e, confirmando a ocorrência de aloimunização por aloanticorpos de significância em portadores do câncer de mama. Observamos que a aloimunização não está correlacionada ao número de transfusões de concentrados de hemácias na Instituição, confirmando também a hipótese de aloimunização prévia, principalmente por históricos gestacionais e transfusionais.

Como a aloimunização prévia pode vir a nem ser detectada em P.A.I. por Liss/AGH, e a partir do momento que foi observado que o tempo para geração de aloanticorpos seria longo (superior a 72 horas), os resultados obtidos demonstraram que a técnica enzimática pode ser utilizada com o intuito de se detectar aloanticorpos em reduzido intervalo de tempo pós-exposição a antígenos eritrocitários.

Diante desses fatos, propomos a aplicação da fenotipagem eritrocitária para os antígenos dos sistemas Kell e Rh (E, e, C, c), para todos os indivíduos portadores do câncer de mama. Também propomos a ampliação deste projeto na rotina pré-transfusional sobre os demais grupos de pacientes oncológicos assistenciados pelo INCA. Tal medida certamente contribuirá para reduzir os índices de aloimunização eritrocitária nos receptores eventuais de concentrados de hemácias, como nos politransfundidos também, e conseqüentemente, diminuirá o risco de transfusões fenótipo incompatíveis que poderiam acarretar reações transfusionais hemolíticas ou transfusões ineficazes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, VM. **Freqüência de aloanticorpos irregulares em receptores de concentrados de hemácias atendidos com emergências médicas e/ou com doenças agudas no hospital das clínicas da UFTM**, universidade federal do triangulo mineiro, mestrado em patologia clínica, Uberaba, minas gerais, 2010.

Brasil.Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer- INCA :Disponível em :http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2016/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2016. Acesso em 05 de julho de 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria No. 158, de 04 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Diário Oficial da União nº 158, de 04 de fevereiro de 2016

Bittencourt LP, Pinho MO, Ribeiro VF, Santos RP, Souza FA, Souza WF, Soares AM, Madeira ES, Martins ML, Vaena MM. **Perfil de aloimunização dos pacientes do hospital do câncer II**. Rev Bras Hematol Hemoter. 2012; 34(Supl.2):485-86.

Bordin J. O. Aloimunização após transfusão de concentrado de hemácias em pacientes atendidos em um serviço de emergência. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(4):339-343

Borges G., Rovere K.R., Siqueira A. **Perfil dos pacientes oncológicos que procuraram o departamento de emergência de um hospital de Blumenau no período de 01 abril de 2011 a 31 de outubro**. Revista brasileira de oncologia clínica Vol. 9, nº34 pág 130-134, 2013

Castilho S.L., Junior J.L., Pessoa M.C. Determinação ante-natal da genotipagem RhD fetal a partir de plasma materno como uma ferramenta de acompanhamento de gestante RhD-. 2011. Tese (mestrado) – Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ,RJ

Cochran, W.G. **Sampling Techniques**, Jon Willey & Sons, Third Edition, New York, 1977

Costa R.N. **Avaliação da frequência de anticorpos irregulares de pacientes em um serviço de hemoterapia do rio de janeiro especializado no atendimento do câncer de mama**, programa de pós-graduação, nível especialização em Imunohematologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ,2013.

COZAC, A. P. C. N. C. Estudo do potencial antigênico relativo dos antígenos de grupos sanguíneos menores em pacientes sob esquema transfusional. 2009. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Departamento de Clínica Médica, Ribeirão Preto, SP

Dinardo C.L., Ito G.M., Sampaio L.R., Júnior A.M. Study of possible clinical and laboratory predictors of alloimmunization against red blood cell antigens in cancer patients. Rev Bras Hematol Hemoter. 2013;35(6):414-6

Duarte C.M., Colonesi M.Z., Paula P.P., Dalmazzo L.F. **Frequência de aloanticorpos em amostras de exames pré-transfusionais de pacientes atendidos pelo banco de sangue do hospital santa Teresa – hst, Petrópolis no período de janeiro de 1999 até junho de 2012.** . Rev Bras Hematol Hemoter. 2012; 34(Supl.2):482

ESTRIN J. T., SCHOCKET I., KREGENOW R., HENRY D. H. A Retrospective Review of Blood Transfusions in Cancer Patients with Anemia The Oncologist 1999;4:318-324

Garcia LO, Galvão AC, Mesko JÁ, Campos LM, Almeida S, Onstein G. **Frequência de aloimunização em pacientes que apresentaram problemas imuno-hematológicos no período de maio 2011 a junho 2012 no hospital de clinicas de porto alegre.** Rev Bras Hematol Hemoter. 2012; 34(Supl.2):499.

Garner S.F., Devenish A., Barber H., Contreras M. The importance of monitoring 'enzyme-only' red cell antibodies during pregnancy. Vox Sang 1991; 61: 219-20.

GIRELLO, L., A.; KÜHN, B., de B., I, T. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária** - São Paulo, Ed. SENAC, 2013

HARMENING, M., D. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão** – Rio de Janeiro, Ed. Revinter, 4ª ed., 2006

International Society of Blood Transfusion – ISBT - Holanda. Disponível em: <http://www.isbtweb.org/nc/publications/transfusion-today/>. Acesso em 15 de julho de 2016.

INCA. Hospital do Câncer III. **Relatório de Mapa Transfusional- Transfusões Confirmadas**. Sistema Hemote Versão PLUS. 95f. Rio de Janeiro, 2016.

Issitt P.D., Combs M.R., Bredehoeft S.J., Campbell M.L., Heimer M., Joyner L., Lorentsen L., Remley C., Bullock S., Bumgarner J., Zakeriniasar M., Kirkland A., Melroy H., Millikin D. Lack of clinical significance of “enzyme-only” red cell alloantibodies. *Transfusion* 1993; 33: 284-93. 12.

Lee J.S., Cho D., Shin M.G., Ryang D.W.. Usefulness of NaCl/Enzyme gel test for the identification of unexpected antibodies. *Korean J Lab Med* 2006; 26:204.

Leonard R.C. , Untch M. , Koch F. Management of anaemia in patients with breast cancer: role of epoetin. *Annals of Oncology* 16: 817 – 824, 2005

LORENZI, T. F. et al. Manual de Hematologia: propedêutica e clínica. 4. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2006.

Michalewska B, Ejduk A, Pniewska K. Acute haemolytic transfusion reaction apparently caused by the ‘enzyme-only’ anti-E. *Vox Sang* 2005; 89: 61.

Mohsin S. et AL. Red Cell Alloimmunization in Repeatedly Transfused Cancer Patients *Journal of Rawalpindi Medical College (JRMCI)*; 2013;17(2):219-222

MOORE, D. S. **A estatística básica e sua prática** - Rio de Janeiro: LTC Editora, 2000.

Narvios A. Spontaneous Loss or Reactivation of Atypical RBC Alloantibodies in Cancer Patients **CURRENT ISSUES IN TRANSFUSION MEDICINE** Volume 10, Number 3 The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, 2002

NATUKUNDA, B. et al. Prevalence and specificities of red blood cell alloantibodies in transfused Ugandans with different diseases. *Vox Sanguinis*, v. 98, p. 167-71, 2010.

Natukunda B. Post-transfusion and maternal red blood cell alloimmunization in Uganda. Master degree in Public Health Science, Leiden University, 2013

NOVARETTI, M. C. Z. Investigação Laboratorial em Pacientes com Anticorpos Eritrocitários. In: BORDIN, J. O.; LANGHI JÚNIOR, D. M.; COVAS, D. T. Hemoterapia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. p. 186-89.

Oliveira M., Ribeiro F.C., Vizzoni A.G. Conceitos básicos e aplicados em imunohematologia - Rio de Janeiro: EPSJV, 2013.

Reisner R, Butler G, Bundy K, Moore SB. Comparison of the polyethylene glycol antiglobulin test and the use of enzymes in antibody detection and identification. *Transfusion* 1996; 36: 487-9.

Ronald F. Pinheiro; Maria de Lourdes L. F. Chauffaille.
Síndromemielodisplásica secundária à quimio ou radioterapia – SMD relacionada a tratamento Rev. Bras. Hematol.Hemoter. vol.28 no.3 São José do Rio Preto July/Sept. 2006.

SANTOS, F. W. R. et al. Post-transfusion red alloimmunization in patients with acute disorders and medical emergencies. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, p. 369-72, 2007.

SCHONEWILLE, H. et al. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. *Transfusion*, v. 46, p. 250-56, 2006

Schonewille H., Haak H.L., Zijl A.M. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion* 1999;39:763-771

Shin J.H., Lee J. Y., Kim J. H., Kim H. R., Lee J. N. Screening and Identification of Unexpected Red Cell Antibodies by Simultaneous LISS/Coombs and NaCl/Enzyme Gel Methods. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 632-5

Shin J.W. Unexpected red cell antibody detection by conditional combination of LISS/Coombs and NaCl/Enzyme gel tests at a tertiary care hospital in Korea: A 5-year study Blood Research 2013;48:217-21

Solh Z., Nancy M. Heddle N. M. Transfusion-Related Alloimmunization in Children: Epidemiology and Effects of Chemotherapy. McMaster University MASTER OF SCIENCE (2015) Hamilton, Ontario (Health Research Methodology)

Takeshita A., Adachi M., Kim D., Han,K. Differences in transfusion related alloimmunity to erythrocytes between south Korea and Japan. Basic Science and Clinical Practice in Blood Transfusion: Poster III. 56th ASH annual meeting and exposition, San Francisco, CA, December, 2014

Zaman S., Chaurasia R., Chatterjee K., Thapliyal R. M. Prevalence and Specificity of RBC Alloantibodies in Indian Patients Attending a Tertiary Care Hospital. Advances in Hematology Volume 2014, Article ID 749218.

10 - APÊNDICES

(Apêndice A)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: “Avaliação da implementação da pesquisa de anticorpos irregulares com hemácias tratadas com enzima nos exames pré-transfusionais de pacientes com neoplasia maligna de mama do Instituto Nacional do Câncer.”

Pesquisador responsável: Renato Nascimento da Costa

Instituição responsável pela Pesquisa: Hemocentro de Ribeirão Preto

Endereço: Rua tenente Catão Roxo, 2501 – Vista Alegre, Ribeirão Preto, SP

Tel.: (16) 2101-9300

Nome dos orientadores: Rodrigo do Tocantis Calado de Saloma Rodrigues

Flávia Leite Souza Santos

1. Eu, Renato Nascimento da Costa, Biomédico, venho pedir sua participação voluntária na pesquisa “Avaliação da implementação da pesquisa de anticorpos irregulares com hemácias tratadas com enzima nos exames pré-transfusionais de pacientes com neoplasia maligna de mama do Instituto Nacional do Câncer.”, a ser feita sob a orientação do Profs. Dr. Rodrigo do Tocantis Calado de Saloma Rodrigues e Msc. Dra. Flávia Leite Souza Santos do Departamento de Imunohematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto. Leia com atenção as informações abaixo antes de concordar.
2. Esta pesquisa tem como objetivo em introduzir na rotina transfusional a técnica enzimática da pesquisa de anticorpos irregulares, com o benefício de promover o aumento da segurança transfusional de pacientes com câncer de mama do hospital do Câncer III do INCA, evitando-se reações transfusionais.
3. Para a realização da **pesquisa**, serão utilizadas 2 tubos com EDTA, onde serão coletados 8 ml de sangue proveniente de veia periférica do braço, ou seja, uma quantidade equivalente a 2 colheres de chá. A aplicação do teste será realizada em amostras de sangue de rotina, não sendo necessária a realização de coletas adicionais. O sangue destinado á pesquisa será adequadamente preservado em geladeira na agência transfusional do hospital do Câncer III, sendo que o material será totalmente descartado ao término do estudo. A aplicação do novo teste estará sob a minha responsabilidade. Será fornecido, também, um questionário para obter dados referentes a seus antecedentes transfusionais e gestacionais. Essas informações, também, poderão ser obtidas a partir do acesso a seus registros médicos pela equipe de pesquisadores envolvidos, caso seja necessário.

4. O seu tratamento será exatamente o mesmo caso vc participe ou não deste estudo. O exame para a **pesquisa** não apresenta riscos biológicos, uma vez que o sangue será colhido usando-se material descartável e realizado por médicos (as) ou profissionais do HCIII habituados a colher sangue. As punções venosas para exames laboratoriais, que são parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor e desconforto no local da punção ou manchas roxas transitórias chamadas de equimoses.

5. A senhora poderá se retirar desse estudo no momento que desejar, assim como pedir qualquer tipo de informação que julgar necessária durante e após a realização da pesquisa. Sua identidade será mantida em segredo (sigilo) e o sangue coletado será identificado por código numérico específico. Os resultados poderão ser apresentados em um ou mais artigos a serem publicadas em revistas científicas (nacionais e internacionais) e divulgadas em congressos, simpósios, reuniões científicas, conferências, mesas redondas (nacionais e internacionais), salas de aula e etc., sempre sendo mantido o sigilo de identidade.

6. Após o término da pesquisa iremos comparar os resultados obtidos pela adição do novo teste com a rotina atual, sendo que a análise e interpretação dos dados e resultados serão de minha responsabilidade e de meus orientadores do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Eu, por intermédio deste termo, dou livremente meu consentimento para participar neste projeto.

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Data: ____ / ____ / ____

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste projeto de pesquisa ao participante para consentir pelo mesmo. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido.

Nome do Pesquisador: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

Data: ____ / ____ / ____

Rúbrica do participante: _____

Rúbrica do pesquisador: _____

(Apêndice B)

Projeto: “ Avaliação da implantação da pesquisa de anticorpos irregulares com hemácias tratadas com enzima nos exames pré-transfusionais de pacientes com neoplasia maligna de mama”

Data: ___/___/___

Idade: _____ Data de nascimento: ___/___/___ Raça: _____

Data de triagem: ___/___/___

Tipo de tratamento atual: _____ Setor de atendimento: _____

- 1) Data de Menopausa: _____ Apresentava quantos anos; _____ Número de gestações: _____
- 2) Número de abortos: _____ Espontâneos () Provocados ()
- 3) Data do último parto(DUP): ___/___/___
- 4) Apresenta histórico de doença hemolítica perinatal
() Sim () Não () Não sabe
- 5) Número de filhos Rh positivos _____ Não sabe()
- 6) Fez uso de imunoglobulina Anti-D nos últimos 3 meses:
() Sim () Não () Não sabe
- 7) Tem conhecimento do seu grupo sanguíneo: Caso resposta positiva, por favor responda qual: _____ () Não () Não sabe
- 8) Realizou alguma transfusão de sangue externamente ao Instituto Nacional do Câncer: () Sim () Não () Não Sabe
- 9) Em caso de resposta afirmativa do tópico 9, a transfusão apresentou-se após a menarca: () Sim () Não () Não Sabe

Nº de transfusões (externo): ___CH: () PFC: () CP5:() CR:()

Nº de transfusões (interno): ___CH: () PFC: () CP5:() CR:()

(Apêndice C)

Modelo de aplicação
Testes Imunohematológicos

Paciente: _____

Matrícula: _____ Ordem de serviço da amostra (institucional): _____

data de coleta: ____/____/____ data de realização do exame: ____/____/____

A____ B____ AB____ DVI+____ DVI-____ a1____ b____

Grupo sanguíneo: ABO: ____ RhD: _____ D Fraco: _____

P.A.I	I	II	III	AC
4°C				
AGH				
ENZ				

Painel de hemácias – Biorad – 37° C Coombs e/ou enzima a 37°C (GEL)

AGH 1____ 2____ 3____ 4____ 5____ 6____ 7____ 8____ 9____ 10____ 11____

ENZ 1____ 2____ 3____ 4____ 5____ 6____ 7____ 8____ 9____ 10____ 11____

Especificidade: _____

Painel de hemácias – Biorad – 4°C (GEL)

Neutro 1____ 2____ 3____ 4____ 5____ 6____ 7____ 8____ 9____ 10____ 11____

Especificidade: _____ Titulação: _____

Painel de hemácias papainizadas – Biorad – 37°C (TUBO)

Neutro 1____ 2____ 3____ 4____ 5____ 6____ 7____ 8____ 9____ 10____ 11____

Especificidade: _____

Pesquisa de rouleaux; () Positiva () Negativa

Fenotipagem Eritrocitária: De acordo com a especificidade encontrada do anticorpo

FLUXOGRAMA 1

ATIVIDADES DA AGÊNCIA TRANSFUSIONAL HCIII

