

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Mariana Martins Godin

**ENSAIO DA MONOCAMADA DE MONÓCITOS PARA O ESTUDO DO
SIGNIFICADO CLÍNICO DE ALO E AUTOANTICORPOS
ANTIERITROCITÁRIOS EM PACIENTES ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO
HEMOMINAS – BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS**

Belo Horizonte
2023

Mariana Martins Godin

**ENSAIO DA MONOCAMADA DE MONÓCITOS PARA O ESTUDO DO
SIGNIFICADO CLÍNICO DE ALO E AUTOANTICORPOS
ANTIERITROCITÁRIOS EM PACIENTES ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO
HEMOMINAS – BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obter o grau de Doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luci Maria Sant'Ana
Dusse

Coorientadora: Dr^a Luciana Cayres Schmidt

Belo Horizonte
2023

G585e Godin, Mariana Martins.
Ensaio da monocamada de monócitos para o estudo do significado clínico de alo e autoanticorpos antieritrocitários em pacientes atendidos na Fundação Hemominas – Belo Horizonte - Minas Gerais [recurso eletrônico] / Mariana Martins Godin. – 2023.

1 recurso eletrônico (99 f.: il.): pdf

Orientadora: Luci Maria Sant'Ana Dusse.

Coorientadora: Luciana Cayres Schmidt.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Ensaio – Teses. 2. Sangue – Transfusão – Teses. 3. Reação transfusional – Teses. 4. Isoanticorpos – Teses. 5. Autoanticorpos – Teses. I. Dusse, Luci Maria Sant'Ana. II. Schmidt, Luciana Cayres. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.65



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

ENSAIO DA MONOCAMADA DE MONÓCITOS PARA O ESTUDO DO SIGNIFICADO CLÍNICO DE ALO E AUTOANTICORPOS ANTIERITROCITÁRIOS EM PACIENTES ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS

MARIANA MARTINS GODIN

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 19 de dezembro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Luci Maria Sant Ana Dusse - Orientadora
UFMG

Profa. Luciana Cayres Sches Schmidt - Coorientadora
UFMG

Profa. Mária das Graças Carvalho
UFMG

Profa. Ana Paula Lucas Mota
UFMG

Profa. Salvina Maria de Campos
FAMINAS

Profa. Marina Lobato Martins
Hemominas

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2023.

Dedico este trabalho

*A Deus, por me abençoar e me dar força para iniciar e concluir essa caminhada tão
desafiadora.*

Aos pacientes e doadores de sangue, por tamanha contribuição no avanço da ciência.

*Às minhas queridas orientadoras, Prof^a Luci Dusse e Dr^a Luciana Cayres,
pela atenção e ensinamentos durante todo o processo.*

Aos meus pais e irmãs, pelo amor, compreensão da jornada e apoio incondicionais.

Ao meu namorado, Bruno Morelli, pelo amor, ânimo e constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me capacitar e me conceder saúde para cumprir mais essa etapa da minha vida, mesmo durante um período tão desafiador e incerto, como foi a Pandemia da COVID-19.

Ao meu pai, Ismar Godin e à minha mãe, Zélia Martins Godin, por acreditarem na minha capacidade e por me apoiarem em todas as situações.

Às minhas irmãs, Juliana Martins Godin e Adriana Martins Godin, que me incentivaram a encarar mais esse desafio e por me ajudarem sempre, presencialmente ou mesmo à distância.

À minha querida orientadora, Prof^a Luci Maria Sant'Ana Dusse, pelo suporte e pela vasta experiência transmitida a mim por meio de seus ensinamentos.

À minha querida coorientadora, Dr^a Luciana Cayres Schmidt, por acreditar na proposta da pesquisa e por me apoiar de forma incondicional na sua execução.

À Fundação Hemominas, por aceitar a proposta de ser instituição coparticipante do projeto e pelo suporte financeiro.

Ao Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas, pela aquisição de reagentes para a execução do estudo e pelo suporte nas dúvidas que surgiram ao longo do tempo.

Às equipes dos setores de Fracionamento e Hematologia da Fundação Hemominas, pela presteza em me auxiliar na obtenção das bolsas de sangue e na disponibilização de equipamentos necessários aos testes.

À professora Ilka Afonso Reis, coordenadora do Projeto de Extensão LabEst do Instituto de Ciências Exatas (ICEx) da UFMG, e os alunos da disciplina “Laboratório de Estatística”, Igor Emerenciano Silveira Braga e Marcel Zanetti de Carvalho, pelo suporte das análises estatísticas e nas dúvidas relacionadas aos resultados.

À Dr^a Maria Clara Fernandes da Silva Malta, pelo suporte durante o período da submissão do artigo científico, assim como pelas contribuições na revisão final do texto.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A transfusão de concentrado de hemácias é uma terapia de suporte à vida, sendo fundamental no tratamento da anemia ou da perda de sangue. Todavia, existem riscos associados à hemotransfusão, como a ocorrência de reação transfusional hemolítica causada por anticorpos. Na rotina dos serviços de Hemoterapia, com relativa frequência surgem pacientes que desenvolveram alo ou autoanticorpos antieritrocitários tornando, muitas vezes, impossível encontrar hemácias compatíveis para a transfusão segura. Neste contexto, a Doença Falciforme destaca-se por apresentar taxas muito mais altas de aloimunização como resultado da exposição a hemácias de doadores. Dessa forma, é crucial a disponibilização de testes que contribuam para a decisão médica quanto à autorização de transfusões quando não há hemácias compatíveis. O Ensaio da Monocamada de Monócitos (MMA) foi proposto como uma ferramenta promissora para a distinção entre alo e autoanticorpos antieritrocitários clinicamente significantes dos insignificantes. O objetivo deste estudo foi avaliar o MMA na rotina da Central de Imuno-Hematologia da Fundação Hemominas para a definição do significado clínico de alo e autoanticorpos antieritrocitários em pacientes atendidos pelo serviço, após padronização e validação do ensaio. Foram estudados três grupos de pacientes: 1. Pacientes do sexo feminino, incluindo gestantes, que desenvolveram aloanticorpos inespecíficos (n=8); 2. Pacientes que apresentavam aloanticorpos direcionados a antígenos de alta frequência populacional (n=15); 3. Pacientes que apresentavam autoanticorpos (n=40). A grande maioria dos aloanticorpos direcionados a antígenos de alta frequência na população, bem como dos autoanticorpos não foi clinicamente relevante pelo MMA. Esse entendimento pode evitar a necessidade de se buscar sangue raro no estado e até mesmo na rede nacional, agilizando o atendimento hemoterápico de pacientes que não dispõem de bolsas compatíveis. Não houve correlação entre a intensidade de reação da prova de compatibilidade ou do Coombs direto pós-adsorção do anticorpo e os resultados positivos para o MMA. Isso reforça a conduta de não liberar sangue “menos incompatível” para o paciente, na prática transfusional. Além disso, o acompanhamento, pelo MMA, de gestante aloimunizada por Anti-M, cujo feto apresentou Doença Hemolítica Perinatal, abriu caminho para a importância desse ensaio no contexto materno-fetal. Os resultados advindos do presente estudo permitem concluir que foi possível prestar assistência hemoterápica para pacientes sem bolsas compatíveis, além de apontar um caminho promissor de aplicação do MMA no acompanhamento obstétrico.

PALAVRAS-CHAVE: ensaio da monocamada de monócitos; reação transfusional hemolítica; aloanticorpos; autoanticorpos; significado clínico.

ABSTRACT

Transfusion of red blood cells is a life-sustaining therapy and is essential in the treatment of anemia or blood loss. However, there are risks associated with blood transfusion, such as the occurrence of a hemolytic transfusion reaction caused by antibodies. In the routine of Hemotherapy services, patients relatively frequently appear who have developed anti-erythrocyte allo- or autoantibodies, often making it impossible to find compatible red blood cells for safe transfusion. In this context, Sickle Cell Disease stands out for presenting much higher rates of alloimmunization as a result of exposure to donor red blood cells. Therefore, it is crucial to provide tests that contribute to medical decisions regarding the authorization of transfusions when there are no compatible red blood cells. The Monocyte Monolayer Assay (MMA) has emerged as a promising tool for distinguishing clinically significant anti-erythrocyte allo- and autoantibodies. The objective of this study was to evaluate MMA in the routine of the Central de Imuno-Hematologia of Fundação Hemominas to define the clinical significance of anti-erythrocyte allo and autoantibodies in patients treated there, after assay standardization and validation. Three groups of patients were studied: 1. Female patients, including pregnant women, who developed nonspecific alloantibodies (n=8); 2. Patients who had alloantibodies directed to high population frequency antigens (n=15); 3. Patients who had autoantibodies (n=40). The vast majority of alloantibodies directed to high-frequency antigens in the population, as well as autoantibodies, were not clinically relevant by MMA. This understanding can avoid the need to search for rare blood in the state and even nationally, speeding up hemotherapy care for patients who do not have compatible red blood cells. There was no correlation between the reaction intensity of the cross match test or Direct Antiglobulin Test post antibody adsorption and the positive results for MMA. This reinforces the practice of not releasing “less incompatible” blood to the patient in transfusion practice. Furthermore, the monitoring, by MMA, of a pregnant woman alloimmunized by Anti-M, whose fetus presented Perinatal Hemolytic Disease, paved the way for the importance of this test in the maternal-fetal context. The results from the present study allow us to conclude that it was possible to provide hemotherapy assistance to patients without compatible red blood cells, in addition to pointing out a promising path for applying MMA in obstetric monitoring.

KEYWORDS : monocyte monolayer assay; hemolytic transfusion reaction; alloantibodies; autoantibodies; clinical significance.

LISTA DE TABELAS

1- Resultados do <i>Monocyte Index</i> para a repetibilidade intraensaio para amostras-controle.....	46
2- Resultados do <i>Monocyte Index</i> para a repetibilidade interensaio para amostras-controle.....	47
3- Resultados da análise estatística da precisão do ensaio com amostras-controle.....	47
4- Resultados do <i>Monocyte Index</i> para avaliação da repetibilidade intraensaio para amostra biológica humana com Anti-D.....	48
5- Resultados do <i>Monocyte Index</i> para avaliação da repetibilidade interensaio para amostra biológica humana com Anti-D.....	48
6- Resultados da análise estatística da precisão do ensaio empregando-se amostra humana com Anti-D.....	49
7- Resultados do <i>Monocyte Index</i> na avaliação do efeito matriz.....	49
8- Resultados do <i>Monocyte Index</i> na avaliação da linearidade.....	50
9- Resultados das estatísticas derivadas da regressão linear simples.....	52
10- Resultados do teste de Levene para o modelo linear.....	53
11- Resultados do teste de Shapiro-Wilk para a normalidade dos resíduos.....	53
12- Intervalos de confiança para o modelo de regressão.....	54
13- Resultados dos <i>Monocyte Index</i> obtidos para os Concentrados de Hemácias testados para pacientes.....	55
14- Resultados dos <i>Monocyte Index</i> obtidos para amostra de gestante aloimunizada cujo feto apresentou Doença Hemolítica Perinatal.....	57
15- Grupo 1: resultados do <i>Monocyte Index</i> e associação com outras variáveis.....	59
16- Grupo 1: comparação da distribuição dos valores do <i>Monocyte Index</i> (%) segundo outras variáveis.....	60
17- Grupo 2: resultados do <i>Monocyte Index</i> e associação com outras variáveis.....	64
18- Grupo 2: comparação da distribuição dos valores do <i>Monocyte Index</i> (%) segundo outras variáveis.....	65
19- Grupo 3: resultados do <i>Monocyte Index</i> e associação com outras variáveis.....	69
20- Grupo 3: comparação da distribuição dos valores do <i>Monocyte Index</i> (%) segundo outras variáveis.....	71
21- Correlação de Spearman entre Prova de Compatibilidade e <i>Monocyte Index</i> para os três grupos.....	75
22- Correlação de Spearman entre Teste Direto da Antiglobulina pós-adsorção e <i>Monocyte Index</i> para os três grupos.....	76

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ilustração de antígenos de grupos sanguíneos presentes na membrana da hemácia.....	20
Figura 2 - Estruturas dos isotipos de imunoglobulinas.....	21
Figura 3- Mecanismos de destruição de hemácias por ligação de antígenos e complemento.....	24
Figura 4- Destruição ou alteração da hemácia mediada por anticorpos.....	29
Figura 5- Intensidades de aglutinação das reações antígeno-anticorpo pela método gel-teste.....	29
Figura 6- Representação esquemática da etapa de isolamento e adesão dos monócitos.....	39
Figura 7- Representação esquemática da etapa de opsonização do anticorpo à hemácia.....	40
Figura 8- Representação esquemática da etapa de realização do ensaio até a leitura da lâmina.....	41
Figura 9- Estação de trabalho para a realização do ensaio na Central de Imuno-Hematologia.....	43
Figura 10- Imagens microscópicas dos controles positivo e negativo.....	45
Figura 11- Gráfico de dispersão dos valores do <i>Monocyte Index</i> versus título do anticorpo.....	51
Figura 12- Gráfico de dispersão dos valores do <i>Monocyte Index</i> versus logaritmo de base 2 versus título do anticorpo.....	51
Figura 13- Gráfico de análise de resíduos do modelo linear – resíduos versus título do anticorpo.....	52
Figura 14- Gráfico QQ-plot dos resíduos no modelo linear.....	53
Figura 15- Distribuição da variável Prova de Compatibilidade pelo <i>Monocyte Index</i> , para os três grupos.....	75
Figura 16- Distribuição da variável Teste Direto da Antiglobulina pós-adsorção pelo <i>Monocyte Index</i> , para os três grupos.....	76
Quadro 1- Interpretação dos resultados do <i>Monocyte Index</i>	32
Quadro 2- Isolamento e adesão dos monócitos.....	38
Quadro 3- Opsonização das hemácias pré-selecionadas.....	39
Quadro 4- Ensaio da Monocamada de Monócitos.....	40
Quadro 5- Alterações propostas no protocolo experimental com relação ao protocolo original.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AHAI	Anemia hemolítica autoimune
C3	Fração C3 do complemento
C3b	Fração C3b do complemento
C3bg	Fração C3bg do complemento
CAM	Complexo de ataque à membrana
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas
CHF	Concentrado de Hemácias Fenotipadas
CHM	Concentrado de Hemácias
CIH	Central de Imuno-Hematologia
CN	Controle negativo
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
CP	Controle positivo
DF	Doença Falciforme
DHPN	Doença Hemolítica Perinatal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fc γ R	Receptor do tipo gama para fragmento Fc de IgG
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC	Intervalo de Confiança
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina isotipo G
IgM	Imunoglobulina isotipo M
IgA	Imunoglobulina isotipo A
IgD	Imunoglobulina isotipo D
IgE	Imunoglobulina isotipo E
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
MI	<i>Monocyte Index</i>
MMA	<i>Monocyte Monolayer Assay</i>
M Φ	Macrófago
n	Número amostral
PAI	Pesquisa de anticorpos irregulares

PC	Prova de compatibilidade
POP	Procedimento Operacional Padrão
RTH	Reação transfusional hemolítica
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
ST	Sangue total
TAD	Teste da Antiglobulina Direto
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA.....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1 Descoberta dos grupos sanguíneos: breve histórico.....	19
3.2 Aspectos imunológicos da transfusão de hemácias.....	20
3.3 Importância clínica de aloanticorpos.....	25
3.4 Aspectos relacionados à transfusão de Concentrado de Hemácias incompatível.....	26
3.5 Ensaio imunológicos para a previsão do significado clínico de anticorpos.....	27
3.6 Testes pré-transfusionais obrigatórios.....	29
3.7 Ensaio da Monocamada de Monócitos.....	30
4 OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo Geral.....	35
4.2 Objetivos Específicos.....	35
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1 Aspecto éticos.....	36
5.2 Delineamento do estudo.....	36
5.3 Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa.....	36
5.4 Protocolo experimental.....	37
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1 Padronização do ensaio	43
6.2 Validação do ensaio.....	45
6.2.1 Avaliação da precisão com amostras-controle.....	46
6.2.2 Avaliação da precisão com amostras biológicas.....	48
6.2.3 Avaliação da seletividade.....	49
6.2.4 Avaliação da linearidade.....	50
6.2.5 Avaliação de desfechos de pacientes	54
6.3 Grupo 1: avaliação do significado clínico de anticorpos inespecíficos.....	59
6.4 Grupo 2: avaliação do significado clínico de anticorpos direcionados a antígenos de alta frequência populacional	63
6.5 Grupo 3: avaliação do significado clínico de autoanticorpos da classe IgG.....	68

6.6 Correlação de Spearman para a relação entre MI versus TAD e PC.....	75
6.7 Propostas para integrar o MMA na rotina laboratorial da CIH.....	77
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	79
9 CONCLUSÕES.....	79
10 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS.....	80
11 RELAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA	80
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A transfusão de hemácias é considerada uma das intervenções terapêuticas mais comuns em pacientes hospitalizados. Entretanto, essa terapia não está isenta de riscos, especialmente a aloimunização, que consiste na produção de anticorpos direcionados a antígenos não-próprios do indivíduo. Os chamados aloanticorpos antieritrocitários podem ser formados após a exposição prévia do receptor à hemotransfusão, em mulheres durante a gestação e até mesmo após o transplante de órgãos. Uma vez produzidos, esses anticorpos criam situação de alerta diante da necessidade transfusional, pois podem dificultar a identificação de um concentrado de hemácias (CHM) compatível, além de terem o potencial de provocar reação transfusional hemolítica (RTH). Podem, ainda, ser responsáveis por consequências devastadoras no contexto materno-fetal, sendo capazes de desencadear a Doença Hemolítica Perinatal (DHPN).

Outra situação desafiadora no campo da Medicina Transfusional é a presença de autoanticorpos antieritrocitários em pacientes que necessitam de transfusão de hemácias. Os chamados autoanticorpos são direcionados a antígenos que estão expressos nas hemácias do próprio paciente, independentemente de transfusões ou gestações prévias. Os autoanticorpos estão comumente presentes em pacientes que apresentam Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI) e, frequentemente, não é possível determinar a sua especificidade devido a limitações da metodologia sorológica e por serem direcionados a antígenos amplamente expressos na população em geral. Uma das principais dificuldades no atendimento hemoterápico a pacientes que apresentam autoanticorpos antieritrocitários é a indisponibilidade de CHM compatível e a incerteza acerca do seu significado clínico, o que leva o médico a ter que se responsabilizar pela decisão de autorizar ou não uma transfusão incompatível ao paciente.

A prova de compatibilidade (PC) ou prova cruzada é um teste pré-transfusional obrigatório *in vitro* que consiste em colocar o soro do receptor em contato com a hemácia a ser transfundida. Se houver algum anticorpo no soro do paciente direcionado a antígeno presente na hemácia do doador, haverá a ligação anticorpo-antígeno. O resultado advindo dessa ligação permite classificar a transfusão como compatível ou incompatível, a partir da observação macroscópica da reação de hemaglutinação. Tanto alo quanto autoanticorpos podem levar à incompatibilidade no teste pré-transfusional, sendo que muitas vezes não é sabido se o anticorpo envolvido possui

verdadeiramente importância clínica a ser considerada. Essa dúvida persistente pode gerar atraso transfusional, agravando o estado de saúde do paciente.

Seja pela presença de alo ou autoanticorpos antieritrocitários, quando o objetivo é determinar o significado clínico de determinado anticorpo, os testes sorológicos disponíveis nos serviços de imuno-hematologia são, muitas vezes, insuficientes para dar essa resposta. Soma-se a isso o fato de que a presença de um anticorpo no receptor de CHM que não pode ser compatibilizado, gera insegurança por parte dos profissionais envolvidos. Não há um respaldo adicional com relação ao risco de hemólise pós-transfusional a que o paciente estará exposto.

A Central de Imuno-Hematologia (CIH) da Fundação Hemominas é o serviço de referência no estado de Minas Gerais e se localiza no Hemocentro de Belo Horizonte. Esse serviço atende a um número expressivo de pacientes que necessitam de transfusão de sangue. Rotineiramente, amostras oriundas de todas as regiões de Minas Gerais são recebidas na CIH para a realização ou atualização do estudo imuno-hematológico, que inclui a pesquisa e identificação de anticorpos irregulares, a fenotipagem eritrocitária (quando indicado), dentre outros testes. A Fundação Hemominas também provê a triagem de concentrado de hemácias fenotipadas (CHF) para pacientes com perfis fenotípicos específicos que necessitam de receber esse tipo de hemocomponente. Existem protocolos estabelecidos na Fundação para atender a demanda de pacientes politransfundidos, em especial aqueles que já são aloimunizados e cuja doença de base justifique uma seleção mais criteriosa do CHF.

Na rotina laboratorial, métodos sorológicos e moleculares estão disponíveis para auxiliar na identificação de anticorpos antieritrocitários. Ainda assim, alguns casos podem permanecer inconclusivos, resultando em atraso no atendimento à necessidade transfusional do paciente. Eventualmente, na tentativa de elucidar o caso, torna-se necessário até mesmo o envio da amostra do paciente a laboratórios externos de referência. No entanto, o retorno do resultado é quase sempre demorado, tendo em vista que casos complexos demandam tempo (até meses) para serem elucidados, além de dependerem da *expertise* de profissionais experientes e com elevado conhecimento em imuno-hematologia.

Dessa forma, no campo da Medicina Transfusional, quando o objetivo é determinar o significado clínico de determinado alo/autoanticorpo antieritrocitário, os testes sorológicos e moleculares nem sempre são suficientes.

Considerando que a CIH da Fundação Hemominas é o serviço de referência em imunohematologia no estado, seria de grande relevância a implementação de um teste que contribuísse efetivamente para a identificação de alo e autoanticorpos clinicamente significativos. Isso permitirá um suporte, ao médico, diante da difícil decisão em autorizar ou não uma transfusão de CHM a pacientes que apresentam situações imunológicas complexas, como a presença de múltiplos aloanticorpos, anticorpos de especificidade não determinada pelos testes de rotina, aloanticorpos direcionados a antígeno de alta frequência populacional e de autoanticorpos antieritrocitários associados a testes pré-transfusionais incompatíveis.

O Ensaio da Monocamada de Monócitos (do inglês, *Monocyte Monolayer Assay* – MMA) consiste em um ensaio celular empregado para prever o significado clínico de anticorpos antieritrocitários da classe IgG, tendo em vista que esses anticorpos podem desencadear RTH e DHPN. Esse ensaio é internacionalmente reconhecido como sendo capaz de dar suporte à clínica no entendimento acerca da importância transfusional ou gestacional de determinado anticorpo.

O MMA vem sendo estudado há mais de 40 anos pelo seu uso potencial na diferenciação entre alo e autoanticorpos da classe IgG clinicamente significantes dos insignificantes. Sabe-se que a presença de aloanticorpos cria situações desafiadoras no tratamento hemoterápico, especialmente nos pacientes que dependem de transfusões frequentes de CHF, como os portadores de Doença Falciforme (DF). Nesses pacientes, é frequente a detecção de múltiplos aloanticorpos, uma vez que seu estado inflamatório ativado contribui para essa resposta.

Muitos pacientes são, ainda, submetidos à politransusão ao longo da vida, aumentando também o risco de produção de autoanticorpos. Certamente, a presença de aloanticorpos em pacientes com DF aumenta significativamente o risco de reações transfusionais hemolíticas, incluindo reações de hiper-hemólise imunologicamente mediadas. Atrasos na busca por um CHF compatível contribuem para o aumento do risco de desfechos desfavoráveis nesse grupo de pacientes. Dessa forma, ainda que a PC seja positiva, o MMA pode auxiliar na seleção mais segura de um CHM a ser oferecido a receptores que vivem essa realidade. Considerando a frequência elevada de pacientes portadores de DF em Minas Gerais, que são atendidos na Fundação Hemominas, esse estudo assume grande relevância.

2 JUSTIFICATIVA

A relevância do presente estudo para o Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas fundamenta-se, sobretudo, na possibilidade de aproximar o conhecimento científico acadêmico, adquirido em uma instituição pública de ensino, da assistência direta à população rotineiramente atendida em uma instituição pública da área da saúde. Essa parceria resulta na aplicação direta do conhecimento gerado em prol da população, com benefícios inquestionáveis para a hemotransfusão.

A Fundação Hemominas é uma instituição pública do estado de Minas Gerais, vinculada à Secretaria de Estado da Saúde, que se destaca pelo seu importante papel em garantir a oferta de sangue e hemoderivados de qualidade para mais de 90% da população mineira. Atua, inclusive, desenvolvendo atividades nas áreas de prestação de serviço, assistência médica, ensino, pesquisa, desenvolvimento tecnológico, produção, controle da qualidade e educação sanitária. Dentre as áreas do conhecimento oferecidas para a prestação de um serviço hemoterápico de qualidade, a Imuno-Hematologia ocupa lugar de destaque, considerando os riscos associados à hemotransfusão, como a ocorrência de RTH. Além disso, o entendimento acerca da relação feto-materna também configura um grande desafio aos profissionais da área, considerando a associação de anticorpos maternos com a ocorrência da DHPN.

Dessa forma, é imprescindível a implementação na Central Imuno-Hematologia (CIH), de testes que auxiliem a decisão médica quanto à autorização ou não transfusões de hemácias quando não há hemocomponentes compatíveis para o atendimento ao paciente, bem como contribuam na elucidação de casos de DHPN.

A proposta do presente estudo surgiu da necessidade de prover conhecimento científico acerca da importância clínica de alo e autoanticorpos antieritrocitários nos pacientes atendidos pela Hemominas, o que muitas vezes é um desafio para a CIH, gerando apreensão e insegurança para os profissionais do setor e, especialmente, para os médicos que prescreverão o hemocomponente e que acompanharão o desfecho de cada caso.

O MMA constitui um teste grande importância para a distinção de alo e autoanticorpos antieritrocitários clinicamente significativos, pois permite selecionar de forma mais segura um CHM incompatível. Esse ensaio tem sido aplicado de forma promissora, ainda, no acompanhamento de gestantes aloimunizadas, cujo feto apresente evidência clínica de anemia, fora do contexto de incompatibilidade RhD.

Cumprе ressaltar que, no Brasil, poucos são os hemocentros que disponibilizam o MMA, sendo a Fundação Pró-Sangue de São Paulo (SP) o serviço de referência na execução desse. Por diversas vezes, a Hemominas, diante de casos complexos que não puderam ser resolvidos utilizando as técnicas disponíveis, teve que recorrer à Fundação Pró-Sangue. No entanto, o envio de amostras de pacientes atendidos na Hemominas para essa Fundação é oneroso para o estado. Além disso, a liberação do resultado é demorada, em função da grande demanda desse serviço no atendimento aos pacientes de São Paulo e região.

Dessa forma, a implementação do MMA na Fundação Hemominas é urgente e absolutamente necessária para avançar na qualidade dos serviços ofertados à população de Minas Gerais, suprir a demanda local e posicionar esse serviço como um centro de referência nacional no atendimento hemoterápico e, de forma bastante promissora, no acompanhamento materno-fetal em casos de DHPN associada a outros aloanticorpos que não o Anti-D.

Está bem estabelecido que o MMA contribui para a previsão de riscos de RTH associadas a aloanticorpos e autoanticorpos da classe IgG. Destaca-se, ainda, sua potencial aplicação no acompanhamento materno-fetal diante da ocorrência da DHPN e, surpreendentemente, na tomada da decisão clínica em se iniciar o tratamento da gestante com imunossuppressores, de modo a postergar a interrupção da gravidez, quando do envolvimento de autoanticorpos maternos com hemólise fetal, o que contribui significativamente para a sobrevivência do feto e do recém-nascido.

É importante destacar que, após a implementação do MMA na Fundação Hemominas, já foi possível prestar suporte transfusional a tempo de contribuir para a realização de cirurgias críticas em dois pacientes que apresentavam, respectivamente, um aloanticorpo raro e autoanticorpos, sem a disponibilidade de CHM compatíveis. O ensaio permitiu, ainda, atendimento hemoterápico seguro no preparo, para o parto, de gestante com DF, polialoimunizada e que apresentava anticorpo cuja especificidade não pode ser determinada nos testes sorológicos de rotina. Soma-se a isso, a realização de acompanhamento de gestante aloimunizada, empregando-se o MMA, no sentido de contribuir para a elucidação do envolvimento de aloanticorpo rotineiramente não associado à ocorrência de DHPN.

Tendo em vista o grande alcance da Fundação Hemominas no atendimento hemoterápico prestado para a população de Minas Gerais, o presente estudo apresenta importância inquestionável para a elucidação da relevância de anticorpos, seja na prática transfusional, seja na investigação da relação feto-materna. Tal conhecimento certamente contribuirá para a

otimização de condutas a serem aplicadas na prática hemoterápica, bem como no avanço do conhecimento acerca da resposta imunológica envolvida no âmbito da Medicina Transfusional e do acompanhamento obstétrico. Esse estudo contribuirá, ainda, para a revisão de protocolos adotados, elevando ainda mais a segurança transfusional dos pacientes atendidos pela rede Hemominas, além de servir como referência para outros profissionais que buscam literatura na área.

2 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Descoberta dos grupos sanguíneos: breve histórico

Em novembro de 1901, um artigo publicado no *Viennese Weekly Journal of Medicine*, intitulado *Agglutination phenomena of normal human blood*, de Karl Landsteiner, marcou a descoberta dos grupos sanguíneos. Esse estudo continua representando a base da terapia transfusional, por descrever, pela primeira vez, o sistema ABO. Em 1930, Landsteiner foi premiado com o Prêmio Nobel por tamanha contribuição no campo da medicina (FIGL & PELINKA, 2004).

Inicialmente, Landsteiner discriminou os grupos sanguíneos em A, B e C (posteriormente denominado O). Ele demonstrou que o soro de uma pessoa possuía anticorpos voltados contra os antígenos ausentes em suas hemácias. O quarto grupo sanguíneo, AB, foi descrito um ano mais tarde por Decastello & Sturli (STORRY & OLSSON, 2009).

Após a descrição do sistema ABO, não houve a descrição de novos sistemas de grupos sanguíneos durante 25 anos. Em 1927, Landsteiner e Levine descreveram os sistemas MN e P, por meio da identificação de anticorpos imunes, em cobaias, direcionados aos antígenos desses sistemas. Entre os anos de 1939 e 1941, grupos diferentes de pesquisadores liderados por Landsteiner/ Wiener e Levine/ Stetson desempenharam papel fundamental na descrição dos polimorfismos observados no sistema Rh e na descrição, pela primeira vez, do anticorpo Anti-D em mulher cujo feto morreu ainda no útero materno, em decorrência da DHPN. Os demais sistemas de grupos sanguíneos foram sendo descritos à medida em que o conhecimento avançou na direção de aloanticorpos detectados no soro de pacientes transfundidos ou de mães de crianças com DHPN (KLEIN & ANSTEE, 2014).

3.2 Aspectos imunológicos da transfusão de hemácias

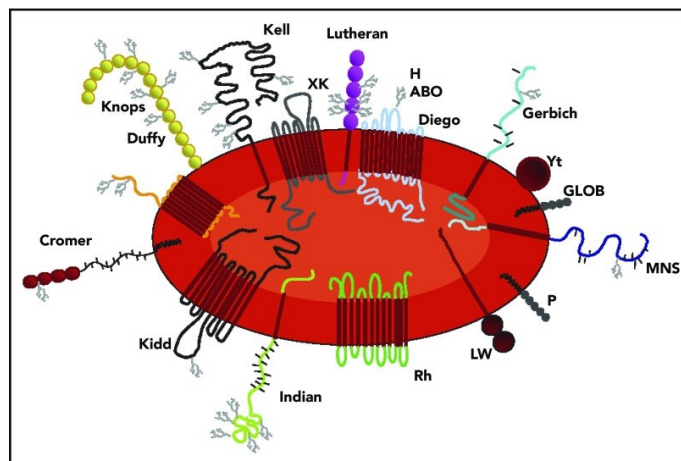
Os antígenos eritrocitários de grupos sanguíneos são estruturas polimórficas constituídas por proteínas e carboidratos que se localizam na superfície extracelular da membrana das hemácias (**Figura 1**) (REID & MOHANDAS, 2004).

De acordo com a *International Society of Blood Transfusion* (ISBT, 2023), atualmente estão descritos um total de 347 antígenos eritrocitários, distribuídos em 45 sistemas de grupo sanguíneos, geneticamente determinados por 48 genes.

Com relação aos antígenos proteicos, esses se apresentam como estruturas diversas e com funções específicas. As sequências primárias dessas proteínas são conhecidas e, na maioria dos casos, as bases moleculares dos diferentes alelos estão descritas. Já os antígenos de carboidratos se apresentam associados a proteínas (glicoproteínas) e a lipídeos (glicolipídeos), que são moléculas com epítomos de carboidratos imunodominantes, cuja síntese requer a ação de uma série de enzimas conhecidas como glicosiltransferases (KLEIN & ANSTEE, 2014).

As diversas funções dos antígenos eritrocitários incluem a manutenção da integridade estrutural da membrana da hemácia, o transporte e recepção de moléculas, atuam como componentes e reguladores do complemento, como constituintes do glicocálix, como moléculas de adesão, além de apresentarem funções enzimáticas (REID & MOHANDAS, 2004).

Figura 1 – Ilustração de antígenos de grupos sanguíneos presentes na membrana da hemácia



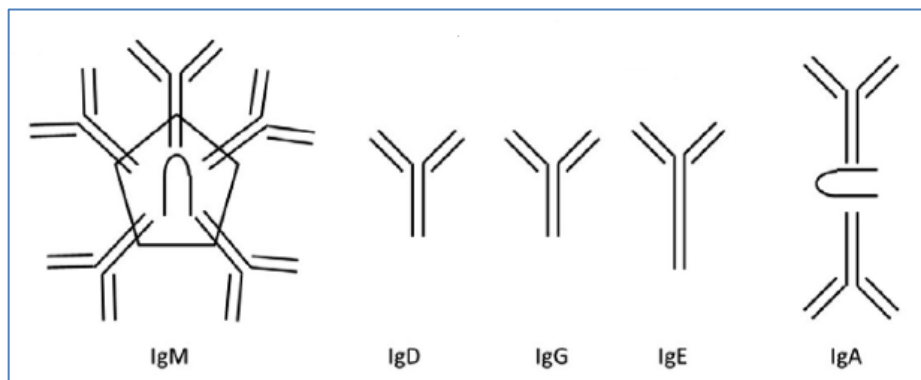
Autoria: Elisabet Sjöberg Webster. Fonte: TORMEY & HENDRICKSON (2019).

Os antígenos de grupos sanguíneos são reconhecidos a partir do momento em que há a produção de anticorpos, por indivíduos antígeno-negativos, após exposição a hemácias antígeno-positivas, seja por meio da transfusão de sangue ou da gestação (REID & MOHANDAS, 2004).

As respostas imunológicas a antígenos estranhos ao organismo podem ser de natureza inata e adaptativa. Na resposta inata, há resposta imediata como consequência do reconhecimento de patógenos por receptores específicos presentes em células fagocíticas - neutrófilos, macrófagos e células dendríticas – e citocinas/quimiocinas por elas produzidas, que induzem e mantêm o processo inflamatório. Já na resposta adaptativa, o antígeno é reconhecido por receptores específicos nos linfócitos T, que subsequentemente estimulam os linfócitos B, sendo que alguns desses não se diferenciam e permanecem, na ausência de estimulação antigênica adicional, como células de memória. Em episódio de nova estimulação antigênica, células de memória são capazes de montar uma resposta secundária (anamnésica), caracterizada pela produção mais rápida e potente de anticorpos específicos, quando comparada com a resposta inata primária. (KLEIN & ANSTEE, 2014; MURPHY & WEAVER, 2016).

Anticorpos são imunoglobulinas (Ig), ou seja, proteínas estruturalmente relacionadas e que desempenham a função de se ligar ao antígeno complementar e mediar vários efeitos biológicos. Uma característica estrutural comum a todas as moléculas de Ig é o arranjo de um par de cadeias polipeptídicas pesadas idênticas (fragmentos Fc), unidas entre si por ligações covalentes (pontes dissulfeto) e não covalentes, e um par de cadeias leves idênticas (fragmentos Fab), onde se localizam os sítios de ligação ao antígeno. Cinco classes diferentes de Ig são conhecidas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (**Figura 2**). Distinguem-se entre si pela região constante da cadeia pesada e pelo número de sítios de ligação ao antígeno e potência de suas funções efetoras. Moléculas de IgG, IgD e IgE são monoméricas, enquanto moléculas de IgM são pentaméricas e moléculas de IgA são monoméricas ou diméricas (KLEIN & ANSTEE, 2014; STOWELL & GORHAM, 2020).

Figura 2 – Estruturas dos isotipos de imunoglobulinas



Fonte: Adaptado de STOWELL & GORHAM (2020).

O termo afinidade de um anticorpo pelo seu antígeno refere-se à capacidade de ligação de um único sítio de ligação, enquanto o termo avidéz refere-se à vinculação da força total conferida pelos efeitos combinados em vários locais de ligação. Por exemplo, embora os sítios individuais de ligação da IgM apresentem relativamente baixa afinidade, a sua estrutura pentamérica proporciona alta avidéz na ligação ao antígeno, por apresentar dez sítios de ligação disponíveis. Tal característica da IgM faz com que essa isoforma ative potentemente o complemento, alterando sua estrutura tridimensional após a ligação ao antígeno. Em geral, IgM (e algumas IgG) podem causar hemólise durante reações transfusionais e na anemia hemolítica autoimune. É importante ressaltar que, ao contrário da isoforma IgG, a IgM não atravessa a placenta e, portanto, não está envolvida na DHPN (STOWELL & GORHAM, 2020).

Enquanto a IgM é gerada na fase inicial da resposta imune específica ao antígeno, anticorpos IgG são importantes do ponto de vista das funções efetoras da resposta imune humoral tardia. Em humanos, são conhecidas quatro subclasses de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Cada subclasse apresenta uma região constante diferente e capacidades distintas de ativar o complemento e/ou de interagir com receptores em fagócitos. IgG1 e IgG3 são as mais potentes, enquanto a IgG2 ativa fracamente o complemento e a IgG4 carece, em grande parte, de atividade efetora. Em consistência com essas observações, pacientes que apresentam apenas anticorpos antieritrocitários da subclasse IgG4 normalmente não apresentam hemólise decorrente da ligação anticorpo-antígeno. Em contraste, anticorpos antieritrocitários que pertencem às subclasses IgG1 e IgG3 podem induzir hemólise. Assim, a determinação da subclasse da imunoglobulina IgG pode sugerir a importância clínica do anticorpo investigado (NOUMSI *et al.*, 2015; STOWELL & GORHAM, 2020).

Uma vez em que há a ligação do anticorpo IgG ao antígeno complementar, os fragmentos Fc da sua estrutura são reconhecidos pela família gama (γ) de receptores Fc (Fc γ R) encontrados na superfície das células. Pelo menos quatro Fc γ R estão descritos (Fc γ R1, Fc γ R2a, Fc γ R2b e Fc γ R3), com diferentes propriedades e, inclusive, podendo apresentar funções opostas. Os receptores dos tipos Fc γ R2a e Fc γ R3 promovem a fagocitose de antígenos-alvo. Devido à afinidade relativamente baixa a tais receptores, a IgG monomérica não se liga diretamente a eles, o que faz com que essa ligação ocorra somente quando múltiplas IgG se ligam a antígenos-alvo simultaneamente. Em contraste, Fc γ R2b é um receptor inibitório que previne a fagocitose. Já o Fc γ R1 apresenta alta afinidade pela IgG monomérica, tal que Fc γ R1 se liga a IgG, esteja ela complexada ou não ao antígeno-alvo. Assim, o efeito sobre a fagocitose depende da ligação

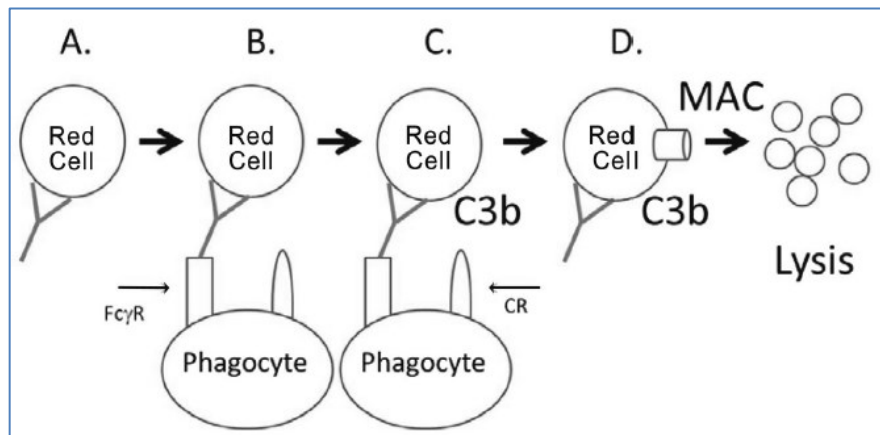
efetiva das diferentes subclasses de IgG e suas interações com o Fc γ R (STOWELL & GORHAM, 2020).

Os fragmentos Fc dos anticorpos IgG podem, ainda, ativar o sistema do complemento, que consiste em uma cascata de proteases que, uma vez ativadas, amplificam o sinal inicial, levando à produção de um grande número de moléculas efetoras. Embora existam vários caminhos para ativação do complemento, a presente abordagem faz referência à via clássica, iniciada pela porção Fc de IgG. Nessa modalidade de ativação, a IgG não sofre mudança conformacional. Dessa forma, para que ocorra a ativação do complemento, é necessário que múltiplas moléculas de IgG se complexem aos antígenos-alvo, o que evita a ativação indiscriminada do complemento por IgG circulante não ligada (STOWELL & GORHAM, 2020).

Uma vez ativado, o sistema do complemento dá início a dois mecanismos distintos para a destruição de alvos. O primeiro envolve a marcação do antígeno-alvo com componentes do complemento (C3b), rotulando-o para destruição, o que é conhecido como opsonização. Múltiplas cópias de C3b podem ser reconhecidas por receptores específicos nas células fagocíticas, como os macrófagos presentes no Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), promovendo a endocitose e destruição do antígeno-alvo. No entanto, a fração C3b pode, também, ser degradada a C3dg, que não é reconhecida por fagócitos, evitando assim a fagocitose. Entretanto, o componente C3dg é reconhecido por receptores do complemento nas nos linfócitos B e, portanto, pode afetar o desenvolvimento de aloanticorpos. Já no segundo mecanismo, a fração C3 ativada promove a montagem do complexo de ataque à membrana (CAM), que consiste em proteínas do complemento (C5b-C9) organizadas em uma estrutura que se assemelha a um tubo oco inserido na membrana da célula-alvo, originando um canal entre o interior dessa célula e o ambiente externo, o que resulta na lise osmótica do alvo (STOWELL & GORHAM, 2020).

Em geral, uma vez que o anticorpo da classe IgG se liga a um antígeno eritrocitário, a hemácia passa a ser a célula-alvo e poderá ser fagocitada pela interação da IgG com o Fc γ R do fagócito. Poderá haver, ainda, a ativação da cascata do complemento, o que promove a deposição da fração C3b na superfície das hemácias, levando à fagocitose mediada pelos receptores de complemento nos fagócitos. Finalmente, se a ativação do complemento for completa, haverá a inserção do CAM, causando lise da célula-alvo (**Figura 3**) (STOWELL & GORHAM, 2020).

Figura 3 – Mecanismos de destruição de hemácias por ligação de anticorpos e complemento



(A) Ligação da imunoglobulina IgG ao antígeno eritrocitário. (B) Ligação do fragmento Fc da IgG ao FcγR no fagócito. (C) A opsonização da hemácia poderá ser aumentada pela ativação do complemento, com deposição da fração C3b na membrana da hemácia. (D) Se ainda assim a opsonização combinada IgG/ C3b no fagócito não for suficiente para mediar a destruição da célula, a ativação completa da cascata do complemento pode levar à inserção do CAM na superfície da hemácia, resultando em lise. Esses processos ocorrem simultaneamente e o resultado advém do efeito agregado das vias ativadas. Legenda: red cell=hemácia; phagocyte=fagócito; MAC=complexo de ataque à membrana; lysis=lise; CR=receptor para complemento no fagócito. Fonte: STOWELL & GORHAM (2020).

Dessa forma, a hemólise resultante de uma transfusão de CHM incompatível envolve diversos aspectos que contribuem para o desfecho global do evento, como quantidade de anticorpos complexados ao antígeno-alvo, isotipo e subclasse do anticorpo envolvido, propriedades do antígeno, como sua densidade na membrana eritrocitária e a sua relação com o citoesqueleto da hemácia. Dessa maneira, a ativação de vias imunológicas e a toxicidade associada à hemólise podem levar a consequências clínicas negativas, que vão além perda de eficácia da hemotransfusão. Na verdade, pode ocorrer toxicidade substancial, levando à morbidade e, em alguns casos, à mortalidade do indivíduo (STOWELL & GORHAM, 2020).

Em síntese, o mecanismo da hemólise imunomediada pode ser explicado por dois mecanismos distintos. O primeiro corresponde à destruição intravascular imediata das hemácias pela ativação completa do sistema do complemento, processo esse desencadeado frequentemente, mas não exclusivamente, por anticorpos da classe IgM. O segundo mecanismo consiste na destruição extravascular das hemácias por fagócitos do sistema imunológico que reconhecem anticorpos da classe IgG e proteínas do complemento ligadas à hemácia. A marcação da hemácia por anticorpos da classe IgG e/ou por proteínas do complemento determinam sua destruição extravascular, com a participação de macrófagos do SMF, presentes no baço e no fígado. (FLEGEL, 2015; GARRATY, 2008).

3.3 Importância clínica de aloanticorpos

A aloimunização consiste na produção, pelos receptores, de aloanticorpos antieritrocitários direcionados a antígenos expressos nas hemácias transfundidas e ausentes nas suas próprias hemácias. Os aloanticorpos considerados clinicamente significativos possuem o potencial de mediar RTH imediata e tardia, dificultando, inclusive, a localização de unidades de hemácias compatíveis para transfusões futuras. Os aloanticorpos podem, ainda, ser produzidos por mulheres durante a gestação, pois a expressão de antígenos paternos pelo feto pode desencadear a sensibilização materna e comprometer futuras gestações pela possibilidade da ocorrência da DHPN (TORMEY & HENDRICKSON, 2016).

De acordo com o *British Committee for Standards in Haematology*, anticorpos clinicamente significativos são aqueles capazes de causar morbidade ao paciente devido à destruição acelerada de uma proporção significativa de hemácias transfundidas (CHAPMAN *et al.*, 2004).

A importância clínica de um sistema de grupo sanguíneo depende, principalmente, da frequência com que os aloanticorpos direcionados aos antígenos desse sistema ocorre e das características dos aloanticorpos, a saber, classe de imunoglobulina a que pertence e, se IgG, subclasse, amplitude térmica de reação e capacidade de fixar complemento. Essas características, por sua vez, determinam a capacidade do anticorpo de causar destruição das hemácias e de provocar DHPN, pela sua capacidade de atravessar a placenta (KLEIN & ANSTEE, 2014).

A aloimunização contra antígenos eritrocitários associada à transfusão pode ser um problema clinicamente significativo. As complicações reportadas e atribuídas à aloimunização antieritrocitária representam apenas um terço daquelas que realmente existem, dada uma combinação de diferentes aspectos, como os relacionados ao doador, ao hemocomponente, ao receptor (fatores genéticos, inflamatórios e imunológicos), que reconhecidamente influenciarão em qual transfusão o receptor se tornará aloimunizado. Atualmente, a principal estratégia incentivada na prevenção da aloimunização é, sem dúvida a transfusão criteriosa de CHM de acordo com o quadro clínico do paciente. Estratégias para prevenir o desenvolvimento de anticorpos precisam ser otimizadas, assim como estratégias para mitigar os perigos dos aloanticorpos existentes. Aloanticorpos associados à transfusão e à gestação têm implicações que vão muito além do banco de sangue e da medicina transfusional, estendendo-se a áreas

como hematologia, oncologia, transplante, obstetrícia, imunologia, entre outras. (TORMEY & HENDRICKSON, 2019).

3.4 Aspectos relacionados à transfusão de Concentrado de Hemácias incompatível

Aloanticorpos antieritrocitários são, em geral, categorizados em três grupos: aqueles que geralmente são clinicamente significativos e devem ser compatibilizados (por exemplo, anticorpos direcionados a antígenos dos sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy), aqueles que geralmente são clinicamente insignificantes (por exemplo, anticorpos que não reagem a 37°C), e aqueles que possuem significado clínico variável (por exemplo: anti-Yt^a, -Ge, -Lu^b). A obtenção de sangue raro, ou seja, antígeno-negativo para pacientes que apresentam fenótipos raros na população, é frequentemente desafiadora. Para pacientes que apresentam anticorpos como aqueles citados no último exemplo, faz-se necessário tentar diferenciar quais receptores realmente requerem sangue raro justificadamente para não desperdiçar o uso de CHM igualmente raro (ARNDT & GARRATY, 2004).

A presença de aloanticorpos cria situações desafiadoras no tratamento hemoterápico de pacientes que dependem de transfusões frequentes de CHM, como os portadores de hemoglobinopatias, em especial para pacientes com DF. Nesse grupo de pacientes, é frequente a detecção de múltiplos aloanticorpos, uma vez que seu estado inflamatório ativado contribui para a formação desses anticorpos e muitos são submetidos à politransfusão ao longo da vida. Sabidamente, a presença de aloanticorpos em pacientes com DF aumenta significativamente o risco de reações transfusionais hemolíticas, incluindo reações de hiperemólise. Assim, a disponibilização de um CHM compatível pode não ser possível em determinadas situações, levando a atraso no atendimento hemoterápico do paciente, o que pode resultar em desfechos desfavoráveis para a sua recuperação (CHONAT, *et al.*, 2019; LINDER & CHOU, 2021).

Diante da complexidade antigênica existente na membrana eritrocitária, a determinação da especificidade de anticorpos antieritrocitários representa um grande desafio na rotina de serviços especializados em imuno-hematologia, e nem sempre isso é metodologicamente possível.

O conhecimento acerca das características e do significado clínico desses anticorpos refletirá na conduta transfusional a ser adotada. Nesse sentido, considerando a elevada complexidade na

identificação da especificidade de aloanticorpos, faz-se necessário mencionar aqueles direcionados a antígenos de alta frequência populacional. São casos em que o paciente apresenta um fenótipo raro, comparando-o ao restante da população, por não expressar determinado antígeno eritrocitário amplamente expresso pelas pessoas em geral. Dessa forma, ao entrar em contato com o antígeno ausente nas suas hemácias, o indivíduo poderá responder produzindo o aloanticorpo correspondente. A conduta transfusional nesses casos configura uma importante preocupação em situações emergenciais e no acompanhamento obstétrico, pois nem sempre o serviço dispõe de CHM fenótipo compatível com o receptor (BEM AMOR *et al.*, 2016).

Outra complicação importante no processo transfusional de CHM consiste na produção, pelo paciente, de autoanticorpos antieritrocitários. Esses correspondem a anticorpos direcionados a antígenos próprios do paciente. Em geral, esses antígenos são amplamente expressos pela população e nem sempre é possível determinar a sua especificidade. Podem ser considerados benignos, ou seja, clinicamente insignificantes. Entretanto, podem também ser frequentemente reconhecidos como agentes causadores da AHAI por indução de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos e/ou pela ativação sequencial dos componentes da cascata do complemento. O potencial hemolítico desses autoanticorpos dependerá da sua classe (principalmente IgG e IgM), da sua amplitude térmica de reação (formas quente e fria), da sua afinidade e da sua eficiência na ativação do complemento (BARCELLINI, 2016).

A presença de autoanticorpos antieritrocitários também representa um fator complicador quando o paciente necessita de transfusão de CHM, pois os autoanticorpos interferem na PC, podem diminuir a sobrevivência das hemácias transfundidas e podem ser a causa de atraso no atendimento à sua necessidade transfusional (QUIST & KOEPSSELL, 2015).

Frente a uma PC positiva, ou seja, incompatível, seja por aloanticorpo não compatibilizado, seja pela presença de autoanticorpo antieritrocitário, os resultados dos testes realizados em serviços de imuno-hematologia orientam o médico na tomada de decisão sobre a relação risco/benefício em autorizar ou não a transfusão de um CHM para determinado paciente.

3.5 Ensaios imunológicos para a previsão do significado clínico de anticorpos

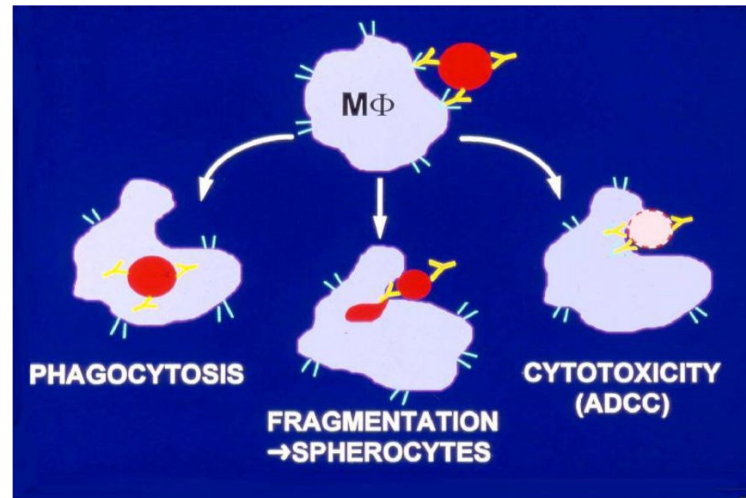
Uma vez que as hemácias opsonizadas por anticorpos ou complemento se ligam aos macrófagos, estão descritos três mecanismos pelos quais as hemácias serão afetadas. O primeiro consiste na fagocitose completa das hemácias, que serão destruídas pelos macrófagos. Já o segundo consiste na fragmentação da membrana das hemácias pela ação dos macrófagos, porém

sem que haja a sua destruição completa, sendo que as hemácias retornarão à circulação periférica com sobrevida menor e serão reconhecidas como esferócitos em esfregaços sanguíneos. Por fim, o terceiro mecanismo consiste na adesão das hemácias à parte externa dos macrófagos, onde serão lisadas por citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos, na qual os macrófagos secretarão substâncias tóxicas líticas direcionadas às hemácias ligadas (**FIGURA 4**) (FLEGEL, 2015).

De acordo com a literatura, existem alguns métodos descritos para melhor prever a sobrevida *in vivo* das hemácias transfundidas, como os ensaios descritos abaixo (FLEGEL, 2015; GARRATY, 2008; TONG *et al.*, 2019; ZUPANSKA, 1993):

- a) Ensaio de marcação de hemácias incompatíveis com o isótopo radioativo cromo-51 (^{51}Cr): consiste na avaliação, *in vivo*, da sobrevida de hemácias incompatíveis marcadas com ^{51}Cr , por meio da medição da radioatividade liberada no plasma a partir da lise dessas células. Em geral, esse ensaio não é empregado na prática transfusional, principalmente por expor o paciente à radioatividade e por demandar, do serviço, a marcação prévia das hemácias a serem transfundidas com o isótopo radioativo;
- b) Ensaio de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (do inglês, *antibody-dependent cellular cytotoxicity* - ADCC): consiste em um ensaio *in vitro* que avalia a destruição de hemácias incompatíveis marcadas com o isótopo radioativo ^{51}Cr , por meio da citotoxicidade mediada pela secreção de substâncias tóxicas líticas por células como macrófagos e células dendríticas. Esse ensaio também não é amplamente empregado na prática transfusional e deve ser melhor avaliado como um método que prevê o significado clínico de alo e autoanticorpos antieritrocitários;
- c) Ensaio de quimioluminescência: consiste na avaliação da resposta dos macrófagos durante a fagocitose de hemácias sensibilizadas, por meio da produção de radicais de oxigênio, que podem reagir com luminol e gerar a emissão de luz. A necessidade de um luminômetro para a captação da luz torna esse ensaio mais caro e mais difícil de ser introduzido na prática clínica.
- d) MMA: consiste em um ensaio celular *in vitro* que avalia a fagocitose, pelos macrófagos, de hemácias incompatíveis marcadas por anticorpos/ complemento, sendo o método mais aplicável à prática laboratorial e clínica na investigação da importância transfusional de alo e autoanticorpos antieritrocitários.

Figura 4 – Destruição ou alteração da hemácia mediada por anticorpos



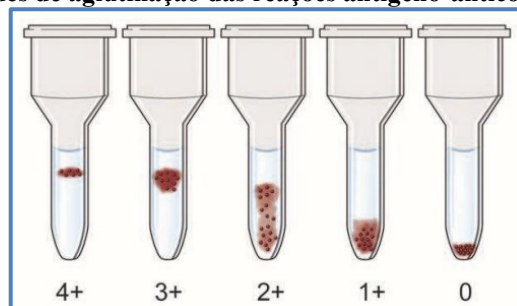
Uma célula efetora reconhece a hemácia por meio de anticorpos que estão ligados à sua membrana. Três mecanismos podem levar à destruição ou alteração da hemácia: (i) A hemácia é fagocitada pelo macrófago (MΦ) e lisada intracelularmente. (ii) A hemácia é parcialmente fagocitada (fragmentada), mas escapa do ataque imunológico do macrófago (MΦ), permanecendo na circulação. (iii) A hemácia é atacada por um macrófago (MΦ) e lisada extracelularmente por meio da citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos. Legenda: phagocytosis=fagocitose; fragmentation= fragmentação; spherocytes= esferócitos; cytotoxicity= citotoxicidade.

Fonte: modificado de GARRATY (2008) em FLEGEL (2015).

3.6 Testes pré-transfusionais obrigatórios

Diante da prescrição médica de CHM para um paciente, uma amostra de sangue total coletada em anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA) deverá ser obtida para a realização dos testes pré-transfusionais obrigatórios, de acordo com a legislação brasileira atual. Os testes pré-transfusionais incluirão tipagem ABO (provas direta e reversa) e RhD, a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) no sangue do receptor, a retipagem ABO (prova direta) e RhD do componente sanguíneo a ser transfundido e a realização de uma PC entre as hemácias do doador e o soro ou plasma do receptor (BRASIL, 2017). A Figura 5 apresenta a interpretação das intensidades de aglutinação (de 4+ a 0), das reações antígeno-anticorpo, pelo método gel-teste.

Figura 5 – Intensidades de aglutinação das reações antígeno-anticorpo pela método gel-teste



Fonte: Adaptado de HUR *et al.* (2011)

Desse modo, será realizado o teste de compatibilidade entre o sangue do receptor e amostras das bolsas a serem utilizadas no ato transfusional. Quando a PAI com a amostra do receptor mostrar resultado positivo, é recomendada a identificação da especificidade do(s) anticorpo(s) detectado(s) para seleção segura do CHM a ser transfundido. Quando os resultados dos testes pré-transfusionais demonstrarem que não há a disponibilidade de CHM compatível para o receptor, o serviço de hemoterapia comunicará este fato ao médico solicitante e, em conjunto com este, realizará a avaliação clínica do paciente. A decisão de transfundir CHM incompatível será justificada por escrito, em termo assinado pelo hemoterapeuta e/ou pelo médico assistente do paciente e, quando possível, pelo paciente ou seu responsável legal (BRASIL, 2017).

3.7 Ensaio da Monocamada de Monócitos

A avaliação do significado clínico de anticorpos antieritrocitários para a seleção adequada de CHM para pacientes que necessitam de transfusão tem sido historicamente baseada na especificidade do anticorpo, utilizando-se métodos sorológicos. Diante de casos transfusionais complexos, o método *in vitro* mais amplamente testado e com elevado valor preditivo para o significado clínico de anticorpos *in vivo* é o MMA (BOLIGAN *et al.*, 2022).

Trata-se do método *in vitro* mais extensivamente avaliado para prever o significado clínico de anticorpos antieritrocitários. Por ser um método não invasivo, o MMA também pode ser aplicável na investigação da DHPN, tendo em vista que anticorpos maternos da classe IgG podem atravessar a placenta e se ligar às hemácias fetais, causando a sua destruição. Outras aplicações do método são na investigação da anemia hemolítica induzida por drogas e na investigação do mecanismo de hemólise associada à administração intravenosa de imunoglobulina IgG (TONG *et al.*, 2019).

O MMA avalia a fagocitose de hemácias do doador experimentalmente opsonizadas por anticorpos da classe IgG presentes no soro do receptor. Esse método utiliza monócitos isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis, que expressam Fc γ R, envolvidos em respostas imunológicas. O MMA explora a interação entre esse tipo de receptor nos monócitos e hemácias opsonizadas por anticorpos da classe IgG, sendo o produto dessa interação observado por meio da adesão da hemácia ao monócito ou sua completa fagocitose (TONG & BRANCH, 2017).

Em aspectos práticos, o MMA é uma técnica laboriosa que requer experiência da equipe executante, tanto em cultura de células quanto em microscopia. Existem várias etapas críticas

que devem ser rigorosamente executadas, com destaque para a geração da monocamada de monócitos, a opsonização das hemácias testadas e a quantificação manual. A equipe envolvida deve ser tecnicamente bem treinada em todos os aspectos do ensaio, como pipetagens, lavagens e leitura das lâminas. A padronização de controles também deve ser cuidadosamente definida. É recomendado que profissionais que desejam implementar esse ensaio busquem treinamento específico em centros de referência na área (TONG & BRANCH, 2017).

Para a execução do MMA, seria desejável que fossem utilizados monócitos autólogos do paciente, para refletir melhor o seu sistema imunológico, considerando o seu estado inflamatório, terapias imunossupressoras e potenciais polimorfismos genéticos de Fc γ R. É sabido que monócitos alogênicos podem não fornecer interpretação fidedigna do significado clínico de um alo ou autoanticorpo utilizando-se o MMA. Apesar disso, a maioria dos laboratórios de referência que realizam esse ensaio para avaliações clínicas utilizam amostras frescas de sangue total de doadores voluntários saudáveis em detrimento do uso de monócitos autólogos de pacientes. Uma justificativa para essa conduta se baseia no fato de que o MMA é, em geral, empregado buscando-se atendimento imediato para o paciente. Assim, a execução do MMA com monócitos autólogos comprometeria a agilidade do processo, uma vez que a amostra de sangue total necessária à técnica precisaria ser fresca e muitos pacientes são provenientes de regiões geograficamente distantes dos serviços que executam o exame. Todavia, ainda faltam estudos que correlacionem melhor o uso de monócitos autólogos com os resultados obtidos para o MMA (TONG *et al.*, 2016).

Profissionais que trabalham com o MMA em uma rotina laboratorial devem se atentar que, ao se transfundir unidades de sangue antígeno positivo para um receptor aloimunizado, existe a possibilidade de ocorrência de uma eventual alteração pós-transfusional na apresentação do anticorpo e na sua reatividade. Esse ensaio é considerado um bom preditor do desfecho de transfusões, mas pode não prever resultados transfusionais subsequentes. Estudos mostram exemplos de aloanticorpos que sofreram essa alteração de não clinicamente significativo para clinicamente significativo, após a administração de unidades positivas para antígenos não compatibilizados. Portanto, após a transfusão nessas condições, é recomendado que os estudos de sobrevivência das hemácias *in vitro* sejam repetidos, como o MMA, para todas as unidades adicionais a serem transfundidas, utilizando a mesma técnica, especialmente se o título do aloanticorpo aumentar. Sabe-se que a sensibilização *in vivo* das hemácias do doador pelos anticorpos presentes no receptor pode preparar o paciente no futuro para uma RTH tardia, ou

até mesmo aguda, pois a exposição adicional ao antígeno pode alterar as propriedades do aloanticorpo envolvido (BRANCH *et al.*, 2021; NOUMSI *et al.*, 2015).

A interpretação do MMA é obtida por meio da determinação do Índice de Monócitos (*Monocyte Index* - MI). Esse índice é obtido após a leitura microscópica das lâminas produzidas a partir da execução técnica do ensaio e corresponde ao número de monócitos com hemácias aderidas ou fagocitadas, dividindo-se pelo número total de monócitos quantificados nos mesmos campos, multiplicado por 100. Em geral, um *cut-off* de 5% é adotado para determinar a significância clínica dos anticorpos, conforme descrito no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Interpretação dos resultados do *Monocyte Index*

MI (%)	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
$MI \leq 5,0$	Anticorpo clinicamente não significativo. Baixo risco de hemólise.
$MI = 5,1 - 20,0$	Associa-se a 33% o risco do paciente apresentar hemólise pós transfusional.
$MI > 20,0$	Associa-se a 64% o risco do paciente apresentar hemólise pós transfusional.

Fonte: Adaptado de ARNDT & GARRATY (2004).

Vários são os estudos que mostram como o MMA auxilia na definição do significado clínico de aloanticorpos antieritrocitários, em especial para anticorpos direcionados a antígenos de alta frequência populacional, conforme mostrados adiante. São frequentes os casos clínicos descritos na literatura que abordam como o MMA colaborou na conduta transfusional a ser adotada diante de situações desafiadoras e no acompanhamento materno-fetal, como nos casos citados a seguir.

ARNDT & GARRATY (2004) avaliaram a utilização do MMA na investigação do significado clínico de diversos aloanticorpos. Dentre eles, foram testados aloanticorpos direcionados a antígenos de alta frequência, como Anti-Ge (Gerbich). De acordo com a literatura, a importância clínica desse aloanticorpo é variável, podendo ou não estar envolvido em RTH tardia. Nesse estudo em questão, dos 27 anticorpos Anti-Ge testados, 16 (59%) apresentaram teste positivo pelo MMA, ou seja, eram clinicamente significativos. Ressalta-se que nem sempre é possível disponibilizar CHM antígeno-negativo quando é evidenciada a presença de

Anti-Ge na amostra de um paciente que necessita de transfusão. Dessa forma, o MMA pode auxiliar na conduta de transfundir ou não o hemocomponente disponível.

Um relato de caso clínico de grande relevância abordou a utilização do MMA na elucidação do significado clínico do aloanticorpo Anti-Di^b, um anticorpo direcionado ao antígeno Di^b do sistema Diego, amplamente expresso na população. Um jovem paciente necessitava de reserva de CHM para ser submetido a uma cirurgia eletiva. Seu estudo imuno-hematológico revelou a presença de três aloanticorpos (Anti-E + Anti-S + Anti-Di^b). Tendo em vista que a chance da disponibilização de um CHM compatível seria raríssima, os autores optaram por realizar o MMA para determinados CHM disponíveis no serviço. Os resultados mostraram que o anticorpo Anti-Di^b avaliado era clinicamente significativo. Dessa forma, a doação de sangue autóloga foi incentivada para prosseguir à cirurgia (BRANCH *et. al.*, 2021).

Outro importante relato de caso clínico descrito na literatura que empregou o MMA para auxiliar na conduta transfusional envolveu uma gestante no 3º trimestre de gestação. Na sua amostra foi identificada a presença do aloanticorpo Anti-In^b, que é um anticorpo direcionado ao antígeno In^b amplamente expresso na população e pertencente ao sistema Indian. A identificação desse aloanticorpo levantou duas grandes preocupações para a equipe assistente, como a possibilidade do feto desenvolver DHPN e a possibilidade da mulher necessitar de transfusão no período pós-parto. O MMA foi realizado com a amostra materna e foi constatada que o aloanticorpo em questão seria capaz de causar RTH. Não havia CHM compatível disponível localmente e nem mesmo nacionalmente. Dessa forma, a doação de sangue autólogo foi incentivada, além do preparo de toda a equipe multidisciplinar para atuar em prol de medidas mais conservadoras no momento do parto, incluindo cuidados voltados para o recém-nascido e para a possibilidade de evento hemorrágico materno. O desfecho do caso foi favorável e não houve evidência de DHPN no recém-nascido (SHREE *et al.*, 2018).

Um outro estudo de elevada relevância no campo da obstetrícia empregou o MMA na elucidação acerca do mecanismo de ação envolvendo o aloanticorpo Anti-Jr^a e a ocorrência de anemia fetal severa. Os resultados apresentados reforçaram a hipótese de que Anti-Jr^a pode prejudicar a eritropoiese, levando a sintomas clinicamente significativos da anemia fetal/neonatal e enfraquecendo a hipótese do potencial hemolítico desse aloanticorpo, considerando que os resultados do MI não sugeriram a ocorrência de hemólise como mecanismo principal da anemia fetal. Dessa forma, os autores sugeriram que gestantes que

apresentem esse aloanticorpo sejam encaminhadas a centros de referência no acompanhamento materno-fetal para monitoramento, independentemente do título do anticorpo (TRAN *et al.*, 2023).

O MMA pode também ser aplicável na elucidação de eventos hemolíticos mediados por autoanticorpos da classe IgG, como no caso de uma gestante que exibiu autoanticorpo quente, sem sinais de hemólise, e cujo feto apresentou anemia grave, a ponto de ser submetido a transfusão intrauterina. O MMA foi realizado utilizando-se a amostra materna e as hemácias fetais e o resultado foi positivo. Esse resultado indicou que a hemólise fetal foi causada por autoanticorpo materno. A gestante foi tratada com prednisona e foi observada melhora clínica fetal (CONRADO *et al.*, 2018).

De forma semelhante, há relato na literatura do emprego do MMA como segunda PC para paciente com DF que apresentava síndrome de hiperemólise, que pode ser potencialmente fatal nesse grupo de pacientes. A identificação de anticorpos é frequentemente desafiadora no contexto da DF, principalmente porque, em geral, múltiplos anticorpos estão envolvidos e os pacientes são politransfundidos, o que dificulta a aplicação de algumas técnicas sorológicas. A avaliação imuno-hematológica da paciente revelou a presença de múltiplos anticorpos. O MMA foi empregado para avaliar a importância clínica dos anticorpos irregulares e foi adotado como segunda PC, ou seja, a transfusão foi realizada apenas quando o MMA se mostrou negativo para as unidades de CHF selecionadas e com cuidadoso monitorando de perto o período pós-transfusional (CRUZ *et al.*, 2023)

Outra aplicação do MMA na rotina laboratorial refere-se a investigação do significado clínico de anticorpos de especificidade não determinada pelos serviços de imuno-hematologia. Esses anticorpos são detectados nos testes pré-transfusionais, associados ou não a outros aloanticorpos. Podem ser clinicamente insignificantes ou potencialmente capazes de causar RTH. Um estudo nacional avaliou a relevância clínica desses anticorpos oriundos de 32 pacientes utilizando o MMA, no período de 2015 a 2017. Mais de um terço dos anticorpos avaliados apresentavam o potencial de ser clinicamente relevantes, o que reforça a importância que deve ser dispensada a esse grupo de anticorpos no processo pré-transfusional (CONRADO *et al.*, 2019).

Em síntese, os resultados do MMA são assertivos na previsão de riscos de reações transfusionais hemolíticas tardias associadas a aloanticorpos da classe IgG ou quando CHM

compatível não estiver disponível para transfusão. Ademais, ao longo de anos esse ensaio tem sido empregado também na avaliação do significado clínico de autoanticorpos da classe IgG, correlacionando-os ao risco de desencadear hemólise extravascular, além da sua aplicação no acompanhamento materno-fetal (ARNDT & GARRATY, 2004; CONRADO *et al.*, 2018; NOUMSI *et al.*, 2015).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o Ensaio da Monocamada de Monócitos na rotina da CIH da Fundação Hemominas para a definição do significado clínico de alo e autoanticorpos antieritrocitários em pacientes atendidos pela rede Hemominas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar o MMA na CIH da Fundação Hemominas.
- b) Validar o MMA na CIH da Fundação Hemominas, de acordo com critérios aplicáveis ao método e estabelecidos na Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, incluindo também uma etapa de avaliação casos reais para acompanhamento de desfechos *in vivo*.
- c) Avaliar, empregando-se o MMA, o significado clínico de:
 - aloanticorpos da classe IgG, de especificidade não determinada, em mulheres politransfundidas com DF (Grupo 1), correlacionando os resultados com histórico gestacional, intensidade de aglutinação da reação na PC e do Teste da Aglutinação Direta (TAD) após a adsorção do aloanticorpo estudado.
 - aloanticorpos direcionados a antígenos de alta frequência na população (Grupo 2), correlacionando os resultados com sexo, associação com outros aloanticorpos, histórico gestacional e transfusional, intensidade de aglutinação da reação na PC e do TAD após a adsorção do aloanticorpo estudado.
 - autoanticorpos da classe IgG (Grupo 3), correlacionando os resultados com condição clínica, sexo, associação com aloanticorpos, associação com autoanticorpos da classe IgM, histórico gestacional e transfusional, intensidade de aglutinação da reação na PC e do TAD após a adsorção do autoanticorpo estudado.

- d) Propor estratégias de ações a serem apresentadas à Fundação Hemominas como forma de concretizar a implementação rotineira do MMA no quadro de exames oferecidos pela CIH, de modo a otimizar o acompanhamento hemoterápico de pacientes que apresentem alo/autoanticorpos antieritrocitários e que necessitem de transfusões sem bolsas compatíveis.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Este estudo foi elaborado buscando-se atender aos fundamentos éticos e científicos descritos na Resolução CNS N° 466/12 e na Resolução CNS N° 441/11. O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelos seguintes Comitês de Ética em Pesquisa:

- da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), como instituição proponente (CAAE: 30000920.0.0000.5149);
- da Fundação Hemominas (CEP-Hemominas), como instituição coparticipante (CAAE: 30000920.0.3001.5118) (**ANEXO A**).

Aos Comitês de Ética em Pesquisa foi solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os participantes da pesquisa (pacientes e doadores). A solicitação de dispensa foi inteiramente fundamentada na norma vigente para casos específicos em que essa dispensa pode ser concedida e foi acatada por todos os Comitês por onde o projeto tramitou.

5.2 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional e transversal que foi realizado entre os anos de 2020 a 2023 na CIH da Fundação Hemominas, no Hemocentro de Belo Horizonte – Minas Gerais.

5.3 Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa

a) Critérios de inclusão dos pacientes

Foram incluídas amostras de pacientes de todas as faixas etárias (considerando que a presença de alo e autoanticorpos antieritrocitários pode ser detectada inclusive em crianças), desde que

o volume de amostra fosse suficiente para os testes e cujo estudo imuno-hematológico apresentasse elevada complexidade. Os critérios de inclusão para os grupos foram:

- Grupo 1 (n=8): mulheres com DF, aloimunizadas, com risco elevado para síndrome de hiperemólise, que apresentaram aloanticorpos antieritrocitários da classe IgG cuja especificidade não pode ser determinada pelos testes sorológicos convencionais;
- Grupo 2 (n=15): pacientes de ambos os sexos, que apresentaram aloanticorpos antieritrocitários da classe IgG direcionados a antígenos amplamente expressos na população, independentemente da doença de base;
- Grupo 3 (n=40): pacientes de ambos os sexos, que apresentaram autoanticorpos antieritrocitários da classe IgG, independentemente da doença de base.

b) Critérios de exclusão dos pacientes

Foram excluídos do estudo:

- pacientes que se enquadravam nos critérios descritos anteriormente, mas que não possuíam volume mínimo de amostra para a realização do ensaio;
- pacientes que apresentavam autoanticorpos antieritrocitários exclusivamente das classes IgA e/ou IgM;
- pacientes que apresentavam aloanticorpos antieritrocitários da classe IgM.

5.4 Protocolo experimental

As etapas a seguir descrevem o protocolo que foi executado e foram fundamentadas em estudos de referência na área (CONRADO *et al.*, 2018; NOUMSI *et al.*, 2015; TONG *et al.*, 2019; TONG & BRANCH, 2017).

a) Isolamento e adesão dos monócitos

Os monócitos necessários à execução da técnica foram obtidos a partir de bolsa ST recém-coletada, ou seja, coletada na manhã do dia do experimento, de um doador do grupo “O” (ou “ABO” compatível com o paciente a ser avaliado), de ambos os sexos, com idade igual ou inferior a 45 anos, que compareceram ao hemocentro para realizar doação voluntária de sangue e cuja bolsa de ST tenha resultado em um volume insuficiente para ser fracionada.

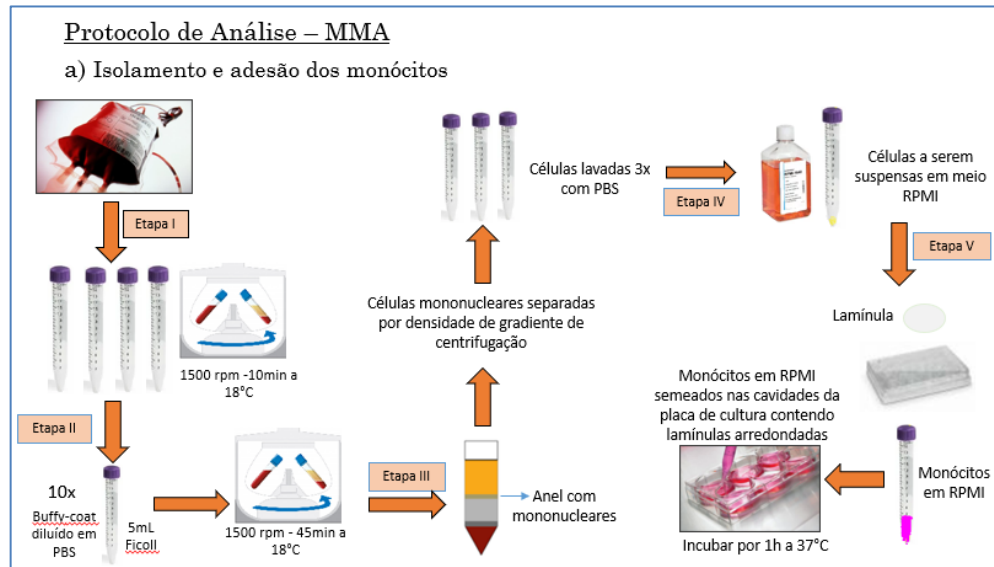
O volume de ST necessário para a obtenção dos monócitos foi de 60mL, sendo que o volume residual da bolsa era encaminhado a outros projetos de pesquisa. As células mononucleares foram separadas por densidade de gradiente de centrifugação utilizando o reagente Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare), conforme procedimentos descritos no **Quadro 2** e esquematizados na **Figura 6** para melhor compreensão das etapas.

Quadro 2 – Isolamento e adesão dos monócitos

ETAPAS	PROCEDIMENTOS
I	Foram aliqotados 60mL de ST em 4 tubos de Falcon (15mL cada). Os tubos foram centrifugados sob refrigeração (18 a 20°C), por 10 minutos a 1500 rpm, sendo o freio da centrífuga desativado para não causar impacto mecânico às células.
II	O plasma rico em plaquetas foi desprezado e as células presentes na camada leucocitária foram delicadamente ressuspensas com solução tampão (PBS) pH=7,4. Em uma grade, foram disponibilizados 10 tubos de Falcon (capacidade de 15mL) contendo 5mL do reagente Ficoll-Paque Plus em cada tubo. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, as células ressuspensas em PBS foram delicada e lentamente adicionadas a cada tubo, até alcançar a sua capacidade máxima. Os 10 tubos de Falcon foram centrifugados sob refrigeração (18 a 20°C), por 45 minutos a 1500rpm, com o freio da centrífuga desativado para não causar impacto mecânico às células.
III	Com o auxílio de pipetas de Pasteur, foram coletadas as camadas de células em formato de anel esbranquiçado de cada tubo. As células mononucleares foram transferidas para 03 tubos de Falcon (15ml cada) e foram lavadas 03 vezes com PBS, sob refrigeração (18 a 20°C), por 10 minutos a 1500rpm, com o freio da centrífuga desativado para não causar impacto mecânico às células. Antes da última lavagem, todas as células foram transferidas para um único tubo de Falcon.
IV	O último sobrenadante foi totalmente desprezado e as células mononucleares foram ressuspensas em 1mL de meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich) por teste a ser realizado (máximo de 4 testes).
V	As lamínulas arredondadas a serem utilizadas no ensaio foram limpas com álcool 70°GL e foram depositadas nas cavidades de uma placa estéril para cultura de células (12 cavidades), sendo uma lamínula por cavidade (total de 4 lamínulas). Foi pipetado 1mL de células em meio de cultura por cavidade da placa, que foi incubada por 1 hora a 37°C. Ao final da incubação, as cavidades da placa foram lavadas 3X com PBS, com o auxílio de pipetas de Pasteur, para remoção das células não aderidas. Após as lavagens, as cavidades foram mantidas com PBS para não ressecarem e a placa foi mantida tampada.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6 - Representação esquemática da etapa de isolamento e adesão dos monócitos



Fonte: Elaborada pela autora.

b) Oponização das hemácias com o anticorpo

Primeiramente, foi realizado uma PC entre o soro testado e a hemácia do CHF selecionado como possível alternativa transfusional para o paciente. O resultado esperado foi sempre positivo, ou seja, incompatível. Esse resultado reflete a presença de um anticorpo no soro do paciente que se ligou ao antígeno correspondente à sua especificidade na hemácia da bolsa.

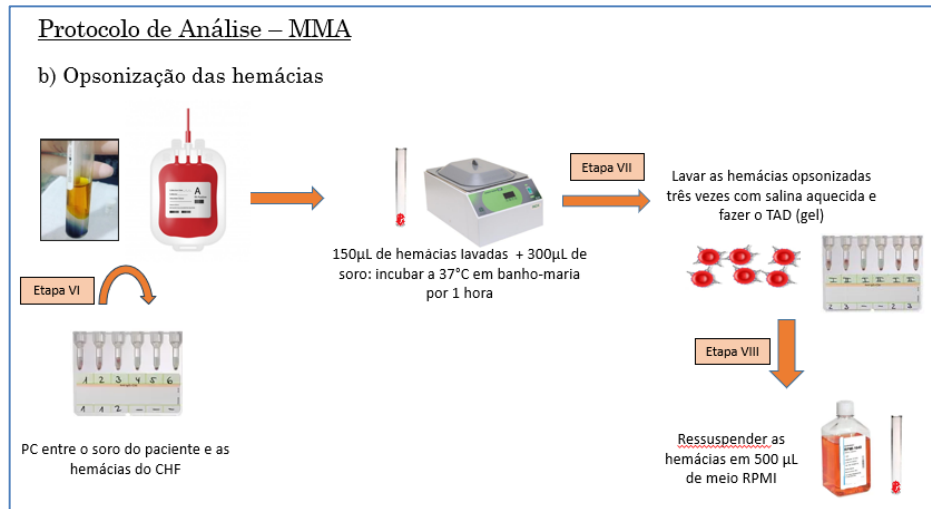
Em seguida, foi promovida a oponização ou adsorção do anticorpo presente no soro às hemácias pré-selecionadas, conforme procedimentos descritos no **Quadro 3** e esquematizados na **Figura 7** para melhor compreensão das etapas.

Quadro 3 – Oponização das hemácias pré-selecionadas

ETAPAS	PROCEDIMENTOS
VI	Foi realizada uma PC entre o soro do paciente e as hemácias do CHF pré-selecionado. Foram lavados 500µL de hemácias do mesmo CHF com solução fisiológica por 3 vezes. Em um tubo de Kahn, foram pipetados 150µL das hemácias lavadas. Foram adicionados 300µL do soro do paciente e o tubo foi incubado a 37°C por 1 hora em banho-maria úmido.
VII	Ao final da incubação, as hemácias sensibilizadas foram lavadas com solução fisiológica aquecida a 37°C (técnica adaptada pelas pesquisadoras) por 3 vezes, retirando-se bem o último sobrenadante. Foi realizado o TAD de cada hemácia testada, em gel-teste (BIORAD), para avaliar o sucesso da oponização, ou seja, um resultado positivo revela uma ligação bem-sucedida do anticorpo do paciente à hemácia candidata à transfusão.
VIII	Foram adicionados 500µL do meio de cultura RPMI às hemácias lavadas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 7 – Representação esquemática da etapa da opsonização do anticorpo à hemácia



Fonte: Elaborada pela autora.

c) Ensaio da Monocamada de Monócitos

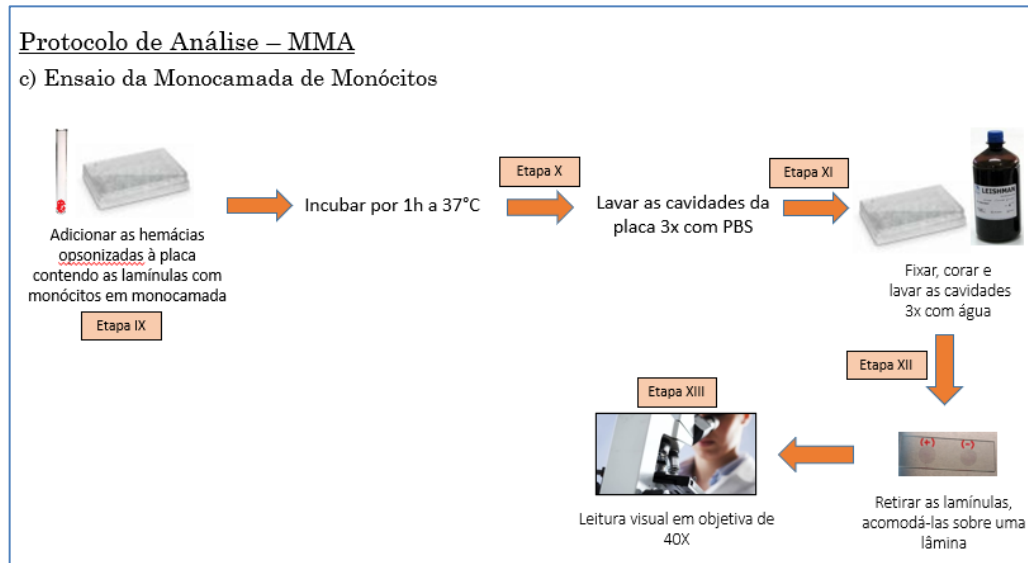
O ensaio propriamente dito foi realizado conforme procedimentos descritos no **Quadro 4** e esquematizados na **Figura 8** para melhor compreensão das etapas.

Quadro 4 – Ensaio da monocamada de monócitos

ENSAIO DA MONOCAMADA DE MONÓCITOS	
ETAPAS	PROCEDIMENTOS
IX	As cavidades da placa de cultura de células foram secas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e, em seguida, foram adicionados 500µL de hemácias opsonizadas suspensas em meio RPMI por cavidade que continha os monócitos aderidos e a placa foi novamente incubada durante 1 hora a 37°C.
X	Ao final da incubação, as cavidades da placa foram lavadas com PBS por 3 vezes, com o auxílio de pipetas de Pasteur, para remoção das hemácias livres. As cavidades da placa foram secadas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.
XI	Foram adicionados 500µL de corante de Leishmann (Merck) por cavidade e a placa foi incubada por 5 minutos, ao abrigo da luz. Após esse período, o volume da cavidade foi dobrado utilizando-se água de torneira e foram aplicados sopros de ar sobre as cavidades contendo o corante até que a superfície desenvolvesse um tom perolado. A placa foi incubada por mais 20 minutos, ao abrigo da luz, sendo em seguida lavada com água de torneira por 3 vezes, secando-se bem a água da última lavagem com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.
XII	Por fim, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas com o auxílio do bisel de uma agulha e, com o auxílio de uma pinça, foram depositadas de forma invertida sobre uma lâmina para microscopia previamente limpa com álcool 70°GL.
XIII	A leitura de cada teste foi realizada utilizando-se um microscópio óptico binocular (Opton) e aumento de 40X. Uma gota de água de torneira foi cuidadosamente depositada por baixo da lamínula caso houvesse ressecamento durante a leitura. Foram obtidas imagens com câmera fotográfica de aparelho celular de todas as lamínulas lidas ao longo do estudo. As imagens foram salvas para consulta posterior, caso fosse necessário. O tempo médio para realização do ensaio é de 8 horas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8 – Representação esquemática da etapa de realização do ensaio até a leitura da lâmina



Fonte: Elaborada pela autora.

d) Leitura e interpretação

A leitura foi realizada pela avaliação global das lâminulas, observando se as células estavam homogeneamente distribuídas (média de 80 células por campo), sem a presença de grumos e com coloração satisfatória. O índice de monócitos (*Monocyte Index* - MI) foi determinado contando-se, pelo menos, 200 monócitos, com o auxílio de um contador manual de células sanguíneas (Kacil – modelo CCS-01). O MI corresponde ao número de monócitos com hemácias aderidas ou fagocitadas, dividindo-se pelo número total de monócitos quantificados nos mesmos campos, multiplicado por 100. Um *cut-off* de 5% foi adotado para determinar a significância clínica dos anticorpos. Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com o **Quadro 1**, anteriormente apresentado.

e) Controles do ensaio

Um controle positivo e um controle negativo do processo de opsonização foram realizados para cada ensaio executado. O controle positivo (CP) foi realizado com hemácias comerciais sensibilizadas com anticorpos Anti-D da classe IgG (BIORAD) previamente lavadas com solução fisiológica por 3 vezes, para remoção dos componentes do produto. Foi realizado um TAD das hemácias comerciais lavadas e o resultado foi de 4+ em todos os experimentos realizados. A intensidade de reação do TAD pelo método gel-teste pode variar de negativa a 4+, refletindo a quantidade de anticorpos que se encontram aderidos à membrana da hemácia. Essas hemácias foram suspensas com 500µL do meio de cultura RPMI e foram transferidas

para a cavidade da placa, reservada para o CP, que já continha a lamínula com os monócitos aderidos. O resultado esperado foi um $MI \geq 20,0\%$.

O controle negativo (CN) foi realizado com as hemácias da própria bolsa de ST utilizada na obtenção dos monócitos, previamente lavadas com solução fisiológica por 3 vezes. Parte-se do princípio que doadores de sangue são indivíduos saudáveis que raramente apresentam anticorpos aderidos às suas hemácias, ou seja, são na sua grande maioria indivíduos que apresentam TAD negativo. Foi realizado um TAD das hemácias lavadas e o resultado foi negativo em todos os experimentos realizados. Essas hemácias foram suspensas com $500\mu\text{L}$ do meio de cultura RPMI e foram pipetadas na cavidade da placa reservada para o CN, que já continha a lamínula com os monócitos aderidos. O resultado esperado foi um $MI=0$, ou seja, ausência de adesão de hemácias aos monócitos e ausência de fagocitose de hemácias pelos monócitos.

f) Número amostral e análise estatística dos dados

Para a investigação relativa a aloanticorpos antieritrocitários, considerou-se o interesse no estudo de dois grupos específicos de pacientes:

- Grupo 1: Foi proposto o estudo de todos os casos que fossem detectados no período de análise das amostras (entre os anos de 2022 e 2023).
- Grupo 2: Foi proposto o estudo de todos os casos que fossem detectados no período de análise das amostras (entre os anos de 2022 e 2023).
- Grupo 3: Para a investigação relativa a autoanticorpos antieritrocitários, foi proposto o estudo de 40 amostras a serem incluídas no período de análise das amostras (entre os anos de 2022 e 2023).

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o software estatístico R (versão 4.3.2) e foram utilizadas abordagens estatísticas com análises univariadas e bivariadas, regressão linear simples (com transformação logarítmica, quando necessário), teste de Mann-Whitney, teste t-student, teste F e correlação de Spearman. Todas as análises utilizaram o nível de significância de 5%. Além disso, foi empregada, ainda, estatística descritiva de dados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Padronização do ensaio

Um treinamento prévio da execução prática do ensaio MMA e leitura dos resultados foi feito pela doutoranda na Fundação Pró-Sangue da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com carga horária total de 40 horas.

Na CIH da Fundação Hemominas, foi definido o espaço físico do laboratório destinado aos testes e a estação de trabalho (**Figura 9**) e o Procedimento Operacional Padrão (POP) foi elaborado, bem como foram definidos todos os equipamentos, reagentes e insumos necessários para a execução da pesquisa. O suporte financeiro para o projeto foi concedido, na sua maior parte, pela própria Fundação Hemominas. O Serviço de Pesquisa da Fundação e a UFMG (por meio de recursos advindos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPQ) contribuíram na compra dos insumos que faltavam.

Figura 9 – Estação de trabalho para a realização do ensaio na Central de Imuno-Hematologia



Fonte: Acervo pessoal (2020)

No protocolo proposto, alguns pontos tiveram que ser adaptados com relação ao protocolo original, conforme descrito no **Quadro 5**.

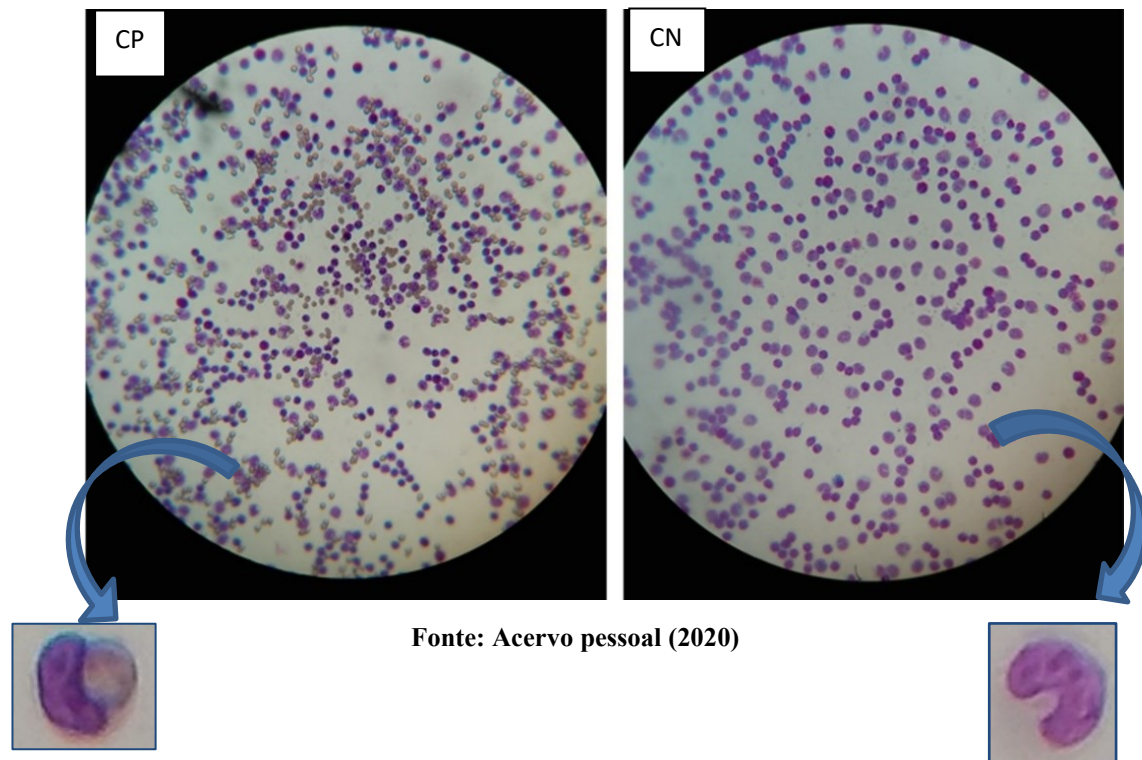
Quadro 5 – Alterações propostas no protocolo experimental com relação ao protocolo original

Etapa do ensaio	Protocolo original	Protocolo proposto	Evidência observada
Tempo para fixação e coloração das células	Fixação: 10 minutos Coloração: 20 minutos	Fixação: 05 minutos Coloração: 20 minutos	Após uma série de testes com o corante de Leishmann, foi observado que a diminuição no tempo de fixação das células promoveu melhor coloração tanto dos mononucleares quanto das hemácias, otimizando assim a leitura das lâminas, ou seja: citoplasma dos mononucleares ligeiramente basofílicos, com eventuais granulações azurófilas e núcleo basofílico e hemácias com tonalidade rósea à microscopia óptica.
Critérios para utilização de bolsas de sangue usadas para o isolamento dos monócitos	Utilização de bolsas ST viáveis para transfusão somente de doadores do sexo masculino	Utilização somente de bolsas ST com volume insuficiente para serem fracionadas e inclusão de doadores de ambos os sexos	Não foi obtida autorização da instituição para utilizar bolsas viáveis para transfusão, ainda mais em um período de pandemia e de queda no número das doações. O uso de bolsas ST com volume insuficiente foi satisfatório, considerando que são necessários somente 60mL para cada ensaio. Foram realizados testes para isolamento de monócitos tanto com bolsas oriundas de doadores homens quanto de mulheres, e os resultados foram satisfatórios com relação ao número médio de monócitos obtidos (80 monócitos/campo), sem comprometer o ensaio.
Lavagem das hemácias opsonizadas após a adsorção do anticorpo	Utilização de salina mantida a temperatura ambiente (18 a 24°C)	Utilização de salina pré-aquecida a 37°C	Considerando que a opsonização <i>in vitro</i> das hemácias é uma etapa crítica para o sucesso do ensaio e pela experiência das pesquisadoras, foi padronizado o uso de salina pré-aquecida na lavagem dessas hemácias para melhor preservar a ligação antígeno-anticorpo ocorrida a 37°C.

Fonte: Elaborado pela autora.

Foram obtidas imagens das lamínulas lidas ao microscópio óptico (aumento de 40X), tanto para os controles positivos quanto para os controles negativos (**Figura 10**). Observa-se na imagem à esquerda a presença de hemácias aderidas e fagocitadas pelos monócitos (CP). Já na fotografia à direita, observa-se a ausência de hemácias aderidas e/ou fagocitadas pelos monócitos (CN).

Figura 10– Imagens microscópicas dos controles positivo e negativo



6.2 Validação do ensaio

Na literatura nacional e internacional, pouco se encontra a respeito de processos de validação do MMA na rotina laboratorial. No Brasil, foi evidenciado um importante estudo realizado que objetivou validar esse ensaio na rotina do laboratório e que configurou um estudo pioneiro de referência na área e um ponto de partida para outros profissionais (KAHL, 2021).

A Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, tem como objetivo estabelecer critérios para a validação de métodos analíticos e sua abrangência é aplicável a insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção. O MMA não configura um ensaio puramente quantitativo, se aproximando mais de um método semiquantitativo, com leitura visual do microscopista para o cálculo do MI. Entretanto, no parágrafo 3° dessa Resolução, é estabelecido que será admitida a utilização de abordagens alternativas para a validação de métodos analíticos aplicados aos produtos biológicos, como ensaios biológicos e imunológicos, que se assemelham mais ao perfil do MMA. Dessa forma, no presente estudo, foram propostas as análises a seguir para a validação do ensaio na CIH, a fim de demonstrar que o método gera resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, atendendo a critérios objetivos.

6.2.1 Avaliação da precisão com amostras-controle

A precisão do ensaio foi estabelecida por meio da análise da repetibilidade intraensaio (intradia) e interensaio (interdia), empregando o mesmo procedimento de medição, a mesma operadora, as mesmas condições de execução e o mesmo local durante um curto período. Dessa forma, foram realizadas cinco replicatas com amostras-controle (controles positivos e negativos), conforme descrito na **Tabela 1** e na **Tabela 2**.

Tabela 1 – Resultados do *Monocyte Index* para a repetibilidade intraensaio para amostras-controle

Dia Único	Controle Testado	TAD	MI (%)
Replicata 1	CP	4+	56,5
	CN	0	0,0
Replicata 2	CP	4+	51,2
	CN	0	0,0
Replicata 3	CP	4+	53,8
	CN	0	0,0
Replicata 4	CP	4+	58,0
	CN	0	0,0
Replicata 5	CP	4+	61,2
	CN	0	0,0

NOTAS: CN= Controle negativo: amostra de doador proveniente de bolsa de ST destinada à obtenção dos monócitos. CP= Controle positivo: hemácia comercial sensibilizada com anticorpos Anti-D da classe IgG (BIORAD) e o resultado esperado para o MI deveria ser $\geq 20,0\%$. Para um MI=0 entende-se ausência de hemácias aderidas e/ou fagocitadas pelos monócitos. Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2 – Resultados do *Monocyte Index* para a repetibilidade interensaio para amostras-controle

Dia da Análise	Controle Testado	TAD	MI (%)
Dia 1	CP	4+	49,0
	CN	0	0,0
Dia 2	CP	4+	52,5
	CN	0	0,0
Dia 3	CP	4+	57,4
	CN	0	0,0
Dia 4	CP	4+	50,4
	CN	0	0,0
Dia 5	CP	4+	52,8
	CN	0	0,0

NOTAS: CN= Controle negativo: amostra de doador proveniente de bolsa de ST destinada à obtenção dos monócitos. CP= Controle positivo: hemácia comercial sensibilizada com anticorpos Anti-D da classe IgG (BIORAD) e o resultado esperado para o MI deveria ser $\geq 20,0\%$. Para um MI=0 entende-se ausência de hemácias aderidas e/ou fagocitadas pelos monócitos. Fonte: Dados da pesquisa.

A análise da precisão é obtida por meio do Coeficiente de Variação (CV), foi empregada a equação $CV=sX.100$, sendo “s” o desvio padrão das replicatas e “X” o valor médio das replicatas, conforme aplicado na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Resultados da análise estatística da precisão do ensaio com amostras-controle

Parâmetros	Ensaio Intradia		Ensaio Interdia	
	CN (MI%)	CP (MI%)	CN (MI%)	CP (MI%)
Média	0	56,14	0	52,42
Desvio-padrão	0	3,85	0	3,19
Coeficiente de Variação (%)	-	6,86	-	6,09

Fonte: Dados da pesquisa.

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos, por meio do CV, que não deve ser superior a 15%, de acordo com os critérios estabelecidos na RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 (ANVISA), o que foi atendido no presente estudo.

6.2.2 Avaliação da precisão com amostras biológicas

Foram testadas amostras biológicas (soro humano com Anti-D) para avaliar a repetibilidade intraensaio e interensaio do MMA, conforme mostrado na **Tabela 4** e na **Tabela 5**.

Tabela 4 – Resultados do *Monocyte Index* para avaliação da repetibilidade intraensaio para amostra biológica humana com Anti-D

Dia Único	PC	TAD pós-adsorção	MI (%)
Replicata 1	2+	2+	12,1
Replicata 2	2+	2+	10,9
Replicata 3	2+	2+	11,0
Replicata 4	2+	2+	12,9
Replicata 5	2+	2+	13,8

NOTA: Foram executados CP e CN para aprovação dos testes, sendo esperado para a amostra humana um MI superior a 5,0%. Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 5 – Resultados do *Monocyte Index* para avaliação da repetibilidade interensaio para amostra biológica humana com Anti-D

Dia da Análise	PC	TAD pós-adsorção	MI (%)
Dia 1	2+	2+	11,0
Dia 2	2+	2+	10,9
Dia 3	2+	2+	12,1
Dia 4	2+	2+	11,2
Dia 5	2+	2+	11,9

NOTA: Foram executados CP e CN para aprovação dos testes, sendo esperado para a amostra humana um MI superior a 5,0%. Fonte: Dados da pesquisa.

A análise da precisão intradia e interdia empregando-se amostra humana com Anti-D foi avaliada por meio do cálculo do CV, conforme mostrado na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Resultados da análise estatística da precisão do ensaio empregando-se amostra humana com Anti-D

Parâmetros	Ensaio intradia MI(%)	Ensaio interdia MI (%)
Média	12,14	11,42
Desvio-padrão	1,24	0,54
Coefficiente de Variação (%)	10,23	4,77

Fonte: Dados da pesquisa.

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos, por meio do CV, que não deve ser superior a 15%, de acordo com os critérios estabelecidos na RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 (ANVISA), o que foi atendido no presente estudo.

6.2.3 Avaliação da seletividade

De acordo com a RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, o parâmetro seletividade de um método analítico deve ser demonstrado por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra. No presente estudo, considerou-se componentes da matriz como sendo a presença de outros anticorpos no soro humano a ser analisado, além do anticorpo-alvo a ser avaliado quanto ao seu significado clínico.

Durante essa análise, foi considerado o Anti-D como anticorpo de interesse. Foram propostos dois grupos de trabalho: o primeiro sem o efeito matriz (amostra humana com Anti-D) e o segundo com o efeito matriz (amostra humana com Anti-D + Anti-E + Anti-K). Foi proposto, ainda, trabalhar com três níveis de concentração dos soros analisados, conforme mostrado na

Tabela 7.

Tabela 7- Resultados do *Monocyte Index* na avaliação do efeito matriz

Título	Sem efeito matriz			Com efeito matriz			Teste F (p-valor)	Teste t (p-valor)
	Rep. 1 (MI%)	Rep. 2 (MI%)	Rep. 3 (MI%)	Rep. 1 (MI%)	Rep. 2 (MI%)	Rep. 3 (MI%)		
16	5,1	4,6	5,4	4,9	5,3	5,0	0.4	0.9
64	13,1	12,9	13,2	12,5	12,1	12,4	0.7	0.01
256	12,4	11,5	11,8	10,9	11,9	12,0	0.7	0.5

NOTAS: Para a análise “sem efeito matriz” foram empregados soros humanos com Anti-D, em três concentrações, acrescidos de parte igual de soro “AB” (PAI negativa). Para a análise “com efeito matriz”, foram empregados os mesmos soros humanos com Anti-D, acrescidos de parte igual de soro humano contendo os anticorpos Anti-E + Anti-K. Legenda: Rep.= replicata. Fonte: Dados da pesquisa.

O teste F demonstrou que não houve diferença estatística entre as variâncias dos grupos “sem” e “com” efeito de matriz, para os três títulos avaliados ($p > 0.05$). Isso significa que não foi evidenciado efeito relacionado à matriz sobre a precisão dos resultados do MI, para os três títulos utilizados. Com relação ao efeito da presença da matriz sobre a média, o Teste t apontou diferença estatística entre as médias apenas no caso do título 64 ($p < 0.05$). Na prática do ensaio, essa diferença estatística apontada para o MI não impactaria no resultado do ensaio em si, pois uma variação do resultado ao redor da média não alteraria a interpretação do teste, considerando os valores dos *cut-off* pré-estabelecidos para o MMA (**Quadro 1**). Para os demais títulos, não foi evidenciado efeito relacionado à matriz sobre as médias dos MI. Dessa forma, foi considerado que o teste de seletividade realizado foi aprovado por atender ao que é proposto no MMA.

6.2.4 Avaliação da linearidade

De acordo com a RDC N° 166, de 24 de julho de 2017, o parâmetro linearidade de um método deve ser demonstrado por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Para isso, foram utilizadas cinco concentrações diferentes de anticorpos Anti-D humanos e as análises do MI foram feitas em triplicata, conforme descrito na **Tabela 8**.

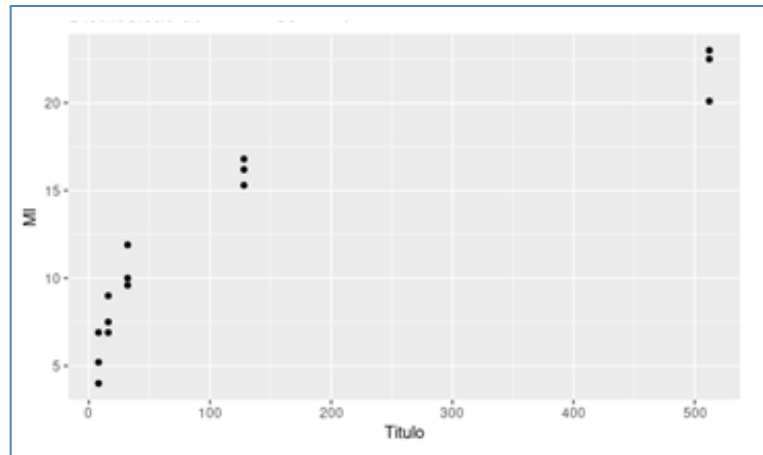
Tabela 8 – Resultados do *Monocyte Index* na avaliação da linearidade

Dia da análise	Concentração (Título)	Replicata 1 (MI%)	Replicata 2 (MI%)	Replicata 3 (MI%)
Dia 1	8	5,2	6,9	4,0
Dia 2	16	7,5	9,0	6,9
Dia 3	32	10,0	9,6	11,9
Dia 4	128	16,2	16,8	15,3
Dia 5	512	20,1	22,5	23,0

Fonte: Dados da pesquisa.

Para a análise da linearidade, os dados foram ajustados a um modelo de regressão linear simples, a fim de explicar o MI observado em função da quantidade do anticorpo (título), conforme demonstrado na **Figura 11**.

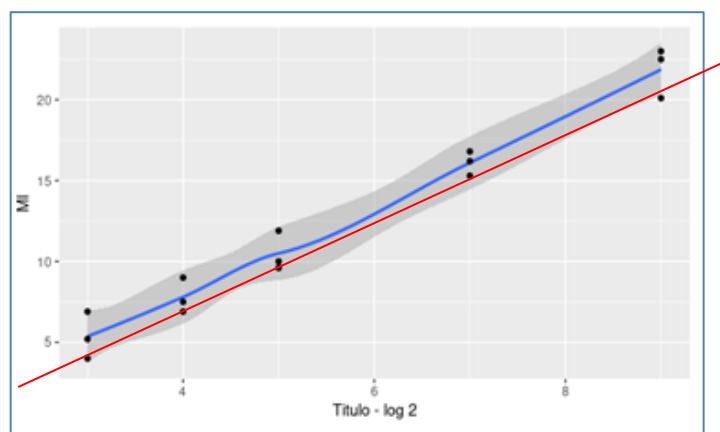
Figura 11 – Gráfico de dispersão dos valores do MI versus título do anticorpo



Fonte: Dados da pesquisa.

A distribuição dos dados despertou um convite à aplicação do logaritmo (de base 2) na variável “título” antes do ajuste linear, conforme demonstrado na **Figura 12**.

Figura 12 – Gráfico de dispersão dos valores do MI versus logaritmo de base 2 do título do anticorpo



Fonte: Dados da pesquisa.

Assim sendo, o modelo ajustado forneceu informações estatísticas, conforme demonstrado na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Resultados das estatísticas derivadas da regressão linear simples

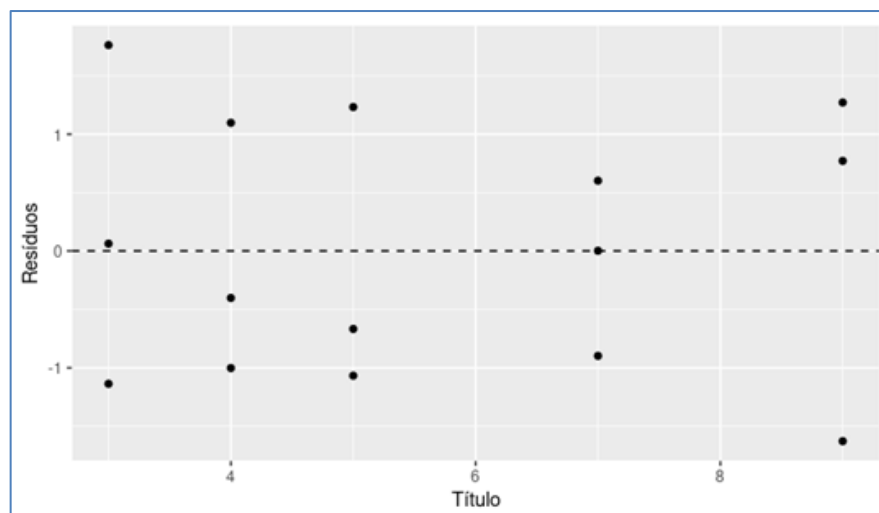
Estatísticas	
R quadrado	0.971
R quadrado ajustado	0.9687
Erro padrão	1.106
Observações	15

Fonte: Dados da pesquisa.

A regressão linear simples, após a aplicação logarítmica, mostrou que o título dos anticorpos testados prevê aproximadamente mais de 97% (coeficiente de determinação = 0.971) dos resultados do MI, comprovando a linearidade do ensaio.

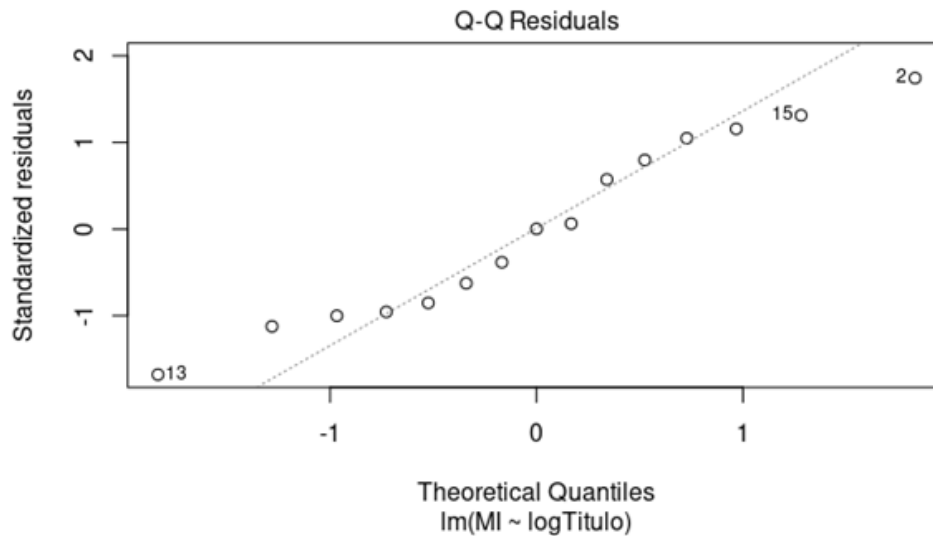
Na análise de resíduos, a **Figura 13** apresenta resíduos razoavelmente bem distribuídos em torno do intercepto de origem, indicando possível homoscedasticidade.

Figura 13 – Gráfico de análise de resíduos do modelo linear – resíduos versus título do anticorpo



Fonte: Dados da pesquisa.

Em um QQ-plot para avaliar a aderência à distribuição normal, observou-se apenas alguns poucos desvios nas duas caudas, conforme demonstrado na **Figura 14**.

Figura 14 – Gráfico QQ-plot dos resíduos no modelo linear

Fonte: Dados da pesquisa.

Para avaliar a homocedasticidade dos erros do modelo via testes, foi realizado o teste de Levene (**Tabela 10**), cuja conclusão, a 5% de significância, é de que não se pode rejeitar a hipótese nula de que a variância dos erros é igual para todos os valores do título (variável explicativa).

Tabela 10 - Resultados do teste de Levene para o modelo linear

Graus de liberdade	Estatística F	p-valor
4	0.1398	0.9635

Fonte: Dados da pesquisa.

Para testar a normalidade dos erros, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk (**Tabela 11**), cuja conclusão, a 5% de significância, é de que não se pode rejeitar a hipótese nula de que os erros seguem a distribuição normal.

Tabela 11 - Resultados do teste de Shapiro-Wilk para a normalidade dos resíduos

Estatística W	p-valor
0.9407	0.3912

Fonte: Dados da pesquisa.

Por fim, calculou-se os intervalos de confiança (IC) para o intercepto e o coeficiente de inclinação da regressão (relativo à variável “título”), conforme demonstrado na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Intervalos de confiança para o modelo de regressão

Coeficientes	Estimativas pontuais	Inferior a 95% (2.5%)	Superior a 95% (97.5%)
Intercepto	-3.159	-4.8776	-1.4396
Inclinação	2.765	2.4787	3.0517

Fonte: Dados da pesquisa.

É possível observar que tanto o coeficiente de intercepto quanto o de inclinação são estatisticamente diferentes de zero (ou seja, não-nulos), pois nenhum dos intervalos contém o valor zero. Dessa forma, ao nível de confiança de 95%, o IC para a inclinação é (2.48, 3.05). Como esse IC de 95% não inclui o valor zero, é possível concluir que uma variação no título tem efeito no valor do MI, o que reforça a relação linear entre as variáveis.

6.2.5 Avaliação de desfechos de pacientes

Essa etapa da validação consistiu em executar o MMA como forma de acompanhar alguns pacientes selecionados que receberam CHF incompatível (devido à falta de CHF compatível e após consentimento médico), de maneira a associar o valor do MI evidenciado para o hemocomponente transfundido com a recuperação clínica do paciente e a não ocorrência de hemólise pós-transfusional. Todos os médicos responsáveis pelos pacientes incluídos nessa etapa tomaram ciência de que as amostras desses pacientes seriam submetidas ao MMA com os CHF selecionados como forma de contribuir para a validação do ensaio na CIH. Controles positivos e negativos foram realizados para todos os ensaios executados. Os resultados encontrados estão descritos nas **Tabelas 13 e 14**.

Tabela 13 – Resultados dos *Monocyte Index* obtidos para os Concentrados de Hemácias testados para pacientes (continua)

Paciente testado	Motivo da transfusão	Anticorpo(s) presente(s) no soro do paciente/ Controles do ensaio	Prova Cruzada (soro do paciente + CHF)	TAD pós-adsorção	MI (%)	Relato clínico pós-transfusão
Paciente 1 (JBR)	Necessidade de reserva de 03 unidades de CHF para cirurgia (correção de aneurisma de aorta)	Anti-Ge	2+ (1°CHF)	1+	0	O paciente recebeu 01 CHF no intraoperatório e 02 CHF no pós-operatório, após apresentar sangramento. (Hb pré-transfusional=5,7g/dL; Hb pós-transfusional=7,9g/dL) Alta hospitalar relatada no 8° dia após o procedimento e recuperação satisfatória, sem relato de hemólise pós-transfusional.
		CN	NR	NR	0	
		CP	NR	NR	>20,0	
		Anti-Ge	2+ (2°CHF)	0*	0	
		CN	NR	NR	0	
		CP	NR	NR	>20,0	
		Anti-Ge	2+ (3°CHF)	0*	0	
		CN	NR	NR	0	
CP	NR	NR	>20,0			
Paciente 2 (CSM)	Gestante com doença falciforme e necessidade de transfusão antes do parto.	Anti-D + Anti-G + Anti-E + Anti-M + Anti-S + anticorpo de especificidade não determinada	2+ (1°CHF)	2+	4,0 (<5,0)	De acordo com o hospital, os CHF não foram transfundidos e as bolsas foram devolvidas para a Fundação Hemominas.
		CN	NR	NR	0	
		CP	NR	NR	>20,0	
		Anti-D + Anti-G + Anti-E + Anti-M + Anti-S + anticorpo de especificidade não determinada	1+ (2°CHF)	1+	2,0 (<5,0)	
		CN	NR	NR	0	
CP	NR	NR	>20,0			

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 13 – Resultados dos *Monocyte Index* obtidos para os Concentrados de Hemácias testados para pacientes (conclusão)

Paciente testado	Motivo da transfusão	Anticorpo(s) presente(s) no soro do paciente/ Controles do ensaio	Prova Cruzada (soro do paciente + CHF)	TAD pós-adsorção	MI (%)	Relato clínico pós-transfusão
Paciente 3 (LSG)	Gestante com doença falciforme e necessidade de transfusão antes do parto. PC incompatíveis com CHF.	Anti-C + Anti-Fy ^a + Anti-Jk ^a + anticorpo das classes IgG + IgM de especificidade não determinada	2+ (1°CHF)	2+	0	A paciente recebeu o primeiro CHF antes do parto (Hb pré-transfusional=6,7g/dL; Hb pós-transfusional=8,3g/dL. O segundo CHF foi transfundido no período pós-parto (Hb pré-transfusional=5,7g/dL; Hb pós-transfusional=7,0g/dL). Não houve alteração de marcadores laboratoriais para hemólise (bilirrubina indireta, lactato desidrogenase e reticulócitos), com relação aos valores basais da paciente, após as duas transfusões realizadas.
		CN	NR	NR	0	
		CP	NR	NR	>20,0	
		Anti-C + Anti-Fy ^a + Anti-Jk ^a + anticorpo das classes IgG + IgM de especificidade não determinada	2+ (2°CHF)	0*	0	
		CN	NR	NR	0	
CP	NR	NR	>20,0			
Paciente 4 (SMS)	Necessidade de preparo para cirurgia de revascularização de membro inferior esquerdo (Hb=6,0).	Anti-K + Anti-Fy ^a + anticorpo de especificidade não determinada	0*	1+	0	De acordo com o hospital, o CHF não foi transfundido e a bolsa foi devolvida para a Fundação Hemominas.
		CN	NR	NR	0	
		CP	NR	NR	>20,0	

CN: Controle Negativo - amostras de doadores provenientes de bolsas de ST destinadas à obtenção dos monócitos. **CP: Controle positivo** - hemácias comerciais sensibilizadas com anticorpos Anti-D da classe IgG. **NR: Não realizado**. **Hb: hemoglobina**. Os testes PC e TAD pós-adsorção foram realizados pela metodologia gel-teste, sendo que para uma intensidade de reação de “traços” entende-se uma reação positiva inferior a 1+ e para a intensidade de reação de 0* (“poeira”) entende-se a reação positiva mais fraca possível de ser detectada a olho nu. Para um MI=0 entende-se ausência de hemácias aderidas e/ou fagocitadas pelos monócitos. O relato clínico pós-transfusão foi fornecido pelo serviço de origem onde o paciente foi assistido. Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 14 – Resultados dos *Monocyte Index* obtidos para amostra de gestante aloimunizada cujo feto apresentou Doença Hemolítica Perinatal

Paciente (AGIF)	Motivo da testagem	Anticorpo presente no soro da paciente/ Controles do ensaio	Prova Cruzada	TAD pós-adsorção	MI (%)	Desfecho clínico
Gestante aloimunizada acompanhada em centro de referência em medicina fetal (idade gestacional: por volta de 20 semanas)	Feto apresentou quadro grave de hemólise intrauterina	Anti-M reativo a 37°C	4+	4+	42,0	Paciente submetida a transfusões intrauterinas devido à necessidade de prover oxigenação para o feto. Parto previsto ao completar a 32ª semana de gestação, porém, o feto não resistiu e foi constatada morte intrauterina.
			(Teste 1: soro da paciente + hemácia do genitor do feto (antígeno “M” positiva))			
		CN	NR	NR	0	
		CP	NR	NR	>20,0	
		Anti-M reativo a 37°C	4+	4+	23,5	
			(Teste 2: soro da paciente + hemácia de CHF antígeno “M” positiva)			
		CN	NR	NR	0	
		CP	NR	NR	>20,0	

CN: Controle Negativo - amostras de doadores provenientes de bolsas de ST destinadas à obtenção dos monócitos. CP: Controle positivo - hemácias comerciais sensibilizadas com anticorpos Anti-D da classe IgG. NR: Não realizado. Os testes PC e TAD pós-adsorção foram realizados pela metodologia gel-teste. Para um MI=0 entende-se ausência de hemácias aderidas e/ou fagocitadas pelos monócitos. O desfecho clínico foi fornecido pelo serviço de origem onde a paciente foi assistida. Fonte: Dados da pesquisa.

No caso do paciente 1 (JBR) havia a necessidade de reserva de CHM para que o paciente fosse submetido à cirurgia de correção de aneurisma de aorta abdominal. Foi evidenciada a presença de Anti-Ge no soro do paciente. A prescrição médica solicitava, no mínimo, 03 CHM para a realização do procedimento. A situação clínica do paciente era muito delicada, pois o atraso na sua cirurgia poderia culminar em um desfecho desfavorável. Como não havia CHM compatível, o MMA foi proposto como teste auxiliar na avaliação da importância clínica do aloanticorpo. Foram liberadas três CHF, que foram transfundidos. Não houve evidência clínica de reação hemolítica pós-transfusional e o paciente recebeu alta melhorada dias depois.

Já a paciente 2 (CSM) apresentava DF e necessitava de transfusão para preparo pré-parto. Na sua amostra de soro, além da evidência de múltiplos aloanticorpos, havia ainda a presença de um anticorpo cuja especificidade não pode ser determinada pelos testes sorológicos convencionais. Todas as PC com os CHF disponíveis eram incompatíveis. O MMA foi proposto como teste auxiliar, sendo os resultados do MI de 4,0% e 2,0%, ou seja, inferiores a 5,1%. Como se tratava de paciente gestante e com doença falciforme, que enfrentava inúmeros desafios imunológicos, as transfusões de CHF com MI diferente de zero não são recomendadas. Dessa forma, as transfusões não aconteceram e outras abordagens foram adotadas.

Com relação à paciente 3 (LSG), semelhante à paciente 2, também havia a necessidade de preparo transfusional no pré-parto para gestante com DF. Além de múltiplos aloanticorpos, havia ainda a presença de anticorpos das classes IgG e IgM cuja especificidade não pode ser determinada pelos testes sorológicos convencionais, com PC incompatíveis com os CHF disponíveis. O MMA foi proposto como teste auxiliar e os MI das bolsas testadas foram igual a zero. A paciente recebeu 02 CHM em momentos distintos e apresentou boa recuperação.

A respeito do paciente 4 (SMS), havia a necessidade de preparo para cirurgia de revascularização de membro inferior esquerdo, pois o paciente apresentava uma importante anemia de causa não especificada. Ele apresentava a presença de Anti-K + Anti-Fya + anticorpo de especificidade não determinada pelos testes sorológicos convencionais, sem CHF compatível. O MMA foi proposto como teste auxiliar e resultou em MI igual a zero. A bolsa foi enviada para o hospital. Entretanto, durante o procedimento, não houve a necessidade de transfundir o paciente.

Com relação à paciente AGIF, tratava-se de gestante aloimunizada cujo feto sofreu consequências drásticas pela ação do aloanticorpo Anti-M. Esse caso raro foi alvo da redação e submissão de um artigo científico (*Case Study*) na revista *Transfusion Medicine*, intitulado “*Alloanti-M-induced intrauterine fetal death: the role of the Monocyte Monolayer Assay in elucidating Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn*” conforme será mostrado mais adiante.

Todos os resultados obtidos nessa etapa da validação foram essenciais para considerar que o ensaio *in vitro* proposto é capaz de refletir os desfechos *in vivo* no que se refere à avaliação da ocorrência ou não de hemólise, seja após transfusão de hemácias, seja no acompanhamento materno-fetal.

6.3 Grupo 1: avaliação do significado clínico de anticorpos inespecíficos

a) Resultados

Foi estudado um grupo de oito mulheres com DF, politransfundidas, aloimunizadas, com idade inferior a 30 anos e que apresentavam anticorpo cuja especificidade não foi determinada pelos testes sorológicos de rotina. Esse grupo foi eleito na pesquisa por representar uma amostra de pacientes do sexo feminino com DF, com histórico de hiperemólise e que frequentemente necessitam de transfusão de hemácias sem que haja a disponibilidade de CHF compatível.

O MMA foi executado conforme padronizado. Os resultados do MI foram calculados e relacionados às seguintes variáveis: histórico gestacional, intensidade de aglutinação da reação na PC e do TAD após a adsorção do aloanticorpo. Os resultados estão descritos na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Grupo 1: resultados do *Monocyte Index* e associação com outras variáveis

Amostra	Gestação (atual)	PC	TAD pós-adsorção	MI (%)	Conclusão	Anticorpo apresenta importância clínica?
1	Não	2+	2+	1,0	Positivo	Sim
2	Não	2+	2+	2,0	Positivo	Sim
3	Sim	1+	2+	5,1	Positivo	Sim
4	Sim	2+	2+	4,0	Positivo	Sim
5	Sim	1+	1+	2,0	Positivo	Sim
6	Sim	2+	2+	0,0	Negativo	Não
7	Sim	2+	W	0,0	Negativo	Não
8	Sim	2+	2+	0,0	Negativo	Não

NOTA: As leituras das intensidades de reação da PC e do TAD podem variar da seguinte forma: 0 (negativo), W (positivo fraco), 1+, 2+, 3+ e 4+. Fonte: Dados da pesquisa.

Uma outra forma de sumarizar dados foi em termos dos quartis ou percentis. Essas medidas são particularmente úteis para dados não simétricos, conforme mostrado na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Grupo 1: comparação da distribuição dos valores do *Monocyte Index* (%) segundo outras variáveis

Variável	Mínimo	Primeiro Quartil	Mediana	Terceiro Quartil	Máximo	P-valor*
Gestação						
Sim (n= 6)	0	0	1	3.5	5.1	0.9
Não (n= 2)	1	1.2	1.5	1.8	2	
PC						
1+ (n= 2)	2	2.8	3.5	4.3	5.1	**
2+ (n= 6)	0	0	0.5	1.8	4	
TAD***						
W (n= 1)	0	0	0	0	0	**
1+ (n= 1)	2	2	2	2	2	
2+ (n= 6)	0	0.25	1.5	3.5	5.1	

* Valor-p do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. ** Resultados da correlação de Spearman para a relação entre MI versus PC e TAD serão mostrados à frente. ***TAD: realizado após a adsorção do anticorpo. W=positivo fraco. Fonte: Dados da pesquisa.

b) Discussão

No presente estudo, é possível observar que, das 8 pacientes incluídas, 6 (75%) estavam grávidas e necessitavam de transfusão de hemácias, enquanto 2 (25%) não estavam, mas também necessitavam de transfusão para tratar agravos relacionados à doença. Dentre as gestantes, 3 (50%) apresentaram um MI positivo e 3 (50%) um MI negativo. Já entre as 2 não gestantes, todas apresentaram um MI positivo. Apesar da maioria dos resultados positivos encontrados para o MI ser inferior a 5,0%, considera-se que o anticorpo inespecífico investigado apresenta importância clínica significativa, por se tratar de pacientes com DF. Assim, desejava-se conhecer se a gestação estaria ou não estatisticamente associada a um resultado positivo para o MI, quando se investigou a relevância clínica do anticorpo inespecífico. No entanto, essa associação não foi comprovada ($p=0,9$). O número reduzido de participantes nesse grupo pode ter impactado no resultado encontrado.

É sabido que pacientes com DF apresentam taxas muito mais altas de aloimunização como resultado da exposição a hemácias de doadores em comparação com indivíduos transfundidos sem DF. Aproximadamente 30% dos indivíduos com DF desenvolvem aloanticorpos antieritrocitários durante toda a sua vida, em comparação com 2–5% de todos os outros

indivíduos transfundidos. Dessa forma, a aloimunização pode levar a importantes limitações no tratamento transfusional desses indivíduos (CAMPBELL-LEE & KITTLES, 2014).

Na rotina laboratorial, quando um resultado positivo é obtido na triagem de anticorpos, porém a especificidade do anticorpo não pode ser determinada, o anticorpo é denominado “anticorpo de especificidade indeterminada” e a sua ocorrência é relativamente comum entre pacientes politransfundidos. A presença desses anticorpos que pode sugerir um anticorpo em processo de desenvolvimento ou pode indicar, ainda, um anticorpo cujo título diminuiu para um nível mínimo com relação ao limite de detecção do método, ou seja, os chamados anticorpos evanescentes (TORMEY & HENDRICKSON, 2013).

De acordo com a literatura, mulheres grávidas com DF apresentam risco aumentado de recorrência de episódios de dor aguda, particularmente durante e após o segundo trimestre de gestação. Evidências científicas mostram que a estratégia de transfusão profilática proporciona uma redução na mortalidade materna, de episódios de dor vaso-oclusiva, de complicações pulmonares (incluindo embolia pulmonar), de pielonefrite, de mortalidade perinatal e de morte neonatal e prematuridade (SHARMA *et al.*, 2020).

Além do risco de ocorrência de RTH tardia em pacientes politransfundidos com DF, em que há a depuração prematura das hemácias transfundidas como resultado de uma resposta anamnésica rápida pelo indivíduo previamente aloimunizado, é sabido que, em algumas situações, essas reações levam não apenas à destruição das hemácias do doador, mas também das hemácias do próprio receptor, quadro conhecido como síndrome de hiperemólise. Os fatores associados à ocorrência de hiperemólise são pouco compreendidos, embora uma história pregressa de reação hiperemolítica possa ser o principal fator de risco para outra reação futura (BALBUENA-MERLE & HENDRICKSON, 2019).

O quadro de hiperemólise nem sempre está associado à detecção, no receptor, de novos aloanticorpos. Alguns pacientes podem apresentar TAD positivos por autoanticorpos associados ou por anticorpos inespecíficos, o que dificulta ainda mais a análise crítica diante dos resultados dos testes pré-transfusoriais desses pacientes. Também é conhecido que alguns pacientes podem apresentar testes de triagem de anticorpos completamente negativos, sem nenhuma evidência de novos alo ou autoanticorpos e ainda assim cursarem com RTH tardias com hiperemólise, o que pode ser explicado pela presença de aloanticorpos direcionados a

antígenos de baixa incidência na população ou antígenos não presentes nas hemácias-reagentes utilizadas nos testes de triagem (BALBUENA-MERLE & HENDRICKSON, 2019).

De acordo com uma revisão sistemática recente, parece haver uma prevalência mais elevada da síndrome de hiperemólise em mulheres, juntamente com a maioria dos casos associados à DF. Entretanto, os autores destacaram que, infelizmente, há muito poucas publicações sobre mulheres grávidas que possam ser usadas como orientação (RIHSLING *et al.*, 2023).

Considerando que a presença desses anticorpos inespecíficos pode provocar PC incompatível e que o seu significado clínico é frequentemente desconhecido, faz-se necessário adotar estratégias para atender adequadamente a demanda transfusional dos pacientes que apresentam tais anticorpos (CONRADO *et al.*, 2019).

A aplicação do MMA é recomendada como exame complementar em pacientes aloimunizados que apresentam anticorpos inespecíficos e com predisposição para evoluir para RTH e hiperemólise, especialmente pacientes com DF. Ao implementar o MMA como uma segunda prova cruzada, aumenta-se a segurança transfusional desses receptores com possibilidade ou histórico de hiperemólise, transfundindo apenas quando o MMA for negativo e monitorando de perto o período pós-transfusional (CRUZ *et al.*, 2023). Dessa forma, considerando o perfil das pacientes incluídas no Grupo 1, apesar dos resultados positivos para o MMA não terem ultrapassado um valor de 5,1% para o MI, ainda assim a transfusão das bolsas testadas não é recomendada. Desse modo, resultados negativos para o MMA dão maior suporte para o médico no momento de autorizar a transfusão de hemácias.

São raros os estudos que investigaram a importância clínica desses anticorpos inespecíficos em pacientes com DF. Dentre esses poucos estudos, um se destacou por ter avaliado o significado clínico de anticorpos inespecíficos em uma amostra de 32 pacientes que apresentavam condições clínicas variadas, empregando-se também o MMA. Desse grupo de pacientes, 12 (37,5%) apresentaram anticorpo inespecífico com significado clínico relevante, enquanto 20 (62,5%) não apresentaram. Dentre os pacientes avaliados, 7 apresentavam DF e, em 5 desses, foram observados anticorpos inespecíficos clinicamente importantes. No entanto, a presença da doença não foi estatisticamente associada à relevância clínica do anticorpo investigado ($p=0.208$). Os autores também apontam que o baixo número de participantes de pesquisa pode ter relação com o resultado estatístico observado (CONRADO *et al.*, 2019).

No Grupo 1, buscou-se conhecer, ainda, uma possível associação estatisticamente válida entre as intensidades de reação da PC e do TAD pós-adsorção com o MI observado para cada paciente. A análise relativa a esse objetivo será mostrada mais adiante (**item 6.6**).

6.4 Grupo 2: avaliação do significado clínico de anticorpos direcionados a antígenos de alta frequência populacional

a) Resultados

Foi estudado um grupo de 15 pacientes, de ambos os sexos, que apresentavam aloanticorpos da classe IgG direcionados a antígenos de alta frequência na população. Esse grupo foi eleito na pesquisa por representar uma amostra de pacientes candidatos a receber sangue raro ou mulheres aloimunizadas em contexto gestacional.

O MMA foi executado e os resultados do MI foram calculados e relacionados às seguintes variáveis: associação com outros aloanticorpos, sexo, histórico gestacional, histórico transfusional, intensidade de aglutinação da reação na PC e do TAD após a adsorção do aloanticorpo. Os resultados estão descritos na **Tabela 17**.

Tabela 17 - Grupo 2: resultados do *Monocyte Index* e associação com outras variáveis

Amostras	Associação com outros aloanticorpos	Sexo	Gestação prévia	Transfusão Prévia	PC	TAD pós-adsorção	MI (%)	Conclusão	Clinicamente relevante?
Aloac ind.	Sim	M	NA	Sim	W	1+	0,0	Negativo	Não
Aloac ind.	Sim	M	NA	Sim	W	W	0,0	Negativo	Não
Anti-U	Não	M	NA	Sim	2+	1+	0,0	Negativo	Não
Anti-Ge	Não	M	NA	Sim	2+	W	0,0	Negativo	Não
Anti-Ge	Não	M	NA	Sim	2+	W	0,0	Negativo	Não
Anti-Ge	Não	M	NA	Sim	2+	W	0,0	Negativo	Não
Anti-U	Sim	F	Sim	Não	2+	W	0,0	Negativo	Não
Anti-Rh29	Não	F	Sim	Não	3+	4+	0,0	Negativo	Não
Anti-Lu ^b	Não	M	NA	Não	2+	3+	0,0	Negativo	Não
Anti-Ge	Não	M	NA	Não	2+	3+	0,0	Negativo	Não
Anti-Lu ^{b*}	Não	F	Não	Sim	2+	1+	0,0	Negativo	Não
Anti-hr ^S	Sim	M	NA	Sim	2+	3+	0,0	Negativo	Não
Anti-hr ^B	Não	F	Sim	Não	W	W	1,0	Positivo	Não
Anti-PP1Pk	Não	M	NA	Sim	3+	3+	31,5	Positivo	Sim
Anti-M ^{**}	Sim	F	Sim	Não	4+	4+	48,2	Positivo	Sim

***Anti-Lub identificado em gestante durante o pré-natal; **Anti-M reativo a 37°C envolvido em DHPN. NOTAS: Aloac ind.= aloanticorpo de especificidade indeterminada; NA= não se aplica; W= *weak* (reação fraca); M= masculino; F= feminino. Fonte: Dados da pesquisa.**

Uma outra forma de sumarizar dados é em termos dos quartis ou percentis. Essas medidas são particularmente úteis para dados não simétricos, conforme mostrado na **Tabela 18**.

Tabela 18 – Grupo 2: comparação da distribuição dos valores da variável *Monocyte Index (%)* segundo outras variáveis

Variável	Mínimo	Primeiro Quartil	Mediana	Terceiro Quartil	Máximo	P-valor*
Associação com outros aloanticorpos						
Sim (n= 5)	0	0	0	0	48	0.9
Não (n= 10)	0	0	0	0	32	
Sexo						
Masculino (n= 10)	0	0	0	0	32	0.2
Feminino (n= 5)	0	0	0	0	48	
Gestação prévia						
Sim (n= 4)	0	0	0.5	13	48	0.4
Não (n= 1)	0	0	0	0	0	
Transfusão prévia						
Sim (n= 9)	0	0	0	0	32	0.3
Não (n= 6)	0	0	0	0.75	48	
Prova de compatibilidade						
W (n= 3)	0	0	0	0.5	1	**
2+ (n= 9)	0	0	0	0	0	
3+ (n= 2)	0	7.9	16	23.6	32	
4+ (n= 1)	48	48	48	48	48	
TAD pós-adsorção						
W (n= 6)	0	0	0	0	1	**
1+ (n= 3)	0	0	0	0	0	
3+ (n= 4)	0	0	0	7.9	32	
4+ (n= 2)	0	12	24	36	48	

* Valor-p do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. ** Resultados da correlação de Spearman para a relação entre MI versus PC e TAD serão mostrados à frente. Fonte: Dados da pesquisa.

b) Discussão

No Grupo 2, foi avaliado o significado clínico de 15 aloanticorpos direcionados a antígeno de elevada frequência, oriundos de pacientes que, por motivos diversos, necessitavam de transfusão ou mulheres gestantes que apresentaram PAI positiva durante o pré-natal.

Um tipo sanguíneo considerado raro é definido, de acordo com a ISBT, quando a frequência do fenótipo na população é inferior a um para cada mil indivíduos (<1:1000), em uma determinada região ou país, ou ainda um tipo sanguíneo que apresenta uma combinação da ausência de expressão de antígenos específicos (BRASIL, 2022).

Existem diferentes estratégias de busca por sangue raro. Na maioria das vezes, a identificação de fenótipos raros de grupos sanguíneos ocorre durante a avaliação imuno-hematológica pré-transfusional. Em algumas situações, como cirurgias eletivas, dependendo do quadro clínico do paciente, a doação autóloga pode ser incentivada. Em casos nos quais somente é possível considerar doações do tipo alogênicas para a transfusão de um paciente que apresenta sangue raro, a busca familiar passa a ser a principal estratégia, visto que a probabilidade de irmãos apresentarem o fenótipo negativo para o antígeno correspondente é de, no mínimo, 25%. Entretanto, em casos de combinação de anticorpos de diferentes especificidades, a chance de se encontrar um fenótipo estendido compatível passa a ser menor. Ainda assim, a busca familiar normalmente apresenta mais sucesso do que a procura aleatória na população de doadores (BRASIL, 2022).

No Grupo 2, dos 15 aloanticorpos investigados, 13 (87%) não apresentaram importância clínica significativa, enquanto apenas 2 (13%) foram clinicamente relevantes. Esses resultados mostraram que, na sua grande maioria, os aloanticorpos avaliados não apresentavam relevância clínica significativa. Isso aponta para o fato de que o MMA pode mudar a perspectiva diante de casos desafiadores na medicina transfusional e também na obstetria.

Para o Grupo 2, não foi possível observar associação estatisticamente válida entre o MI observado para os aloanticorpos estudados e as outras variáveis, ou seja, associação com outros aloanticorpos, sexo, histórico gestacional e histórico transfusional ($P > 0.05$). O baixo número de participantes de pesquisa nesse grupo pode ter impactado no resultado encontrado, apesar de serem anticorpos considerados raros de serem evidenciados em uma rotina laboratorial.

Na literatura, muitas publicações envolvendo o tema são advindas de relatos de casos, ou seja, são exploradas situações específicas causadas por determinados aloanticorpos direcionados a antígenos de alta frequência, conforme já discutido anteriormente. Outros estudos investigaram a relevância clínica de um conjunto de anticorpos e, dentre esses, alguns aloanticorpos semelhantes aos que foram aqui abordados, porém, com foco apenas no resultado no MMA. Dessa forma, a investigação conduzida neste estudo, associando outras variáveis, se torna inédita.

No Grupo 2, buscou-se conhecer, ainda, uma possível associação estatisticamente válida entre as intensidades de reação da PC e do TAD pós-adsorção com o MI observado para cada paciente. A análise relativa a esse objetivo será mostrada mais adiante (**item 6.6**).

O suporte transfusional para pacientes que apresentam aloanticorpos direcionados a antígenos de alta prevalência é frequentemente desafiador, por ser uma assistência de custo elevado e demorada, e nem sempre bem-sucedida, o que coloca a vida do paciente em risco. Quando unidades antígeno-negativas não estão prontamente disponíveis para pacientes aloimunizados, torna-se importante estabelecer o significado clínico do aloanticorpo para conhecer o risco de uma reação hemolítica pós-transfusão (NOUMSI *et al.*, 2015; ARNDT & GARRATY, 2004).

Um estudo norte-americano semelhante ao presente estudo investigou o significado clínico de 61 aloanticorpos, ao longo de sete anos, empregando o MMA e adotando um *cut-off* de 5% acima do qual o anticorpo seria definido como clinicamente relevante. Um total de 19 anticorpos (31,1%) apresentaram um MI > 5%, enquanto 42 (68,9%) forneceram um MI inferior a 5% ou negativo. Os autores destacaram evidências de que anticorpos de mesma especificidade, porém de amostras distintas, forneceram resultados variáveis do MI, o que pode estar associado à quantidade de anticorpos opsonizando a hemácia testada e à sua subclasse. Os autores relataram transfusões de 103 unidades de sangue antígeno-positivo para 31 pacientes aloimunizados, empregando o MMA como uma segunda prova cruzada. Com base em relatórios de centros médicos, nenhum desses pacientes apresentou sinais clínicos de hemólise pós-transfusional (NOUMSI *et al.*, 2015).

Dos 15 aloanticorpos investigados no presente estudo, o Anti-Ge (Gerbich) foi o mais frequentemente testado. Das quatro amostras incluídas, nenhuma delas demonstrou um MI > 5,0%. Em geral, a produção desse aloanticorpo advém de transfusão prévia ou gestação, mas também pode ocorrer naturalmente. JASKIEWICZ *et al.* (2018) mostraram que anticorpos Gerbich foram clinicamente significativos, podendo estar relacionados a RTH que, em geral, foi leve. A investigação de anticorpos direcionados a antígenos de alta prevalência do sistema Gerbich é uma das principais indicações para a emprego do MMA, como forma de prever o significado clínico desses aloanticorpos e, dessa forma, evitar a necessidade de recorrer a bolsas raras (JASKIEWICZ *et al.*, 2018).

Vale mencionar que os resultados do MMA podem mudar à medida em que transfusões de unidades antígeno-positivas vão acontecendo. Além disso, a sobrevida da hemácia incompatível transfundida também pode diminuir, comparando a uma hemácia compatível. Essa observação ainda carece de ser mais bem investigada por mais estudos de

acompanhamento pós-transfusional desses pacientes (NOUMSI *et al.*, 2015; TONG *et al.*, 2019).

Diante dos resultados observados nesse grupo, cabe destacar o aloanticorpo Anti-PP1Pk (antigamente denominado de Anti-Tj^a). Esse anticorpo foi identificado em paciente do sexo masculino, com necessidade de reserva de sangue para a realização de prostatectomia. O resultado do MMA foi positivo (MI=31,5%), ou seja, o aloanticorpo foi avaliado como clinicamente significativo. O paciente em questão apresentava o fenótipo extremamente raro “p”, além de ser RhD negativo, ou seja, a busca por um CHF se tornaria ainda mais desafiadora. A frequência desse fenótipo raro na população europeia é de 5-8/milhão de pessoas, o que mostra o quão difícil é identificar um doador raro. Anticorpos Anti-PP1Pk podem se formar espontaneamente já na infância e são uma mistura de anticorpos IgG e IgM. São hemolisinas potentes associadas a graves RTH e DHPN (DI CIACCIO *et al.*, 2021; POOLE & DANIELS, 2007).

6.5 Grupo 3: avaliação do significado clínico de autoanticorpos da classe IgG

a) Resultados

Foi estudado um grupo de 40 pacientes, de ambos os sexos, que apresentavam autoanticorpos da classe IgG. Esse grupo foi eleito na pesquisa por representar uma amostra de pacientes que frequentemente não dispõem de CHM compatível, justamente porque o autoanticorpo apresenta a característica de se ligar a antígenos próprios do indivíduo e que são amplamente expressos na população, resultando em PC incompatíveis.

O MMA foi executado e os resultados do MI foram calculados e relacionados às seguintes variáveis: condição clínica, sexo, associação com aloanticorpos, associação com autoanticorpos da classe IgM, histórico gestacional e transfusional, intensidade de aglutinação da reação na PC e do TAD após a adsorção do autoanticorpo estudado. Os resultados estão descritos na **Tabela 19**.

Tabela 19 - Grupo 3: resultados do *Monocyte Index* e associação com outras variáveis (continua)

Amostra	Dados clínicos	Associação com aloac	Associação com autoac IgM	Sexo	Gestação	Transfusão prévia	PC	TAD pós-adsorção	MI (%)	Conclusão	Clinicamente relevante?
1	DF	Sim	Não	F	Não	Sim	2+	2+	0,0	Negativo	Não
2	SMD	Sim	Não	F	Sim	Sim	2+	W	0,0	Negativo	Não
3	Beta Talassemia	Sim	Sim	M	NA	Sim	2+	2+	0,0	Negativo	Não
4	Beta Talassemia	Sim	Sim	M	NA	Sim	2+	W	0,0	Negativo	Não
5	LH + S. Evans	Não	Não	F	Não	Sim	2+	4+	0,0	Negativo	Não
6	AHAI	Não	Não	F	Não	Não	2+	2+	0,0	Negativo	Não
7	DF	Não	Sim	M	NA	Sim	1+	W	0,0	Negativo	Não
8	DF+DRC	Sim	Sim	M	NA	Sim	2+	2+	0,0	Negativo	Não
9	Linfoma+AHAI	Não	Sim	M	NA	Não	4+	4+	62,1	Positivo	Sim
10	IRC	Não	Não	F	Sim	Sim	2+	4+	2,0	Positivo	Não
11	IRC+pneumonia	Não	Sim	M	NA	Sim	2+	4+	26,4	Positivo	Sim
12	Anemia a esclarecer	Não	Não	F	Sim	Não	2+	3+	0,0	Negativo	Não
13	LLC + HDA	Não	Sim	F	Sim	Não	2+	2+	0,0	Negativo	Não
14	Gestação com elevado risco de sangramento	Não	Não	F	Sim	Não	2+	2+	0,0	Negativo	Não
15	Fibrose hepática	Não	Sim	F	Sim	Sim	2+	3+	2,0	Positivo	Não
16	Doença de Crohn	Não	Sim	F	Sim	Não	1+	0	0,0	Negativo	Não
17	Bicitopenia a esclarecer	Sim	Sim	F	Não	Não	3+	3+	0,0	Negativo	Não
18	Anemia grave	Não	Não	M	NA	Não	2+	4+	0,0	Negativo	Não
19	Cirrose Hepática	Não	Não	M	NA	Não	3+	4+	0,0	Negativo	Não
20	Anemia + Plaquetopenia	Não	Sim	F	Não	Não	2+	1+	0,0	Negativo	Não
21	AHAI	Sim	Sim	F	Sim	Não	2+	1+	0,0	Negativo	Não
22	IP+ anemia sintomática	Não	Sim	M	Não	Não	W	W	0,0	Negativo	Não

Tabela 19 - Grupo 3: resultados do *Monocyte Index* e associação com outras variáveis (conclusão)

Amostra	Dados clínicos	Associação com aloac	Associação com autoac IgM	Sexo	Gestação prévia	Transfusão prévia	PC	TAD pós-adsorção	MI (%)	Conclusão	Clinicamente relevante?
23	HDA + anemia aguda	Sim	Não	M	NA	Sim	W	W	0,0	Negativo	Não
24	Anemia grave + Diabetes mellitus + HAS	Não	Sim	F	Sim	Não	3+	3+	0,0	Negativo	Não
25	LNH	Não	Sim	F	Sim	Não	W	W	0,0	Negativo	Não
26	COVID-19 + Diabetes + HAS	Não	Não	F	Sim	Não	2+	4+	0,0	Negativo	Não
27	DF	Sim	Não	M	NA	Sim	3+	3+	0,0	Negativo	Não
28	IAM	Não	Não	M	NA	Não	2+	2+	0,0	Negativo	Não
29	LMA	Sim	Não	F	Não	Sim	2+	W	0,0	Negativo	Não
30	Anemia com repercussão clínica	Sim	Não	F	Sim	Sim	W	W	0,0	Negativo	Não
31	Pneumonia grave + disfunção renal	Não	Não	M	NA	Não	2+	2+	0,0	Negativo	Não
32	Miomatose uterina	Não	Sim	F	Não	Sim	1+	W	0,0	Negativo	Não
33	DRC + Infecção Trato Urinário	Sim	Sim	F	Sim	Sim	W	2+	0,0	Negativo	Não
34	Mielodisplasia	Sim	Sim	F	Não	Não	2+	W	0,0	Negativo	Não
35	Síndrome HELLP	Não	Não	F	Sim	Não	2+	2+	0,0	Negativo	Não
36	IAM	Não	Não	M	NA	Não	2+	2+	2,0	Positivo	Não
37	Cirurgia de revascularização	Não	Não	M	NA	Não	2+	W	4,0	Positivo	Não
38	Angina instável	Não	Não	M	NA	Não	2+	W	2,0	Positivo	Não
39	IAM	Não	Não	M	NA	Não	2+	2+	1,0	Positivo	Não
40	IAM	Não	Não	M	NA	Não	2+	2+	4,0	Positivo	Não

NOTAS: SMD= Síndrome Mielodisplásica; LH=Linfoma de Hodgkin; AHAI=Anemia Hemolítica Autoimune; IRC= Insuficiência Renal Crônica; DRC=Doença Renal Crônica; LLC=Leucemia Linfocítica Crônica; IP=imunodeficiência primária; HDA=Hemorragia Digestiva Alta; HAS=Hipertensão Arterial Sistêmica; LNH=Linfoma não- Hodgkin ; IAM=Infarto Agudo do Miocárdio; LMA= Leucemia Mieloide Aguda.; aloac=aloanticorpo; autoac=autoanticorpo; M= masculino; F=feminino. Fonte: Dados da pesquisa.

Uma outra forma de sumarizar os dados é em termos dos quartis ou percentis. Essas medidas são particularmente úteis para dados não simétricos, conforme mostrado na **Tabela 20**. Como a variável “Dados Clínicos” se mostrou bastante diversificada, esses dados foram agrupados em duas categorias: “Doenças Hematológicas” (benignas ou malignas) e “Doenças não-Hematológicas” (demais doenças).

Tabela 20 – Grupo 3: comparação da distribuição dos valores do *Monocyte Index* (%) segundo outras variáveis

Variável	Mínimo	Primeiro Quartil	Mediana	Terceiro Quartil	Máximo	P-valor*
Doenças hematológicas						
Sim (n= 15)	0	0	0	0	62	0.1
Não (n= 25)	0	0	0	2	26	
Associação com aloac						
Sim (n= 13)	0	0	0	0	0	0.02
Não (n= 27)	0	0	0	2	62	
Associação com autoac da classe IgM						
Sim (n= 18)	0	0	0	0	62	0.6
Não (n= 22)	0	0	0	0.75	4	
Gênero						
Masculino (n= 18)	0	0	0	2	62	0.02
Feminino (n= 22)	0	0	0	0	2	
Gestação prévia						
Sim (n= 14)	0	0	0	0	2	0.2
Não (n= 8)	0	0	0	0	0	
Transfusão prévia						
Sim (n= 16)	0	0	0	0	26	0.6
Não (n= 24)	0	0	0	0.25	62	
PC						
W (n= 5)	0	0	0	0	0	
1+ (n= 3)	0	0	0	0	0	
2+ (n= 27)	0	0	0	1.5	26	
3+ (n= 4)	0	0	0	0	0	
4+ (n= 1)	62	62	62	62	62	
TAD pós-adsorção						
0 (n= 1)	0	0	0	0	0	
W (n= 12)	0	0	0	0	4	
1+ (n= 2)	0	0	0	0	0	
2+ (n= 13)	0	0	0	0	4	
3+ (n= 5)	0	0	0	0	2	
4+ (n= 7)	0	0	0	14	62	

* P-valor do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (hipótese nula: as amostras vêm de distribuições com a mesma medida de tendência central). ** Resultados da correlação de Spearman para a relação entre MI versus PC e TAD serão mostrados à frente. NOTAS: aloac= aloanticorpo; autoac= autoanticorpo. Fonte: Dados da pesquisa.

b) Discussão

No Grupo 3, observa-se que, das 40 amostras contendo autoanticorpos da classe IgG investigadas, 9 (22,5%) apresentaram resultado positivo para o MMA (MI variando de 1,0 a 62,1%), enquanto 31 (77,5%) apresentaram resultado negativo (MI=0). Entretanto, das amostras com o MMA positivo, apenas dois apresentaram um MI>5,0%, ou seja, os autoanticorpos avaliados possuíam importância clínica. É possível notar que, na grande maioria dos casos avaliados, os autoanticorpos não apresentaram importância clínica significativa.

Um estudo alemão bastante relevante investigou a conduta transfusional em um grupo de 36 pacientes com AHAI ativa por autoanticorpos quentes e em terapia imunossupressora, com o intuito de minimizar ou mesmo questionar o receio historicamente cultivado em torno da transfusão de hemácias em pacientes com esse quadro. Em apenas três dos 36 pacientes foram detectados aloanticorpos clinicamente significativos. A transfusão de hemácias foi administrada em 32 dos 36 pacientes, sem evidências de RTH significativas devido ao autoanticorpo ou aloanticorpo. Quatro dos 36 pacientes faleceram por não receberem transfusão ou por serem transfundidos com atraso. Os autores concluíram que a incidência da aloimunização, bem como a ocorrência de efeitos adversos advindos de RTH são desnecessariamente superestimados na AIHA, o que foi apoiado pelo resultados do estudo (YÜREK, *et. al.*, 2015).

Embora o MMA tenha sido classicamente descrito como uma simulação *in vitro* do comportamento de aloanticorpos antieritrocitários, esse teste pode ser útil para avaliar a capacidade dos autoanticorpos antieritrocitários em mediar a fagocitose extravascular. Dessa forma, o MMA pode ser empregado na elucidação de casos tanto para fins diagnósticos quanto para propósitos terapêuticos (CONRADO *et. al.*, 2018).

Das amostras testadas, 15 (37,5%) eram oriundas de pacientes com alguma doença hematológica (benigna ou maligna), enquanto 25 (62,5%) delas eram de pacientes com outras condições clínicas diversas. Foi testada a hipótese de que resultados positivos para o MMA estariam associados a amostras de pacientes com doenças hematológicas, por serem quadros em que o indivíduo é imunologicamente mais desafiado, seja pela própria doença, que proporciona uma quebra da tolerância do sistema imunológico aos antígenos próprios do indivíduo, seja por constituírem um grupo de pacientes com uma maior e mais frequente

necessidade transfusional. Entretanto, essa associação não foi estatisticamente comprovada, para o grupo estudado ($p=0.1$).

O que vem sendo amplamente discutido por autores da área é que a AHAI é um quadro considerado raro, podendo estar associada não somente à presença do autoanticorpo, mas a outras condições como quadros infecciosos, medicamentos, doenças linfoproliferativas, dentre outras. Entretanto, observa-se elevada frequência de detecção de autoanticorpos antieritrocitários em pacientes nas mais diversas condições clínicas, conforme pode ser observado no grupo estudado, sem necessariamente estarem relacionados à “verdadeira” AHAI (QUIST & KOESELL, 2015; YÜREK, *et. al.*, 2015). Dessa forma, fica bastante evidente que serviços de referência necessitam, cada vez mais, de implementarem técnicas que auxiliem na definição da relevância clínica desses autoanticorpos, com o propósito de proporcionar atendimento ágil e adequado aos pacientes.

Das amostras testadas, 13 (32,5%) eram provenientes de pacientes que apresentavam autoanticorpo IgG associados a aloanticorpos, enquanto 27 (67,5%) apresentavam somente o autoanticorpo. Foi testada a hipótese de que resultados positivos para o MMA estariam mais associados a amostras de pacientes com autoanticorpos IgG juntamente a aloanticorpos, comparando com amostras de pacientes apenas com autoanticorpo. No entanto, foi evidenciada uma associação estatisticamente válida ($p=0.02$) entre apresentar resultado positivo para o MMA e amostras com autoanticorpo de pacientes não-aloimunizados. Uma possível justificativa seria a de que quando o indivíduo apresenta aloanticorpos associados em sua amostra, as exigências de compatibilização passam a ser ampliadas, inclusive para outros sistemas de grupos sanguíneos, com o intuito profilático. Dessa forma, as unidades de hemácias testadas apresentam mais antígenos negativos comparando com o paciente não-aloimunizado. Cabe mencionar que terapias imunossupressoras não foram consideradas nessa análise.

DINARDO (2018) teceu um relevante comentário acerca da alta frequência de autoanticorpos entre pacientes aloimunizados, o que lançou luz sobre uma questão importante, mas ainda não esclarecida, sobre quão clinicamente relevantes esses autoanticorpos são após uma transfusão. Embora alguns estudos sugiram que esses autoanticorpos sejam benignos, há relatos de casos da ocorrência de hemólise autoimune pós-transfusional grave. Dessa forma, mais estudos são necessários com o intuito de ampliar esse entendimento.

Das amostras testadas, 18 (45%) apresentaram autoanticorpos IgG juntamente com a presença de autoanticorpos da classe IgM, enquanto 22 (55%) apresentaram somente autoanticorpos IgG. Foi testada a hipótese de que resultados positivos para o MMA estariam mais associados a amostras de pacientes com autoanticorpos IgG coexistindo com autoanticorpos da classe IgM, por uma maior ativação das proteínas do complemento pela IgM, o que ampliaria ainda mais a opsonização das hemácias por essas proteínas e, conseqüentemente, aumentaria a fagocitose das hemácias pelos macrófagos. Entretanto, essa associação não foi estatisticamente comprovada ($p=0.6$), para o grupo estudado.

Das amostras testadas, 18 (45%) eram de pacientes do sexo masculino e 22 (55%) do sexo feminino. Apesar da maioria dos participantes serem mulheres, foi evidenciada associação estatisticamente válida entre resultados positivos para o MMA e ser do sexo masculino ($p=0.02$). Uma possível justificativa pode estar relacionada ao fato de protocolos transfusionais ampliarem a compatibilização de antígenos negativos em se tratando de mulheres em idade fértil, no sentido de protegê-las profilaticamente para que não produzam aloanticorpos que possam estar associados a DHPN. Assim, elas estariam imunologicamente mais protegidas comparando aos homens.

Dentre as mulheres avaliadas no Grupo 3 ($n=22$), 14 delas (64%) possuíam histórico de gestação prévia, enquanto oito (36%) não. Não foi evidenciada associação estatisticamente válida entre resultados positivos para o MMA e gestação prévia, para o grupo estudado ($P=0.6$). A justificativa do item anterior pode estar também relacionada ao que foi observado nessa etapa.

Ainda com relação ao Grupo 3, dos pacientes avaliados, 16 (40%) deles já haviam recebido transfusão prévia, enquanto 24 (60%) não. Não foi evidenciada associação estatisticamente válida entre resultados positivos para o MMA e ter recebido transfusão previamente, para o grupo estudado ($p=0.6$). O fato do paciente já ter recebido transfusão previamente não foi um fator associado a um MMA positivo.

No Grupo 3, buscou-se conhecer, ainda, uma possível associação estatisticamente válida entre as intensidades de reação da PC e do TAD pós-adsorção com o MI observado para cada paciente. A análise relativa a esse objetivo será mostrada abaixo (**item 6.6**).

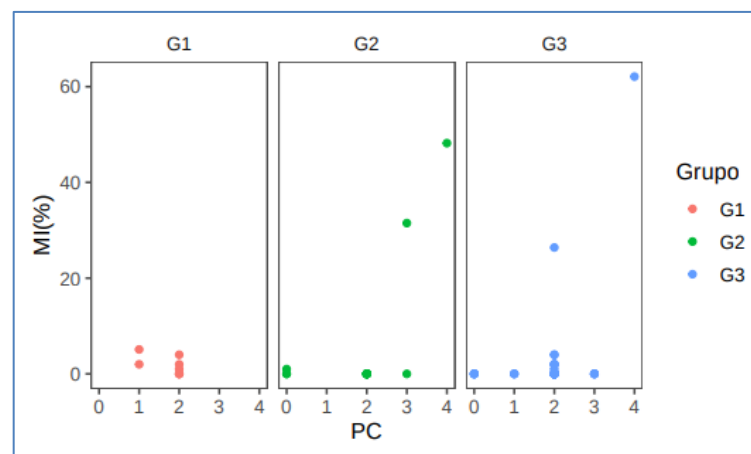
6.6 Correlação de Spearman para a relação entre MI versus TAD e PC

a) Resultados

Sabe-se que a correlação de Spearman avalia a relação monotônica entre duas variáveis contínuas ou ordinais. Em uma relação monotônica, as variáveis tendem a mudar juntas, mas não necessariamente a uma taxa constante. O coeficiente de correlação de Spearman baseia-se nos valores classificados de cada variável, em vez de os dados brutos. No presente estudo a aplicação dessa correlação foi particularmente útil em se tratando das variáveis “PC” e “TAD pós-adsorção”, por serem expressas em intensidade de aglutinação (0, W, 1+, 2+, 3+, 4+).

Gráficos de dispersão mostram bem a relação entre variáveis. Dessa forma, as **Figuras 15 e 16** mostram como as variáveis “PC” e “TAD pós-adsorção” se relacionam com a variável “MI”, para os três grupos de pacientes estudados. As **Tabelas 21 e 22** mostram a correlação de Spearman entre essas variáveis citadas para os três grupos.

Figura 15 – Distribuição da variável Prova de Compatibilidade pelo *Monocyte Index*, para os três grupos



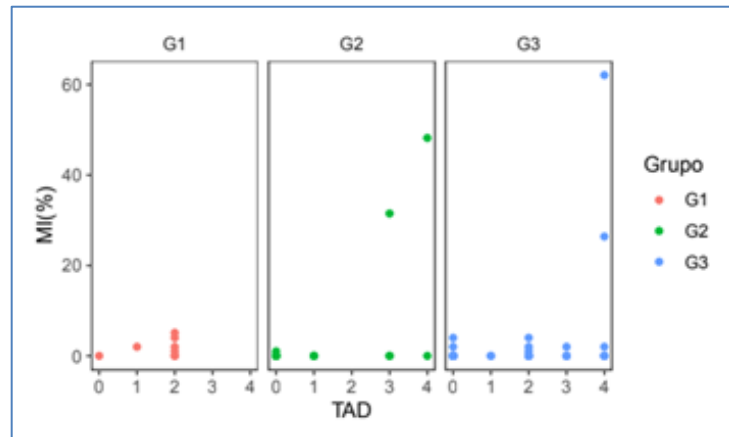
Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 21 - Correlação de Spearman entre Prova de Compatibilidade e *Monocyte Index* para os três grupos

Grupo	Coefficiente	P-valor
G1	-0.5846128	0.1279986
G2	0.3682555	0.1951377
G3	0.2171228	0.1783736

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 16– Distribuição da variável Teste Direto da Antiglobulina pós-adsorção pelo *Monocyte Index* para os três grupos



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 22 - Correlação de Spearman entre Teste Direto da Antiglobulina pós-adsorção e *Monocyte Index* para os três grupos

Grupo	Coefficiente	P-valor
G1	0.2491266	0.5518550
G2	0.3121166	0.2773090
G3	0.2187598	0.1750423

Fonte: Dados da pesquisa.

b) Discussão

No presente estudo, desejava-se investigar se havia associação estatisticamente válida entre resultados positivos para o MMA e a intensidade da PC, para os três grupos avaliados. A hipótese testada foi a de que, quanto maior a intensidade de reação da PC, maior seria o resultado do MI para determinada amostra. Entretanto, essa associação não foi estatisticamente comprovada, para os três grupos, conforme mostrado na **Tabela 21** ($p > 0.05$). Dessa forma, conclui-se que não há uma correlação com valor estatístico consistente que comprove a hipótese levantada. Poucos estudos na literatura exploraram a correlação entre essas variáveis.

Um estudo semelhante que investigou a importância clínica de aloanticorpos incluiu também uma etapa que explorou a intensidade de reação dos anticorpos na fase da antiglobulina humana como uma representação empírica da quantidade de imunoglobulinas ligadas às hemácias. Os autores evidenciaram que alguns anticorpos que reagem apenas fracamente (1+) permaneceram capazes de causar fagocitose maciça de hemácias antígeno-positivas, enquanto outros que

mostraram uma forte reação (3+/4+) não induziram destruição significativa de hemácias. Os resultados apresentados corroboram os resultados evidenciados no presente estudo, deixando clara a correlação fraca entre a intensidade de reação do anticorpo avaliado sorologicamente e o seu significado clínico. Assim, a prática de liberar transfusão com base no CHM “menos incompatível” como alternativa à indisponibilidade do CHM compatível deve ser desencorajada (NOUMSI *et. al.*, 2015).

De forma, semelhante, desejava-se investigar se havia associação estatisticamente válida entre resultados positivos para o MMA e a intensidade do TAD pós-adsorção do anticorpo testado, para os três grupos avaliados. A hipótese testada foi a de que, quanto maior a intensidade de reação do TAD, maior seria o resultado do MI para determinada amostra. Entretanto, essa associação não foi estatisticamente comprovada, para os três grupos, conforme mostrado na **Tabela 22** ($p > 0.05$). Dessa forma, conclui-se que não há uma correlação com valor estatístico consistente que comprove a hipótese levantada. A busca por estudos semelhantes que tenham explorado essa correlação não retornou resultados passíveis de comparação, o que demonstra o ineditismo da presente investigação.

6.7 Propostas para integrar o MMA na rotina laboratorial da CIH

Foram elaboradas algumas ações a serem apresentadas à instituição como forma de concretizar a implementação rotineira do MMA no rol de exames oferecidos pela CIH, de modo a otimizar o acompanhamento hemoterápico de pacientes que apresentem alo/autoanticorpos antieritrocitários e que necessitem de transfusões, sem que haja bolsas compatíveis:

- a) Incluir o POP para a execução do MMA, que foi elaborado no âmbito da pesquisa, no rol dos documentos institucionais da Diretoria Técnica – Gerência de Laboratórios - CIH, o que fará com que o ensaio seja considerado oficialmente integrado aos exames que o laboratório realiza;
- b) Promover o treinamento de mais profissionais (analistas e técnicos) na execução do MMA, de forma a ampliar o número de pessoas capacitadas para atender a demanda de exames;
- c) Elaborar uma máscara de laudo para relatar os resultados do MMA (**ANEXO B**), tendo como referência o laudo que é hoje emitido pela Fundação Pró-Sangue (SP);

d) Propor um fluxo de trabalho para os casos indicados ao MMA. Esse exame, pelas suas características, constitui um teste que deverá ser realizado apenas após a discussão, pela equipe de trabalho, de critérios como:

- Identificar os casos complexos de pacientes sem CHM compatível;
- Avaliar a urgência do caso junto ao serviço de origem;
- Discutir alternativas para obtenção de CHM compatível/ doação autóloga, se houver essa possibilidade;
- Avaliar o histórico do paciente com relação ao seu quadro clínico/ doença de base/ transfusões prévias / exames laboratoriais complementares/ estudo imuno-hematológico recentemente executado;
- Identificar o CHF mais indicado para transfusão: uma alíquota dessa bolsa deverá ser testada pelo MMA, sendo que a mesma bolsa deverá permanecer reservada no serviço para o paciente avaliado;
- Emitir laudo com o resultado do ensaio, orientando o serviço de origem quanto ao seu significado e limitações;
- Acompanhar o período pós-transfusional dos pacientes que foram transfundidos a partir dos resultados do MMA, por meio de preenchimento de formulário de acompanhamento pelo serviço de origem (**ANEXO C**), que deverá retornar essas respostas para serem avaliadas pela equipe de trabalho da CIH.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a complexidade dos casos atendidos pela CIH da Fundação Hemominas, bem como o alcance dessa instituição pública de saúde, torna-se evidente a necessidade da implementação de testes que contribuam ainda mais para o aumento da segurança transfusional dos pacientes de Minas Gerais, como foi o caso do MMA.

A parceria entre instituições públicas de ensino e de assistência à saúde permite o desenvolvimento de projetos de pesquisa e a conseqüente concretização de melhorias para a população, como foi o caso do presente estudo.

Além das investigações conduzidas em prol do conhecimento acerca da relevância clínica transfusional de alo e autoanticorpos antieritrocitários, este estudo abriu caminho, ainda, para a

aplicação do MMA no contexto obstétrico, explorando o significado clínico de anticorpos na relação feto-materna.

Certamente, os campos de aplicação do MMA em serviços de referência em imuno-hematologia são ainda mais amplos do que os aqui explorados, o que abre perspectivas para que novas pesquisas sejam conduzidas, de forma a ampliar ainda mais o conhecimento na área.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As principais limitações do presente estudo foram:

- a) O número reduzido de participantes nos Grupo 1 e 2, o que certamente contribuiu para diminuir o poder amostral nas análises estatísticas realizadas;
- b) A participação das proteínas do complemento (C3b/ C3d) na opsonização das hemácias não foi avaliada e é sabido que a presença dessas proteínas pode levar a resultados positivos para o MMA, em especial para um MI até 5,0%;
- c) O uso de terapias imunossupressoras e a definição das subclasses de IgG dos anticorpos estudados não foram explorados neste estudo;
- d) Na etapa de validação do MMA na CIH, não foram realizados testes de exatidão e de comparação entre pares na leitura das lâminas. O primeiro não foi executado por depender do suporte de laboratório externo e de uma logística de envio de amostras para fora de Minas Gerais, o que precisará ser melhor definido. Já o segundo teste não foi executado porque apenas a aluna de doutorado e sua Coorientadora possuíam o conhecimento do método. Porém, ainda não foi possível executar esse comparativo entre as duas profissionais, o que se pretende fazer em breve.

9 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que já foi possível prestar suporte transfusional a tempo de contribuir para a realização de cirurgias críticas em dois pacientes que apresentavam, respectivamente, um aloanticorpo raro e autoanticorpos, sem a disponibilidade de CH compatíveis.

O ensaio permitiu, ainda, atendimento hemoterápico seguro no preparo, para o parto, de gestante com Doença Falciforme (DF), polialoimunizada e que apresentava anticorpo cuja especificidade não pode ser determinada nos testes sorológicos de rotina. Soma-se a isso, a realização de acompanhamento de gestante aloimunizada, empregando-se o MMA, no sentido de contribuir para a elucidação do envolvimento de aloanticorpo frequentemente não associado à ocorrência de DHPN.

Por fim, o desenvolvimento do presente estudo na Fundação Hemominas permitiu a implementação de um importante teste no âmbito institucional, de modo a tornar a CIH independente de outros serviços e marcando o início de novas perspectivas relacionadas ao acompanhamento hemoterápico e obstétrico de pacientes.

10 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

- Avaliação da importância clínica de alo e autoanticorpos em mulheres gestantes, empregando-se o MMA como método auxiliar no campo da obstetrícia;
- Avaliação da estabilidade dos monócitos e da sua capacidade fagocítica, por exemplo, por métodos de criopreservação, de modo a otimizar a obtenção dessas células na execução do MMA;
- Reavaliação do volume de sangue total (60mL) utilizado na etapa de isolamento dos monócitos, de modo a considerar uma possível redução desse volume e, dessa forma, propor até mesmo a obtenção de monócitos autólogos de pacientes a serem testados pelo ensaio;
- Avaliação de mais desfechos de pacientes atendidos por meio do MMA, para contribuir na validação local dos valores de referência atualmente adotados para o MI;
- Avaliação do papel das proteínas do complemento, associadas ou não a anticorpos, na opsonização de hemácias e o impacto sobre os resultados do MMA.

11 RELAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- a) A equipe de pesquisa submeteu resumo no Congresso Virtual HEMOPLAY 2021, promovido pela Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, intitulado “Validação do Ensaio da Monocamada de Monócitos na Fundação Hemominas” (ANEXO D). O resumo foi apresentado na modalidade de e-pôster durante o evento, que ocorreu de 27 a 30 de outubro de 2021, além de constar nos anais do congresso.

- b) A equipe de pesquisa submeteu resumo no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2022, intitulado “Significado clínico do aloanticorpo Anti-Ge avaliado pelo Ensaio da Monocamada de Monócitos em paciente atendido pela Fundação Hemominas: relato de caso” (**ANEXO E**). O resumo foi apresentado na categoria painel durante o evento, que ocorreu de 26 a 29 de outubro de 2022, além de constar nos anais do congresso.
- c) A aluna participou como coautora de resumo no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2022, intitulado “Aplicação de testes moleculares para análise de casos complexos em imuno-hematologia na Fundação Hemominas” (**ANEXO F**). O resumo foi apresentado na categoria painel durante o evento, que ocorreu de 26 a 29 de outubro de 2022.
- d) A equipe submeteu artigo científico, na revista britânica *Transfusion Medicine*, no formato de Estudo de Caso (*Case Study*), intitulado “*Alloanti-M-induced intrauterine fetal death: the role of the Monocyte Monolayer Assay in elucidating Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn*”. O artigo foi submetido em 25/10/2023 e encontra-se sob revisão até o presente momento. (**ANEXOS G e H**)

REFERÊNCIAS

- ALVES, VM; MARTINS, PRJ; SOARES, S; ARAUJO, G; SCHMIDT, LC; COSTA, SSM; LANGHI, DM; SOUZA, HM. Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v. 34, n. 3, p. 206-11. 2012.
- ARNDT, PA; GARRATY, G. A retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting the clinical significance of blood group alloantibodies. **Transfusion**, v. 44, p. 1273-81. 2004.
- BALBUENA-MERLE, R; HENDRICKSON, JE. Red blood cell alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. **Transfus Clin Biol.**, v. 26, n. 2, p. 112 -15. 2019.
- BARCELLINI W. The clinical dilemma and management of red cell autoantibodies. **Expert Rev Hematol.**, v. 9, n. 4, p. 325-7. 2016.
- BARNETT, V. **Sample Survey: principles and methods**. London: Arnold, 1982.
- BEN AMOR, I; REKIK, T; LOUATI, N; LAHIANI, W; REKIK, H; PEYRARD, T; MENIF, H; GARGOURI, J. Difficultés de la prise en charge de l'allo-immunisation anti-public. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 23, n. 2, p. 103-5. 2016.
- BOLIGAN, KF; SANDHU, G; BRANCH, DR. Methods to Evaluate the Potential Clinical Significance of Antibodies to Red Blood Cells. **Curr Protoc**, v.2, n.8 (e504). 2022.
- BRANCH, DR; HOLTON, MB, ISON, T; COTE, J; DUBE, C; LAU, W. Potentially clinically significant anti-Di^b identified by monocyte monolayer assay before transfusion. **Transfusion**, v. 61, n. 1, p. 331-2. 2021.
- BRANCH, DR; SANDHU, G; RAOS, M. Monocyte monolayer assay predictions of clinical outcome for serologically incompatible red blood cells is all about timing. **Transfusion**, v. 61, n. 8, p. 2516-17. 2021.
- BRASIL. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Aprova a consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 set. 2017. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br/images/documentos/Legislacoes/Portaria_Consolidacao_5_28_SETEMBRO_2017.pdf> Acesso em: 08 de novembro de 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Guia do cadastro nacional de sangue raro**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_cadastro_nacional_sangue_raro.pdf> Acesso em: 30 de novembro de 2023.
- CAMPBELL-LEE, SA; KITTLES, RA. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: listen to your ancestors. **Transfus Med Hemother**, v. 41, n. 6, p. 431-5. 2014.
- CHAPMAN, JF; ELLIOTT, C; KNOWLES, SM; MILKINS, CE; POOLE, GD & Working Party of the British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. **Transfusion Medicine**, v.14, p. 59–73. 2004.

CHONAT, S; ARTHUR, CM; ZERRA, PE; MAIER, CL; JAJOSKY, RP; YEE, MEM; MILLER, MJ; JOSEPHSON, CD; ROBACK, JD; FASANO, R; STOWELL, SR. Challenges in preventing and treating hemolytic complications associated with red blood cell transfusion. **Transfus Clin Biol.**, v. 26, n. 2, p. 130-4. 2019.

CONRADO, MCAV; CARDODO, RA; DEZON, MR; Oliveira VB; Neto ADC; Ziza KC; Krieger JE; Pereira AC; Sabino EC; Rocha V; Mendrone-Júnior A; Dinardo CL. Prevalence and laboratorial determinants of the clinical relevance of antibodies of undetermined specificity. **Vox Sang.**, v. 114, n. 6, p. 616-21. 2019.

CONRADO, MCAV; D'AVILA, AN; VIEIRA, JB; BONIFACIO, SL; GOMES, FCA; DEZAN, MR; OLIVEIRA, VB; RIBEIRO, IH; TUCUNDUVA, LTCM; JUNIOR, AM; ROCHA, V; DINARDO, CL. Defining the clinical relevance of red blood cell autoantibodies by Monocyte Monolayer Assay. **J Clin LAB Anal.**, v. 32: e22274. 2018.

CRUZ, DT; CONRADO, MCV; MENDRONE, A; DINARDO, CL. Application of Monocyte Monolayer Assay technique to predict hyperhemolysis in patients with sickle cell disease. **Hematol Transfus Cell Ther.** S2531-1379(23)00157-8. 2023.

CRUZ, RO; MOTA, MA; CONTI, FM; PEREIRA, RAD; KUTNER, JM; ARAVECHIA, MG; CASTILHO, L. Prevalence of erythrocyte alloimmunization in polytransfused patients. **Einstein**, v. 9, p. 173-8. 2011.

DI CIACCIO, P; CUTTS, B; ALAHAKOON, TI; DENNINGTON, PM; SOO, LA; CURNOW, J. Clinical consequences of the extremely rare anti-PP1Pk isoantibodies in pregnancy: a case series and review of the literature. **Vox Sang.**, v. 116, n. 5, p. 591-600. 2021.

DINARDO, CL. Red blood cell alloantibodies and autoantibodies: different presentation, same physiopathology. **Hematol Transfus Cell Ther.**, v. 40, n. 2, p. 99-100. 2018.

FASANO, RM; MEYER, EK; BRANSCOMB, J; WHITE, MS; GIBSON, RW; ECKMAN, JR. Impact of Red Blood Cell Antigen Matching on Alloimmunization and Transfusion Complications in Patients with Sickle Cell Disease: A Systematic Review. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 33, p. 12-23. 2019.

FIGL, M.; PELINKA, L. E. Karl Landsteiner, the discoverer of blood groups. **Resuscitation**, v. 63, p. 251–254, 2004.

FLEGEL, WA. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis. **Transfusion**, v. 55, suppl 2(0): S47-58. 2015.

GARRATY, G. The James Blundell Award Lecture 2007: Do we really understand immune red cell destruction? **Transfusion Medicine**, v. 18, p. 321-34. 2008.

HENDRICKSON, JE; TORMEY, CA. Red Blood Cell Antibodies in Hematology/Oncology Patients: Interpretation of Immunohematologic Tests and Clinical Significance of Detected Antibodies. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 30, p. 635–51. 2016.

HENDRICKSON, JE; TORMEY, CA. Understanding red blood cell alloimmunization triggers. **Hematology**, p. 446 – 5. 2016.

HUR, M; MOON, HW; KWON, SW. ABO-incompatible kidney transplantation. **INTECH**, 2011. Disponível em: <<https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/19053.pdf>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2024.

INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD GROUPS (ISBT). Table of blood group systems v11.2 31-JUL-2023. Disponível em: <<https://www.isbtweb.org/resource/tableofbloodgroupsystems.html>> Acesso em 03 de outubro de 2023.

JASKIEWICZ, E; PEYRARD, T; KACZMAREK, R; ZERKA, A; JODLOWSKA, M; CZERWINSKI, M. The Gerbich blood group system: old knowledge, new importance. **Transfus Med Rev.**, v. 32, n. 2, p.111-16. 2018.

KAHL, Jessica Hanser Nunes. Implantação da técnica MMA (Monocyte Monolayer Assay) na rotina de testes pré-transfusionais do laboratório de imuno-hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina. Florianópolis, 2021. 68p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Documento eletrônico. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/222048>>. Acesso em 27 de janeiro de 2023.

KLEIN, HG; ANSTEE, DJ. Immunology of red cells. In: **Mollison's blood transfusion in clinical medicine**. 12th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, p. 53-117. 2014.

LINDER, GE; CHOU, ST. Red cell transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. **Haematologica**, v. 106, p. 1805-15. 2021.

MAURO, FR; TRASTULLI, F; ALESSANDRI, C; VALESINI, G; GIOVANETTI, G; RIEMMA, C; PORRAZZO, M; PEPE, S; COLAFIGLI, G; CAPUTO, MD; DE PROPIS, MS; GUARINI, AR; GIRELLI, G; COLUZZI, S; FOÀ, R. Clinical relevance of silent red blood cell autoantibodies. **Haematologica**, v. 102: e473. 2017.

MURPHY, K; WEAVER, C. The Induced Responses of Innate Immunity. In: **Janeway's immunobiology**. 9th ed. New York: Garland Science, p. 77–137. 2016.

NETO, OGV; ALVES, VM; PEREIRA, GA; SOUZA, HM; MARTINS, PRJ. Clinical and epidemiological profile of alloimmunized and autoimmunize multi-transfused patients against red blood cell antigens in a blood center of Minas Gerais. **Hematol transfuse cell ther.**, v. 40, n. 2, p. 107-11. 2018.

NOUMSI, GT; BILLINGSLEY, LK; MOULDS, JM. Successful transfusion of antigen positive blood to alloimmunised patients using a monocyte monolayer assay. **Transfusion Medicine**, v. 25, p. 92-100. 2015.

PAHUJA, S; PUJANI, M; GUPTA, SK; CHANDRA, J; JAIN, M. Alloimmunization and red cell autoimmunization in multitransfused thalassemics of Indian origin. **Hematology**, v. 15, n. 3, p. 174-77. 2010.

PESSONI, L; FERREIRA, MA; DA SILVA, JCR.; ALCÂNTARA, KC. Red blood cell alloimmunization among hospitalized patients: transfusion reactions and low alloantibody identification rate. **Hematol transfus cell ther.**, v. 40, n. 4, p. 326-31. 2018.

POOLE, J; DANIELS, G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. **Transfus Med Rev.**, v. 21, n. 1, p. 58-71. 2007.

QUIST, E; KOEPESELL, S. Autoimmune Hemolytic Anemia and Red Blood Cell Autoantibodies. **Arch Pathol Lab Med**, v. 139, n. 11, p. 1455–8. 2015.

REID, ME; MOHANDAS, N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. **Seminars in Hematology**, v. 41, n. 2, p. 93-117. 2004.

SHARMA D; OGBENNA, AA; KASSIM A, ANDREWS, J. Transfusion support in patients with sickle cell disease. **Semin Hematol.**, v. 57, n. 2, p. 39-50. 2020.

SHREE, R; MA, KK; ER, LS; DELANEY, M. Management of pregnancy sensitized with anti-Inb with monocyte monolayer assay and maternal blood donation. **Immunoematology**, v. 33, n. 1, p. 7-10. 2018.

SINGHAL, D; KUTYNA, MM; CHHETRI, R; WEE, LYA; HAGUE, S; NATH, L; NATH, SV; SINHA, R; WICKHAM, N; LEWIS, ID; ROSS, DM; BRADY, PG; TO, LB; REYNOLDS, J; WOOD, EM; ROXBY, DJ; HIWASE, DK. Red cell alloimmunization is associated with development of autoantibodies and increased red cell transfusion requirements in myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, v. 102, n. 12, p. 2021-9. 2017.

SINGHAL, D; ROXBY, DJ; HIWASE, DK. Red cell autoimmunization and alloimmunization in myelodysplastic syndromes: prevalence, characteristic and significance. **Haematologica**, v. 104: e454. 2019.

STORRY, J. R.; OLSSON, M.L. The ABO blood group system revisited: a review and update. **Immunoematology Journal of Blood Group Serology and Education**, v. 25, n. 2, p. 48-59, 2009.

STOWELL, SR; GORHAM, JD. Molecular Biology and Immunology in Transfusion Medicine. In: **American Association of Blood Banking Technical Manual**. 20th ed. Bethesda; p. 229–54. 2020.

TONG, TN, BRANCH, DR. Use of a Monocyte Monolayer Assay to Evaluate Fc γ Receptor-mediated Phagocytosis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 119, p. 1-7. 2017.

TONG, TN; BURKE-MURPHY, E; SAKAC, D; PENDERGRAST, J; CSERTI-GAZDEWICH, C; LAROCHE, V; BRANCH, DR. Optimal conditions for the performance of a monocyte monolayer assay. **Transfusion**, v. 56, n. 11, p. 2680-90. 2016.

TONG, TN; CEN, S; BRANCH, DR. The Monocyte Monolayer Assay: Past, Present and Future. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 33, p. 24-8. 2019.

TORMEY, CA; HENDRICKSON, JE. Antibodies of undetermined significance: nuisance or near miss? **Transfusion**, v. 53, n. 5, p. 926-8. 2013.

TORMEY, CA; HENDRICKSON, JE. Transfusion-related red blood cell alloantibodies: induction and consequences. **Blood**, v. 133, p. 1821–30. 2019.

TRAN, A; YAN, MTS; BRANCH, DR, BLACQUIERE, M; PINEAULT, N; PASHA, R; CLARKE, G. Severe fetal anemia caused by anti-Jr^a : Burst forming unit-erythroid colony formation inhibition assay suggesting possible erythroid suppression mechanism. **Transfusion**, v. 63, n, 4, p. 877-882. 2023.

YÜREK, S; MAYER, B; ALMAHALLAWI, M; PRUSS, A; SALAMA, A; Precautions surrounding blood transfusion in autoimmune haemolytic anaemias are overestimated. **Blood Transfus.**, v.13, n. 4, p. 616-21. 2015.

ZUPANSKA, B. Clinical application of functional assays for assessing the red cell antibody activity. **Transfus Sci.**, v. 14; n. 4, p. 371-81. 1993.

ANEXO A – Comprovante de aprovação ética da pesquisa na Fundação Hemominas



**FUNDAÇÃO
HEMOMINAS**

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DECLARAÇÃO

Belo Horizonte, 24 de maio de 2022.

Declaro que o projeto de pesquisa “**Significado clínico de alo e autoanticorpos antieritrocitários em pacientes atendidos na Fundação Hemominas utilizando o ensaio da monocamada de monócitos**” (CAAE 3000920.0.3001.5118), coordenado pela pesquisadora Dra. Luci Maria Sant Ana Dusse, foi **APROVADO** em 06/08/2020 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas.

Daniel Gonçalves Chaves

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Fundação Hemominas

Comitê de Ética em Pesquisa
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Comitê de Ética em Pesquisa
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Alameda Ezequiel Dias, 321 - Santa Efigênia – Belo Horizonte – MG – CEP 30130-110
e-mail: cep@hemominas.mg.gov.br – Tel: 3768-4689

ANEXO B – Proposta de máscara do laudo para emissão de resultado do MMA

 <p>FUNDAÇÃO HEMOMINAS</p>	<p align="center">Laudo do Ensaio de Monocamada de Monócitos (MMA)</p>
--	---

Paciente:

IH:

Data de Nascimento:

Mãe:

Solicitante:

Serviço Solicitante:

Método utilizado: Ensaio de Monocamada de Monócitos Modificado (MMA)

Material utilizado: Soro ou Plasma .

Resultado obtido:

- Presença de 5% ou mais de monócitos contendo hemácias fagocitadas ou aderidas à superfície celular (MI ≥ 5%)
- Presença de menos do que 5% de monócitos contendo hemácias fagocitadas ou aderidas a superfície celular (MI < 5%)
- Ausência de hemácias no interior dos monócitos avaliados.

Observação: MMA realizado com as hemácias da bolsa _____ com prova cruzada positiva em gel Liss/Coombs.


Conclusão:

- O anticorpo avaliado apresenta significado clínico.
- O anticorpo avaliado não apresenta significado clínico.

LUCIANA CAYRES SCHMIDT
 CRF-MG: 9196
 Responsável Laboratório de Imuno-
 Hematologia

RESPONSÁVEL PELA LIBERAÇÃO
 Registro no Conselho -

ANEXO C – Proposta de formulário de acompanhamento de transfusão após o MMA

	<p>Acompanhamento de Pacientes após liberação de CHM pelo Ensaio da Monocamada de Monócitos</p>
---	--

Por gentileza, preencher os campos abaixo para efeito de acompanhamento dos casos:

Paciente: _____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Atendido por: Hospital _____

Indicação clínica da transfusão: _____

CHM testado(s) pelo MMA: _____

O(a) paciente recebeu o CHM testado pelo MMA? _____ Data da transfusão: ____ / ____ / ____

Com relação ao incremento no valor da hemoglobina após a transfusão de CHM, por favor, responder abaixo:

Valor da hemoglobina antes do CHM: _____

Valor da hemoglobina após o CHM: _____

Há resultados dos seguintes exames antes e após a transfusão?

- 1) Reticulócitos (sim/ não): _____
Se sim, qual o valor dos reticulócitos antes e após a transfusão?

- 2) LDH e Bilirrubina total/ indireta (sim/ não): _____
Se sim, qual os valores da LDH/ bilirrubinas antes e após a transfusão?

- 3) Hemoglobinúria (sim/ não): _____
Se sim, qual o resultado da pesquisa de hemoglobina na urina antes e após a transfusão?

- 4) Qual o último valor de hemoglobina antes da alta hospitalar? _____
- 5) O (a) paciente retornou para nova avaliação da hemoglobina após a alta hospitalar? Se sim, informar o valor da hemoglobina e a data da última dosagem. _____
- 6) Outras informações que julgar necessárias:

ANEXO D – Certificado de apresentação de e-pôster no HEMO PLAY 2021

 <p>HEMO[®] PLAY 2021</p> <p><small>Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular</small></p>	CERTIFICADO	
<p>Certificamos que o trabalho intitulado "VALIDAÇÃO DO ENSAIO DA MONOCAMADA DE MONÓCITOS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS" de autoria de "Godin MM, Schmidt LC, Dusse LMS" foi apresentado na categoria e-Pôster na plataforma digital do Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO PLAY 2021, realizado no período de 27 a 30 de outubro de 2021.</p>		
<p>São Paulo, 30 de outubro de 2021.</p>		
 <p>ABHH <small>Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular</small></p>	 <hr/> <p>Vania Tietsche de Moraes Hungria <small>Presidente do HEMO PLAY 2021</small></p>	 <hr/> <p>Dante Langhi Jr. <small>Presidente da ABHH</small></p>



ANEXO E – Declaração de apresentação de pôster no HEMO 2022

HEMO[®] 2022

São Paulo, 22 de setembro de 2022.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho intitulado abaixo foi selecionado para apresentação no **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2022**, a ser realizado no período de 26 a 29 de outubro de 2022 em São Paulo/SP.

- **Categoria:** PAINEL DIA 27. Das 8:30 às 18:00
- **Título:** SIGNIFICADO CLÍNICO DO ALOANTICORPO ANTI-GE AVALIADO PELO ENSAIO DA MONOCAMADA DE MONÓCITOS EM PACIENTE ATENDIDO PELA FUNDAÇÃO HEMOMINAS: RELATO DE CASO
- **Autores:** Godin MM, Schmidt LC, Malta MCF5, Andrade CG, Rodrigues KF, Vieira MTA, Oliveira MEA, Belo KPM, Silva TLA, Dusse LMS



Luciana de Souza

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR

CNPJ: 11.422.382/0002-49

Inscrição Estadual – Isenta

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR
SUCURSAL - Rua Tenente Catão Roxo 2501 / Ribeirão Preto - SP - BRASIL 14051 140
Tel/fax +55 16 3630 8411 / PABX +55 16 2101 9344 / renata.fava@abhh.org.br - www.abhh.org.br

**ANEXO F – Declaração de apresentação de pôster no HEMO 2022
(coautoria)**

HEMO[®]
2022

São Paulo, 22 de setembro de 2022.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho intitulado abaixo foi selecionado para apresentação no **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2022**, a ser realizado no período de 26 a 29 de outubro de 2022 em São Paulo/SP.

- **Categoria:** PAINEL DIA 27. Das 8:30 às 18:00
- **Título:** APLICAÇÃO DE TESTES MOLECULARES PARA ANÁLISE DE CASOS COMPLEXOS EM IMUNOHEMATOLOGIA NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS
- **Autores:** Silva-Malta MCF, Schmidt LC, Muniz AA, Godin MM, Ferraz IA, Alves MT, Andrade CG, Martins ML



Luciana de Souza

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR
CNPJ: 11.422.382/0002-49
Inscrição Estadual – Isenta

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR
SUCURSAL - Rua Tenente Catão Roxo 2501 / Ribeirão Preto - SP - BRASIL 14051-140
Tel/fax +55 16 3630 8411 / PABX +55 16 2101 9344 / renata.lava@abhh.org.br - www.abhh.org.br

ANEXO G – Artigo submetido na revista *Transfusion Medicine*: e-mail de submissão e comprovante do site

05/12/23, 21:46 Yahoo Mail - Manuscript submitted - TME-2023-0178

Manuscript submitted - TME-2023-0178

De: Suryakala Anand (onbehalfof@manuscriptcentral.com)
 Para: marigdn@yahoo.com.br
 Cc: marigdn@yahoo.com.br; luciana.cayres@hemominas.mg.gov.br; maria.malta@hemominas.mg.gov.br; claramc@hotmail.com; lucidusse@gmail.com
 Data: quinta-feira, 26 de outubro de 2023 às 01:28 BRT

26-Oct-2023

Dear Dr. Godin,

Re: TME-2023-0178 Alloanti-M-induced intrauterine fetal death: the role of the Monocyte Monolayer Assay in elucidating Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn

Thank you for submitting your paper to *Transfusion Medicine*,

You are able to check the progress of your manuscript by logging into your Author Center at <https://mc.manuscriptcentral.com/transmed>.

If you have any queries please do not hesitate to contact the Editorial Office (transmed.edit@wiley.com). Please mention your manuscript reference number in all future correspondence. If there are any corrections to your e-mail address, please let the Editorial Office know.

If you DISAGREE with being listed as a coauthor please contact us at: transmed.edit@wiley.com

Thank you for your submission.

Sincerely,

Suryakala Anand
 Transfusion Medicine Editorial Office

05/12/23, 21:37 My Submissions | Wiley Authors

WILEY My Submissions Mariana ▾

My Submissions Journal: All Journals ▾ Submission Status: All Submission Statuses ▾

Transfusion Medicine
Case Study

Alloanti-M-induced intrauterine fetal death: the role of the Monocyte Monolayer Assay in elucidating Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn

Submission Status	Under Review
Manuscript ID	TME-2023-0178
Submitted On	25 October 2023 by Mariana Godin
Submission Started	25 October 2023 by Mariana Godin

This submission is under consideration and cannot be edited. Further information will be emailed to you by the journal editorial office.

[Submission overview →](#)

Need help choosing a journal?

We've put together some resources and tools to help you find the right journal for your research.

[Find a Journal](#)

[Privacy Policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Contact Us](#) | [Help](#) | [Cookie Preferences](#)

©Atypen Systems, LLC [Atypen BioX](#)

https://wiley.atypen.com/submit/dashboard 1/1

ANEXO H – Artigo submetido na revista *Transfusion Medicine* (continua)

Alloanti-M-induced intrauterine fetal death: the role of the Monocyte Monolayer Assay in elucidating Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn

Mariana Martins Godin^{1,2}; Luciana Cayres Schmidt¹; Maria Clara Fernandes da Silva Malta¹;
Luci Maria SantAna Dusse²

¹ Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Brazil

² Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Running title: The role of MMA in elucidating HDFN induced by Anti-M

This work was supported by Fundação Hemominas and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ.

Abstract

Introduction: Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN) is associated with the induction of fetal anemia by the action of maternal IgG alloantibodies that cross the placenta and target fetal red blood cell (RBC) antigens. Usually, the occurrence of this disease is associated with alloantibodies directed to Rh and K antigens, while severe or fatal cases involving alloanti-M are being rare. The Monocyte Monolayer Assay (MMA) is a cellular assay that has been shown to be useful in defining the clinical importance of antibodies.

Case description: A 32-year-old woman experienced the death of her fetus around the 28th week of pregnancy, due to severe anemia induced by alloanti-M, even after episodes of intrauterine RBC transfusions. The immunohematological investigation revealed the presence of two other alloantibodies in the maternal serum. The use of the MMA contributed to elucidate the case, associating only alloanti-M with the evidenced fatal outcome.

Discussion: The presence of alloanti-M in pregnant women, in principle, is not a concern, as it is commonly identified as an IgM antibody of natural origin. However, it can also be present in its IgG isoform of immune origin, being associated with both the destruction of fetal RBC and the suppression of erythropoiesis. There is still no consensus among professionals for the monitoring of pregnant women through the titration of alloanti-M. In this context, MMA emerges as a useful and promising tool to clarify the unfavorable outcomes observed in pregnancies of alloimmunized women.

Conclusion: There is a need to broaden the view on the clinical importance of IgG alloantibodies in pregnant women, directed not only to Rh and K antigens, as well as to application and improvement of MMA in the understanding of the action of alloantibodies and maternal-fetal follow-up.

Keywords: alloimmunization; anti-M; intrauterine fetal death; monocyte monolayer assay; MMA; Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn; HDFN.

Introduction

Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN) is one of the main consequences of maternal alloimmunization. HDFN results in the destruction of red blood cells (RBC) or fetal erythroid precursors by maternal IgG antibodies. IgG cross the placenta and target paternal antigens genetically inherited by the fetus.¹ Some cases can result in severe anemia in the fetus and neonate and trigger intrauterine fetal death. Anti-D is the alloantibody most frequently associated with unfavorable clinical conditions, although the anti-C and anti-K are also associated with significant RBC destruction and the occurrence of severe anemia in the fetus and neonate.²

Case reports of severe HDFN associated with alloantibodies directed to antigens of the MNS system are rare, especially when it comes to Anti-M alloantibody, usually detected as an IgM naturally occurring and clinically insignificant. However, there are

reports of unusual severe anemia in the fetus and newborn associated with IgG Anti-M, not only related to fetal hemolysis, but mainly due to the suppression of erythropoiesis immunologically induced by this alloantibody.^{3,4}

It is estimated that about 9 to 10% of pregnant women with positive screening for irregular antibodies have the IgM Anti-M alloantibody.^{4,5} The coexistence of the IgG component is not frequent, but when present, it can be related to the morbidity and mortality observed in fetuses and newborns. Furthermore, there is still no well-established consensus in the literature about the critical titer to be considered by the clinic during the follow-up of pregnant women with IgG Anti-M.^{3,4,6}

The Monocyte Monolayer Assay (MMA) is a cellular assay that has been shown to be useful in helping to understand the involvement of maternal antibodies in the clinical manifestation of fetal hemolysis.^{7,8}

Thus, the present report describes a rare case of intrauterine death associated with the presence of maternal IgG Anti-M and how MMA aided to elucidate the case.

Corresponding author: Mariana Martins Godin

Address: Fundação Hemominas – Central de Imuno-hematologia.

Alameda Ezequiel Dias, 321, Bairro Santa Efigênia, MG, Brazil. Zip Code: 30130-110. Fone: +55 31 37684563/4563 E-mail: marigdn@yahoo.com.br

ANEXO H - Artigo submetido na revista *Transfusion Medicine* (continua)

Case description

A 32-year-old Brazilian woman, with no history of transfusion or previous pregnancy, had a blood sample sent to the immunohematology reference laboratory of Fundação Hemominas – (Central de Imuno-Hematologia - CIH/ Belo Horizonte/ Minas Gerais/ Brazil), to clarify the discrepancy between the forward and reverse typing of the ABO grouping. As interference from alloantibody was suspected in the reverse test, the Antibody Screening (AS) was performed and the result was positive. The Antibody Identification (AI) revealed the presence of Anti-M alloantibody reactive at 37°C and 4°C. AS and AI were carried out by the column agglutination method, according to the manufacturer's instructions (BIORAD). Reverse blood grouping was repeated using M-negative reagent RBC and the patient's ABO/RhD grouping was clarified as "A/positive".

About three months later, new samples from this patient were sent to the same service after a post-spontaneous abortion bleeding around the fifth week of pregnancy, requiring curettage and reporting a positive AS. Again, the presence of the Anti-M alloantibody in the patient's serum was confirmed. The fetal loss was not considered to be clinically related to the presence of that alloantibody in the maternal sample, as it occurred very early.

Nine months after the abortion, new samples from this patient - now in the third trimester of her second pregnancy - and from her husband, were sent to the CIH by a Fetal Medicine Center specialized in monitoring high-risk pregnant women. Considering the indication for intrauterine RBC transfusion at the 24th week of pregnancy due to signs of severe fetal anemia, a new AI was requested (results presented below). The second intrauterine transfusion occurred in the 28th week of pregnancy and the third in the following week. During the last transfusion, the fetus presented with bradycardia, not resisting the procedure and evolving to death.

Maternal and paternal samples were initially submitted to investigation of the ABO/RhD grouping and extended phenotyping (Table 1). Maternal sample was submitted to direct antiglobulin test (DAT), which result was negative, and AS, which result was positive. The AI revealed the presence of Anti-M in maternal serum, which showed a strong reaction with M+N- (4+) and M+N+ (3+) RBC. The AI included tests with selected RCB to exclude the presence of antibodies against antigens absent in the mother's cells, but present in the father's: "S", "K", "Jk^a" and "Fy^a". The presence of the alloantibodies against these antigens was excluded with at least 3 RBC M- and positive for these antigens. Paternal sample was submitted to DAT and AS and both results were negative. It was not possible to obtain a fetal sample for investigation. All tests were performed using the column agglutination method, according to the manufacturer's instructions (BIORAD). Low-prevalence antigens were also evaluated in paternal RBC. The phenotypic was performed by using the column agglutination method (BIORAD) and rare polyspecific sera (part of the laboratory's human sera collection), since commercial antisera are not available.

At this stage, AI after the maternal serum treatment with dithiothreitol reagent (DTT/INLAB[®]) was performed. Serum treatment with DTT consisted of incubating equal parts of serum and 0.01M DTT for 1 hour at 37°C, with homogenization every 10 minutes. Maternal serum treatment with the DTT reagent confirmed the concomitant presence of the IgG and IgM components of the anti-M antibody.

Subsequently, Anti-M in maternal serum was titrated using the tube method as recommended by the *American Association of Blood Banks* (AABB, 2020). This test consisted of a saline-indirect antiglobulin test (Sal-IAT) using the RBC from paternal origin (M+N-), considering that it was not possible to obtain a sample from the fetus. Serial dilutions of maternal serum were prepared in saline solution, as well as a 5% suspension of paternal RBC. The titration was carried out in two stages: the first, with maternal serum without treatment with the 0.01M DTT reagent (semiquantitative evaluation of the antibody titer in relation to the

IgG + IgM components); the second, with maternal serum treated with the 0.01M DTT (to assess the titer of the IgG component alone). A titer of 512 was evidenced for the IgG + IgM components and 256 for the IgG component of the Anti-M alloantibody.

Additionally, alloantibody IgG subclass analysis was performed. The patient's serum was previously treated with the DTT reagent to destroy the IgM components. Then, the ID-Card "ID-DAT IgG1/IgG3" was used, according to the manufacturer's instructions (BIORAD). The result revealed that component did not belong to the IgG1 or IgG3 subclasses (IgG1- / IgG3-).

Aiming to investigate the presence of other alloantibody(s) in the maternal serum, the process of adsorption of the serum tested with M+N- allogeneic RBC was carried out, for complete removal of the Anti-M present in the sample. Then, maternal adsorbed serum, free of Anti-M, was tested against paternal RBC and the result was positive, suggesting the presence of additional alloantibody. After further investigation, the presence of Anti-Wr^a (probably from natural origin) was confirmed in addition to another alloantibody directed to a low population prevalence antigen expressed in paternal RBC. However, it was not possible to conclude the specificity of the last evidenced alloantibody.

For a better understanding of the case, paternal RBC genotyping was carried out to infer the expression of low incidence antigens (Bloodchip IDCore^{XT}, PCR-RFLP and PCR-SSP). Furthermore, the paternal RBC were evaluated for the presence of low-frequency erythrocyte antigens using serological methods (phenotyping using human serum). Altogether the results indicated that the father's RBC did not express the Wr^a antigen, nor other low-frequency antigens evaluated (Table 2).

Aiming to clarify the clinical significance of maternal alloantibodies as possible causative agents of fetal anemia, maternal serum and paternal RBC were submitted to MMA. The test was performed as already described in previous studies.^{7,8}

Mononuclear cells were isolated and obtained by centrifugation gradient (Ficoll Paque[®]), from an aliquot of whole blood in CPDA-1 from a group "O" blood donor. After washing the cells 3 times with phosphate-buffered saline (PBS; pH=7.4), the mononuclear cells were suspended in RPMI 1640 medium (Merck) and 1mL aliquots were incubated in a cell culture plate wells (Biofilm[®]), containing a specific coverslip, for 1 hour at 37°C. Sensitized RBC were prepared by incubating 300µL of the patient's serum with 150µL of the tested RBC for 1 hour at 37°C. After incubation, the RBC were washed 3 times with pre-warmed saline solution at 37°C and resuspended in RPMI 1640 medium (Merck), and then added to the monocyte monolayer present on the coverslip, inside the well of the culture plate, which was incubated for another 1 hour at 37°C. Finally, coverslips were washed with PBS, fixed and stained with Leishman dye (Interlab). O/RhD positive RBC, sensitized with Anti-D (IgG), were used as a positive control (Coombs Control BIORAD) and non-sensitized RBC from a negative DAT donor as a negative control. The assay was read using optical microscopy to obtain the Monocyte Index (MI), defined as the ratio between the number of monocytes with adhered/phagocytosed RBC and the total number of monocytes counted (200 cells). The evaluated antibody was considered clinically relevant if the MI was greater than 5%.⁷ As a test validation criterion, the positive control should result in a MI greater than 20% and the negative one in a MI=0.

Considering the complexity of the case and aiming to elucidate the relationship of the Anti-M alloantibody especially with the second fetal loss, five different tests were performed using MMA (Table 3).

The first test was performed using maternal serum and allogeneic M+N- RBC, with the aim of demonstrating an MI equal to zero in the absence of the "M" antigen, which was observed. Regarding the second test, MMA was performed with maternal serum and paternal M+N- RBC, in order to correlate a positive and clinically relevant MI result (MI=48%) to the expression of the M antigen in the paternal RBC (Figure 1). The third test consisted of performing MMA with maternal serum and allogeneic RBC from an M+N- donor, to prove that a positive MI (MI=33%) was

ANEXO H - Artigo submetido na revista *Transfusion Medicine* (continua)

related to the expression of the M antigen, even when using non-paternal RBC.

To assess the clinical importance of unidentified alloantibody detected in maternal plasma, tests 4 and 5 were proposed using MMA. Initially, adsorption of maternal serum with M+N- allogeneic RBC was performed to completely remove the Anti-M alloantibody from the sample. Subsequently, an IAT was performed using the adsorbed serum with the paternal RBC and the result was positive. It demonstrated that there was still the presence of another alloantibody in the adsorbed serum directed to some paternal antigen.

In MMA test 4, the maternal serum adsorbed and the paternal RBC were used. The MI obtained was equal to zero, thus ruling out the clinical relevance of this unidentified alloantibody. Finally, test 5 was performed, using the same adsorbed maternal serum and M+N- allogeneic RBC. However, these RBC did not express the antigen observed in the paternal RBC, since the IAT between the adsorbed serum and the allogeneic RBC was negative. MI equal to zero was observed in the MMA test 5, which demonstrated the total removal of the Anti-M alloantibody from the maternal sample.

Discussion

In general, the obstetric follow-up of Brazilian pregnant women or those who intend to become pregnant does not routinely include screening for irregular antibodies in RhD-positive patients. On the other hand, when the presence of Anti-D is detected in RhD negative pregnant women, the follow-up of these patients will include periodic alloantibody titration, considering that there are specific protocols that correlate the detected titer with the severity of HDFN.¹ However, for non-D alloantibodies, the antibody titration is still insufficient to detect cases that represent a high risk for HDFN. For these alloantibodies there is no clear evidence of correlation between titer and the severity of the disease.

At first, the presence of Anti-M alloantibody in pregnant women is not a concern, as it is commonly identified as an IgM class antibody of natural origin. However, this alloantibody can also be present in its IgG component of immune origin. The present case report described how maternal alloimmunization resulted in severe fetal anemia caused by the action of Anti-M alloantibody, with fatal outcome in the third trimester of pregnancy, even with episodes of intrauterine RBC transfusion. It should be noted that there are few cases involving Anti-M alloantibody reported in the literature, especially when it results in fetal death.

It is known that fetal-maternal hemorrhages can occur spontaneously from the first trimester of pregnancy, intensifying during the third trimester.^{3,10} In the case reported, the patient stated that she had never been given a blood transfusion. However, she had a previous abortion, which probably resulted in alloimmunization and, consequently, in the production of the IgG component of the Anti-M alloantibody.

Maternal Anti-M alloantibody can cause the destruction of mature fetal RBC that express the M antigen, resulting in HDFN occurrence.⁴ Above all, it is well established that the Anti-M alloantibody is mainly related to the inhibition of the growth of precursor cells of the erythroid lineage. This can be justified by the fact that glycophorin A (GPA) transmembrane protein carries the antigenic determinants MN, abundantly expressed in immature RBC precursors.⁹

The titration of the maternal Anti-M alloantibody in the evaluated patient revealed an expressive titer of 256 for its IgG component. The literature reveals that there is still no consensus about pregnant women monitoring through the Anti-M titration. It is noteworthy that the data are quite heterogeneous, since the clinical manifestation of HDFN can be observed in women with titers ranging from 1 to 4096, with varied outcomes.⁴ Even so, some strategies have been proposed for monitoring pregnant women who have Anti-M (IgG), associating the

titration/variation of the alloantibody titer throughout the pregnancy with the patient's history and with the performance of specific medical exams that monitor the HDFN occurrence.⁶

With regard to the subclass of the IgG component of alloanti-M, it was expected that such immunoglobulin belonged to the IgG1 or IgG3 subclass, since they are most frequently associated with the hemolytic action of the antibody.⁴ However, the presence of IgG1 and/or IgG3 was not confirmed, which makes the present case report even more unusual compared to previously published studies.^{3,4}

In the present case, the AI also revealed the presence of anti-Wra (Diego system) in the maternal serum. MMA was not performed to evaluate the clinical importance of this antibody since the paternal RBCs were phenotyped as Wr(a-), making its involvement in HDFN unlikely. Anti-Wra is a naturally occurring antibody, whose presence was previously reported in 3.24% of Brazilian blood donors¹¹.

The application of non-invasive complementary tests aiming to correlate the action of a specific IgG class antibody with the fetal hemolysis occurrence in alloimmunized pregnant women is highly desirable. In this context, MMA appears as an interesting option, as it makes it possible to determine the clinical importance of anti-erythrocyte antibodies observed in pregnant women.^{3,8}

In the present Case Study, it was possible to correlate the presence of the Anti-M alloantibody in the maternal serum to a positive MI (MI>20%) when tested with positive "M" RBC, especially when the used RBC were the paternal ones (MI=48%). Through MMA, it was also possible to rule out the hemolytic role of the second unidentified alloantibody detected in the mother's sample (MI=0).

An important pioneering North American study investigated the applicability of MMA as a possible useful and non-invasive test modality to predict the severity of fetus hemolytic disease, especially when alloantibodies whose titration does not still correlate well with the HDFN severity. Larson *et al.* (1995) proposed a cutoff of 20% for the MI below which the occurrence of episodes of moderate or severe HDFN was not observed. These authors point out that new studies are needed in different populations to consolidate the MMA with this objective.¹²

The literature review revealed that few studies address the application of MMA in the maternal-fetal context and that this assay may help in clarifying the role of IgG class antibodies in HDFN occurrence. Therefore, the present case constitutes a valuable opportunity to evaluate in practice the applicability of MMA for resolving cases of HDFN involving erythrocyte alloantibodies that are generally not associated with this type of disease, as is the case with anti-M.

The data presented allow us to propose that MMA is a useful and promising tool to clarify the unfavorable outcomes observed in pregnancies of alloimmunized women. The routine use of this assay may contribute to the understanding of cases of HDFN, especially in fetuses/neonates from couples compatible with respect to ABO and RhD system, which is extremely desirable for obstetrics, considering that other alloantibodies may be clinically important.

Conclusion

From the evidence presented here, it is clear the need to expand the view on the clinical importance of IgG class alloantibodies in pregnant women, directed not only to the Rh and Kell antigens. Furthermore, the data presented indicates that MMA is a useful tool in elucidating the reasons for fetal loss in women alloimmunized with non-anti-D antibodies. Since it is an assay that can be performed in a laboratory routine, MMA can reduce the need for invasive and expensive medical exams for patients and specialized services in fetal medicine. Future studies will certainly be necessary to further consolidate the insertion of MMA as an auxiliary test in obstetric care.

ANEXO H - Artigo submetido na revista *Transfusion Medicine* (continua)

Consent

For the publication of this Case Study, both parents consented to all investigations and subsequent reporting. The Free and Informed Consent Form was prepared in accordance with Brazilian legislation that governs research ethics. The study was approved by the Fundação Hemominas Ethics Committee (Reference: CAAE 30000920.0.3001.5118).

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ and Fundação

Hemominas. The authors would like to thank the entire CIH team for their commitment during the investigation of this case, also including the Customer Support Laboratory (BIORAD) and the Immunohematology Laboratory of Hospital Israelita Albert Einstein for complementary tests. Also, the authors would like to thank Maria Clara Fernandes da Silva Malta, who provided critical comments on the manuscript.

Interest conflicts

The authors have no competing interests.

References:

- De Haas M, Thirik FF, Koelewijn JM, van der Schoot CE. Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 2015; 109(2):99-113.
- Koelewijn JM, Slootweg YM, Folman C, van Kamp IL, Oepkes D, de Haas M. Diagnostic value of laboratory monitoring to predict severe hemolytic disease of the fetus and newborn in non-D and non-K-alloimmunized pregnancies. *Transfusion* 2020; 60(2):391-399.
- Wikman A, Edner A, Gryfelt G, Jonsson B, Henter JI. Fetal hemolytic anemia and intrauterine death caused by anti-M immunization. *Transfusion* 2007; 47(5):911-917.
- Yasuda H, Ohto H, Nollet KE, Kawabata K, Saito S, Yagi Y, Negishi Y, Ishida A. Hemolytic disease of the fetus and newborn with late-onset anemia due to anti-M: a case report and review of the Japanese literature. *Transfusion With Rev. Dr.* 2014; 28(1):1-6.
- De Young-Owens A, Kennedy M, Rose RL, Boyle J, O'Shaughnessy R. Anti-M isoimmunization: management and outcome at the Ohio State University from 1969 to 1995. *Obstet Gynecol* 1997; 90(6):962-966.
- Stetson B, Scrape S, Markham KB. Anti-M Alloimmunization: Management and Outcome at a Single Institution. *AJP Rep* 2017; 7(4):e205-e210.
- Arndt PA, Garratty G. A retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting the clinical significance of blood group alloantibodies. *Transfusion* 2004; 44(9):1273-1281.
- Conrad MCAV, D'Avila AN, Scallop JB, Boniface SL, Gomes FCA, Dezan MR, Oliveira VB, Ribeiro IH, Tucunduva LTCM, Mendrone-Junior A, Rocha V, Dinardo CL. Defining the clinical relevance of red blood cell autoantibodies by Monocyte Monolayer Assay. *J Clin Lab Anal* 2018;32(2): e22274. Hinchliffe RF, Nolan B, Vora AJ, Stamps R. Neonatal pure red cell aplasia due to anti-M. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006; 91(6): F467-468.
- Mathew AM, Shah S, Bhatnagar N, Shah M, Patel T, Thakkar T. Maternal allo anti-M antibody-induced hemolytic disease of newborn. *Asian J Transfus Sci* 2022; 16(1):144-147.
- Muniz JG, Amoni CP, Gazito D, Persona RM, Vendrame TAP, Latini FRM, Castilho L. Frequency of Wra antigen and anti-Wra in Brazilian blood donor. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015; 37(5):316-319.
- Larson PJ, Thorp JM Jr, Miller RC, Hoffman M. The monocyte monolayer assay: a noninvasive technique for predicting the severity of in utero hemolysis. *Am J Perinatol* 1995; 12(3):157-160.

Table 1 –Maternal and paternal red blood cell phenotyping

Sample	ABO	Rh	Kell	MNS	Duffy	Kidd	P ₁	Lutheran
Maternal	A	CcDEe	K-	M-N+ S-s+	Fy(a-b+)	Jk(a-b+)	NT	NT
Paternal	A	CcDee	K+k+ Kp(a-b+)	M+N- S+s+	Fy(a+b+)	Jk(a+b+)	P ₁ -	Lu(a-b+)

Note: NT=not tested.

Table 2 –Serological and molecular evaluation of low prevalence antigens in paternal red blood cells

Low prevalence antigens in paternal red blood cells					
Dantu-	Ny(a-)	Hut-	Wr(a-)	Vw-	V-
Di(a-)	Yt(b-)	Lu(a-)	Rb(a-)	Bp(a-)	VS-
Lw(b-)	Sc-2	In(b-)	LU-19	Mi(a-)	Tc(c-)

ANEXO H - Artigo submetido na revista *Transfusion Medicine* (conclusão)

Table 3 - Monocyte Monolayer Assays performed to assist in case elucidation

Test	Tested antibody	Tested RBC	IAT*	DAT**	MI*** (%)
1	Maternal Anti-M (serum)	Allogenic: M-N+	0	0	0
2	Maternal Anti-M (serum)	Paternal: M+N-	4+	4+	48
3	Maternal Anti-M (serum)	Allogenic: M+N-	4+	4+	33
4	Unidentified maternal alloantibody (alloadsorbed serum)	Paternal: M+N-	3+	2+	0
5	Unidentified maternal alloantibody (alloadsorbed serum)	Allogenic: M+N-	0	0	0

Notes: *IAT= Indirect Antiglobulin Test between maternal serum and tested RBC (column agglutination method); **DAT= Direct Antiglobulin Test of the tested RBC after the adsorption of the evaluated antibody (column agglutination method); ***MI= Monocyte Index expressed in percentage (%).

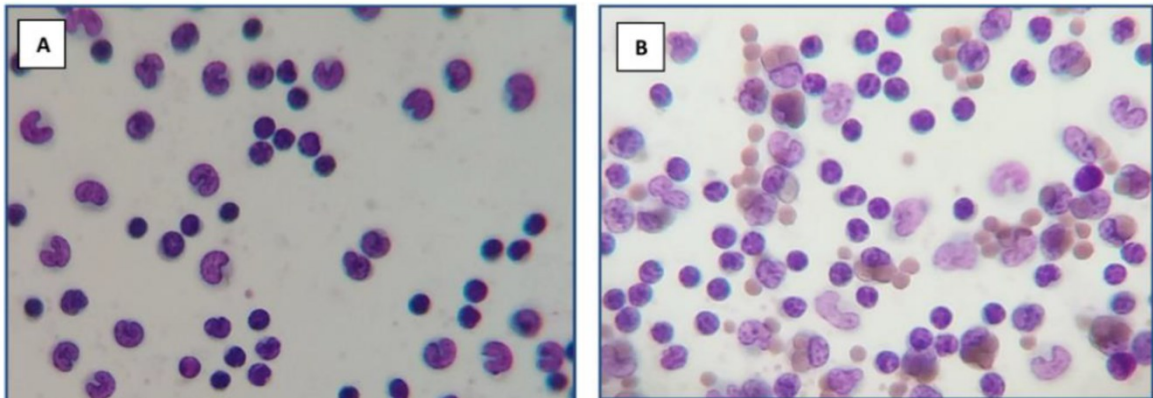


FIGURE 1 – MMA results. (A) MMA result performed with maternal serum and allogenic M-N+ RBC: there was no adhered or phagocytosed RBC by monocytes (MI=0). **(B)** MMA result performed with maternal serum and paternal M+N- RBC: adhered and phagocytosed RBC by monocytes was observed (MI=48%)