

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
MESTRADO EM PATOLOGIA

DAISY MARIA MEIRELES ARRUDA

**ALOIMUNIDADE CONTRA OS ANTÍGENOS HLA DE CLASSE I EM  
PACIENTES PORTADORES DAS SÍNDROMES  
MIELODISPLÁSTICAS E DE ANEMIA APLÁSTICA.**

FORTALEZA  
2005

DAISY MARIA MEIRELES ARRUDA

ALOIMUNIDADE CONTRA OS ANTÍGENOS HLA DE CLASSE I EM  
PACIENTES PORTADORES DAS SÍNDROMES  
MIELODISPLÁSTICAS E DE ANEMIA APLÁSTICA.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu

A817a Arruda, Daisy Maria Meireles

Aloimunidade contra os antígenos HLA de classe I em pacientes portadores das síndromes mielodisplásticas e de anemia aplástica / Daisy Maria Meireles Arruda. - Fortaleza, 2005.

127 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Departamento de Patologia e Medicina Legal.

1. Anemia aplástica. 2. Síndromes mielodisplásticas. 3. Transfusão de sangue 4. Antígenos HLA.  
I. Título.

CDD 616.152

FORTALEZA  
2005  
DAISY MARIA MEIRELES ARRUDA

ALOIMUNIDADE CONTRA OS ANTÍGENOS HLA DE CLASSE I EM  
PACIENTES PORTADORES DAS SÍNDROMES  
MIELODISPLÁSTICAS E DE ANEMIA APLÁSTICA.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em  
Patologia do Departamento de Patologia e Medicina  
Legal da Universidade Federal do Ceará como  
requisito parcial para a obtenção do título de mestre  
em Patologia.

Data da Aprovação: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2005.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu**  
**Orientador- Presidente**

---

**Profª Drª Maria da Silva Pitombeira**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Profª Drª Silvia Maria Meira Magalhães**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Profª Drª Paola Frassinetti Torres Ferreira da Costa**  
**Universidade de Fortaleza**

*“Meu pai disse certa vez que há dois tipos de pessoas: as que fazem o trabalho e as que recebem o crédito por ele. E me disse para tentar ficar no primeiro grupo, onde a concorrência é menor”*

*Indira Gandhi*

## Dedicatória

---

*Dedico esse trabalho às pessoas que mais contribuíram para minha formação humana e profissional:*

*A Deus – por ter me dado a oportunidade de realizar mais um sonho e por todos os momentos felizes e principalmente os tristes, pois são nesses momentos que aprendo a ser mais humilde com as pessoas e com a vida.*

*Ao meu pai Fausto Arruda (in memoriam), a minha mãe Maria Helena (in memoriam), ao meu padrinho Dr. Raimundo Arruda (in memoriam) e meus irmãos Mary, Celi, Arruda Filho, Alexandre, Ricardo, Jackson, Denise e Diana – meus primeiros, contínuos e melhores professores de minha vida, modelos de inspiração, de comportamento e ética.*

*Ao meu esposo Zivaldo e meus filhos Lucas e Luana – razão maior de esperança e que fazem tudo valer a pena.*

*Aos Drs. Luis Carlos Fontenele, Murilo Martins, Henry de Holanda Campos e Carlos Ribeiro – modelos de amor à profissão, com quem tive a honra de aprender, trabalhar e desfrutar de seus saberes.*

*À minha amiga Dra. Silvia Fernandes Ribeiro da Silva - há 25 anos divido minhas alegrias e tristezas, exemplo vivo de amor à profissão, coragem, determinação, perseverança e minha grande incentivadora na realização deste curso.*

*À minha amiga Dra. Sônia Leite da Silva - pela compreensão das minhas inquietudes, incentivando e colaborando de forma valiosa em todos os momentos deste trabalho.*

# Agradecimento Especial

---

*Ao professor Dr. Talapala Govindaswamy. Naidu, manifesto minha gratidão por ter possibilitado ampliar meus conhecimentos, ter tornado prazeroso assimilar seus ensinamentos, ter contribuído para despertar em mim um gosto especial pela imunologia. E acima de tudo pela paciência e tolerância nas minhas incertezas, orientando cada passo deste trabalho de forma brilhante, além da confiança depositada em mim.*

*... o meu muito obrigada.*

## Agradecimentos

---

*Aos professores do curso de mestrado que se empenharam em transmitir os progressos da ciência de maneira inteligível, de acordo com a finalidade à qual se destinou esse curso.*

*Ao professor Dr. Ivo Castelo Branco por ter me concedido uma bolsa da CAPES no momento mais oportuno.*

*Ao Dr. Henry H. Campos e Dra. Wanda Campos por ter tornado possível a realização desse estudo no Laboratório de HLA.*

*À Dra. Silvia Fernandes pela preciosa orientação na parte prática e na análise dos dados desse estudo.*

*À Dra. Sônia Leite pelo indispensável apoio na correção e formatação desse trabalho.*

*À Dra. Silvia Maria Meira Magalhães pela permissão de trabalhar com os pacientes do ambulatório de Síndrome Mielodisplástica e por suas valiosas observações referente ao texto de Síndrome Mielodisplástica.*

*Ao Dr. Herivaldo Ferreira da Silva pela permissão de trabalhar com os pacientes do ambulatório de anemia aplástica e por seu apoio referente à revisão do texto de Anemia Aplástica.*

*Ao ex-diretor do HEMOCE, Dr. Ormando Campos que tornou possível a realização da coleta das amostras dos pacientes do ambulatório de AA e SMD*

*À diretora do HEMOCE, Dra Clara Bastos que acatou a decisão do ex-diretor, dando continuidade a realização da coleta das amostras dos pacientes do ambulatório de AA e SMD*



*À equipe do Laboratório de HLA, Dra. Maria do Carmo Serpa e Dra. Márcia Farias pela ajuda na realização do PRA.*

*Aos auxiliares do Laboratório de HLA Jacqueline e Wilson, pela ajuda no processamento das amostras.*

*Aos auxiliares do Laboratório de Hematologia do Hemoce Sueli, Ivoneide, Ivina e Eloneida, pela ajuda na coleta das amostras dos pacientes.*

*Aos pacientes que concordaram em participar desse estudo, mesmo sem compreender bem o benefício que o mesmo lhes traria.*

*Aos colegas de turma pelo companherismo e solidariedade durante as dificuldades que passamos juntos, especialmente a Dra. Fátima Guerreiro, companheira de estudo desde do início, por dividir comigo as angústias das incertezas em todos os momentos do nosso curso .*

*À secretária do curso de mestrado de Patologia Paula pelo apoio nos assuntos burocráticos.*

*À equipe do SAME do HUWC que prontamente me disponibilizou os prontuários dos pacientes com AA e SMD.*

*A todos que de alguma forma me ajudaram ou contribuíram para que essa dissertação se tornasse realidade.*

*...o meu muito obrigada.*

# Lista de Abreviaturas

---

AA	Anemia Aplástica
AAS	Anemia Aplástica Severa
Ag	Anticorpo
Ag	Antígeno
AR	Anemia Refratária
ARSA	Anemia Refratária Sideroblástica em Anel
AREB	Anemia Refratária com Excesso de Blastos
AREB – t	Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação
ASHI	American Society for Histocompatibility and Immunogenetics
BM	Banho-Maria
CH	Concentrado de Hemácias
CP	Concentrado de Plaquetas
CsA	Ciclosporina A
CMV	Citomegalovírus
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
CPA	Célula Processadora de Antígenos
CDC	Citotoxicidade Dependente do Complemento
CPDHR	Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais
DEVH	Doença Enxerto Versus Hospedeiro
DTT	Dithiothreitol
DR	Locus DR do sistema HLA de Classe II
DQ	Locus DQ do sistema HLA de Classe II
DP	Locus DP do sistema HLA de Classe II
EBV	Vírus Epstein Barr
EPO	Eritropoetina
FAB	Grupo Franco-Americano-Britânico
FiSH	Fluorescência na Hibridização <i>in situ</i>
g	Giros
GAL	Globulina anti-linfócitos
GAT	Globulina anti-timócitos
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulocíticas
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulocíticas e Monocíticas
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio

HPN	Hemoglobinúria Paroxística Noturna
IAASG	International Aplastic Anemia Study Group
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IPSS	Internacional Prognostic Scoring System
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crónica
MO	Medula Óssea
MLCT/DC	Microlinfocitotoxicidade Dependente do Complemento
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PRA	Painel de Reatividade de Antígeno
rpm	Rotações por Minuto
RPMI	Meio “ Roswell Park Memorial Institute”
SMD	Síndrome Mielodisplástica
SP	Sangue Periférico
SFB	Soro Fetal Bovino
TA	Temperatura Ambiente
TCT	Transplante de Células Tronco
TMO	Transplante de Medula Óssea
TCR	Receptor de Células T
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Th1	Linfócitos T Help 1
Th2	Linfócitos T Help 2
UFC	Universidade Federal do Ceará

# Lista de Tabelas

---

Tabela 1:	Classificação das Síndromes Mielodisplásticas de acordo com os critérios do grupo FAB	19
Tabela 2:	Comparação entre as classificações FAB e OMS das Síndromes Mielodisplásticas	22
Tabela 3:	Protocolo de exclusão para as Síndromes Mielodisplásticas	27
Tabela 4:	Internacional Prognostic Scoring System	29
Tabela 5:	Desenvolvimento da Expansão Clonal e Aloimunização	47
Tabela 6:	Escores para interpretação das reações no PRA	61
Tabela 7:	Diagnóstico clínico dos pacientes portadores de Síndromes Mielodisplásticas de acordo com a classificação FAB	63
Tabela 8:	Caracterização dos pacientes portadores das Síndromes Mielodisplásticas	66
Tabela 9:	Características clínicas dos pacientes portadores das Síndromes Mielodisplásticas relacionadas à incidência de aloimunização	69
Tabela 10:	Caracterização dos 50 pacientes portadores das SMD com Padrão 1 (PRA=0%) de reatividade	72
Tabela 11:	Dados comparativos dos pacientes aloimunizados de acordo com o diagnóstico clínico das Síndromes Mielodisplásticas	74
Tabela 12:	Caracterização dos anticorpos em pacientes alorreativos nas Síndromes Mielodisplásticas	76
Tabela 13:	Distribuição dos pacientes portadores de Anemia Aplástica de acordo com reatividade no PRA	77
Tabela 14:	Características clínicas dos pacientes portadores de AA de acordo com o grau de reatividade diante do PRA	78
Tabela 15:	Caracterização dos anticorpos em pacientes alorreativos em pacientes portadores de Anemia Aplástica	81

# Lista de Figuras

---

<b>Figura 1</b>	Localização do complexo HLA no braço curto do cromossoma 6	38
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática das moléculas HLA de Classe I e II, mostrando o local de ligação do peptídeo	39
<b>Figura 3</b>	Representação cristalográfica da moléculas HLA de classe I	40
<b>Figura 4</b>	Soros aliqüotados em tubos de Fisher.	51
<b>Figura 5</b>	Soros estocados em freezer a -20°C	51
<b>Figura 6</b>	Preparação das placas de Terasaki para distribuição dos soros	52
<b>Figura 7</b>	Soros distribuídos em placas de Terasaki com óleo mineral	52
<b>Figura 8</b>	Esquema mostrando o processamento da amostra de sangue total para obtenção do anel de células mononucleares	53
<b>Figura 9</b>	Separação do anel de células mononucleares	54
<b>Figura 10</b>	Retirada do anel de células mononucleares	54
<b>Figura 11</b>	Incubação da lã de nylon com RPMI em estufa a 37°C	56
<b>Figura 12</b>	Confecção do “cotonete” de lã de nylon e incubação em RPMI	57
<b>Figura 13</b>	Gotejamento da suspensão de linfócitos sobre o “cotonete” de lã de nylon	57
<b>Figura 14</b>	Lã de nylon incubada com suspensão de linfócitos	58
<b>Figura 15</b>	Lavagem da lã de nylon com RPMI a 5% em SFB para separação dos linfócitos T	58
<b>Figura 16</b>	Placas de Terasaki prontas para leitura	60
<b>Figura 17</b>	Esquema de diferentes graus de lise celular na técnica de MLCT/DC	60
<b>Figura 18</b>	Distribuição dos 70 pacientes portadores das SMD quanto ao gênero	64
<b>Figura 19</b>	Freqüência dos antígenos ABO em 70 pacientes portadores das SMD	64
<b>Figura 20</b>	Ocorrência de anticorpos anti-HLA nos 70 pacientes portadores das SMD no PRA	67
<b>Figura 21</b>	Distribuição dos padrões de reatividade dos 70 pacientes portadores das SMD de acordo com a positividade no PRA	68
<b>Figura 22</b>	Distribuição de 40 pacientes portadores de AA de acordo com a reatividade contra painel de linfócitos (PRA)	79

## Resumo

---

As Síndromes Mielodisplásticas e Anemia Aplástica são desordens hematológicas que apresentam citopenias periféricas, com desenvolvimento de características clínicas extensas, com manifestações clínicas variáveis que vão desde uma leve anemia até uma pancitopenia severa, necessitando, nos últimos casos, de reposição transfusional contínua de concentrados de hemácias (CH) e de plaquetas (CP), tornando-os alvos à aloimunização pós-transfusional e desenvolvimento do estado de refratariedade às transfusões. Este estudo objetivou determinar a incidência de anticorpos anti-HLA de classe I em pacientes politransfundidos e correlacionar a aloimunidade ao perfil clínico dos pacientes de SMD e AA. 110 pacientes foram incluídos nesta pesquisa (70 portadores das SMD e 40 de AA), com os portadores das SMD classificados em quatro sub-grupos clínicos: anemia refratária (AR), anemia refratária sideroblástica em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB) e anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t). Soros dos pacientes foram tratados com Dithiothreitol (DTT) para a pesquisa de Acs contra os Ag HLA de classe I, usando a técnica de “citotoxicidade dependente do complemento” (CDC), no painel de linfócitos baseado na frequência dos Ags HLA da nossa população (PRA). Os resultados demonstraram que os pacientes portadores das SMD desenvolveram um menor grau de aloimunização (28,6%), que os pacientes de AA (45%). A alorreatividade foi mais freqüente nos portadores de AA que tinham recebido maiores médias transfusionais de CP, em relação aos pacientes de SMD que receberam maior número de transfusões com CH. O grau de alorreatividade se manifestou diferente nestas duas doenças e, de forma geral, se relacionou com: o maior número médio de transfusões, a aplicação de preparações não desleucotizadas de CH e CP e o uso de imunossuppressores (ciclosporina e/ou soros anti-leucocitários). Somente o uso de corticóide não foi suficiente para reduzir a aloimunização. O mais alto grau de alorreatividade (Padrão 4) nas SMD foi evidenciado somente em mulheres, principalmente nas múltiparas. IgG persistente esteve mais presente no Padrão 4. Estes dados revelam que alguns pacientes das SMD e AA podem desenvolver anticorpos anti-HLA, se forem politransfundidos com hemoconcentrados não desleucotizados e sem o tratamento com os imunossuppressores CsA e/ou GAL. Tal alorreatividade poderá tornar o paciente refratário às futuras transfusões e dificultar, em princípio, recebimento do transplante de medula óssea de doadores HLA compatíveis.

# Abstract

---

## **ALOIMMUNITY AGAINST HLA CLASS I ANTIGENS IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME AND APLASTIC ANEMIA.**

Daisy Maria Meireles Arruda

Department of Pathology and Legal Medicine; Federal University of Ceara

Myelodysplastic syndrome (MDS) and aplastic anemia (AA) are two of the hematological disorders which present peripheral cytopenias, with extensive clinical manifestations that vary from slight anemia to severe pancytopenia; the latter requiring continuous transfusional reposition of red cell (RC) and platelet concentrates (PC), which can induce aloimmunization in patients. Such patients can develop a post-transfusional refractory state, rendering further transfusions unviable. The objective of the present study was to investigate the incidence of anti-HLA antibodies in politransfused patients, and correlate the aloimmunity levels to the clinical profiles of MDS and AA patients. A total of 110 politransfused patients (70 with MDS, and 40 with AA) have been included in the study, with the MDS patients being subclassified into four clinical diagnostic categories: refractory anemia (RA), ringed-sideroblastic refractory anemia (RSRA), refractory anemia with excess blasts (RAEB) and refractory anemia with excess blasts in transformation (RAEB-t). Blood serum samples from these patients were treated with dithiothreitol for the detection of anti-HLA class I antibodies, using the complement-dependent cytotoxicity test (CDC), in a panel of lymphocytes constituted on the basis of the frequency of HLA antigens in our population (PRA). The results showed that a larger number of AA patients were aloimmunized than MDS patients (45% v 28.6%), with the aloreactivity being higher in AA patients who received higher mean transfusions of PC, than in MDS patients who received higher average number of EC transfusions. The degree of aloimmunization was different in the two disorders, and was generally related to: the number of transfusions received, the application of un-deleukocytised PC and EC, and the type of immunosuppressant drugs used in treatment [Cyclosporin (CsA) and/or antiglobulin (ALG) therapy significantly reduced aloimmunization, but corticoids alone were not sufficient]. The highest degree of aloimmunity (Grade 4) was observed only in MDS females, particularly in those who had multiple births. Persistent IgG was also associated with Grade 4 aloimmunity. These results reveal that significant numbers of MDS and AA patients, if politransfused with un-deleukocytised PC and EC and un-treated with immunosuppressants CsA and/or ALG, can develop anti-HLA antibodies and become refractory to further transfusions. Such aloimmunized patients can also become potentially unsuited to receive bone marrow transplants from HLA-matched donors.

# Sumário

---

INTRODUÇÃO		18
1	SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS	18
	1.1. DEFINIÇÃO	18
	1.2. CLASSIFICAÇÃO	19
	1.3. INCIDÊNCIA	23
	1.4. FISIOPATOLOGIA	24
	1.5. DIAGNÓSTICO	25
	1.6. TRATAMENTO	27
2	ANEMIA APLÁSTICA	31
	2.1. DEFINIÇÃO	31
	2.2. CLASSIFICAÇÃO	31
	2.3. INCIDÊNCIA	32
	2.4. FISIOPATOLOGIA	32
	2.5. DIAGNÓSTICO	33
	2.6. TRATAMENTO	34
3	RECONHECIMENTO ANTIGÊNICO E O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE	38
4	ALOIMUNIZAÇÃO	42
	4.1. ALOIMUNIZAÇÃO EM GESTANTES	43
	4.2. ALOIMUNIZAÇÃO APÓS TRANSFUSÃO	43
	4.3. ALOIMUNIZAÇÃO APÓS TRANSPLANTES	44
5	PAINEL DE REATIVIDADE CONTRA ANTIGENOS – PRA	44
OBJETIVOS		48
	OBJETIVO GERAL	48
	OBJETIVO ESPECÍFICO	48
MATERIAIS E MÉTODOS		49
1	SELEÇÃO DE PACIENTES	49
	A. DESENHO DO ESTUDO	49
	B. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	49
	C. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	49
	D. PARÂMETROS AVALIADOS	49
	E. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOROS DOS PACIENTES	50
2	PAINEL DE LINFÓCITOS	51
	2.1. PREPARO DAS PLACAS DE TERASAKI	51
	2.2. OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS T DOS DOADORES DO PAINEL PARA REALIZAÇÃO DO PRA	52
	2.2.1. OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS TOTAIS DOS DOADORES DO PAINEL	53
	2.2.2. OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS T DOS DOADORES DO	



	PAINEL	55
	2.2.2.1. PREPARAÇÃO DA LÃ DE NYLON	56
	2.2.2.2. OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS T	57
3	REALIZAÇÃO DO PRA	59
	3.1. DISTRIBUIÇÃO DOS LINFÓCITOS T DOS DOADORES NO PRA	59
	3.2. LEITURA DAS PLACAS DE TERASAKI	60
	3.3. ANÁLISES DOS RESULTADOS	61
4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
5	PRECEITOS ÉTICOS	62
RESULTADOS		63
	1. SÍNDROME MIELODISPLÁSTICAS	63
	2. ANEMIA APLÁSTICA	76
DISCUSSÃO		82
CONCLUSÃO		94
BIBLIOGRAFIA		96
ANEXOS		121

# I ntrodução

---

## 1. SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS

### 1.1. DEFINIÇÃO

As Síndromes Mielodisplásticas (SMD) são desordens hematológicas clonais caracterizadas clínica e morfológicamente por anormalidades na proliferação e maturação dos precursores hematopoéticos, resultando em citopenias periféricas de uma ou mais linhagens celulares, com potencial para transformação leucêmica (Koeffler, HP., 1986; Mufti & Galton, 1986; Janssen et al., 1989; Ramos et al., 1999; Heaney & Golde, 1999; Gardais, j., 2000; Hofmann & Koeffler, 2002).

O grupo das SMD recebeu, anteriormente, denominações diversas, tais como anemia refratária (Rhoades & Barcker, 1938), anemia pré-leucêmica (Hamilton-Peterson et al., 1949), pré-leucemia (Block et al., 1953), anemia refratária com sideroblasto em anel (Bjorkman, J.E., 1956), anemia refratária monoblástica (Dacie et al., 1959), leucemia aguda latente (Rheingold et al., 1963), síndrome pré-leucêmica (Saarni & Linman, 1973), leucemia mielomonocítica subaguda (Sexauer et al., 1974), leucemia mielomonocítica crônica (Miescher & Farquet, 1974), leucemia mielóide aguda hipoplásica (Berad et al., 1975), anemia refratária com excesso de blastos (Dreyfus, B., 1976), displasia hematopoética (Linman & Bagby, 1978), leucemia mielóide subaguda (Cohen et al., 1979), síndrome dismielopoética (Streuli et al., 1980).

Em 1982, na tentativa de agrupar essas desordens medulares, o grupo cooperativo franco-americano-britânico (FAB) criou a denominação síndromes mielodisplásticas (Bennett et al., 1982), pelo fato de terem observado, que todos os pacientes analisados usualmente tinham anemia e anormalidades morfológicas displásticas em uma ou mais linhagens celulares.

## 1.2. CLASSIFICAÇÃO

O grupo FAB, através de um consenso entre hematologistas e hematopatologistas, com base em achados de sangue periférico (SP) e critérios morfológicos do aspirado de medula óssea (MO), classificou as SMD em cinco subtipos: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblasto em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (Bennett et al., 1982) (**Tabela 1**).

**Tabela 1. Classificação das Síndromes Mielodisplásticas de acordo com o grupo FAB (1982)**

<b>Tipo</b>	<b>Sangue Periférico</b>	<b>Medula Ossea</b>
<b>AR</b> Anemia Refratária	< 1% blastos	Usualmente hiperplasia eritróide com diseritropoese, < 5% blastos
<b>ARSA</b> Anemia Refratária com Sideroblasto em Anel	< 1% blastos	Igual AR, porém Sideroblastos tipo III ≥ 15% precursor eritróide
<b>AREB</b> Anemia Refratária com Excesso de Blastos	< 5% de blastos, citopenia em 2 ou 3 linhagens celulares	5% - 20% blastos, 2 ou 3 linhagens mostrando dismorfismo
<b>AREB-t</b> Anemia Refratária com Excesso de Blastos em transformação	5% - 29% de blastos, com bastonetes de Auer presentes	20% - 30% blastos bastonetes Auer presentes
<b>LMMC</b> Leucemia Mielomonocítica Crônica	< 5% blastos, > 1x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> monócitos	1% - 20% blastos, Monocitose

**FAB: grupo Franco-Americano-Britânico; AR: anemia refratária; ARSA: anemia refratária sideroblástica em anel; AREB; anemia refratária com excesso de blastos; AREB-t: anemia refratária com excesso de blastos em transformação; LMMC: leucemia mielomonocítica crônica.**

Fonte: Bennett et al., 1982

- Anemia Refratária (AR): usualmente é encontrada em pacientes acima de 50 anos de idade, apresentando anemia como principal queixa. O sangue periférico mostra reticulocitopenia, hemácias com alterações morfológicas, blastos geralmente ausentes e, se presentes, abaixo de 1%. A medula óssea se encontra normo ou hiperplasmática com hiperplasia eritróide e diseritropoese. As séries granulocítica e megacariocítica, na maioria dos casos, encontram-se normais, podendo estar associadas a neutropenia e plaquetopenia. Células blásticas estão presentes e não excedem a 5%.
- Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA): neste grupo a principal diferença é a presença de sideroblastos em anel na MO, acima de 15%. Estes sideroblastos, do tipo III, possuem grânulos sideróticos grosseiros e desorganizados ao redor da membrana nuclear (Dacie & Lewis, 1975). Hemoglobinizacão deficiente em alguns precursores eritróides pode ser observada, refletindo no sangue periférico, a presença de eritrócitos com morfologia alterada.
- Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB): ocorre um número maior de blastos no sangue periférico que não ultrapassa 5%, enquanto a medula óssea se apresenta hiperplasmática com hiperplasia eritróide e granulocítica. Há diseritropoese, disgranulopoese e/ou dismegacariopoese. Podem ser observados sideroblastos em anel. A percentagem de blastos na medula óssea se encontra entre 5 a 20%.
- Anemia Refratária com Excesso de Blastos em transformação (AREB-t): há leucopenia isolada ou associada à anemia e plaquetopenia. As células blásticas estão presentes no sangue periférico acima de 5% e na medula óssea, o percentual não excede a 30%. Podem ainda ser observados bastonetes de Auer.
- Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC): a principal característica deste subgrupo é a presença de monocitose absoluta no sangue periférico. Na medula óssea também há monocitose com presença de formas maduras e

imaturas (pró-monócitos e monoblastos). Os granulócitos estão aumentados com ou sem evidências de disgranulopoese do tipo hipogranulação e anomalia do tipo Pelger-Hüet.

A transformação das SMD em leucemia aguda, definida pelo grupo FAB como o achado de percentual igual ou superior a 30% de blastos na medula óssea, ocorre em mais de 30% dos casos (Abruzzese et al, 1996; Bernell et al., 1996). A evolução para leucemia aguda é mais freqüente nos pacientes portadores dos subtipos AREB e AREB-T.

Em 1999, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma nova classificação das SMD. Esta nova classificação se baseia tanto nos critérios bem estabelecidos do grupo FAB (os aspectos morfológicos do SP e da MO) como critérios citogenéticos. De acordo com a OMS foram criados oito novos grupos, considerando as seguintes condições:

- AR com ou sem sideroblasto em anel
- Citopenias refratárias com displasia de duas ou mais linhagens celulares com e sem sideroblastos em anel
- AREB do tipo I e II
- Síndrome 5q-
- SMD inclassificável

As principais alterações da OMS, em relação a FAB, foram o número de blastos presentes na MO que define leucemia aguda, que passa de 30% para 20%; a retirada dos subtipos LMMC e AREB-t e o subtipo AREB que passa a ser dividido em dois grupos (AREB I e AREB II), de acordo com o número de blastos na MO. A AR compreende um subtipo com e sem sideroblasto em anel. Os pacientes com SMD com menos de 5% de blastos na MO e presença de

displasias em múltiplas linhagens pertencem a um outro grupo de citopenias refratárias.

A síndrome 5q- faz parte de outro grupo de pacientes com SMD, que apresentam uma única anomalia cromossômica do tipo 5q- (Harris et al., 1999; Bennett et al., 2000) **(Tabela 2)**.

**Tabela 2. Comparação entre as classificações FAB (1982) e OMS (1999) das Síndromes Mielodisplásticas**

FAB (1982)	OMS (1999)
Anemia refratária (AR)	AR com e sem sideroblasto em anel
Anemia refratária sideroblasto em anel (ARSA)	Citopenias refratárias com displasia em múltiplas linhagens com ou sem sideroblasto em anel
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB)	AREB- I (5-9% blastos) e AREB- II (10-19% blastos)
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB-t)	Síndrome 5q-
Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC)	SMD inclassificável

**FAB: grupo franco-Americano-Britânico; OMS; organização mundial de saúde; AR: anemia refratária; ARSA: anemia refratária sideroblástica em anel; AREB; anemia refratária com excesso de blastos; AREB-T: anemia refratária com excesso de blastos em transformação; LMMC: leucemia mielomonocítica crônica.**

Fonte: Harris et al., 1999.

### 1.3. INCIDÊNCIA

As SMD acometem principalmente indivíduos idosos, acima de 60 anos, com um pico de incidência na oitava década de vida, embora formas secundárias possam ser observadas em pacientes jovens e até mesmo em crianças (Locatelli et al., 1995). Pesquisas realizadas nas décadas de 70, 80 e 90, demonstraram uma grande variação na sua incidência. Aul et al.,(1992), reportaram uma incidência de 1,3/100.000 habitantes/ano durante o período de 1976-1980. Um outro estudo também realizado por Aul et al.,(1992), encontraram uma incidência de 4,1/100.000 habitantes/ano no período de 1986 a 1990.

Williamson et al., (1994), realizaram um estudo de *cohort* em pacientes idosos durante 10 anos, demonstrando uma incidência das SMD de 12,6/100.000 habitantes/ano.

Em um estudo realizados por Aul et al.,(1995), mostraram uma predominância masculina na maioria dos casos.

O aumento da frequência das SMD reflete, uma melhora dos critérios diagnósticos, aumento da qualidade da assistência médica e um maior uso de procedimentos diagnósticos invasivos em pacientes idosos (Aul et al., 1998).

A ocorrência das SMD secundárias, após tratamento com drogas quimioterápicas/citotóxicas, como agentes alquilantes, já foi bem demonstrada (Pedersen-Bjergoard et al.,1990; Goldberg et al., 1990; Goldberg et al., 1991; Levine & Bloomfield, 1992). Igualmente, revisões de casos de LMA secundárias a irradiações ionizantes (principalmente entre os sobreviventes da bomba atômica) (Mole, R., 1990) e exposição ao benzeno (Rinsky et al., 1981; Aksoy, M., 1985; Yin et al., 1987; Brandt, L., 1992) mostraram que muitos destes casos foram precedidos de uma fase suspeita ou documentada de SMD.

A média de sobrevida de paciente com SMD varia de acordo com o subtipo. Para AR e ARSA varia de 30 a 80 meses; para AREB e LMMC varia de 11 a 12 meses e para AREB-t, a média é de apenas 5 a 6 meses(Mufti & Galton, 1986).

#### **1.4. FISIOPATOLOGIA**

As SMD são consideradas um grupo heterogêneo de desordens hematológicas da medula óssea, de origem clonal, que surgem quando ocorre uma lesão numa célula progenitora multipotente, prejudicando a maturação de uma ou mais linhagens (granulocíticas, monocíticas, eritrocíticas ou megacariocíticas), caracterizando uma hematopoese prejudicada, evidenciada por medula óssea hiperclular, excesso de morte celular intramedular (apoptose) e citopenias isoladas ou combinadas no sangue periférico (Koeffler & Golde, 1978; Barosi, et al., 1978; Cazzola, et al., 1982; Mitrou, et al., 1975; Hast & Reizenstein, 1977).

O fenômeno apoptótico está bastante envolvido nas mielodisplasias, ocasionando clones de células progenitoras ineficazes e produção diminuída de células maduras (Rajapaksa, et al., 1996; Mundle, et al., 1996).

Citopenia isolada ou combinada é a anormalidade patofisiológica fundamental na mielodisplasia. Em alguns indivíduos com idade madura (acima de 60) ou idosos (acima de 80), pode apresentar anemia discreta ou descompensada, que quase sempre se caracteriza como anemia crônica, dependente ou não de terapia transfusional. Além da anemia, podemos observar leucopenia com neutropenia, predispondo os pacientes a um risco aumentado de infecções; e plaquetopenias devido a distúrbios quantitativos e qualitativos nos megacariócitos podendo acarretar distúrbios hemorrágicos (Hoefsloot et al., 1997; Dreyfus, B., 1976; Weisdorf et al., 1983; Noel & Solberg, 1992).

As SMD são consideradas patologias que se instalam em etapas sucessivas evoluindo desde de uma fase bem precoce (pré-SMD), que se inicia quando indivíduos geneticamente predispostos se expõem a agentes genotóxicos ocupacionais e/ou ambientais (Aksoy & Erdem, 1978) até a fase nitidamente blástica (fase avançada ou de progressão), na qual ocorre perda ou inativação de



genes supressores e instabilidade cromossômica ligada ao grande número de rearranjos (translocações, deleções, inversões e inserções) e menor número de trocas numéricas (monossomia e trissomia), acarretando a progressão da doença para leucemia aguda (Rosenfeld & List, 2000; Koeffler & Golde, 1978).

## **1.5. DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico das SMD é baseado amplamente nos aspectos morfológicos em pacientes com evidências clínicas de hematopoese ineficaz, manifestada por anemia, neutropenia, trombocitopenia ou por combinações entre esses tipos de citopenias.

As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes são em função da anemia, que por vezes se tornam dependentes de reposição transfusional, de infecções recorrentes ou das manifestações hemorrágicas de intensidade variável (Hofmann et al., 1996; Hoagland, M.C., 1995).

As SMD devem ser consideradas em pacientes com mais de 60 anos de idade apresentando anemia (Hb <11g/dl), sem deficiência de ferro, ácido fólico ou vitamina B12, sem alterações tireoideanas, doença renal, doença hepática, ausência de uso crônico de álcool, especialmente se associada com uma inexplicável neutropenia ou trombocitopenia (Schumacher & Nand, 1995; Tood & Pierre, 1986).

O diagnóstico da SMD, portanto, baseia-se não somente nas anormalidades morfológicas e citogenéticas, mas também na exclusão de condições não clonais e potencialmente reversíveis que podem cursar com citopenias periféricas e alterações de maturação medulares.

A MO nas SMD geralmente se encontra normo ou hiperclular. Nos casos em que a MO se encontra hipocelular é recomendado realizar diagnóstico diferencial com anemia aplástica (AA) e hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) (Lorand-Metze et al., 1999).

A distinção entre SMD hipocelular e AA severa é dada mediante a presença de displasia em pelo menos duas linhagens, alterações citogenéticas clonais e evolução para excesso de blastos ou leucemia aguda (Kouides & Bennett, 1995).

Nos casos de pacientes apresentando características mieloproliferativas atípicas ou características mistas mielodisplásticas/mieloproliferativas, o diagnóstico diferencial deve ser feito baseado nas alterações citogenéticas, caso contrário, a distinção entre as duas entidades, somente será possível com a evolução da doença.

As alterações cromossômicas estão presentes em cerca de 50% dos casos de SMD, por ocasião do diagnóstico. Dentre as alterações mais freqüentes destacam-se a perda parcial ou total dos cromossomos 5, 7, 11 e 20, bem como, a trissomia do 8 e monossomia do 7. A síndrome 5q- é encontrada em até 50% dos casos de AR e confere um curso clínico benigno.

A monossomia 7 e a trissomia 8 estão presentes em 25% e 20% dos casos de AREB-t, respectivamente (Mufti, G.J., 1992; Aul et al., 1994, Heim & Mitelman, 1995; Fenaux et al., 1996).

As mutações dos oncogenes FAS e FMS, que ocorrem com uma frequência de 30 a 40% e 13 a 20%, respectivamente, contribuem para as anomalias citogenéticas implicadas nesta síndrome (Sole et al., 2000).

Atualmente, as alterações cromossômicas, observadas no exame de medula óssea, têm auxiliado cada vez mais no diagnóstico e definição do prognóstico. Outros testes diagnósticos também, têm aumentado as possibilidades de detectar anormalidades citogenéticas, como fluorescência na hibridização *in situ* (FiSH) e PCR. Mas estas análises citogenéticas devem ser integradas e correlacionadas juntamente com os achados clínicos o paciente (Heaney & Golde, 1999).

O diagnóstico das SMD definitivo só pode ser dado, após criteriosos exames do esfregaço do sangue periférico e do aspirado medular, biópsia óssea e de um protocolo de investigação com critérios de exclusão (**Tabela 3**).

**Tabela 3 - Protocolo de exclusão para as Síndromes Mielodisplásticas.**

Deficiências nutricionais: vitamina B12 e ácido fólico
Exposição recente a reagentes tóxicos: metais pesados, chumbo, benzeno, produtos derivados do petróleo
Exposição recente a drogas citotóxicas, fatores de crescimento
Disfunção endócrinas
Etilismo
Disfunções metabólicas <ul style="list-style-type: none"><li>- doenças hepáticas crônicas</li><li>- insuficiência renal</li></ul>
Doenças inflamatórias crônicas
Infeções: HIV, hepatites, CMV, toxoplasmose, parvovírus B19
Doenças auto-imunes

Fonte: Magalhães & Metze (2004)

## 1.6. TRATAMENTO

As SMD, por serem um grupo heterogêneo de desordens da célula tronco hematopoética, caracterizada por progressivas citopenias periféricas e um potencial para transformação leucêmica, e não possuir características bem definidas, é extremamente difícil de ser revertida por outra terapia que não seja o transplante de células tronco (TCT). Desta forma, o tratamento é baseado em medidas de suporte e medidas específicas.

Pacientes com menos de 5% de blastos, com poucas alterações cromossômicas na medula óssea e apresentando apenas citopenia em uma linhagem celular pertencem ao grupo das SMD de baixo risco (**Tabela 4**) (Greenberg et al., 1997) Estes pacientes recebem tratamento de suporte que controlam as citopenias, responsáveis por anemia, infecções e complicações hemorrágicas. Dentre as medidas de suporte destacam-se:

- transfusão de eritrócitos dependendo do estado geral do paciente;
- transfusão de plaquetas, para tratar sangramentos e equimoses espontâneas;
- antibióticos e antifúngicos, na presença de culturas positivas para infecção;
- ácido fólico;
- piridoxina ou vitamina B6;
- sulfato ferroso;

Nos casos de pacientes de risco intermediário ou alto (**Tabela 4**), o tratamento é baseado em abordagens terapêuticas de suporte e específicas, as quais destacamos:

- TCT
- quimioterapia,
- moduladores de respostas
- inibidores da angiogênese
- terapia imunossupressora

**Tabela 4. Classificação dos escores quanto aos grupos de risco de acordo com International Prognostic Scoring System (IPSS – 1997)**

International Prognostic Scoring System				
Grupo de Risco				
	Baixo	Intermediário 1	Intermediário 2	Alto
<b>Escores</b>	0	0,5 a 1,0	1,5 a 2,0	≥ 2,5
<b>Evolução/ELMA</b>	19%	30%	33%	45%
<b>Média (anos)</b>	9,4	3,3	1,1	0,2
<b>Sobrevida média (anos)</b>	5,7	3,5	1,2	0,4

**Fonte: Greenberg *et al*, 1997.**

O TCT em pacientes mais jovens (com menos de 50-55 anos de idade) com doador HLA compatível, relacionado ou não, oferece uma perspectiva de cura completa. A AR e ARSA são os subtipos que mais se beneficiam do TCT. A maioria dos pacientes com SMD tem idade avançada, portanto, o TCT somente é viável na minoria deles.

Várias medidas terapêuticas foram tentadas para melhorar o prognóstico e a sobrevida de pacientes com 5% ou mais de blastos na medula óssea. Essas medidas variam desde o suporte terapêutico (transfusão, antibiótico e antifúngico) até a quimioterapia intensiva. Hidroxiuréia, etoposide, mercaptopurina, azacitidina e Ara-C geralmente são administradas, geralmente, com alguns benefícios, principalmente em pacientes mais idosos. O tratamento similar ao realizado na LMA pode ser tentado em paciente com LMMC, AREB e AREB-t.

A quimioterapia mais intensa pode ser requerida em aproximadamente 50% dos pacientes mais jovens, na tentativa de obter uma remissão, ou em indivíduos jovens onde exista um potencial para realizar o TCT.

Imunossupressores como prednisona são administrados nos casos de pacientes com baixa contagem de plaquetas e apresentando episódios hemorrágicos espontâneos ou excessivos. Ciclosporina e globulina anti-linfocitária são usadas, principalmente, em pacientes com SMD hipocelular dependentes de transfusões sanguíneas (Molldrem et al., 1997, Jonásová et al., 1998).

O uso da eritropoetina recombinante humana (EPO) aumenta o hematócrito em 25 a 30%, dos pacientes tratados, diminuindo a necessidade de reposição transfusional. Pacientes que têm baixo nível de eritropoetina sérica respondem melhor a essa terapêutica (Stein et al., 1991; Rose et al., 1995; Hellstrom-Lindberg, E., 1995).

O uso combinado de EPO e fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF), estimula a eritropoese em 38-48% dos pacientes tratados, com um aumento de neutrófilos na circulação, na quase totalidade (Negrin et al., 1996; Hellstrom-Lindberg et al., 1997; Hellstrom-Lindberg et al., 1998).

Novas drogas têm sido usadas isoladamente ou em associações, como é o caso da aminofostina, um protetor medular, que leva à melhora do quadro de anemia, da leucopenia e da plaquetopenia (Galanopoulos et al., 1999; Hofmann, et al., 1999).

A talidomida tem sido empregada como droga anti-angiogênica (Singhal et al., 1999), devido ao aumento da neoangiogênese em todas as fases das SMD (Raza et al., 1999).

## **2. ANEMIA APLÁSTICA**

### **2.1. DEFINIÇÃO**

Anemia aplástica (AA) é um grupo de desordem de natureza adquirida ou hereditária, grave, caracterizada por deficiência da célula tronco hematopoética, com MO hipocelular em consequência a substituição destas células por tecido adiposo, apresentando pancitopenia periférica por falência medular, causando as síndromes: anêmica, infecciosa e hemorrágica (Young & Alter, 1994, Young & Maciejewski, 1997).

### **2.2. CLASSIFICAÇÃO**

Várias causas são descritas como prováveis fatores etiológicos da AA, podendo ser de origem hereditária ou adquirida. A AA adquirida é, usualmente, uma desordem crônica, cujo agente causal pode ser conhecido (secundária) ou não (primária ou idiopática).

Vários estudos têm mostrado que a maioria dos casos de AA adquirida é idiopática, mas supõe-se que seja decorrente de um processo auto-imune, embora o mecanismo ainda não esteja bem esclarecido (Young, N.S., 1999). Na AA secundária, fatores lesivos como radiações, drogas mielotóxicas ou exposição a agentes químicos agredem diretamente a MO. (Young, N.S., 2000).

A AA hereditária é representada pela anemia de Fanconi, tem herança autossômica recessiva e quase sempre associa-se com retardo de crescimento e defeitos do esqueleto, do trato urinário, da pele e retardo mental. A síndrome é geneticamente heterogênea com mutações em diferentes genes. Os genes expressam diferentes tipos de proteínas, que caracterizam os diferentes subtipos da anemia de Fanconi (Young & Alter, 1994).

### **2.3. INCIDÊNCIA**

A AA, embora possa surgir em qualquer idade, apresenta uma distribuição bimodal, com um pico em torno de 20 anos e outro em torno da quinta década de vida e uma leve predominância no gênero masculino (Najean, Y., 1992).

A incidência da AA é de aproximadamente 2 a 3 casos por 1.000.000 de pessoas por ano na Europa e nos Estados Unidos da América. Por razões ainda desconhecidas, esta doença é duas a três vezes mais freqüente em alguns países da Ásia. Na anemia de Fanconi, a idade usual de aparecimento dos sintomas é de 5 a 10 anos e cerca de 10% dos casos desenvolvem leucemia mielóide aguda (Camitta & Slye, 2004).

### **2.4. FISIOPATOLOGIA**

A AA adquirida não pode ser explicada somente através das causas individuais. Existem dois fatores que devem ser considerados para explicar a fisiopatologia desta doença. Primeiramente, um defeito básico que diminui substancialmente o número de células tronco hematopoéticas totipotentes. O outro fator envolvido, muito importante, é a destruição do tecido hematopoético mediado por reações imunológicas contra as células-troncos hematopoéticas. Esse fenômeno parece ocorrer como uma tentativa auto-reparadora do próprio tecido lesado. Por esta razão, a terapia imunossupressora aliviaria esta reação, mas, como consequência, poderá adquirir uma proliferação medular deficiente, tornando-o propenso a desenvolver complicações tardias.

A apresentação e o curso clínico dessa enfermidade depende do equilíbrio entre esses dois fatores. Se a reação imune for muito forte ocorre aplasia aguda severa; o contrário, se a reação for fraca, a doença se manifesta com pancitopenia crônica e um potencial para complicações mielodisplásticas (Nissen, C., 1986; Young & Maciejewski, 1997).



O envolvimento de células do microambiente medular no processo da doença é um fator adicional (Nissen, C., 1986). Portanto, o sucesso TCT mostra que essa pode ser uma causa rara. Células normais do doador, via de regra, são capazes de desenvolver-se na cavidade da medula do receptor (Passweg, J.R., 1997).

Algumas drogas podem estar associadas com o aparecimento de AA. As drogas antimetabólicas (metotrexate) e as inibidoras da mitose (daunorrubicina) causam apenas aplasia temporária.

No caso do agente alquilante bussulfan, pode ser responsável por uma importante aplasia medular crônica. Existem alguns indivíduos que desenvolvem AA como efeito colateral raro, idiossincrásico, por drogas, como cloranfenicol ou sais de ouro, que não são citotóxicas.

A AA também pode aparecer em pacientes com hepatite viral A ou não-A, não-B, não-C e não-G, CMV, EBV e dengue após alguns meses (Bottiger & Westerholm, 1972; Hagler et al., 1975).

## **2.5. DIAGNÓSTICO**

A grande maioria dos pacientes portadores de AA procura cuidados médicos em consequência dos sinais e sintomas decorrentes da pancitopenia: anemia (diminuição de eritrócitos), infecção (leucopenia com neutropenia) e hemorragia (plaquetopenia).

O exame do esfregaço sangüíneo de um paciente com AA mostra essas anormalidades quantitativas nas três linhagens celulares. De acordo com o International Aplastic Anemia Study Group (IAASG), define-se AAS, quando a contagem de neutrófilos é inferior  $500/\text{mm}^3$ , de plaquetas abaixo de  $20.000/\text{mm}^3$  e reticulócitos menor que  $20.000/\text{mm}^3$  ou 1% (reticulócitos corrigidos pelo hematócrito), associado com uma diminuição da celularidade da medula óssea em tomo de 30% (Kevin, et al., 1997).

Os achados do exame físico refletem essa pancitopenia; o paciente pode apresentar desde freqüentes variações do número de eritrócitos (anemia) até alterações mais graves, como infecções e hemorragias extensas. Em alguns pacientes, a granulopoese pode estar preservada. O grau de pancitopenia é mais evidente na AA muito severa, com neutrófilos abaixo de  $200/\text{mm}^3$ .

Um importante achado observado é a clara evidência de hipocelularidade com aumento de tecido adiposo (em torno de 30%) na biópsia de medula óssea. Por este motivo a biópsia óssea é importante no diagnóstico da AA (Barret et al., 2000). O diagnóstico diferencial deve ser feito com as anemias aplásticas hereditárias, principalmente a anemia de Fanconi, e outras doenças que cursam com pancitopenias periféricas, como as SMD hipocelulares.

## **2.6. TRATAMENTO**

As alterações da AA variam desde uma falha total da hematopoese até uma pancitopenia crônica. Por mais severa que seja a doença, a avaliação clínica inicial é de grande valia para a escolha do tipo de tratamento, o qual é baseado nas manifestações clínicas do paciente no ato do diagnóstico.

Pacientes portadores de AA não severa apresentam anemia, leucopenia e plaquetopenia discretas e não dependem de suporte hemoterápico de eritrócitos e/ou plaquetas, o TCT vai depender de um possível doador (de preferência, irmão) HLA compatível.

Pacientes com AA severa apresentam anemia importante, neutropenia abaixo de  $500/\text{mm}^3$  e plaquetopenia abaixo de  $20.000/\text{mm}^3$ , necessitam inicialmente de tratamento sintomático e específico. Posteriormente avalia-se a possibilidade de um TCT.

O tratamento inicial da AA leve geralmente é sintomático e baseia-se no uso de transfusões sangüíneas de eritrócitos e/ou plaquetas, quando os níveis de Hb for inferior a 9g/dl e plaquetas for abaixo de 20.000/mm<sup>3</sup>. Nos casos de neutropenia acentuada (<500/mm<sup>3</sup>) e risco de infecção, constatada por febre ou isolamento de germes através de culturas (sangue, escarro, fezes, urina, etc), deve ser realizada antibioticoterapia.

Uma política transfusional cuidadosa é crucial para evitar ou diminuir o risco de aloimunização; para isso, todos os hemocomponentes devem ser filtrados ou disleucotizados (Storb et al., 1980; Champlim et al., 1989). O tratamento específico se baseia em todas as medidas que culminem para reconstituição da função medular e um período remissão mais longo.

O prognóstico de pacientes portadores de AAS sem um doador HLA compatível foi bastante otimizado nos últimos anos, com a introdução das drogas imunossupressoras (Frickhofen & Rosenfeld, 2000; Marsh, J.C.W., 2000). O protocolo de imunossupressão mais apropriado é aquele, que combina menor toxicidade, mais alta taxa de resposta, baixo risco de recidiva com um menor desenvolvimento de complicações tardias (Tichelli et al., 1994; Socié & Gluckman, 2000).

O tratamento mais atualizado na AA usa a combinação de três drogas: Globulina anti-timócito (GAT) ou anti-linfócitos (GAL), corticóides e ciclosporina A (CsA) (Doney et al., 1981; Doney et al., 1984; Doney et al, 1987; Doney et al, 1992; Doney et al, 1993). A GAT ou GAL é usada como agente imunossupressor primário, atuando sobre a hematopoese na tentativa de resgatar a função medular.

Os corticosteróides são linfocitolíticos e não possuem efeito sobre a hematopoese. Eles são administrados para diminuir a fragilidade capilar, diminuindo os riscos de sangramento, principalmente na microcirculação, e também para reduzir os efeitos locais das globulinas (doença do soro) em pacientes em uso de globulinas antitimócitos e/ou linfocíticas. A CsA também pode

ser usada no tratamento de AA, com a finalidade de diminuir a ativação dos linfócitos Th1 sobre as células tronco da MO (Young & Maciejewski, 1997; Young, 2000).

Em geral, 70 a 80% dos pacientes respondem a esse tratamento combinado (Young et al., 1994; Rosenfeld et al., 1995). Nos casos de paciente impedido de usar globulina, deve-se realizar um protocolo alternativo com CsA e corticóides (Speck, 1991; Gluckman et al., 1992).

Em alguns estudos, a oximetalona foi usada no tratamento de AA, principalmente em mulheres com anemia de Fanconi. A oximetalona, uma potente droga anabolizante, que acentua a produção e excreção de eritropoetina em pacientes com anemia devido à deficiência da MO, muitas vezes estimulam a eritropoese. Essa terapia deve ser bastante cautelosa e os riscos e benefícios devem ser avaliados criteriosamente, uma vez que essa terapia pode causar toxicidade hepática grave, virilização e deficiência de ferro (Bacigalupo et al., 1993).

O uso de fatores de crescimento, como G-CSF, GM-CSF e IL-3, na tentativa de promover a granulopoese em paciente com neutropenia severa, só é possível se o mesmo apresentar algumas células precursoras comissionadas na MO. O uso de fatores de crescimento é mais apropriado em pacientes com infecção severa após terapia imunossupressora ou após TCT (Marsh et al., 1994; Bacigalupo et al., 1995).

O TCT é o tratamento de escolha para pacientes jovens, com idade até 40 anos, portadores de AAS ou AA leve, com doador HLA compatível. Esses pacientes, por apresentarem pancitopenia crônica, geralmente necessitam de um suporte transfusional cauteloso e adequado. Desse modo, pacientes com suspeita de AA deve ser diagnosticado no menor espaço de tempo, a fim de evitar aloimunização e transmissão de doenças infecciosas, que poderão gerar complicações, como o fenômeno da refratariedade, ou até mesmo, nos casos de

pacientes candidatos à transplantes, ter essa terapia adiada ou dificultada (Speck, et al., 1996).

Refratariedade às transfusões de plaquetas é definida como um incremento insatisfatório na contagem de plaquetas pós-transfusional, em amostras sanguíneas colhidas 1 hora após o término da transfusão, em duas ocasiões, num intervalo inferior a 72h e com concentrados

O transplante alogênico oferece uma probabilidade de cura em torno de 90% dos pacientes portadores de AA (Storb, et al., 1994; Bacigalupo et al., 1995). Em geral, o TCT pode beneficiar os pacientes, sem que haja necessidade de realizar regimes de condicionamento para destruição de sua MO por irradiação. Esse condicionamento fica por conta de altas doses de ciclofosfamida que, na maioria das vezes, é suficiente (Storb, et al., 1994), evitando, assim, as complicações tardias decorrentes da radiação induzida, como SMD e leucemias (Gluckman et al, 1991).

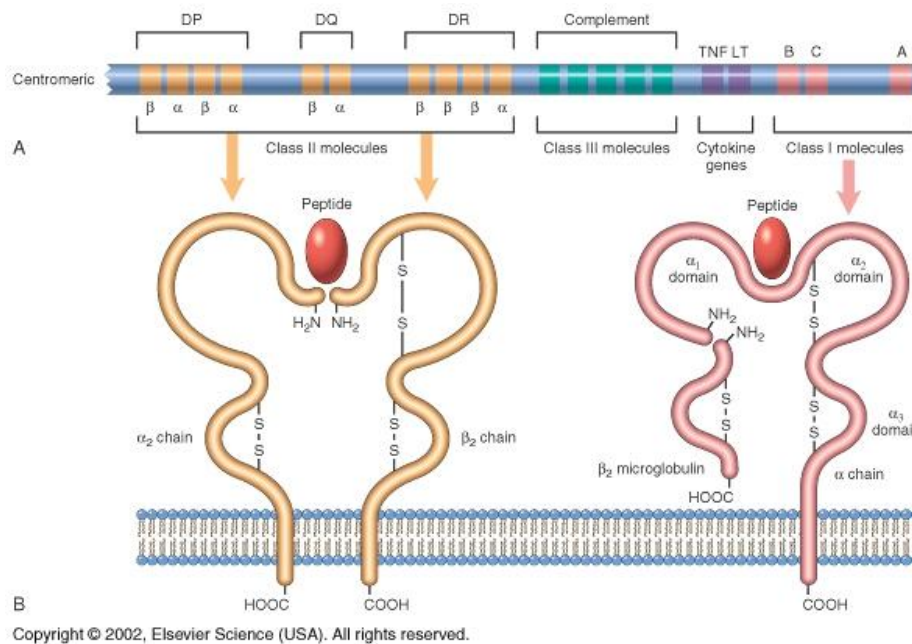
Diversos estudos têm reportado que o uso de CsA e metotrexate, um dia antes do transplante, tem prevenido o aparecimento de rejeição e de Doença do enxerto contra hospedeiro (DEVH) (Storb et al., 1994; Bacigalupo et al., 1995). Então, essa combinação de drogas é usada em pacientes acima de 40 anos, por apresentarem maior risco de desenvolver DEVH e maior risco de morbidade.

Pacientes que necessitam de reposição transfusional de hemácias e/ou plaquetas, com vários episódios de infecções e um intervalo prolongado entre o diagnóstico e o transplante são mais predispostos aos fatores de riscos para a falha do transplante (Speck et al., 1996).

A aloimunização é um desses riscos, que pode acarretar sérias complicações imunológicas antes e após o TCT. A aloimunização pré-transplante ocorre devido à produção de anticorpos contra o sistema HLA, acarretadas pelo suporte hemoterápico; a aloimunização pós-transplante é decorrente da exposição do receptor aos antígenos HLA do doador.

### 3. RECONHECIMENTO ANTIGÊNICO E O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

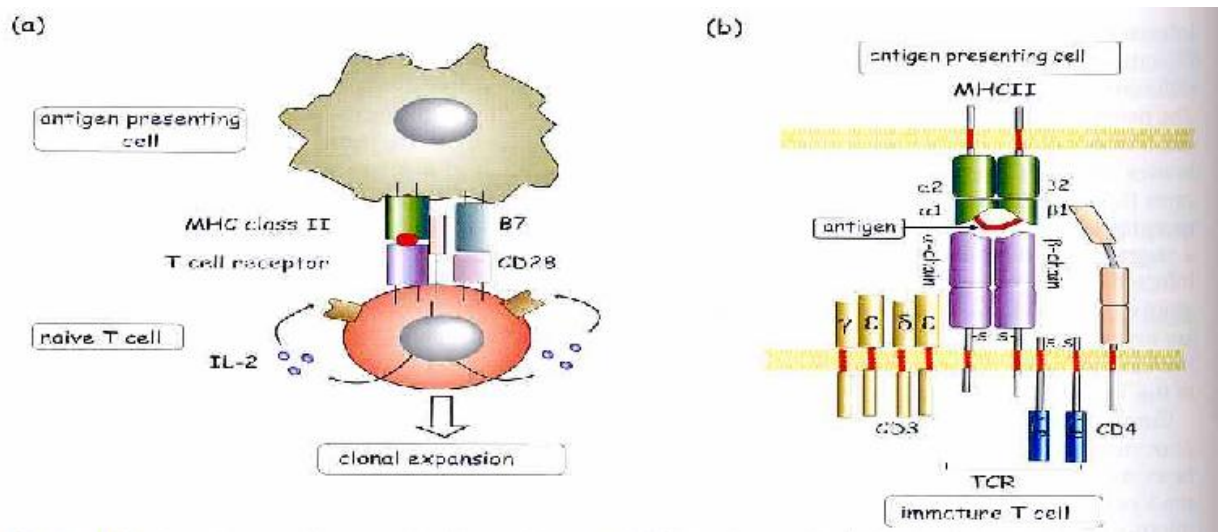
O Complexo principal de histocompatibilidade (CPH) ou sistema HLA, descoberto em 1958, como um amplo *locus* contendo genes altamente polimórficos localizados no braço curto do cromossomo 6, codificam as principais moléculas de histocompatibilidade no homem: moléculas HLA de classe I e de classe II (**figura 1**).



**Figura 1. Localização do complexo HLA no braço curto do cromossomo 6.**

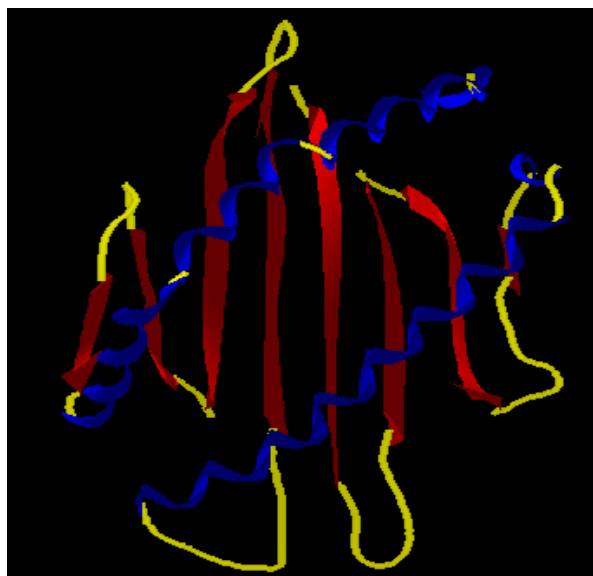
As moléculas HLA de classe I e II são glicoproteínas, altamente polimórficas que se expressam nas superfícies das células do nosso organismo, (**Figura 1**) que determinam a compatibilidade genética/molecular entre tecidos e estão envolvidas nos processos de rejeição de aloenxertos.

As moléculas de classe I (HLA A, B e C) estão presentes na superfície de todas as células nucleadas do organismo, enquanto, os antígenos de classe II (HLA DR, DQ e DP) estão presentes somente na superfície de células envolvidas diretamente com a resposta imune, como monócitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, linfócitos B e linfócitos T ativados (**Figura 2**). Os linfócitos T em repouso e as plaquetas só expressam moléculas HLA de classe I (**Figura 3**).



**Figura 2. Representação esquemática das moléculas HLA de Classe I e II, mostrando o local de ligação do peptídeo.**

Fonte: [bioweb.wku.edu/courses/bio1566/imagens/nrtk002.jpg](http://bioweb.wku.edu/courses/bio1566/imagens/nrtk002.jpg)



**Figura 3. Representação cristalográfica da molécula HLA de classe I.**

Fonte: [www.biology.arizona.edu](http://www.biology.arizona.edu)

Em todos os indivíduos, os linfócitos T só reconhecem os peptídeos estranhos processados pelas células processadoras de antígenos (CPA) (células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos e linfócitos B), quando esses peptídeos estão ligados e expostos pelas moléculas do CPH de classe I ou classe II daquele indivíduo. De certa forma, as moléculas de classe I apresentam peptídeos de origem endógena aos linfócitos CD8<sup>+</sup>, e as de classe II, apresentam peptídeos de origem exógena aos linfócitos CD4<sup>+</sup> (Colombani, J., 1991; Thorsby et al., 1994; Sayegh et al., 1994; Pamer & Cresswel, 1998)

O reconhecimento dos aloantígenos é realizado pelo receptor de células T (TCR), localizado na superfície de linfócitos T. Os aloantígenos são capturados e processados pelas CPAs profissionais, tais como, macrófagos, células dendríticas, e linfócitos B, para gerar peptídeos que são exibidos nas superfícies das CPAs complexadas com as moléculas de classe II.



Os linfócitos CD4<sup>+</sup> reconhecem os peptídeos derivados dos antígenos, que são internalizados do ambiente extracelular, processados nas vesículas endossômicas e lisossômicas e exibidos ligados às moléculas do CPH de classe II.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem os peptídeos que foram derivados de antígenos sintetizados endogenamente ou fagocitados, processados no citosol e exibidos ligados a moléculas do CPH de classe I.

Os antígenos protéicos também podem ser reconhecidos por linfócitos B nos folículos linfóides dos órgãos linfóides periféricos. Os polissacarídeos e outros antígenos não protéicos são capturados nos órgãos linfóides e reconhecidos pelos linfócitos B, porém não pelas células T (Delves & Roitt, 2000).

A ligação do complexo peptídeo-CPH de classe II na superfície das CPAs com o TCR dos linfócitos é o primeiro sinal de ativação (ligação fraca), sendo necessário um segundo sinal, derivado de interações entre moléculas acessórias co-estimuladoras, como CD28/B7 e outras para aumentar a força de adesão entre as células T e as CPAs, garantindo assim, o tempo necessário para que o TCR localize, reconheça e responda ao complexo peptídeo –CPH, exibido pelas CPAs (Lenschow et al., 1996).

A ativação dos linfócitos T, só é concretizada, com ajuda de citocinas inflamatórias, tais como interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2) interleucina 3 (IL-3), fator de necrose tumoral  $\beta$  (FNT- $\beta$ ) e interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (IFN) (Salomon, 1998). Os linfócitos T ativados produzem IL-2 que irão se ligar aos receptores de interleucina 2 (IL-2R) expressos em sua membrana (ativação autócrina), os quais sofrerão expansão clonal (Abbas et al., 2005).

Os linfócitos CD4<sup>+</sup> se diferenciam em duas subpopulações de linfócitos, de acordo com o perfil de interleucina produzida por eles: Th1 e Th2. Os linfócitos Th1 produzem IL-2, IL-3, FNT- $\beta$  e IFN  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e são responsáveis pela resposta imune mediada por células. Existem dois tipos de resposta imune mediadas por

células: no primeiro, as células T (CD4+ ou CD8+) reconhecem os peptídeos dos microrganismos fagocitados pelos macrófagos, tornando-se ativados e com capacidade de expressar o CD40L, o qual se liga ao CD40 dos macrófagos, como conseqüência, libera IFN -  $\gamma$  (ativando ainda mais os macrófagos) e TNF (reação inflamatória), daí, os macrófagos ativados aumentam a produção de substâncias microbicidas, favorecendo a morte dos microrganismos fagocitados; no segundo tipo, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem os antígenos peptídicos dos microrganismos (vírus), que infectam e sobrevivem e se replicam no citosol de qualquer célula nucleada, como resultado, secretam citotoxinas que matam as células infectadas, erradicando a infecção (Abbas et al., 2005).

A resposta imune adquirida, também desenvolve imunidade humoral, mediada por anticorpos, produzidos pelos linfócitos B. Os antígenos protéicos são endocitados pelas células B antígenos-específicos, as proteínas são processadas, e os peptídeos são exibidos às células T CD4+, tornando-se ativadas, conseqüentemente expressam o CD40L, que se liga ao CD40 das células B. Essas interações resultam na proliferação de células B e sua diferenciação em plasmócitos, células produtoras de anticorpos. Os anticorpos combatem as infecções através dos mecanismos de neutralização (ligação de anticorpos específicos aos microrganismos e às suas toxinas), de opsonização (através de anticorpos IgG ligados a superfície dos microrganismos), de fagocitose e destruição dos microrganismos (ligação de anticorpos IgM ou IgG aos microrganismos) ativando o sistema complemento, promovendo a lise dos microrganismos no lúmen dos órgãos mucosos (Abbas et al., 2005).

#### **4. ALOIMUNIZAÇÃO**

O sistema imune quando entra em contato com aloantígenos do sistema HLA, são produzidos anticorpos anti-HLA (aloanticorpos). Esta aloimunização pode ocorrer por vias de imunização natural e artificial. A aloimunização natural

decorre de gestações prévias (Payne & Rolfs, 1958; Van Rod et al, 1958), e a artificial, ocorre em consequência à múltiplas transfusões sangüíneas e transplantes prévios, sendo este último, a principal via de sensibilização (Dausset, J.,1958a; Dausset, J., 1958b; Colombani, J. 1991) acompanhada de gestações e transfusões. Portanto, os anticorpos anti-HLA podem ser isolados em mulheres grávidas, indivíduos politransfundidos e pacientes candidatos a um segundo transplante.

#### **4.1. ALOIMUNIZAÇÃO EM GESTANTES**

Na gestação ocorre aloimunização por conta da metade do genoma do feto de origem paterna, que é geneticamente diferente de sua mãe, então, a mãe produz aloanticorpos contra os aloantígenos do feto, distintos dos seus (Propper et al., 1991).

#### **4.2. ALOIMUNIZAÇÃO APÓS TRANSFUSÕES**

Terapia transfusional é a mais efetiva conduta usada para corrigir anemias com falha na produção de células hematopoéticas ou controle de hemorragias agudas em pacientes que desenvolveram trombocitopenia associada com aplasia de medula óssea ou diminuição da produção de plaquetas (Freireich, E.J., 1966; Grumet & Yankee, 1970). Essa terapia é realizada em caráter de incompatibilidade com os antígenos HLA entre doador e receptor. Então, a cada transfusão o paciente entra em contato com aloantígenos HLA distintos dos seus, podendo tornar-se aloimunizados. Aloimunização é uma consequência preocupante entre os pacientes politransfundidos, razão pela qual alguns candidatos a transplantes podem vir a ter seu transplante contra indicado, por apresentarem anticorpos contra os antígenos de seu doador (Scornik et al.,1984); ou desenvolverem refratariedade às transfusões de plaquetas, com aproveitamento inadequado das mesmas (Yankee et al., 1973).

### **4.3. ALOIMUNIZAÇÃO APÓS-TRANSPLANTES**

Outra causa de aloimunização, atualmente bastante comum, é a observada em pacientes candidatos a retransplantes, devido ao crescente aumento desta prática de tratamento. Esta forma de imunização se torna muito eficaz, devido à carga de antígenos apresentada e pelo tempo em que o receptor fica exposto aos antígenos estranhos do doador.

Através de observações clínicas, Neumann, J., (1997) revelou que pacientes mais sensibilizados são aqueles que foram submetidos a mais de um estímulo. Assim, pacientes pouco transfundidos só tornam-se hiperimunizados, se precedidos de uma ou mais gestações (Opelz et al., 1981) ou em consequência de um transplante perdido por rejeição (Neumann, J., 1997).

### **5. PAINEL DE REATIVIDADE CONTRA ANTIGENOS – PRA**

A aloimunização decorrente da presença de anticorpos anti-HLA no soro de gestantes, de pacientes politransfundidos e pacientes candidatos a retransplantes, podem ser detectados através do estudo da reatividade contra um painel de linfócitos (PRA). Este é um exame usual, pelo qual a sensibilização prévia contra antígenos HLA é observada. O PRA é uma técnica que utiliza antígenos HLA de classe I e II conhecidos, os quais detectam a presença de anticorpos anti-HLA. A monitorização desses anticorpos, permite observar o grau de aloimunização expressa em percentagem contra o PRA, evidenciar a especificidade e a classe dos anticorpos formados. Dessa maneira, a informação é bastante útil para prever compatibilidade ou incompatibilidade entre receptor e doador, prever a sobrevida do enxerto e prever também, o aparecimento de rejeição do enxerto, conseqüentemente, melhorando a terapia imunossupressora, quando se mostra inadequada (McKenna et al., 2000).

O PRA utiliza a metodologia de citotoxicidade dependente de complemento

(PRA-CDC), introduzida em 1971, que consiste na incubação do soro do receptor com linfócitos T do doador previamente fenotipados de um painel criteriosamente selecionados (Zmijewski, C., 1995; Zachary et al., 1995).

Os doadores do painel de linfócitos (potenciais doadores, pessoas do laboratório ou do serviço de transplante) são previamente fenotipados para os antígenos do sistema HLA e selecionados de acordo com a frequência genética da população. Esta seleção criteriosa tem a finalidade de evitar uma avaliação distorcida do real grau de sensibilização do receptor ou PRA falso-negativo. Além do cuidado da representatividade, o painel deve refletir, no mínimo, o mesmo grau de sensibilidade, exigido na prova cruzada no pré-transplante (Silva et al, 1998). A realização do PRA ocorre de acordo com os protocolos de cada serviço, dependendo da finalidade da pesquisa desses anticorpos.

A natureza do anticorpo (IgM ou IgG) poderá ser determinada se os soros do receptor forem tratados com dithiothreitol (DTT). Este procedimento consiste na desnaturação das IgM, tornando-as incapazes de ativar complemento, sem interferir na função das IgG, permitindo assim a distinção entre estas duas classes de imunoglobulinas. A importância dessa metodologia estar ligada ao fato de que os anticorpos anti-HLA são, na maioria das vezes, de natureza IgG, enquanto os anticorpos não-HLA e/ou auto anticorpos são de natureza IgM.

A pesquisa de anticorpos anti-HLA, também pode ser detectada pela metodologia do PRA por ELISA (PRA-ELISA) utilizando moléculas de HLA solúveis. Este teste foi introduzido em 1993, como um método alternativo para detecção de anticorpos anti-HLA de classe I de natureza IgG (Kerman et al., 1996). Buelow et. al., (1995), em um estudo multicêntrico, mostraram que o PRA-ELISA apresenta uma sensibilidade de 93% e especificidade de 94%, podendo ser mais sensível que o PRA por citotoxicidade dependente do complemento (CDC).

As transfusões, gestações e transplantes prévios são as maiores causas de aloimunização de pacientes, com conseqüente produção de aloanticorpos anti-HLA. A presença desses aloanticorpos pode estar relacionada com a magnitude

da expansão clonal, observada em um dado paciente, de acordo com sua própria capacidade de responder a um certo estímulo antigênico. Sabe-se que esta resposta varia de pessoa para pessoa. Anticorpos anti-HLA podem desenvolver-se em indivíduos com expansão clonal mínima e/ou significativa.

O impacto clínico da presença dos anticorpos anti-HLA em indivíduos com expansão clonal mínima, pode ser diferente daquele observado em indivíduos com expansão clonal significativa. Como a expansão clonal não é medida diretamente, a realização do PRA pode fornecer dados importantes sobre a produção de aloanticorpos após um determinado estímulo antigênico (Scornik et al., 1992).

Scornik et al., (1992) observaram após análises dos resultados do PRA, que a expansão clonal e a aloimunização possuem cinco diferentes fases: expansão clonal mínima, expansão clonal mínima com anticorpo, expansão clonal significativa, expansão clonal significativa com anticorpos e expansão clonal com anticorpos persistentes **(Tabela 5)**.

De acordo com essas fases, torna-se mais fácil interpretar o PRA e caracterizar os pacientes como sensibilizados ou não. Pacientes hipersensibilizados, ou seja, com PRA superior a 70% têm maior probabilidade de apresentar estado refratário ao tratamento transfusional, mediado por anticorpos, no qual, infusões adicionais de plaquetas de doadores aleatórios deixam de produzir qualquer acréscimo na contagem de plaquetas uma hora depois de ter sido transfundido. Dados da literatura mostram que 35 a 90% dos pacientes politransfundidos, com doenças hematológica ou com tumores sólidos, tornam-se aloimunizados e 40 a 70% deles, desenvolvem um estado de refratariedade imune-dependente (Murphy & Waters, 1985; Howard & Perkins, 1978, Schiffer et al., 1982a; Schiffer & Slichter, 1982b). Nos pacientes com AA, o estado refratário pode ocorrer em 75% dos pacientes devido a periodicidade das transfusões recebidas (Sivergleid, A.J.,1980).

**Tabela 5. Desenvolvimento da Expansão Clonal e Aloimunização.**

FASES	TRANSFUSÃO	ANTICORPOS
FASE I Expansão clonal mínima	O indivíduo recebeu de 1 A 10 transfusões.	Ausentes
FASE II Expansão clonal mínima com anticorpo	O indivíduo recebeu de 1 A 10 transfusões.	Presentes (IgM e/ou IgG) Ocorre em 10% dos pacientes
FASE III Expansão clonal significativa	Múltiplas transfusões, presença de gravidez e/ou transplantes anteriores	Presentes em baixos títulos de natureza IgG detectáveis por técnicas mais sensíveis
FASE IV Expansão clonal significativa com anticorpos	Múltiplas transfusões, presença de gravidez e/ou transplantes anteriores	Presentes em altos títulos de natureza IgG não persistentes podendo ser detectáveis por técnicas menos sensíveis.
FASE V Expansão clonal com anticorpos persistentes	Pacientes altamente sensibilizados	Presentes em altos títulos de natureza IgG persistentes, mesmo sem estímulos posteriores

**Fonte: Scornik et al., 1992**

Um paciente que se torna terapêuticamente refratário às plaquetas de doadores ao acaso, usualmente desenvolvem anticorpos anti-HLA que reagem diretamente com as plaquetas transfundidas. Isto ocorre devido ao fato das plaquetas expressarem quantidades variadas de antígenos de classe I do CPH e antígenos específicos plaquetários. Esses dois sistemas podem estar implicados com o desenvolvimento do estado de refratariedade às plaquetas, já que as transfusões sanguíneas são freqüentemente realizadas em caráter de incompatibilidade frente aos antígenos desses sistemas.

# Objetivos

---

## **OBJETIVO GERAL**

Propõe-se, neste estudo, verificar a ocorrência de anticorpos anti-HLA de classe I em pacientes portadores das SMD e de AA atendidos no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (UFC).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar as especificidades das moléculas HLA
- Determinar os isotipos das imunoglobulinas
- Identificar as especificidades dos aloanticorpos direcionados contra os antígenos HLA de classe I.



# Materiais e Métodos

---

## 1. Seleção de Pacientes

### A) Desenho do Estudo:

Neste estudo prospectivo não randomizado foram analisados 110 pacientes, provenientes do Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC/UFC), localizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

### B) Critérios de Inclusão:

Neste estudo foram incluídos pacientes:

- Portadores de Anemia Aplástica (AA) ou Síndromes Mielodisplásticas (SMD);
- Idade  $\geq$  18 anos;
- Ambos os sexos;
- Concordaram em participar do estudo através da assinatura do consentimento informado (**Anexo A**) e aceitaram ser submetidos à coleta de sangue para a pesquisa de anticorpos

### C) Critérios de Exclusão:

Foram excluídos do estudo:

- Pacientes que até a finalização do estudo não estavam com todos os dados necessários preenchidos.

### D) Parâmetros Avaliados:

Foi realizada uma pesquisa ativa no prontuário de cada paciente acompanhado no Serviço de Hematologia do HUWC, com a finalidade de reunir dados clínicos e laboratoriais pertinentes ao presente estudo.

Os pacientes foram avaliados através dos seguintes parâmetros:

- Formulário de identificação do paciente: nome completo, data de nascimento, gênero, grupo sanguíneo e número do prontuário (**Anexo B**);
- Dados da história clínica, direcionada para investigação de AA e SMD, pesquisados no prontuário de cada paciente: diagnóstico clínico, tempo de doença, medicação, transfusão, reação transfusional, tipos de transfusão e tipos de concentrados sanguíneos (**Anexo C e D**);
- Reatividade do soro do paciente contra painel de linfócitos (PRA): - PRA com soro puro; - PRA com soro tratado com Dithiothreitol (DTT), identificação do tipo de anticorpo e determinação da classe do anticorpo (**Anexo E**);

Todos os dados foram colocados em planilha de EXCEL, para posterior análise.

#### **E) Obtenção das amostras de soro dos pacientes**

Foram analisadas 214 amostras de soros, com uma média de 3 por paciente com SMD e 2 por paciente com AA, no período de 2002 a 2004, para pesquisa de anticorpos anti-HLA.

As amostras de sangue total foram colhidas no Laboratório de Hematologia do HEMOCE, utilizando sistema de coleta a vácuo sem anticoagulante e, em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Histocompatibilidade e Imunologia de Transplantes do Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais (CPDHR), onde o sangue total foi centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos. O soro, assim obtido, foi aliqotado em dois tubos de Fisher (**Figura 4**) e estocado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  (**Figura 5**) até o momento da montagem das placas de Terasaki, para realização do painel de linfócitos (PRA).



**Figura 4: Soros aliquotados em tubos de Fisher.**



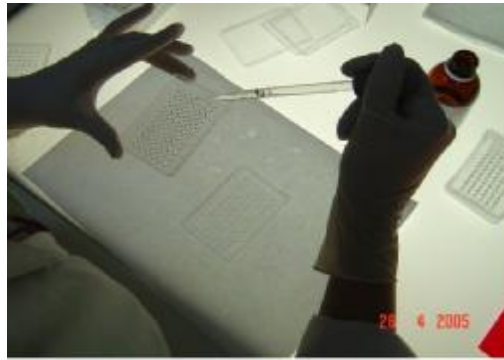
**Figura 5: Soros estocados em freezer a -20°C.**

## **2. Painel de Linfócitos**

O painel de reatividade de linfócitos foi realizado em duas etapas distintas: na primeira ocorreu à distribuição dos soros dos pacientes nas placas de Terasaki, e na segunda, ocorreu à adição dos linfócitos T dos doadores de linfócitos do painel.

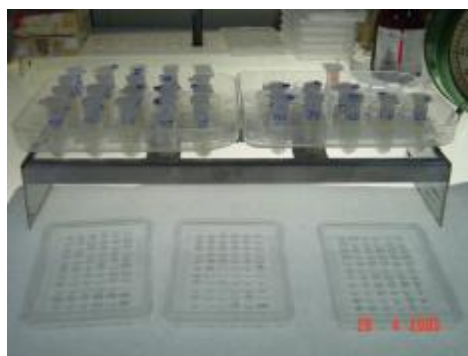
### **2.1. Preparo das Placas de Terasaki**

Para realização do PRA são utilizadas cerca de 40 microplacas de Terasaki, cada uma composta de 72 escavações. Essas placas recebem óleo mineral antes da distribuição dos soros, com a finalidade de evitar a evaporação do mesmo (**Figura 6**).



**Figura 6: Preparação das placas de Terasaki para distribuição dos soros.**

Os soros, anteriormente estocados, foram descongelados em baterias de 36 pacientes por vez, sendo que uma das alíquotas do soro foi previamente tratada com Dithiothreitol (DTT). Esse tratamento, consiste em incubar 10  $\mu$ l de soro do paciente com 90  $\mu$ l de DTT na estufa ou em BM a 37°C por 30 minutos; Em seguida, 1  $\mu$ l do soro de cada paciente a ser analisado (puro e tratado com DTT) foi dispensado com auxílio de uma micropipeta de Hamilton de 50 $\mu$ l, em uma escavação de cada uma das 40 microplacas de Terasaki, de modo que, cada soro de um paciente, ocupou a mesma posição em cada uma das 40 microplacas. Após a distribuição dos soros dos pacientes, as microplacas foram estocadas em freezer a – 20°C até o momento de seu uso (**Figura 7**).



**Figura 7: Soros distribuídos em placas de Terasaki com óleo mineral.**

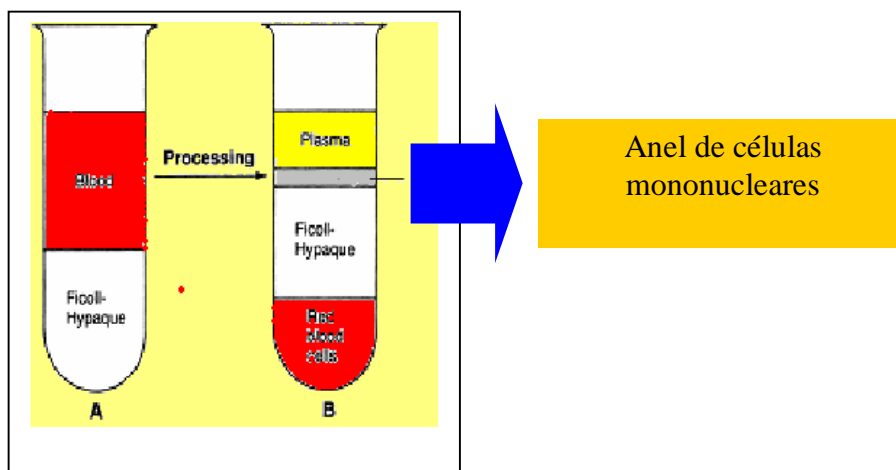
## **2.2. Obtenção de Linfócitos dos doadores do painel para realização do PRA**

Os doadores de linfócitos foram selecionados de acordo com a presença de

antígenos HLA de classe I, de modo que o PRA representasse a freqüência genética da nossa população. Para isso foram utilizadas no mínimo 30 a 40 células de indivíduos distintos. Dentre esses indivíduos estavam os potenciais doadores de pacientes candidatos a transplante renal. Todos foram previamente fenotipados para os antígenos do sistema HLA, a partir de sangue total de acordo com o American Society for histocompatibility and immunogenetics (ASHI) Laboratory Manual (2000).

### 2.2.1. Obtenção dos linfócitos totais dos doadores do painel

- Colher 20 ml de sangue total (ST) com heparina de acordo com técnicas padronizadas de coleta a vácuo;
- Diluir o ST na proporção 1/2 com soro fisiológico em um *becker*;
- Colocar 3ml de ficoll-hypaque com densidade 1.077 (temperatura ambiente) em tubos de ensaio de 10 ml com fundo cônico;
- Acrescentar o ST diluído, lentamente, pelas paredes do tubo sobre o ficoll-hypaque, com cuidado para não misturar as duas fases;
- Centrifugar imediatamente os dois tubos em 1800 a 2000 rpm por 20 minutos na temperatura de 18°C (**Figura 8**);

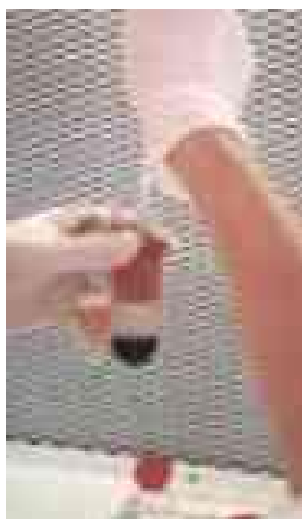


**Figura 8. Esquema mostrando o processamento da amostra de sangue total para obtenção do anel de células mononucleares.**

- Observar uma nuvem branca de células (linfócitos totais) entre a camada de ficoll-hypaque e o plasma (**figura 9**), retirá-la com ajuda de uma pipeta Pasteur, sem que atinja o ficoll-hypaque e transferir para dois tubos de ensaio de fundo cônico com capacidade para 10 ml (**Figura 10**);



**Figura 9. Separação do anel de células mononucleares.**



**Figura 10. Retirada do anel de células mononucleares.**

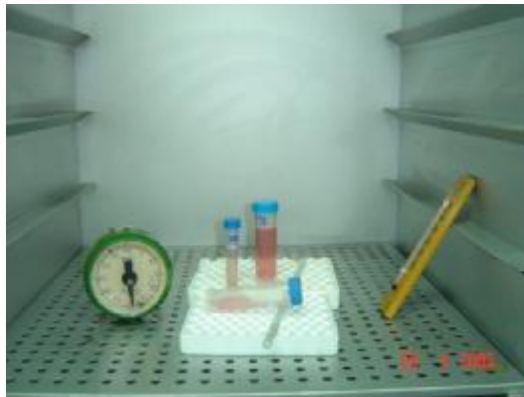
- Acrescentar 5 ml de meio RPMI 1640 e centrifugar a 1800 rpm por 10 minutos na temperatura de 18 °C;
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender o botão de células com 5 ml de RPMI e centrifugar a 1800 rpm por 10 minutos na temperatura de 18 °C;
- Ressuspender o sedimento com 1 a 2 ml de RPMI de acordo com o botão de células formado no fundo do tubo e transferir para dois tubos de Fisher para proceder a retirada das plaquetas, da seguinte maneira:
  - Acrescentar 50 µl de trombina (50 U/ml - Dade Berhing) em cada tubo de Fisher contendo a suspensão;
  - Vedar os tubos e homogeneizá-los por inversão até a formação de grumos plaquetários ( $\pm$  20 seg);
  - Centrifugar em centrífuga de Fisher a 1000 g por 3 segundos;
  - Transferir o sobrenadante para outro tubo de Fisher e centrifugá-lo a 1000 g por 1 minuto;
- Ressuspender o sobrenadante em 1 ml de RPMI e centrifugá-lo a 1000 g por 1 minuto;
- Ajustar a concentração para 15 a 17 x10<sup>6</sup> de linfócitos totais por ml, com ajuda de uma câmara de Neubauer;

### **2.2.2. Obtenção dos linfócitos T dos doadores do painel**

Na realização do PRA foram utilizados linfócitos T. A obtenção destes linfócitos, ocorre a partir de uma suspensão de linfócitos totais, utilizando a técnica do “cotonete” de lã de nylon, que consiste na separação dos linfócitos T dos B, portanto foram necessárias as seguintes etapas:

### 2.2.2.1. Preparação da Lã de Nylon

- Pesar 0,15g de lã de nylon, penteá-la até que todas as fibras estejam alinhadas (todas no sentido paralelo);
- Incubá-la de maneira esticada num tubo de ensaio poliestireno de 50ml e de fundo cônico com 10ml de RPMI à 5% em soro fetal bovino (SFB), de forma que, as fibras da lã fiquem na posição vertical em relação ao tubo e totalmente submersa no RPMI, durante 30 minutos a 37°C (**Figura 11**).
- Preparar um “cotonete” introduzindo um palito de madeira ( $\pm 25$  cm) com uma das pontas fina em contato com um dos lados da lã (o palito deve ficar paralelo as fibras da lã) em seguida, girar o palito sobre a lã, até que a mesma fique totalmente enrolada no palito;



**Figura 11:** Incubação da lã de nylon com RPMI em estufa a 37°C

- Depois do “cotonete” formado (**Figura 12**), desprezar o restante do RPMI do tubo;





**Figura 12: Confeção do “cotonete” de lã de nylon após incubação em RPMI.**

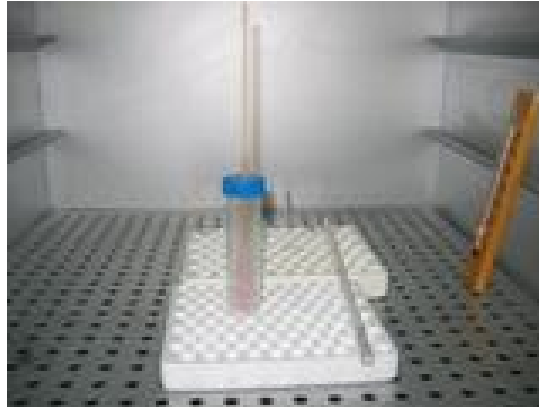
#### 2.2.2.2. Obtenção dos linfócitos T

- A partir da suspensão de linfócitos totais com concentração 15 a 17  $\times 10^6$ , já obtida, despejar gota a gota, sobre a lã em forma de cotonete e incubá-la em um tubo de ensaio de poliestireno de 50ml, de fundo cônico (**Figura 13**).



**Figura 13: Gotejamento da suspensão de linfócitos sobre o cotonete de lã de nylon.**

- Em seguida adaptar uma tampa furada no centro, permitindo que uma parte do “cotonete” fique para fora do tubo e incubar a lâ em estufa por 30 minutos a 37°C (**Figura 14**);



**Figura 14. Lã de nylon incubada com suspensão de linfócitos.**

- Após a incubação, gotejar 40 ml de RPMI à 5% em SFB pré-aquecido com ajuda de uma pipeta Pasteur, e em um tubo de ensaio de 15 ml de fundo cônico limpo; recolher essa suspensão rica em linfócitos T. Os linfócitos B ficaram presos nas fibras da lâ.



**Figura 15. Lavagem da lâ de nylon com RPMI a 5% em SFB para obtenção dos linfócitos T.**

- Centrifugar os tubos contendo os linfócitos T em 1800 a 2000 rpm por 10 minutos na temperatura de 18 °C;
- Ajustar a concentração para 2 a 3 x10<sup>6</sup> células (linfócitos T) por ml com auxílio de uma câmara de Neubauer;

### **3. Realização do PRA**

O PRA é realizado para investigar e monitorar a presença de anticorpos anti HLA (isotipo IgM ou IgG) no soro de pacientes, previamente distribuídos nas placas de Terasaki, contra os antígenos HLA de classe I presentes nos linfócitos T dos doadores do painel (PRA), avaliando desta forma, seu grau de sensibilização decorrente de transfusões anteriores.

#### **3.1. Distribuição dos linfócitos T dos doadores no PRA**

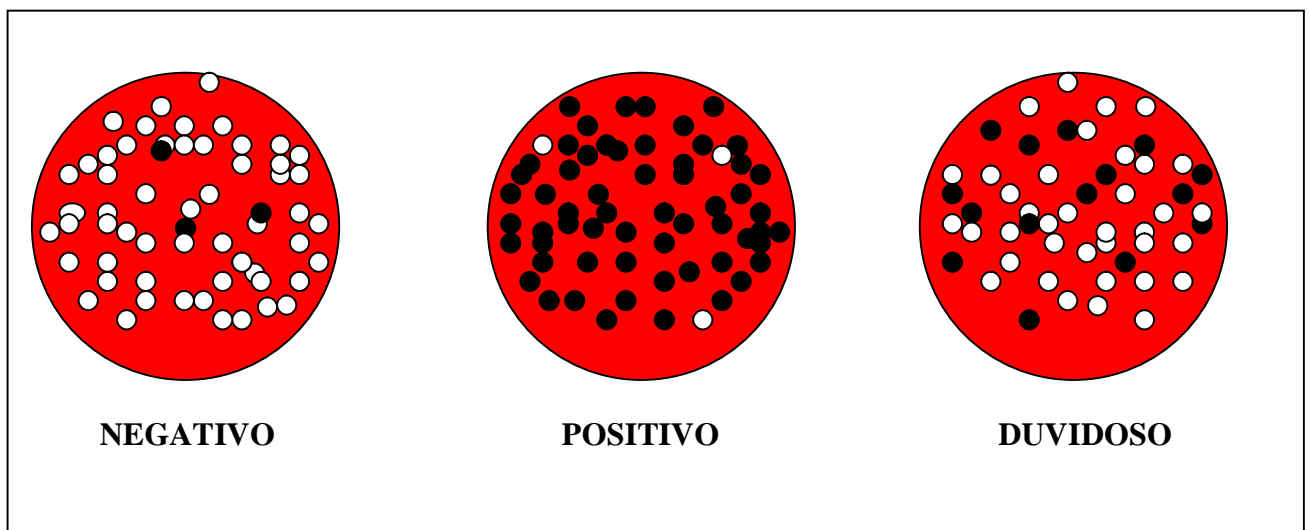
- Descongelar a microplaca de Terasaki estocada, contendo os soros dos pacientes previamente distribuídos (item 2.1);
- Colocar 1 µl de suspensão de linfócitos T do doador do painel, em cada escavação da microplaca, contendo os soros dos pacientes a serem analisados;
- Incubar a microplaca a TA por 45 minutos;
- Acrescentar 3 µl de complemento de coelho em cada escavação e incubar novamente por 90 minutos a TA;
- Adicionar 3 µl de eosina em cada escavação e esperar 5 minutos;
- Em seguida acrescentar formol a 36-38% com pH 7.2 em cada escavação;
- Colocar uma lamínula sobre a microplaca e aguardar cerca de 1 hora para proceder a leitura em microscópio com contraste de fases (**Figura 16**).



**Figura 16: Placas de Terasaki prontas para leitura.**

### 3.2. Leitura da Placas de Terasaki

A avaliação da reação de citotoxicidade, observada em cada escavação, foi baseada no percentual de células lisadas (**Figura 17**).



**Figura 17. Esquema de diferentes graus de lise celular na técnica de MLCT/DC.**

### 3.3. Análise dos Resultados

A quantidade de células lisadas em cada escavação é interpretada de acordo com os escores descritos na **Tabela 6**.

Os escores atribuídos às reações foram anotados em formulário apropriado e quando foram adicionadas as células do último doador do PRA, os resultados foram analisados, quanto à presença ou não de reatividade (presença de alo-anticorpos de classe I), especificidade do anticorpo e classe desse anticorpo, se IgG ou IgM **(Anexo E)**.

Pacientes negativos, foram aqueles que não apresentaram alo-anticorpos em seus soros, portanto, foram chamados de não sensibilizados contra os antígenos do sistema HLA de classe I, portanto não reativos.

Pacientes positivos, aqueles que apresentaram aloanticorpos em seus soros, foram chamados de sensibilizados contra os antígenos do sistema HLA de classe I, portanto reativos. Pacientes alorreativos foram também testados através do Kit LAT<sup>M</sup>, que usa a metodologia ELISA, para confirmação da classe dos anticorpos: classe I e/ou classe II.

**Tabela 6- Escores para interpretação das reações no PRA**

ESCORES	INTERPRETAÇÃO
Æ Indeterminado	Presença de bolhas ou ausência de células
Escore 1	Até 10% de células lisadas - Negativo
Escore 2	De 10 a 30% de células lisadas – Negativo duvidoso
Escore 4	30 a 50 % de células lisadas – Positivo duvidoso
Escore 6	50 a 80 % de células lisadas – Positivo
Escore 8	80 a 100 % de células lisadas – Positivo

#### **4. Análises Estatísticas**

As variáveis quantitativas do estudo foram expressas como média, desvio padrão, valores mínimos e valores máximos. As variáveis qualitativas foram expressas como porcentagem em relação a população do estudo.

#### **5. Preceitos Éticos**

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal do Ceará e foram obedecidas todas as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos estabelecidas na resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde **(Anexo F)**.

# Resultados

---

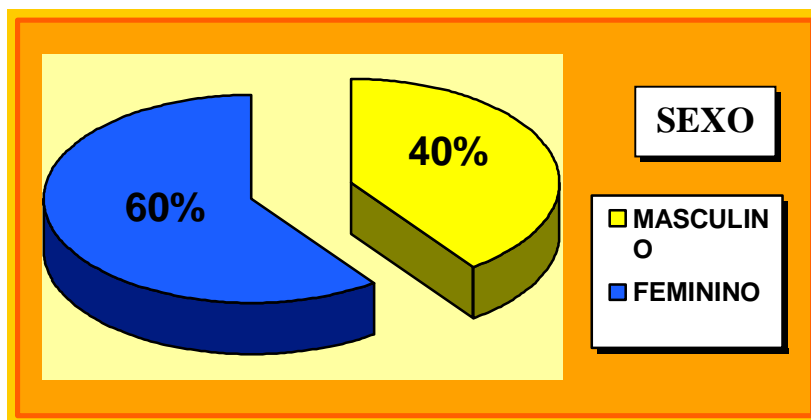
## 1. Síndromes Mielodisplásticas

A classificação dos 70 pacientes portadores das SMD foi baseada nos critérios do grupo FAB e está demonstrado na **Tabela 7**.

**Tabela 7. Diagnóstico clínico dos pacientes portadores de Síndromes Mielodisplásticas de acordo com a classificação FAB.**

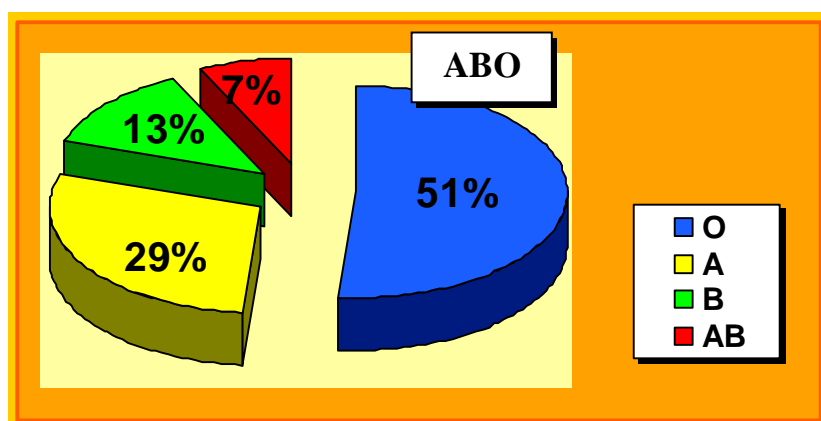
SUB-GRUPOS	Nº DE PACIENTES (Nº e %)
AR	29 (41,4%)
ARSA	30 (42,9%)
AREB	06 (8,6%)
AREB-t	05 (7,1%)
<b>Total</b>	<b>70</b>

A distribuição dos pacientes pelo gênero revelou uma relativa preponderância nas mulheres [42(60%) contra 28(40%) dos homens] (**Figura 18**).



**Figura 18. Distribuição dos 70 pacientes portadores das Síndromes Mielodisplásticas quanto ao gênero.**

A distribuição dos grupos sanguíneos ABO nos pacientes com SMD mostrou-se da seguinte maneira: 51% no grupo O, 29% no grupo A, 13% no grupo B e 7% AB como mostra a **Figura 19**.



**Figura 19. Frequências dos antígenos ABO em 70 pacientes portadores das Síndromes Mielodisplásticas.**



A idade dos 70 pacientes com SMD variou de 20 a 94 anos ( $64,4 \pm 17$ ), sendo 28 (40%) pertencentes ao gênero masculino e 42 (60%) ao gênero feminino.

As características clínicas dos 70 pacientes portadores das SMD resumidas na Tabela 8 revelam que a idade média dos portadores masculinos das SMD foi superior à idade das pacientes femininas ( $71,10 \pm 13,27$  e  $59,90 \pm 17,68$ , respectivamente). Adicionalmente, o sexo feminino das SMD apresentou-se mais precocemente (20a) do que no masculino (40a), porém as idades máximas dos pacientes nas quatro formas clínicas tinham se mostrado praticamente iguais para ambos os sexos. Dentre essas formas clínicas das SMD, a AR foi diagnosticada numa frequência relativamente maior no gênero feminino (47,62%, contra 32,14% dos homens), ao passo que a ARSA incidiu em maior número nos homens do que nas mulheres (57,14% contra 38,10%).

As formas clínicas AR e ARSA responderam por aproximadamente 90% dos casos das SMD no sexo masculino e 86% no sexo feminino. Raros casos de AREB e AREB-t foram diagnosticados em ambos os sexos, numa faixa marginalmente maior em mulheres.

Os resultados da análise do painel de linfócitos mostraram que 50 pacientes (71,4%) não desenvolveram anticorpos anti-HLA (PRA=0%) e 20 pacientes (28,6%) apresentaram anticorpos anti-HLA, sugestivo de aloimunização (valores de PRA>1 foram considerados positivos) (**Figura 20**).

**Tabela 8. Caracterização dos pacientes portadores das Síndromes**

**Mielodisplásticas, (n=70) quanto ao gênero.**

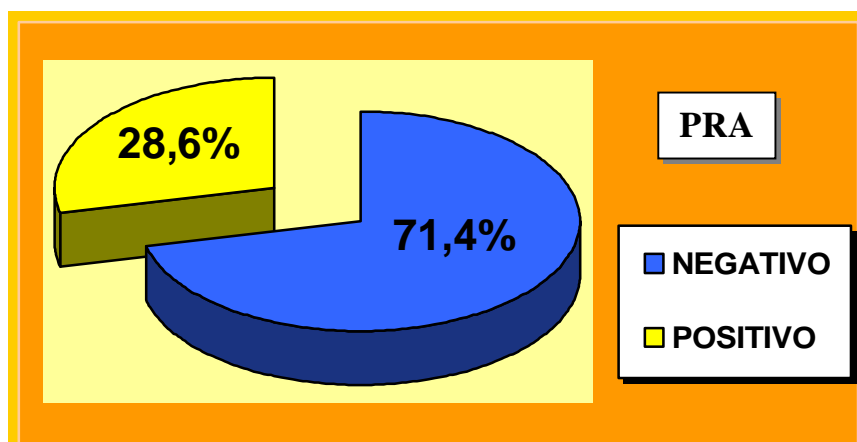
SEXO	MASCULINO	FEMININO
PARÂMETROS	n=28 (40% da amostra)	n=42 (60% da amostra)
FAIXA ETÁRIA (Média ± DP)	40 a 94 anos (71,10±13,27)	20 a 86 anos (59,90±17,68)
DIAGNÓSTICO	(nº e % de casos)	(nº e % de casos)
AR	9 (32,14%)	20 (47,62%)
ARSA	16 (57,14%)	16 (38,10%)
AREB	2	3
AREB-t	1	3
GRUPO SANGUÍNEO		
O	14 (50%)	22 (52,38%)
A	06 (21,43%)	14 (33,33%)
B	06 (21,43%)	03 (7,14%)
AB	02 (7,12%)	03 (7,14%)

**AR ..... anemia refratária**

**ARSA ..... anemia refratária com sideroblasto em anel**

**AREB ..... anemia refratária com excesso de blastos**

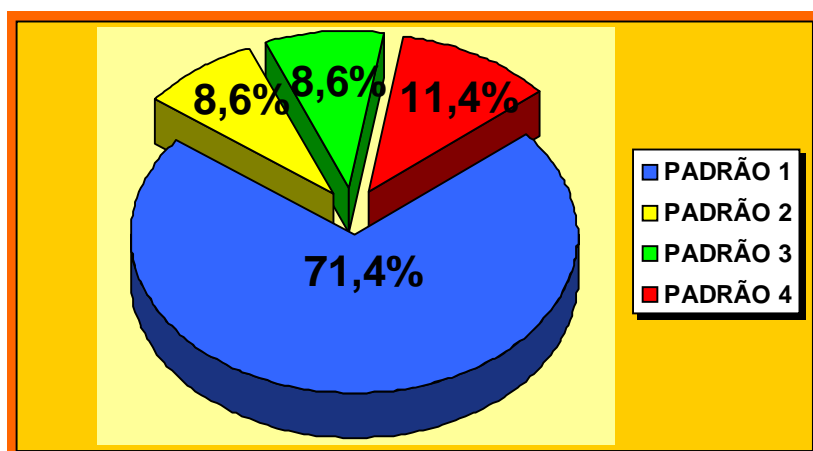
**AREB-t ..... anemia refratária com excesso de blastos em transformação.**



**Figura 20. Ocorrência dos anticorpos anti-HLA nos 70 pacientes portadores das Síndromes Mielodisplásticas no PRA.**

Após a análise geral da porcentagem da reatividade de cada um dos 70 pacientes portadores das SMD, os resultados foram agrupados em 4 padrões: **Padrão 1:** PRA= 0% (não reativo), **Padrão 2:** PRA= 1 a 19%, **Padrão 3:** PRA= 20 a 49% e **Padrão 4:** PRA $\geq$  50% (**Figura 21**).

Dos 20 pacientes aloimunizados distribuídos entres os padrões 2, 3 e 4, oito situaram-se na mais alta faixa de reatividade PRA  $\geq$  50% (padrão 4) e o restante se distribuíram equitativamente nos padrões 2 e 3, com seis pacientes em cada grupo. Ao todo, o expressivo número de 14 dos 20 pacientes revelou a presença de aloanticorpos anti-HLA, com reatividade  $\geq$  20%.



**Figura 21. Distribuição dos padrões de reatividade nos 70 pacientes portadores das Síndromes Mielodisplásticas de acordo com a positividade de PRA.**

Dados sobre a incidência de aloimunização relacionada à idade, sexo, tempo de doença, número de transfusão, tipo de transfusão e tratamento com imunossupressores estão demonstrados na **Tabela 9**.

**Tabela 9. Características clínicas dos pacientes portadores das Síndromes Mielodisplásticas relacionadas à incidência de aloimunização**

Parâmetros (n=70)	PADRÃO 1 (PRA = 0%) n=50 (71,4%)	PADRÃO 2 (PRA = 1 a 19%) n=6 (8,6%)	PADRÃO 3 (PRA = 20 a 49%) n=6 (8,6%)	PADRÃO 4 (PRA ≥50%) n=8 (11,4%)
Idade (média ± DP)	63,3±17,0	57,3±23,0	71,7±12,7	67,3±16,7
Varição (em anos)	20 a 94	22 a 86	47 a 87	36 a 82
Masculino	24	3	3	0
Feminino	26	3	3	8
Tempo de Doença (em meses)	52,1±57,3 (6 a 276)	80,0±97,0 (24 a 276)	29,0±13,3 (6 a 48)	73,3±65,0 (12 a 216)
Nº de Transfusões (média e variação)	4,66±8,0 0 a 38	9,7±7,0 2 a 18	9,3±5,8 2 a 17	62,4±76,3 15 a 218
Tipo de Transusão:				
CH	22 pcts	05 pcts	06 pcts	06 pcts
CH+CP	03	01	00	02
CP	01	00	00	00
Transusão não disleucotizada.	14 pcts (CH) 02 (CP)	03 pcts (CH)	03 pcts (CH)	06 pcts (CH) 02 (CP)

**CH: concentrados de hemácias; CP: concentrados de plaquetas;  
EPO:eritropoetina.**

Vinte dos 70 pacientes de SMD (28,6%) desenvolveram aloanticorpos anti-HLA: oito pacientes (40%) no padrão 4 de reatividade, com o restante distribuindo-se igualmente entre os padrões 2 e 3.

A alorreatividade evidenciou-se mais precocemente no padrão 2, com início aos 22 anos e a uma média de idade de 57,3 anos. Em comparação, os pacientes com os padrões de reatividades 3 e 4 tinham médias de idade maiores (71,7 variação 47 a 87 anos e 67,3 variação 36 a 82 anos, respectivamente).

Os pacientes não alorreativos também revelaram uma média e variação de idades bastante similares às dos alorreativos. Com exceção do grupo do padrão 4, a reatividade se manifestou equitativamente nos dois sexos. Os pacientes do padrão 3 de reatividade tiveram o menor tempo médio de doença, com uma média (29 meses) e uma variação (6 a 48 meses) situando-se, marcadamente, abaixo da metade dos valores observados nos padrões 2 e 4 de alorreatividade.

De especial interesse é a constatação de que todos os casos de aloimunização de padrão 4 incidiram no sexo feminino com história de gestações prévias, em indivíduos com um maior número médio de transfusões de concentrados de hemácias, isoladamente ou em combinação com os concentrados de plaquetas. Salientamos que todos esses pacientes receberam transfusões de CH ou CP não disleucotizados. Em comparação, apenas a metade dos pacientes de cada uma dos padrões 2 e 3 de reatividade tinham recebido transfusões de concentrados não disleucotizados (**Tabela 9**).

A aloimunização manifestou-se também entre os pacientes tratados com drogas antiinflamatórias/imunossupressoras, sendo detectado anticorpos anti-HLA em nove (45%) dos 20 pacientes alorreativos tratados com corticóides, e em seis (30%) tratados com talidomida.

A terapia com corticóide se relacionou com a manifestação do padrão 4 (5 dos 8 aloimunizados foram tratados com corticóides, em comparação, apenas 2 dos 6, de cada um dos padrões 2 e 3 tinham recebido corticóides). Aloanticorpos estavam presentes nos padrões 3 e 4, em números iguais de pacientes tratados com talidomida. Anticorpos anti-HLA, também estavam presentes nos três padrões de positividade nos pacientes que receberam eritropoetina, com uma maior frequência relativa do menor para o maior padrão de positividade (**Tabela 9**).

O perfil dos pacientes masculinos e femininos portadores das SMD não alorreativos (Padrão 1, PRA=0%), está demonstrado na **Tabela 10**. Este grupo de 50 pacientes se distribuiu igualmente entre os dois gêneros; porém, os pacientes femininos revelaram uma média de idade bem menor (57,3, variação 20 a 86 anos) que a dos homens (72,4, variação 50 a 94 anos).

**Tabela 10. Caracterização dos 50 pacientes portadores das Síndromes Mielodisplásticas com Padrão 1 (PRA=0%) de reatividade.**

	<b>MASCULINO</b>	<b>FEMININO</b>
<b>Sexo</b>	n=22 (44%)	n=28 (56%)
<b>Faixa Etária</b>	50 a 94 anos	20 a 86 anos
<b>(Média + DP)</b>	(72,3±12,6)	(57,3±16,3)
<b>Tempo de Doença</b>	34,9 ± 26,3	65,7 ± 70,0
<b>(média +DP e variações)</b>	(06 a 96m)	(06 a 276m)
<b>(meses)</b>		
<b>Nº de transfusão:</b>	0 a 38 (6,9±8,7)	0 a 32 (2,9±6,7)
<b>CH</b>	15 pcts	07 pcts
<b>CH e CP</b>	01	02
<b>CP</b>	0	01
<b>Transfusão não disleucotizada</b>	08 pcts	07 pcts
<b>Tratamento:</b>		
<b>Corticóide</b>	05 pcts	09 pcts
<b>Talidomida</b>	04	03
<b>Eritropoetina</b>	08	03
<b>Diagnóstico:</b>		
<b>AR</b>	9 pcts (40,9%)	17 pcts (60,7%)
<b>ARSA</b>	10 (45,4%)	09 (32,1%)
<b>AREB</b>	02	01
<b>AREB-t</b>	01	01

**CH: concentrados de hemácias; CP: concentrados de plaquetas.**



Vinte e quatro dos pacientes não reativos (48%) não receberam transfusões. Dos 26 pacientes (52%) transfundidos, 22 (84,6%) receberam somente concentrados de hemácias (CH), três concentrados de hemácias e plaquetas (CH + CP), e um apenas recebeu concentrado de plaquetas (CP). Onze das 26 preparações de CH e/ou CP eram disleucotizadas e o restante tinha contaminação leucocitária. Quinze dos 50 pacientes (30%) faziam uso de corticóides, 6 (12%) de talidomida e 11 (22%) de EPO (**Tabela 10**).

Dados clínicos dos 20 pacientes alorreativos, distribuídos entre os padrões 2, 3 e 4 de reatividade, foram analisados em função do diagnóstico das SMD, e o quadro comparativo apresentado na **Tabela 11**.

A aloimunização no Padrão 4 (PRA  $\geq 50\%$ ) apresentou-se mais evidente em pacientes com alta média no tempo de doença e com um maior número de transfusões. Significativamente, este grau de alorreatividade foi evidenciado somente no sexo feminino. Sete destes oito casos apresentavam o diagnóstico clínico de ARSA (4 pacientes) e AREB (3 pacientes), e todos fizeram terapia com corticóides (5 pacientes) ou com talidomida (3 pacientes). Seis dos oito pacientes deste grupo tinham recebido transfusão de CH (média de  $46,7 \pm 55,8$  unidades transfusionais), e os outros dois receberam CH+CP ( $131,5 \pm 86,5$ ).



A aloimunização no Padrão 3 se manifestou igualmente em ambos os gêneros, com distribuição de dois casos de ARSA e um de AR em cada subgrupo. Pacientes pertencentes a esse padrão de reatividade apresentaram uma média de transfusão nos homens de  $16,0 \pm 1,0$ , enquanto nas mulheres foi de  $7,0 \pm 4,0$  unidades transfusionais.

O Padrão 2 de alorreatividade também se evidenciou em seis pacientes, divididos igualmente nos dois gêneros. A forma clínica ARSA foi diagnosticada em três homens, enquanto a AR foi diagnosticada em duas das três mulheres, sendo uma delas diagnosticada com ARSA. Todos os pacientes deste padrão de reatividade tinham recebidos CH, com exceção de um que recebeu CP. Para o Padrão 2, a média de transfusões entre os homens foi de  $12,5 \pm 6,5$ , e nas mulheres ficou em  $11,0 \pm 7,0$ . Os corticóides foram aplicados no tratamento de apenas um paciente de cada sexo deste grupo e a talidomida não foi aplicada em nenhum deles.

A avaliação dos isótipos das imunoglobulinas anti-HLA revelou que a IgM estava presente em sete dos 20 pacientes alorreativos, ao passo que a IgG se apresentou em oito pacientes. Os demais cinco portadores de anti-HLA apresentaram as duas imunoglobulinas (**Tabela 12**). A caracterização das especificidades destas imunoglobulinas, realizada em 11 dos 20 alorreativos, revelou que os anticorpos reconheciam majoritariamente moléculas de HLA de classe I, sendo a reatividade direcionada contra os subtipos A1, A2, A3, A11, A23, A24, B7, B8 e B27 (**Tabela 12**).

**Tabela 12. Caracterização dos anticorpos em pacientes alorreativos portadores das Síndromes Mielodisplásticas.**

Alorreatividade	Anticorpos reativos com HLA:		Isotipos das Imunoglobulinas			Especificidades dos Acs contra os Ags HLA de classe I
	Classe I	Classe II	IgM	IgM/IgG	IgG	
<b>Padrão 2</b> <b>(n=6)</b>	4 pcts	2 pcts	5 pcts	0 pct	1pct	A2 e B7
<b>Padrão 3</b> <b>(n=6)</b>	5	1	3	3	0	A2, A23, A24, B7, B8, B27
<b>Padrão 4</b> <b>(n=8)</b>	2	6	0	2	6	A1, A2, A3, A11, A24

Pacientes aloimunizados apresentaram 55% da reatividade dos anticorpos dirigidos contra as moléculas HLA de classe I e 45% contra as moléculas de classe I e II.

## 2. Anemia Aplástica

Os 40 pacientes portadores da anemia aplástica (AA) estudados, 24(60%) pertenciam ao gênero masculino e 16(40%) ao feminino. A faixa etária desses

pacientes variou de 18 a 70 anos de idade, com uma média de idade  $37,5 \pm 16,6$  anos (**Tabela 13**).

A distribuição dos antígenos ABO nessa população mostrou as seguintes frequências: 45% no grupo “O”, 40% no grupo A, 10% no grupo B e 5% no grupo AB como mostra a tabela **Tabela 13**.

**Tabela 13. Distribuição dos pacientes portadores de Anemia Aplástica de acordo com reatividade no PRA.**

Parâmetros N=40	Idade (média ± DP) (em anos)	Gênero		Grupos Sanguíneos			
		Masc.	Fem.	O	A	B	AB
<b>PRA- negativo</b> n=22 (55%)	37,5 ± 16,6 (18-70)	12 pcts	10 pcts	8 pcts	10 pcts	3 pcts	1 pcts
<b>PRA - positivo</b> n=18 (45%)	32,4 ± 11,7 (18-57)	11 pcts	7 pcts	10 pcts	6 pcts	1 pct	1 pct

Os resultados da análise do painel de linfócitos mostraram que 22 pacientes (55%) não desenvolveram anticorpos anti-HLA (PRA=0%) e 18 (28,6%) apresentaram anticorpos anti-HLA, com alorreatividade nos valores de  $PRA \geq 1$ .

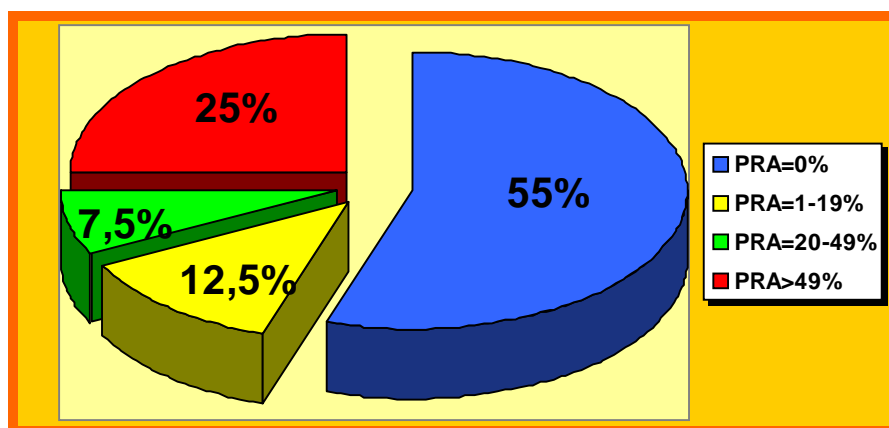
O grupo dos pacientes aloimunizados apresentou uma média de idade menor ( $32,4 \pm 11,7$ ) variando de 18 a 57 anos, enquanto o grupo não reativo revelou uma faixa etária relativamente mais extensa (18 a 70 anos) com uma maior média de idade ( $37,5 \pm 16,6$ ). Adicionalmente, o gênero masculino era majoritário tanto no grupo não reativo quanto no grupo alorreativo.

As características clínicas dos pacientes portadores de AA, conforme à reatividade no painel de linfócitos (PRA), estão resumidas na **Tabela 14**.

**Tabela 14. Características clínicas dos pacientes portadores de Anemia Aplástica de acordo com o grau de reatividade diante o PRA.**

Parâmetros	Padrão 1 (PRA=0) (n=22)	Padrão 2 (PRA=1-19%) (n=5)	Padrão 3 (PRA=20-49%) (n=3)	Padrão 4 (PRA <sup>≥</sup> 50%) (n=10)
Tempo de doença (em meses)	74,1 ± 78,7 (11-312)	31,2 ± 30,1 (12-84)	44,0 ± 30,2 (12-48)	73,1 ± 55,7 (12-216)
Média - transfusões (variação)	77,7 ± 42,8 (21-197)	75,0 ± 36,7 (62-135)	53,0 ± 25,5 (33-89)	86,5 ± 46,6 (25-197)
Tipo de transfusão:				
CH	7 pcts	0 pct	1 pct	0 pct
(CH e CP)	9	5	2	3
CP	2	0	0	9
Transfusão não disleucotizada	12 pcts	3 pcts	2 pcts	8 pcts
Tto imunossupressor:				
Corticóides	2 pcts	2 pcts	3 pcts	7 pcts
CsA + Cort	5	1	0	2
Cort + GAL	3	2	0	1

A análise do painel de linfócitos mostrou que 22 pacientes (55%) não apresentavam reatividade no painel **Padrão 1**. Dos 18 alorreativos, 5 pacientes (12,5%) apresentaram o **Padrão 2**, 3 (7,5%) o **Padrão 3** e o restante dos 10 pacientes (25%) apresentaram o **Padrão 4 (Figura 22)**.



**Figura 22. Distribuição de 40 pacientes portadores de Anemia Aplástica de acordo com a reatividade contra painel de linfócitos (PRA)**

O tempo médio de doença dos pacientes com padrões de alorreatividade 2 e 3 foram muito menores ( $31,2 \pm 30,1$  e  $44,0 \pm 30,2$  meses, respectivamente), do que dos pacientes com os padrões 1 e 4 (respectivamente,  $74,1 \pm 78,7$  e  $86,5 \pm 46,6$  meses).

Os pacientes alorreativos no padrão 3 sofreram o menor número de transfusões, em comparação aos demais grupos de reatividade, com os pacientes do padrão 4 destacando-se com a maior média. Dentre os pacientes portadores

de anticorpos anti-HLA, a reatividade pode estar mais associada às transfusões de concentrados de plaquetas do que de hemácias.

A maioria dos não alorreativos (11 dos 18) também recebeu transfusões de CP, porém 12 desses pacientes receberam CH e CP não disleucotizados. Quanto ao tratamento com agentes imunossupressores, apenas seis dos 18 alorreativos receberam ciclosporina e/ou antiglobulina. Em comparação, oito dos 10 pacientes não alorreativos tiveram tratamento com esses agentes. Doze dos 18 pacientes alorreativos e dois dos 22 não-reativos foram tratados somente com os corticóides.

Os isótipos das imunoglobulinas anti-HLA identificados nos soros dos pacientes com AA foram: IgM apresentou-se em três dos 18 pacientes alorreativos, ao passo que IgG revelou-se em 14 dos 18 pacientes (77,7%). Somente um paciente mostrou as duas imunoglobulinas (**Tabela 15**).

A caracterização das especificidades das imunoglobulinas, realizada em 11 dos 18 alorreativos, revelou que os anticorpos reconheciam, na maioria das vezes, moléculas de HLA de classe I, sendo a reatividade direcionada contra os subtipos A1, A2, A3, A11, A23, A24, B8, B44, B60, B62 e B65 (**Tabela 15**).



**Tabela 15. Caracterização dos anticorpos em pacientes alorreativos em pacientes portadores de Anemia Aplástica**

Alorreatividade	Anticorpos reativos com HLA:		Isotipos das Imunoglobulinas			Especificidades dos Anticorpos reativos com HLA – classe I
	Classe I	Classe II	IgM	IgM/IgG	IgG	
<b>Padrão 2 (n=5)</b>	5 pcts	0 pct	2 pcts	0 pct	3pct	A2, A24, B44, B62 e B65.
<b>Padrão 3 (n=3)</b>	2	1	1	0	2	A23, A24 e B8.
<b>Padrão 4 (n=10)</b>	4	6	0	1	9	A1, A2, A3, A11, A24 e B60

Dos pacientes aloimunizados 61,5% deles apresentaram reatividade dos anticorpos dirigidos contra as moléculas HLA de classe I e 38,9% contra as moléculas de classe I e II.

## Discussão

---

As SMD e AA são grupos de doenças hematológicas heterogêneas que apresentam manifestações clínicas em comum: ambas cursam com citopenias periféricas, com desenvolvimento de características clínicas variáveis, que vão desde leve anemia até uma pancitopenia severa (Ramos et al., 1999; Heaney & Golde, 1999; Gardais, J., 2000; Hofmann & Koeffler, 2002, Magalhães & Metze, 2004; Young & Maciejewski, 1997; Young, 1999; Young, 2000).

Pacientes pancitopênicos, na maioria das vezes, necessitam com frequência de tratamento suportivo de transfusões de concentrados de hemácias (CH) e/ou de plaquetas (CP) como medida profilática ou terapêutica efetiva, para um melhor controle dos níveis de hemoglobina e/ou de plaquetas (Cottler-Fox, M., 1996).

O suporte transfusional de plaquetas é, claramente, a mais efetiva terapia no controle de hemorragias agudas no grupo de pacientes hematológicos, quando os mesmos desenvolvem aplasia medular severa ou diminuição da produção de plaquetas. Entretanto, esses pacientes que recebem uma carga de antígenos estranhos advindos de múltiplas transfusões de doadores aleatórios, geralmente, desenvolvem dentro de 8 semanas (Grumet & Yankee, 1970) anticorpos contra os antígenos de HLA, presentes na superfície das plaquetas, bem como contra os antígenos HLA dos leucócitos que se encontram contaminando os CH e CP. Como consequência, esses pacientes podem tornar-se refratários às transfusões de plaquetas, limitando a eficácia do seu tratamento transfusional.

Pacientes hematológicos, principalmente os portadores das SMD e AA, necessitam de reposição transfusional recorrente de CH e CP, tornando-se alvos preferenciais ao desenvolvimento do estado de refratariedade às transfusões, em

decorrente da aloimunização pós-transfusional. A produção dos aloanticorpos ocorre, na maioria dos casos, devido à presença de leucócitos contaminantes nos CH e CP. Os antígenos HLA alogênicos são reconhecidos pelos receptores dos linfócitos T e B do sistema imune do paciente, produzindo anticorpos anti-HLA de classe I (Schiffer et al., 1978; Daly et al., 1980; Kickler, T.S., 1994; Paula et al., 2004).

A aloimunização é mais freqüente em pacientes com desordens hematológicas trombocitopênicas, que ocorre em torno de 35 a 90% dos casos (Howard & Perkins, 1978; Dutcher et al., 1981; Murphy & Waters, 1985), devido à grande necessidade transfusional de hemocomponentes. Entretanto, a aloimunização contra os antígenos específicos plaquetários (não HLA) ocorre em torno de 2 a 3,8% em pacientes oncológicos e trombocitopênicos crônicos respectivamente (Mueller-Eckhardt, C., 1980; Langenscheidt et al., 1988; Kickler et al., 1990, Novotony et al., 1995, Sans, et al., 2001). Pegel et al., (1982) revelaram que 40% dos pacientes com aplasia medular desenvolveram refratariedade às transfusões de plaquetas decorrente da presença de anticorpos direcionado contra antígenos específicos das plaquetas.

Haja vista, que os pacientes portadores das SMD e AA, necessitam de reposições transfusionais contínuas de CH e CP em seus protocolos de tratamento suportivo, objetivou-se avaliar o grau de aloimunização nesses pacientes, com a finalidade de se conhecer o grau de ocorrência dos anticorpos anti-HLA, principalmente contra as moléculas HLA de classe I, subsidiando dados para aplicação de novas estratégias na prevenção da aloimunização, evitando ou retardando o desenvolvimento da refratariedade.

A nossa casuística, com 110 pacientes portadores de SMD e AA, mostrou concordância somente no subgrupo dos pacientes com AA, enquanto que no grupo dos pacientes com SMD, a presença de aloanticorpos anti-HLA, foi inferior a maioria dos dados da literatura, que relataram taxas que variavam de 35 a 90% dos casos estudados (Howard & Perkins, 1978; Klein & Blajchman, 1982; Dutcher

et al., 1981, Murphy & Waters, 1985); Porém nossos dados se situam acima dos dados de Mueller-Eckhardt (1980), que relatou uma taxa de aloimunidade de 19% em um grupo heterogêneo de pacientes com doenças hematológicas, incluindo as leucemias. Os valores inferiores observados nos pacientes das SMD no presente estudo, em comparação aos valores relatados pelo primeiro grupo de autores, podem estar relacionados a dois fatores: i) o menor tempo de doença ( $62,8 \pm 67,5$  meses) e ii) a menor média transfusional ( $32,9 \pm 55,3$  unidades) de hemocomponentes dos nossos pacientes. Ressalta-se, também, que 84,8% dos pacientes sob estudo receberam somente transfusões de CH, concentrado esse que possui menor capacidade de induzir respostas aloimunes quando comparados com os CP, por apresentar menor carga antigênica que os concentrados de plaquetas. O restante dos pacientes (15,2%) recebeu CP; esses concentrados normalmente são preparados a partir de 8 a 10 unidades plaquetas, provenientes de vários doadores aleatórios, o que aumenta a carga antigênica (aloantígenos plaquetários) nos transfundidos, com ou sem a contaminação leucocitária, contribuindo com uma maior probabilidade na produção de aloanticorpos neste grupo de pacientes.

O presente estudo constatou uma alorreatividade de 45% no grupo de pacientes trombocitopênicos portadores de AA, portanto próximo ao menor valor da maioria dos dados da literatura (35%) mencionados anteriormente. Os nossos pacientes apresentaram maior tempo de doença ( $66,2 \pm 66,5$  meses) e maior média transfusional ( $50,6 \pm 54,7$  unidades) de hemocomponentes, sendo que um número significativo deles (22,5%) receberam somente transfusões de CH, enquanto que 68,2% receberam também, transfusões de plaquetas que são mais propensos a induzir alorrespostas no organismo.

Dutcher et al., em 1981, observaram que as estimativas das freqüências de aloimunização seguida de múltiplas transfusões variaram muito, a depender, em parte, de diferenças no sistema imune individual de cada paciente e do regime de terapia imunossupressora nele administrado. Kickler, T.S., (1994), sugeriu que a presença de leucócitos contaminantes nas preparações sanguíneas seria a principal causa responsável pelo desenvolvimento de aloanticorpos contra os

antígenos HLA de classe I e II. No caso das transfusões de CP, que só expressam antígenos de classe I, os leucócitos contaminantes contribuiriam como co-estimuladores favorecendo ainda mais a aloimunização.

Estudos realizados na década de 80 e 90, relatam que os CH possuem menor contaminação leucocitária em relação aos CP, portanto menor possibilidade de aloimunização (Sirchia et al., 1982; Murphy et al., 1986; Andreu et al., 1988; Oksanen et al., 1991). Os pacientes com SMD do presente estudo receberam um número maior de transfusões de CH do que os pacientes de AA, o que poderia ter contribuído para uma menor frequência de aloanticorpos neste grupo (28,6% das SMD contra 45% das AA). Em comparação, os pacientes de AA receberam maior número de transfusões de CP, sofrendo, em consequência, uma maior exposição aos alo-HLA dos leucócitos. Estes dados estão consistentes com os dados dos autores citados.

Diferentes estudos clínicos têm indicado que o uso de componentes sanguíneos leucoreduzidos produzidos em laboratório poderia prevenir reações febris e diminuir ou prevenir aloimunização aos antígenos HLA e refratariedade às transfusões de plaquetas.

Andreu et al., (1988); Williamson et al. (1994); Sintnicolaas et al. (1995), Ishida & Handa, (1997), Slichter, S.J., (1998) e Pietersz, et al., (1998), observaram que a prática de filtração dos concentrados de CH e CP reduzia a presença de leucócitos contaminantes, contribuindo dessa forma para uma menor incidência da aloimunização nos pacientes transfundidos.

No presente estudo, 35.7% dos pacientes com SMD receberam transfusões de CH e/ou CP não disleucotizados em algum período de seu tratamento, contra 89,7% dos pacientes portadores de AA, o que provavelmente contribuiu para a maior incidência de aloimunização nos pacientes de AA transfundidos com esses hemocomponentes.

Para uma melhor compreensão do processo de aloimunização dos pacientes portadores das SMD e AA, as alorreatividades dos pacientes no painel de linfócitos (PRA) foram agrupadas em 4 padrões, de acordo com o grau de produção dos aloanticorpos: **Padrão 1** (PRA=0), **Padrão 2** (PRA=1 a 19%), **Padrão 3** (PRA=20 a 49%) e **Padrão 4** (PRA  $\geq$ 50%). Esta sistemática assemelha-se com a metodologia comumente utilizada em estudos sobre aloimunização nos pacientes candidatos aos transplantes renais (Tardif & McCalmon, 1995; Duquesnoy & Marrari, 1997).

Analisando o Padrão 1 de cada um dos grupos SMD e AA (**Tabelas 10 e 14**), podemos verificar que uma maior percentagem de pacientes com SMD não apresentou aloimunização (71,4%), porém, os pacientes com AA (55%) apresentaram menos pacientes não reativos. Dentre esses pacientes não alorreativos, havia pacientes que fizeram grandes reposições transfusionais.

Dezoito dos 26 pacientes de SMD não reativos receberam de 1 a 10 transfusões, enquadrando-se na fase 1 (expansão clonal mínima) da classificação proposta por Scornik et al., (1992) (**Tabela. 5**), os quais podem ou não gerar anticorpos alorreativos. Dos demais, oito receberam de 13 a 38 transfusões, enquadrando-se na fase 2 de aloimunização, podendo desenvolver anticorpos IgG em baixos títulos.

Quatro dos 18 pacientes transfundidos fizeram uso de imunossupressores, o que poderia ter contribuído para a ausência de aloimunização neste subgrupo. Este último dado se encontra de acordo com a observação de Dutcher et al., (1980,1981) de que os pacientes portadores de doenças hematológicas, quando tratados com imunossupressores, produziam menos respostas aloimunes. Outros quatro pacientes, que não receberam tratamento com imunossupressores, também não apresentaram aloanticorpos; o que poderá estar relacionado à descontinuação de estímulos antigênicos (transfusões). Alternativamente, estes últimos pacientes podiam ter apresentado anticorpos em títulos abaixo do nível de detecção pelo método MLCT dependente do complemento, utilizado neste estudo.

Vale ressaltar que esta metodologia, geralmente, é considerada pouco sensível para detecção dos anticorpos em baixas concentrações (Howard & Perkins, 1978).

A abordagem da alorreatividade dos pacientes portadores de AA pertencentes ao padrão 1 (PRA=0) (**Tabela 14**) foi semelhante às encontradas nos pacientes com SMD, sendo que 18 dos 22 pacientes não reativos receberam transfusões de CH e/ou CP. Neste grupo, cerca de 80% dos pacientes que sofreram mais de 10 transfusões fizeram ou estavam fazendo terapia imunossupressora com corticóides, CsAS ou GAL e/ou GAT, tratamento este preconizado por vários autores, dentre eles Speck et al. (1977), Frickhofen et al (1991) e Rosenfeld et al. (1995); o que poderia ter contribuído para a diminuição da aloimunização após ceifar o estímulo para produção de aloanticorpos.

O Padrão 2 (PRA=1 a 19%) de aloimunização nas duas doenças revelou comportamentos diferentes (**Tabelas 9, 14**), principalmente nos fundamentos de tempo médio de doença e o número médio de transfusões recebido pelos pacientes.

Os portadores de AA apresentaram menor tempo médio de doença, em comparação com os portadores das SMD ( $31,2 \pm 30,1$  meses contra  $80,0 \pm 97,0$  meses, respectivamente). Diferentemente, esses pacientes receberam maior número médio de transfusões ( $75,0 \pm 36,7$ ), em comparação aos pacientes com SMD ( $9,7 \pm 7,0$ ). Esta grande diferença nas transfusões administradas nos dois grupos de pacientes se relacionou com os quadros de aloimunização dos respectivos grupos – os pacientes de AA revelaram maior incidência de aloimunização [18 dos 40 (45,0%), contra 20 dos 70 (28,6%) pacientes reativos do grupo SMD.

Na literatura atualmente acessível, constam poucos dados de incidências de alorreatividade específicas a cada uma dessas doenças do presente estudo. Klingemann et. al., 1987 observaram em pacientes portadores de AA, uma taxa de refratariedade às transfusões de plaquetas, de 34%, na qual a principal causa, foi atribuída à aloimunização nesse grupo, o qual recebeu mais de 40 unidades de

plaquetas. Laundry et al., (2004) encontraram uma incidência de aloimunização em 62% dos pacientes com AA adquirida.

Os relatos científicos revelam também, que a incidência de anticorpos aloimunes poderá está relacionada ao fenômeno de reações cruzadas, com respostas imunes desenvolvidas contra antígenos que induzem respostas policlonais no organismo humano. Anticorpos aloimunes (anti-HLA) reativos com epítomos de antígenos virais e bacterianos foram descritos por Neumann, J., (1997). É possível que a geração de anticorpos aloimunes, em pelo menos alguns casos de SMD, tenha ocorrido por conta desse fenômeno de imunização policlonal, decorrente de reações cruzadas relatadas pelo autor acima referido. Analisando esses pacientes, verificamos que quatro dos cinco pacientes de AA com padrão 2 de alorreatividade (Tabela 14) apresentaram isotipo IgM. Este perfil se enquandra mais com o que caracteriza os anticorpos policlonais, os quais tendem a ser imunoglobulinas da classe IgM, de curta duração e em baixas concentrações (Scornik et al., 1992).

A faixa de transfusões (21 a 135) presente nos pacientes portadores de AA (Tabela 14), correlaciona-se ao Padrão 2 de reatividade, o que corresponde à fase III de expansão clonal de alorreatividade, na qual haveria produção significativa de anticorpos, porém apresentando anticorpos IgG em baixos títulos (Scornik et al., 1992). Entretanto, dois dos pacientes que receberam um maior número de transfusões, fizeram uso de GAL, que poderia ter diminuído o grau de alorreatividade avaliado no PRA. Adicionalmente, o fato de todos os pacientes terem recebido concentrados de plaquetas disleucotizados, também poderia ter contribuído, em parte, para uma menor alorreatividade evidenciada nestes pacientes.

Os pacientes pertencentes ao Padrão 3 de alorreatividade dos grupos das SMD e AA, apresentaram os tempos médios de doença mais curtos dentre os outros padrões (SMD,  $29,0 \pm 13,3m$  e  $44,0 \pm 30,2m$ , para AA). Apesar da maior média transfusional no grupo de AA ( $53,0 \pm 25$  contra  $9,3 \pm 5,8$  nas SMD), a alorreatividade evidenciada foi muito similar a do grupo das SMD (**Tabelas 9 e**



**14).** Esta observação, não foi de acordo com a opinião geral dos relatos da literatura, de que o grau de aloimunização é influenciado pelo número de transfusões.

Os pacientes das SMD de Padrão 3, quando comparados com os do padrão 2, foram mais alorreativos, apesar de ter recebido um número médio de transfusões semelhantes. Esta diferença poderia estar associada ao fato de que cinco dos seis pacientes do Padrão 3 pertenciam à fase IV de expansão clonal, o que poderia ter proporcionado neles anticorpos de natureza IgG em altos títulos, sendo facilmente detectáveis por técnicas menos sensíveis. Outro dado que também poderia ter contribuído para a maior alorreatividade dos pacientes do Padrão 3, foi a presença, em quase todos os pacientes, de aloanticorpos contra os antígenos de maior frequência em nossa população A2, A9, B7, B8 e B27 (Campos, H.H. 1998). Neste grupo, duas pacientes que receberam apenas duas transfusões também se tornaram aloimunizadas. Segundo Terasaki et al. (1970), mulheres com história de gestações anteriores foram aloimunizadas naturalmente contra 50% dos antígenos HLA de seus filhos (aloimunização primária, contra HLA herdados do pai). De acordo com Neumann, J., (1997), mulheres com história de gestações prévias, podem está recebendo um segundo estímulo antigênico (aloimunização secundária), ao sofrerem transfusões posteriores.

Pacientes com AA, pertencentes ao Padrão 3 (Tabela 14), se comportaram previsivelmente com maior tempo de doença, portanto com uma maior necessidade transfusional; o que resultou na maior exposição destes aos aloantígenos, tornando-os mais alorreativos. Dois destes pacientes tinham média transfusional alta, porém não tornaram-se hiperimunizados, fato este poderia estar relacionado à administração de GAL antes da análise do seu soro.

É presumível que os pacientes com SMD e AA de Padrão 4 de alorreatividade, estavam altamente sensibilizados, apresentando anticorpos de natureza IgG persistentes e em altos títulos, mesmo sem estímulos frequentes, o que vai de encontro com as informações da literatura de que pacientes politransfundidos (>40 transfusões) apresentarem um maior grau de reatividade no

PRA. Segundo Kekomaki, et al., (1998) e Contreras, M., (1998), tais pacientes hiperimunizados teriam uma maior probabilidade de desenvolverem a refratariedade imunológica às transfusões de plaquetas, ocasionando maior causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes hematológicos.

Vale salientar que todos os oito pacientes reativos do Padrão 4 apresentaram IgG contra as moléculas de HLA de classe I, com reatividade persistente no PRA, mesmo sem estímulos antigênicos constantes, o que coincide com o relato de Scornik et al.,(1992).

Um outro dado que merece destaque, é o fato da ocorrência da alorreatividade no Padrão 4, em todos as pacientes femininas multíparas do grupo das SMD. Esta observação vai de encontro com as referências da literatura, de que transfusões sanguíneas e gestações prévias constituem-se as maiores fontes de imunização contra os antígenos HLA (Dausset et al., 1954; Payne e Rolf, 1958; Terasak et al., 1970; Mueller-Eckhardt, 1977; Sirchia et al.,1982; Brand et al., 1988; Contreras, 1998).

Segundo Neumann, J., (1997), as seguintes variações podem aparecer nesse quadro: o não desenvolvimento de anticorpos por algumas mulheres, o desaparecimento da circulação desses em poucas semanas, como também a persistência dos anticorpos, produzidos após duas ou mais gestações, por mais de 20 anos.

O mesmo autor concluiu que pacientes mais sensibilizados, são aqueles que foram submetidos a mais de um estímulo antigênico, como gravidez, transfusão ou transplantes prévios. Desta forma, pressupõe-se que mulheres com história pregressa de multiplas gestações devem ter uma política transfusional diferenciada, por serem pacientes naturalmente aloimunizadas.

Koeffler et al (1986) afirma que as SMD acometem indivíduos acima de 60 anos e que apenas 25% dos casos tem idade menor que 50 anos. Essa observação confirma nossos dados, os quais revelam uma casuística de 80% de pacientes com mais de 50 anos. Bauer, M., (2000) é de opinião de que a imunosenescência ocorre em indivíduos com mais de 65 anos. Considerando que

o fenômeno se inicia por volta dos 50 anos de vida, o indivíduo poderá sofrer diminuição das respostas imunológicas até mesmo aos estímulos antigênicos primários, o que nos leva a imaginar que a hipoalorreatividade de alguns pacientes com SMD possa estar influenciada pelo declínio das atividades imunológicas. Bauer et al (2000); Castle, (2000); Globerson & Efros (2000) e Ginaldi, (2001) são da opinião de que a imunosenescência poderá se relacionar com a diminuição da atividade do timo, que se encontra em acentuada fase de regressão na idade avançada, com a consequente diminuição da atividade dos linfócitos T, a qual reflete negativamente na capacidade de produção de anticorpos aos estímulos imunogênicos.

Diversos estudos, demonstram que terapias transfusionais têm papel importante nos cuidados suportivos de pacientes hematológicos ou pacientes com tumores sólidos (Aisner, J., 1978; Grumet & Yankee, 1970; Sirchia, 1982; Murphy, et al., 2001). Transfusões de concentrados de plaquetas, nas últimas décadas, tornaram-se a mais efetiva terapia no controle de fenômenos hemorrágicos agudos em pacientes trombocitopênicos (Alvarado et al., 1965; Cavins et al., 1968; Freireich, 1966), porém a incidência de anticorpos aloimunes nos pacientes politransfundidos poderá comprometer o sucesso desses procedimentos. Pacientes com SMD e AA que necessitam de suporte transfusional prolongado, por exemplo, comumente desenvolvem refratariedade, tornando-se um problema substancial ao tratamento desses pacientes, podendo levá-los ao óbito. Este problema poderá se relacionar à aloimunização dos pacientes.

Storb et al., (1980) e Champlin et al., (1989) afirmam que a aloimunização nos pacientes de AA, jovens (<40 anos) e candidatos em potencial à TCT de doadores HLA compatíveis aparentados, poderá dificultar, ou até inviabilizar, a realização desse transplante, devido à refratariedade gerada pelas transfusões de CH e/ou CP, principalmente, se esses concentrados pertencerem a seus parentes mais próximos.

Várias estratégias têm sido desenvolvidas para prevenir a aloimunização; a mais importante delas é a disleucotização por filtração dos CH e CP (Murfy, 1986; Sniecinski et al., 1988; Andreu et al., 1988; Kickler et al., 1989; Saarinen et al., 1990 e Van Marwijk-Kooy et al., 1991).

No presente estudo, dos 110 pacientes, 50(45,4%) receberam transfusões de CH e/ou CP não disleucotizadas em algum momento de seu tratamento, dificultando assim, a avaliação da real fonte de aloimunização nestes pacientes.

Acredita-se que, se nenhuma medida preventiva for utilizada, cerca de 40 a 70% dos pacientes politransfundidos podem desenvolver a aloimunização (Sirchia et al., 1982; Schiffer et al., 1983; Murfy et al., 1986; Andreu., 1988; Okasaen et al., 1991).

Saarinen et al., (1989) afirmaram que 50% dos pacientes transfundidos com CH e CP tornam-se refratários às transfusões de plaquetas. Portanto, a aloimunização poderá ser diminuída ou adiada, se medidas forem tomadas no sentido de diminuir o número de doadores de plaquetas aleatórias (CP com 4 a 6 unidades de plaquetas ao invés de 8 a 10 unidades) e a realização de transfusões de CH E CP disleucotizados.

No caso de pacientes aloimunizados transfundir apenas CP por aferese de doador único e se possível crossmatch de plaquetas combinados em pacientes refratários às transfusões de plaquetas. Entretanto, se estas práticas não forem oportunas num dado momento do tratamento, deve-se assegurar, pelo menos, que todos os produtos sangüíneos administrados aos pacientes hematológicos sejam disleucotizados.

Os dados desta investigação demonstram que pacientes portadores das SMD e AA, frequentemente desenvolvem aloanticorpos contra antígenos HLA, e esta aloimunização é influenciada pelo tipo e pela freqüência de transfusões de hemocomponentes; podendo ocasionar obstáculos aos procedimentos de transfusões e de transplantação de medula óssea nestes pacientes. Avaliações

*Daisy Maria Meireles Arruda*

sistemáticas para detecção de anticorpos anti-HLA podem ser valiosas para adoção de estratégias terapêuticas mais adequadas nestes pacientes.

## Conclusões

---

- A pesquisa pelos anticorpos anti-HLA no PRA do grupo de pacientes com AA (45%) apresentou maior grau de aloimunização em relação aos pacientes com SMD (28,6%).
- A taxa de aloimunização nas SMD de 28,6% pode ter sofrido influência pelo menor número de transfusão, pelo tipo de transfusão recebida (mais CH do que de CP), pela terapia antiinflamatória /imunomoduladora e talvez, pelo fenômeno de imunosenescência.
- O grau de aloimunização relacionado ao número de transfusões nas duas doenças ficou bem estabelecido nos Padrões 2 e 4, enquanto o Padrão 3, que recebeu menos transfusão que o Padrão 2, apresentou-se mais alorreativo. O Padrão 3 pode estar na fase de expansão clonal significativa com anticorpos persistentes do tipo IgG, mesmo na ausência de estímulos posteriores.
- Pacientes com AA não alorreativos (55%) apesar da média transfusional elevada ( $77 \pm 42,8$ ) por conta de CP com ou sem CH, não desenvolveram aloanticorpos, porém 63,6% realizaram tratamento com imunossuppressores potentes: Corticóides, CsA ou GAL/GAT, enquanto 38,6% dos pacientes com SMD não reativos transfundidos (52%) receberam tratamento com drogas antiinflamatórias e/ou imunomoduladoras.
- Pacientes mais alorreativos pertencentes ao Padrão 4 de reatividade, apresentaram mais anticorpos do tipo IgG persistentes (SMD= 35% e AA= 77,7%).
- A manifestação da aloimunidade estava direcionada contra os Antígenos HLA de maior prevalência na nossa população: A1, A2, A23, A24, B7,

B8 e B27 nos pacientes com SMD; e A1, A2, A3, A11, A24, B8, B44, B60 e B65 nos pacientes com AA, sendo A1, A2, A24 e B8 alvo comum nas duas doenças.

- Os dados do presente estudo revelaram que pacientes com SMD e AA foram freqüentemente transfundidos com CH e/ou CP não disleucotizados em algum período de seu tratamento, aumentando o risco para a aloimunização.
- O maior nível de tratamento com drogas imunossupressoras no grupo não reativo das SMD pode ter influenciado na menor média transfusional deste grupo [ $4,66 \pm 8,0$  (0-38)].
- Mulheres com história pregressa de múltiplas gestações mostraram-se mais propensas à aloimunização, em ambas as doenças.
- Pacientes com SMD e AA, transfundidos com CH e/ou CP não desleucotizados, tendem a desenvolver um quadro de alorreatividade, se não forem tratados com CS e GAL; o que poderá contribuir para o desenvolvimento do estado de refratariedade às transfusões de plaquetas; além de, em princípio, torná-los inaptos a receber transplantes de medula óssea de doadores HLA-compatíveis.

## Referências Bibliográficas

---

- 1 JANSSEN, J. W.; BUSCHLE, M.; LAYTON, M.; LYONS, J.; BARTRAM, C. R. Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: Evidence for multipotent stem cell origin. **Blood**, v. 73, p. 248-254, 1989.
- 2 KOEFFLER, H. P. Myelodysplastic syndromes (preleukemia). **Semin. Hematol.**, v. 23, p. 284, 1986.
- 3 MUFTI, G. J.; GALTON, D. A. G. Myelodysplastic syndromes: Natural history and features of prognostic importance. **Br. J. Haematol.**, v. 5, p. 953, 1986.
- 4 RAMOS, F.; FERNÁNDEZ-FERRERO, S.; SUÁREZ, D.; BARBÓN, M.; RODRÍGUEZ, J. A.; GIL, S.; MEGIDO, M.; CIUDAD, J.; LÓPEZ, N.; DEL CAÑIZO, C.; ORFAO, A. Myelodysplastic syndrome: a search for minimal diagnostic criteria. **Leuk. Res.**, v. 23, p. 283-290, 1999.
- 5 HEANEY, M. L.; GOLDE, D. W. Myelodysplasia. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, n. 21, p.1649-1660, 1999.
- 6 GARDAIS, J. Dyshaemopoiesis in adults: a practical classification for diagnosis and management. **Leuk. Res.**, v. 24, p. 641-651, 2000.
- 7 HOFMANN, W. F.; KOEFFLER, H. P. Important features of myelodysplastic syndrome. **Int. J. Hematol.**, v. 76, n. 2, p. 222-227, 2002.
- 8 RHOADES, C. P.; BARCKER, W. H. Refractory anemia an analysis of one hundred cases. **JAMA**, v. 110, p. 794-796, 1938.
- 9 HAMILTON-PETERSON, J. L. Preleukaemic anaemia. **Acta Haematol.**, v. 2, p. 309-316, 1949.
- 10 BLOCK, M.; JACBSON, L. O.; BETHARD, W. F. Preleukemic acute human



- leukemia. **JAMA**, v. 152, p. 1018-1028, 1953.
- 11 BJORKMAN, S. E. Chronic refractory anemia with sideroblastic bone marrow. A study of four cases. **Blood**, v. 11, p. 250-259, 1956.
- 12 DACIE, J. V.; SMITH, M. D.; WHITE, J. C.; et al. Refractory normoblastic anemia: a clinical and haematological study of seven cases. **Br. J. Haematol.**, v. 5, p. 56-82, 1959.
- 13 RHEINGOLD, J. J.; KAUFMAN, R.; ADELSON, E.; et al. Smoldering acute leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 268, p. 812-815, 1963.
- 14 SAARNI, M. I.; LINMAN, J. W. Preleukemia: the hematologic síndrome preceding acute leukemia. **Am. J. Med.**, v. 55, p. 38-48, 1973.
- 15 SEXAUER, J.; KASS, L.; SCHNITZER, B. Subacute myelomonocytic leukemia. Clinical, morphologic and ultrastructural studies of 10 cases. **Am. J. Med.**, v. 57, p. 853-861, 1974.
- 16 MIESCHER, P. A.; FARQUET, J. J. Chronic myelomonocytic leukemia in adults. **Semin. Hematol.**, v. 11, p. 129-139, 1974.
- 17 BEARD, M. E.; BATEMAN, C. J.; CROWTHER, D. C.; WRIGLEY, P. F.; WHITEHOUSE, J. M.; FAIRLEY, G. H.; SCOTT, R. B. Hypoplastic acute myelogenous leukemia. **Br. J. Haematol.**, v. 31, n. 2, p. 167-175, 1975.
- 18 DREYFUS, B. Preleukemic states. I. Definition and classification. II. Refractory anemia with an excess of myeloblasts in the bone marrow (smoldering leukemia). **Blood Cells**, v. 2, p. 33-55, 1976.
- 19 LINMAN, J. W.; BAGBY, G. C. The preleukemic syndrome (hemopoietic dysplasia). **Cancer**, v. 42, p. 854-864, 1978.

- 20 COHEN, J. R.; CREGER, W. P.; GREENBERG, P. L.; SCHRIER, S. L. Subacute myeloid leukemia : a clinical review. **Am. J. Med.**, v. 66, p. 959-966, 1979.
- 20 STREULI, R. A.; TESTA, J. R.; VARDIMAN, J. N.; MINTZ, U.; GOLOMB, H. M.; ROWLEY, J. D. Dysmyelopoetic síndrome sequential clinical and cytogenetic studies. **Blood**, v. 55, p. 636-644, 1980.
- 21 BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndrome. **Br. J. Haematol.**, v. 51, p.189, 1982.
- 22 DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. **Practical haematology**. 5. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975. p.138-139.
- 23 ABRUZZESE, E.; BUSS, D.; RAINER, R.; RAO, P. N.; PETTENARI, M. J. Study of clonality in myelodysplastic síndromes: detection of trissomy 8 in bone marrow cell smears by fluorecence in situ hybridization. **Leuk. Res.**, v. 20, p. 551-557, 1996.
- 24 BERNELL, P.; JACOBSSON, B.; NORDGREN, A.; HAST, R. Clonal cell lineage involmient in myelodysplastic syndromes studied by fluorecence in situ hybridization and morphology. **Leuk. Res** ., v.10, p. 662-668, 1996.
- 25 HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK HK; VARDIMAN J; LISTER TA; BLOOMFIELD CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. **J. Clin. Oncol.**, v.17, p. 3835-3849, 1999.
- 26 BENNETT, J. The World Health Organization (WHO) classification of acute leukemias and the myelodysplastic syndromes. **Int. J. Hematol.**, v. 72, n. 2, p. 131-133, 2000.

- 27 LOCATELLI, F.; ZECCA, M.; PESSION, A.; MASERAT, E.; De STEFANO P.; SEVERI, F. Myelodysplastic syndromes: the pediatric point of view. **Haematologica**, v. 80, p. 268-279, 1995.
- 28 AUL, C.; GATTERMANN, N.; SCHNEIDER, W. Epidemiological and etiological aspects of myelodysplastic syndrome. **Leuk. Lymphoma**, v.16, p. 247-262, 1995.
- 29 WILLIAMSON, P. J.; KRUGER, A. R.; REYNOLDS, P. J.; HAMBLIN, T. J.; OSCIER, D. G. Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. **Br. J. Haematol.**, v. 87, p. 743-745, 1994.
- 30 AUL, C.; GATTERMAN, N.; HEYLL, A.; GERMING, U. Primary myelodysplastic syndromes: Analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. **Leukemia**, v. 6, p. 52, 1992.
- 31 AUL, C.; BOWER, D. T.; YOSHIDA, Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 83, p. 71-86, 1998.
- 32 PEDERSEN-BJERGOARD, J.; PHILIP, P.; LARSEN, S. O.; JENSEN, G.; BYRSTING, K. Chromosome aberrations and prognostic factors in therapy related myelodysplasia and acute non-lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 76, n. 6, p. 1083-1091, 1990.
- 33 GOLDBERG, H.; LUSK, E.; MOORE, J.; NOWELL, P. C.; BESA, E. C. Survey of exposure to genotoxic agents in primary myelodysplastic syndrome: correlation with chromosome patterns and data on patients without hematological disease. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6876-6881, 1990.
- 34 LEVINE, E. G.; BLOOMFIELD, C. D. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. **Semin. Oncol.**, v. 19, p. 47-84, 1992

- 35 MOLE, R. Ionizing radiations and human leukemia. In: HENDERSON, E.; LISTER, T. (Ed.) **Leukemia**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 1990. p. 253.
- 36 RINSKY, R. A.; YOUNG, R. J.; SMITH, A. B. Leukemia in benzene workers. **Am. J. Ind. Med.**, v. 2, p. 217-245, 1981.
- 37 AKSOY M. Malignancies due to occupational exposure to benzene. **Am. J. Ind. Med.**, v. 2, p. 217-245, 1985.
- 38 YIN, S. N.; LI, G. L.; TAIN, F. D.; FU, Z. I.; JIN, C.; CHEN, Y. J.; LUO, S. J.; YE, P. Z.; ZHANG, J. Z.; WANG, G. C. Leukemia and benzene workers: A retrospective cohort study. **Br. J. Ind. Med.**, v. 44, p. 124-128, 1987.
- 39 BRANDT L. Exposure to organic solvents and risk of haematological malignancies. **Leuk. Res.**, v.16, p. 67-70,1992.
- 40 KOEFFLER, H. P.; GOLDE, D. W. Cellular maturation in human preleukemia. **Blood**, v. 52, p. 355-361, 1978.
- 41 BAROSI, G.; CAZZOLA, M.; MORANDI, S.; STEFANELLI, M.; PERUGINI, S. Estimation of ferrokinetic parameters by a mathematical model on patients with primary acquired sideroblastic anemia. **Br. J. Haematol.**, v. 39, p. 409-423, 1978.
- 42 CAZZOLA, M.; BAROSI, G.; BERZUINI, C.; DACCO, M.; ORLANDI, E.; STEFANELLI, M.; ASCARI, E. Quantitative evaluation of erythropoietic activity in dysmyelopoietic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 50, p. 55-62, 1982.
- 43 MITROU, P. S.; FISHER, M.; HUNBNER, K. Proliferation of ineffective erythropoiesis with nuclear abnormalities and megakaryoblastoid appearance in preleukaemia. **Acta Haematol.**, v. 54, p. 271-279, 1975.
- 44 HAST, R.; REIZENSTEIN, P. Studies on human preleukaemia. I. Erythroblast and iron kinetics in aregenerative anaemia with hypercellular bone marrow. **Scand. J. Haematol.**, v. 19, p. 347-354, 1977.

- 45 RAJAPAKSA, R.; GINZTON, N.; ROTT, L. S.; GREEBERG, P. L. Altered onco protein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. **Blood**, v. 88, p. 4275 - 4287, 1996.
- 46 MUNDLE, S. D.; VENUGOPAL, P.; CARTLIDGE, J. D.; PANDAV, D. V.; BROADY-ROBINSON, L.; GEZER, S.; ROBIN, E. L.; RIFKIN, S. R.; KLEIN, M.; ALSTON, D. E.; HERNANDEZ, B. M.; ROSI, D.; ALVI, S.; SHETTY, V.T.; GREGORY, S. A.; RAZA, A. Indication of an involvement of interleukin-1 beta converting enzyme-like protease in intramedullary apoptotic cell death in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 88, p. 2640 - 2647, 1996.
- 47 HOEFSLOOT, L. H.; Van AMELSVOORT, M. P.; BROCDERS, L. C.; Van ler PLAS, D. C.; Van LOM, K.; HOOGERBRUGGE, H.; TOUW, J. P.; LOWENBERG, B. Erythropoietin induced activation of STAT5 is impaired in the myelodysplastic syndrome. **Blood**, V.89, p.1690-1700, 1997.
- 48 DREYFUS, B. Preleukemic states. **Nouv. Rev. Fr. Hematol. Blood Cell**, v. 1, p. 33-35, 1976.
- 49 WEISDORF, D. J.; OKEN, M. M.; JOHNSON, G. J.; RYDELL, R. E. Chronic myelodysplastic syndrome: short survival with or without evolution to acute leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v.55, p.691-700, 1983.
- 50 NOËL, P. E.; SOLBERG Jr., L. A. Myelodysplastic syndromes: pathogenesis, diagnosis and treatment. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v.12, p.193-215, 1992.
- 51 ROSENFELD, C.; LIST, A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. **Leukemia**, v. 14, p. 2-8, 2000.
- 52 GREEMBERG, B. R.; MILLER, D.; CARDIFF, R. D; MacKENZIE, M. R.; WALLING, P. Concurrent development of preleukemic, lymphoproliferation and plasma cell disorders. **Br. J. Haematol.**, v. 53, p. 125-133, 1983.

- 53 AKSOY, M. ERDEM, S. Follow-up study on the mortality and the development of leukemia in 44 pancytopenic patients with chronic exposure to benzene. **Blood**, v. 52, p. 285-292, 1978.
- 54 HOFMANN, W. K.; OTTMANN, O. G.; GANSER, A.; HOELZER, D. Myelodysplastic Syndromes: clinical features. **Semin. Hematol.**, v. 33, p.177-185, 1996.
- 55 HOGLAND, M. C. Myelodysplastic syndromes (preleukimia). syndromes: the bone marrow factory failure problem. **Mayo Clin. Proc.**, v. 70, p. 673 - 677, 1995.
- 56 SCHUMACHER, H. E.; NAND, S. **Myelodysplastic syndromes**: approach to diagnosis and treatment. New York:, Igaku-Shoin, 1995. P. 595-598,
- 57 TOOD W. M.; PIERRE, R. V. Preleukaemia: A long-term prospective study of 326 patients. **Scand. J. Haematol.**, v. 36, p. 114-120, 1986.
- 58 LORAND-METZE, I.; MEIRA, D. G.; VASSALLO, J.; LIMA, C. S. P.; METZE, K. The differential diagnosis between aplastic anemia and hypocellular myelodysplasia in patients with pancytopenia. **Haematologica**, v. 84, p. 564-565, 1999.
- 59 KOUIDES, P. A.; BENNETT, J. M. Morfology and classification of the myelodysplstic syndromes and their pathologic variants. **Semin. Hematol.**, v. 33, p. 95, 1995.
- 60 AUL, C.; GATTERMAN, N.; BOULTWOOD, J.; LEWIS, S.; WAINSCOAT, J. S. The 5q- syndrme. **Blood**, v. 84, p. 3253-3260, 1994.
- 61 HEIM, S.; MITELMAN, F. **Câncer cytogenetics**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley-Liss, 1995.
- 62 MUFTI, G. J. Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndromes. **Leuk. Res.**, v. 16, p. 35-41, 1992.

- 63 FENAUX, P.; MOREL, P.; LAI, J. L. Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. **Semin. Hematol.**, v. 33, p.127-138, 1996.
- 64 SOLE, F.; ESPINET, B.; SANS, G. F.; CERVERA, J.; CALASANZ, M. J.; LUÑO, E.; PRIETO, F.; GRANADA, I.; HERNANDEZ, J. M.; CIGUDOSA, J. C.; DIEZ, J. L.; BUREO, E.; MARQUÉS, M. L.; ARRANZ, E.; RÍOS, R.; MARTINEZ CLIMENT, J. A.; VALLESPI, T.; FLORENSA, L.; WOESSNER, S. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v.180, p.346-356, 2000.
- 65 HEANEY, M. L.; GOLDE, D. W: Myelodysplasia. **N. Engl. J. Med**, v. 340, p. 1649-1660, 1999.
- 66 MAGALHÃES, S. M. M.; METZE, I. L. Síndrome mielodisplástica: Protocolo de Exclusão. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 26, p. 263-267, 2004.
- 67 GREENBERG, P.; COX, C.; LEBEAU, M. M.; FENAUX P.; MOREL P; SANZ G; SANZ M .; VALLESPI T; HAMBLIN T; OSCIER D; OHYASHIKI K; TOYAMA K; AUL C; MUFTI G; BENNETT J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 89, p. 2079-2088, 1997.
- 68 MOLLDREM, J. J.; CAPLES, M.; MAVROUDIS, D.; PLANTE, M.; YOUNG, N. S.; BARRETT, A. J. Antithymocyte globulin for patients with myelodysplastic syndrome. **Br. J. Haematol.**, v.99, p.699-705, 1997.
- 69 JONÁSOVÁ, A.; NEUWIRTOVA, R.; CERMAK, J.; VOZOBULOVÁ, V.; MOCIKOVÁ, K.; SISKOVÁ, M.; HOCHOVÁ, I. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. **Br. J. Haematol.**, v. 100, p. 304-309, 1998.
- 70 STEIN, R. S.; ABELS, R. I.; KRANTS, S. B. Pharmacologic doses of recombinant human erythropoietin in the treatment of myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 78, p.1658-1663, 1991.

- 71 ROSE, E. H.; ABELS, R. I.; NELSON, R. A.; McCULLOUGH, D. M.; LESSIN, L. The use of r-HuEpo in the treatment of anemia related to myelodysplasia (MDS). **Br. J. Haematol.**, v. 89, p. 831-837, 1995.
- 72 HELLSTROM-LINDBERG, E. Efficacy of erythropoietin in the myelodysplastic syndromes: a meta –analysis of 205 patients from 17 studies. **Br. J. Haematol.**, v. 89, p. 67-71, 1995.
- 73 NEGRIN, R. S.; STEIN, R.; DOHERTY, K.; CORNWELL, J.; VENDIMAN, J.; KRANTZ, S.; GREENBERG, P. L. Maintenance treatment of the anemia of myelodysplastic syndromes with recombinant humana granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin: evidence for in vivo synergy. **Blood**, v. 87, p. 4076-4081, 1996.
- 74 HELLSTROM-LINDBERG, E.; NEGRIN, R.; STEIN, R.; KRANTZ, S.; LINDBERG, G.; VANDIMAN, J.; OST, A.; GREENBERG P. Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anaemia of patients with myelodysplastic syndromes: Proposal for a predictive model. **Br. J. Haematol.**, v. 99, p. 344-351, 1997.
- 75 HELLSTROM-LINDBERG, E.; AHLGREN, T.; BEGUIN, Y.; CARLSSON, M.; CARNESKOG, J.; DAHL, I. M.; DYBEDAL, I.; GRIMFORS, G.; KANTERLEWENSOHN, L.; LINDER, O.; LUTHMAN, M.; LÖFVENBERG, E.; NILSSON-EHLE, H.; SAMUELSSON, J.; TANGEN, J. M.; WINQVIST, I.; OBERG, G.; OSTERBORG, A.; OST, A. Treatment of anemia in myelodysplastic syndromes with granulocyte colony-stimulating factor plus erythropoietin: results from a randomized phase II study and long-term follow up of 71 patients. **Blood**, v. 92, p. 68-75, 1998.
- 76 GALANOPOULOS, A.; KRITIKOU-GRIVA, E.; GLICORI, J.; et al. Treatment of myelodysplastic syndrome with amifostine and its effect on hematopoiesis. **Blood**, v. 94, suppl, 1, abstr. 1367, p. 306a, 1999.



- 77 HOFMANN, M. K.; SEIPELR, G.; KALINA, U.; et al. Effect of treatment with amifostine used as single agent in patients with refractory anemia on clinical outcom and serum TNF $\alpha$  levels. **Blood** v. 94, suppl, 1, abstr. 1363, p. 305a, 1999.
- 78 SINGHAL, S.; MEHTA, J.; DESIKAN, R.; AYERS, D.; ROBERSON, P.; EDDLEMON, P.; MUNSHI, N.; ANAISSIE, E.; WILSON, C.; DHODAPKAR, M.; ZEDDIS, J.; BARLOGIE, B. Anti-tumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, p. 1565-1571, 1999.
- 79 RAZA A, LISAK L, ANDREWS C, et al: Thalodomide produces transfusión independence in patients with long-standing refractory anemias and myelodysplastic síndromes (SMD). **Blood**, v 94, suppl. 1, abstr 2935, p. 661a 1999.
- 80 YOUNG, N. S.; ALTER, B. P. **Aplastic anemia**: acquired and inherited. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994.
- 81 YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. **Massachusetts Med. Soc.**, v. 336, p. 1365-1372, 1997.
- 82 YOUNG, N. S. Acquired aplastic anemia. **JAMA**, v. 282, p.271-278, 1999.
- 83 YOUNG, N. S. The aetiology of acquired aplastic anemia. **Rev. Clin. Exp. Hematol.**, v. 4, p. 236-259, 2000.
- 84 NAGEAN, Y. Anemies aplastiques. In: BRETON\_GORIUS, J.; REYES, F.; ROCHAN, H. et al. (Eds.). **L'Hematologie de Bernard Dreyfus**. Paris: Flammarion, 1992. p. 705-721.
- 85 CAMITTA, B. M.; SLYE, R. J. **Treatment of acquired aplastic anemia, advanced**. National Marrow Donor Program. Disponível em: <[http://www.marlow.org/MEDICAL/aplastic\\_anemia\\_advanced.html](http://www.marlow.org/MEDICAL/aplastic_anemia_advanced.html)>. Acesso em: 29 nov. 2004.

- 86 NISSEN, C. The pathophysiology of aplastic anemia. **Haematologica**, v. 14, p. 126-132, 1986.
- 87 PASSWEG, J. R. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. Has outcome improved? **Blood**, v. 90, p. 858-864, 1997.
- 88 BOTTIGER, L. E.; WESTERHOLM, B. Aplastic anemia and infectious hepatitis. **Acta Med. Scand.**, v. 192, p. 323-326, 1972.
- 89 HAGLER, L.; PASTORE, R. A.; BERGIN, J. J.; WRENSCH, M. R. Aplastic anemia following viral hepatitis: report of two fatal cases and literature review. **Medicine**, v. 54, p. 139-164, 1975.
- 90 BROWN, K. E.; TISDALE, J.; BARRETT, A. J.; DUNBAR, C. E.; YOUNG, N. S. Hepatitis-associated aplastic anemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, p. 1059-1064, 1997.
- 91 BARRETT, J.; SAUNTHARARAJAK, Y.; MOLLIDREEM J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: Distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? **Semin. Hematol.**, v. 37, n. 1, p. 15-29, 2000.
- 92 STORB, R.; THOMA, E. D.; BUCKNER, C. D.; CLIFT, R. A.; DEEG, H. J.; FEFER, A.; GOODELL, B. W.; SALE, G. E.; SANDERS, J. E.; SINGER, J.; STEWART, P.; WEIDEN, P. L. Marrow transplantation in thirty untransfused patients with severe aplastic anemia. **Ann. Intern. Med.**, v. 92, p. 30-36, 1980.
- 93 CHAMPLIN, R. E.; HOROWITZ, M. M.; VAN BEKKUM, D. W.; CAMITTA, B. M.; ELFENBEIN, G. E.; GALE, R. P.; GLUCKMAN, E.; GOOD, R. A.; RIMM, A. A.; ROZMAN, C. Graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: risk factors and treatment result. **Blood**, v. 73, p. 606-613, 1989.
- 94 FRICKHOFFEN, N.; ROSENFELD, S. J. Immunossuppressive treatment of aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporin. **Semin. Hematol.**, v. 37, p. 6-68, 2000.

- 95 MARSH, J. C. W. Results of Immunossupression in aplastic anemia. **Acta Haematol.**, v. 103, p. 26-32, 2000.
- 96 TICHELLI, A.; GRATWOHL, A.; NISSEN, C.; SPECK, B. Late clonal complications in severe aplastic anemia. **Leuk. Lymphoma**, v. 12, p. 167-175, 1994.
- 97 SOCIÉ, G.; GLUCKMAN, E. Cure from severe aplastic in vivo and late effects. **Acta Haematol.**, v. 103, p. 49-54, 2000.
- 98 DONEY, K. C.; WEIDEN, P. L.; BUCKNER, C. D.; STORB, R.; THOMAS, E. D. Treatment of severe aplastic anemia using antithymocyte globulin with or without an infusion of HLA haploidentical marrow. **Exp. Hematol.**, v. 9, p. 829-834, 1981.
- 99 DONEY, K.; DAHLBERG, S. J.; MONROE, D.; STORB, R.; BUCKNER, C. D.; THOMAS, E. D. Therapy of severe aplastic anemia with anti-human thymocyte globulin and androgens: the effect of HLA- haploidentical marrow infusion. **Blood**, v. 63, p. 342-348, 1984.
- 100 DONEY, K.; BUCKNER, C. D.; STORB, R.; MCGUFFIN, R.; WITHERSPOON, R.; DEEG, H. J.; APPELBAUM, F. R.; SULLIVAN, K. M.; THOMAS, E. D. Treatment of aplastic anemia with antithymocyte globulin, high-dose corticosteroids, and androgens. **Exp. Hematol.**, v. 15, p. 239-242, 1987.
- 101 DONEY, K.; PEPE, M.; STORB, R.; BRYANT, E.; ANASETTI, C.; APPELBAUM, F. R.; BUCKNER, C. D.; SANDERS, J.; SINGER, J.; SULLIVAN, K. Immunossuppressive therapy of aplastic anemia: results of a prospective, randomized trial of antithymocyte globulin (ATG), methylprednisolone, and oxymetholone to ATG, very high-dose methylprednisolone and oxymetholone. **Blood**, v. 79, p. 2566-2571, 1992.
- 102 DONEY, K.; STORB, R.; APPELBAUM, F. R.; BUCKNER, C. D.; SANDERS, J.; SINGER, J.; HANSEN, J. Á. Recombinant granulocyte-

- macrophage colony stimulating factor followed by immunosuppressive therapy of aplastic anemia. **Br. J. Haematol.**, v. 85, p. 182-184, 1993.
- 103 ROSENFELD, S. J.; KIMBALL, J.; VINING, D.; YOUNG, N. S. Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. **Blood**, v. 85, p. 3058-3065, 1995.
- 104 FRICKHOFEN, N.; KALTWASSER, J. P. Immunosuppressive treatment of aplastic anemia: a prospective, randomized multicenter evaluating antilymphocyte globulin (ALG) versus ALG and cyclosporine A. **Blut**, v. 56, p. 191-192, 1998.
- 105 SPECK, B. Allogeneic bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. **Semin. Hematol.**, v. 28, p. 319-321, 1991.
- 106 GLUCKMAN, E.; ESPEROU-BOURDEAU, H.; BARUCHEL, A.; BOOGAERTS, M.; BRIERE, J.; DONADIO, D.; LEVERGER, G.; LEPORRIER, M.; REIFFERS, J.; JANVIER, M. Multicenter randomized study comparing cyclosporine A alone and antithymocyte globulin with prednisone for treatment of severe aplastic anemia. **Blood**, v. 79, p. 2540-2546, 1992.
- 107 BACIGALUPO, A.; CHAPLE, M.; HOWS, J.; VAN LINT, M. T.; MCCANN, S.; MILLIGAN, D.; CHESSELLS, J.; GOLDSTONE, A. H.; OTTOLANDER, J.; VAN'T VEER, E. T. Treatment of aplastic anemia (AA) with antithymocyte globulin (ALG) and methylprednisolone (Mpred) with or without androgens: a randomized trial from the EBMT SAA working party. **Br. J. Haematol.**, v. 83, p. 145-153, 1993.
- 108 MARSH, J. C.; SOCIÉ, G.; SCHREZENMEIER, H.; TICHELLI, A.; GLUCKMAN, E.; LJUNGMAN, P.; MCCANN, S. R.; RAGHAVACHAR, A.; MARIN, P.; HOWS, J. M. Haemopoietic growth factors in aplastic anemia: a cautionary note. **Lancet**, v. 344, p. 172-176, 1994.

- 109 BACIGALUPO, A.; BROCCIA, G.; CORDA, G.; ARCESE, W.; CAROTENUTO, M.; GALLAMINI, A.; LOCATELLI, F.; MORI, P. G.; SARACCO, P.; TODESCHINI, G. Antithymocyte globulin, ciclosporin, and granulocyte colony-stimulating factor in patients with acquired severe aplastic anemia (SAA): a pilot study of the EBMT SAA`Working Party. **Blood**, v. 85, p. 1348-1353, 1995.
- 110 SPECK, B.; TICHELLI, A.; HARDER, F.; KISSLING, M.; WÜRSCH, A.; STEBLER, G. Y. S. I. C.; SIGNER, E.; BARGETZI, M.; ORTH, B.; GRATWOHL, A.; NISSEN, C. Splenectomy as an adjuvant measure in treatment of severe aplastic anemia. **Br. J. Haematol.**, v. 92, p. 818-824, 1996.
- 111 STORB, R.; ETZIONI, R.; ANASETTI, C.; APPELBAUM, F. R.; BUCKNER, C. D.; BENSINGER, W.; BRYANT, E.; CLIFT, R.; DEEG, H. J.; DONEY, K. Cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin in preparation for allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia. **Blood**, v. 84, p. 941-946, 1994.
- 112 GLUCKMAN, E.; SOCIÉ, G., DEVERGIE, A.; BOURDEAU-ESPEROU, H.; TRAINEAU, R.; COSSET, J. M. Marrow transplantation in 107 patients with severe aplastic anemia using cyclophosphamide and thoraco-abdominal irradiation for conditioning: long-term follow-up. **Blood**, v. 78, p. 2451-2455, 1991.
- 113 COLOMBANI, J. Mécanismes moléculaires de présentation de l'antigène par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. **Bull. Inst. Pasteur**, v. 89, p. 109-132, 1991.
- 114 THORSBY, E. The HLA molecules function and role in allorecognition. **Transplant. Proc.**, v. 26, suppl. 3, p. 1699-1701, 1994.

- 115 SAYEGH, M. H.; WATSCHINGER, B.; CARPENTER, C. B. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. **Transplantation**, v. 57, suppl. 9, p.1295-1302, 1994.
- 116 PAMER, E.; CRESSWELL, P. Mechanisms of MHC class I restricted antigen processing. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 323-358, 1998.
- 117 DELVES, P. J. & ROITT, I. M. The Immune System. **N. Eng. J. Med.**, v.343, n. 2, p.108-117.
- 118 LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. The CD28/B7 system of T cell costimulation. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 14, p. 233-258, 1996.
- 119 SALOMON, D. R. A molecular basis for transplantação immunity. In: RACUSEN, L. C.; SOLEZ, K.; BURDICK, J. F. **Kidney Transplant Rejection. Diagnosis and treatment**. New York: Marcel Dekker, chapt. 1, p.1-31, 1998.
- 120 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Complexo de histocompatibilidade principal e reconhecimento antigênico. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. pt. 2, cap. 4 e 5, p. 65-107.
- 121 PAYNE, R.; ROLFS, M. R. Fetomaternal leukocyte incompatibility. **J Clin Invest**, v. 37, p.756, 1958.
- 122 VAN ROOD, J. J.; EMISSE, J. G.; VAN LEEUWEN, A. Leukocyte antibodies in sera of pregnant women. **Nature**, v. 181, p. 1735, 1958.
- 123 DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. **Acta Haematol.**, v. 20, p. 156-166, 1958a.
- 124 DAUSSET, J. Iso-leuco-antibodies. **Vox Sang.**, v. 13, p. 40, 1958b.

- 125 PROPPER, D. J.; LEHENY, W. A.; URBANIAK, S. J.; CATTO, G.; MACLEOD, A. M. Lymphocytotoxins in sera from highly sensitized multiparous dialysis patients: antibody class, relationship with the HLA and with paternal antigens. **Clin. Sci.**, v. 80, suppl. 2, p. 87-93, 1991.
- 126 FREIREICH, E. J. Efectiveness of platelet transfusión in leucemia and aplastic anemia. **Transfusion**, v. 6, p. 50-54, 1966.
- 127 GRUMET, F. C.; YANKEE, R. A. Long-term platelet support of patients with aplastic anemia. Effect of splenectomy and steroid therapy. **Ann. Intern. Med.**, v. 73, p. 1, 1970.
- 128 SCORNIK, J. C.; IRELAND, J. E.; HOWARD, R. J.; PFAFF, W. W. Assessment of the risk for broad sensitization by blood transfusions. **Transplantation**, v. 37, p. 249-253, 1984.
- 129 YANKEE, R. A.; GRAFF, K. S.; DOWLING, R.; HENDERSON, E. S. Selection of unrelated compatible platelet donors by lymphocyte HLA mathing. **N. Engl. J. Med.**, v. 288, p..760-764, 1973.
- 130 NEUMANN, J. Avaliação imunológica pré-transplante. In: NEUMANN, J.; ABBUD FILHO, M.; DURO GARCIA, V. (Ed.) **Transplantes de órgãos e tecidos**. São Paulo: Sarvier, 1997. Cap. 2, p. 34-44.
- 131 OPELZ, G.; GRAVER, B.; TERASAKI, P. I. Induction of high kidney graft survival rate by multiple transfusions. **Lancet**, v. 1, p. 1223-1225, 1981
- 132 MCKENNA, R. M.; TAKEMOTO, S. K.; TERASAKI, P. I. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. **Transplantation**, v. 69, p. 319-325, 2000.

- 133 ZMIJEWSKI, C. Overview of detection and identification of HLA antibodies. In: NAKAEIA, A. (Ed.). **ASHI laboratory manual**. 3<sup>th</sup> ed. Lenexa: American Society of Histocompatibility and Immunogenetics, 1995. p.1.1-1.14
- 134 ZACHARY, A. A.; KLINGMAN, L.; THORNE, N.; SMERGLIA, A. R.; TERESI, G. A. Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. **Transplantation**, v. 60, p. 498-503, 1995.
- 135 SILVA, S. F. R.; SILVA, S. L.; CAMPOS, H. H. Reatividade contra painel de linfócitos em candidatos a transplante renal. In: CRUZ, J.; BARROS, R. T.; CRUZ, H. M. M. (Ed.). **Atualidades em nefrologia 5**. São Paulo: Sarvier, 1998. p.31-339.
- 136 KERMAN, R. H.; SUSSKIND, B.; BUELOW, R.; REGAN, J.; POULETTY, P.; WILLIAMS, J.; GEROLAMI, K.; KERMAN, D. H.; KATZ, S. M.; VAN BUREN, C. T.; KAHAN, B. D. Correlation of ELISA-detected IgG and IgA anti-HLA antibodies in in pretransplant sera with renal allograf rejection. **Transplantation**, v. 62, p. 201-205, 1996.
- 137 BUELOW, R.; MERCIER, I.; GLANVILLE, L.; REGAN, J.; ELLINGSON, L.; JANDA, G.; CLAAS, F.; COLOMBE, B.; GELDER, F.; GROSSE-WILDE, H. Detection of panel reactive anti-HLA class I antibodies by enzyme linked immunoabsorbent assay or lymphocytotoxicity: results of a blinded, controlled, multicenter study. **Hum. Immunol.**, v. 44, p. 1-11, 1995.
- 138 SCORNIK, J. C.; BRUNSON, M. E.; HOWARD, R. J.; PFAFF, W. W. Alloimmunization, memory, and the interpretation of crossmatch results for renal transplantation. **Transplantation**, v. 54, p. 389-394, 1992.
- 139 MURPHY, M. F.; WATERS, A. H. Immunological aspects of platelet transfusions. **Br. J. Haematol.**, v. 60, p. 409-414, 1985.



- 140 HOWARD, J. E.; PERKINS, H. A. The natural history of alloimmunization to platelets. **Transfusion**, v. 18, p. 496, 1978.
- 141 SCHIFFER, C. A.; DUTCHER, J. P.; HOGGE, D. E.; et al. Histocompatible platelet transfusion for patients with leukemia. **Plasma Ther Trans Technol.**, v.3, p.273, 1982a.
- 142 SCHIFFER, C. A.; SLICHTER, S. V: Platelet transfusion from single donors. **N. Engl. J. Med.**, v. 307, p. 245, 1982b.
- 143 SIVERGLEID, A. J. Clinical platelet transfusion. In: SILVER, H (Ed): **Blood, blood compenents and derivatives in transfusion therapy**. Washington DC: American Association of Blood Banks, 1980.p. 45-88.
- 144 COTTLER-FOX, M. Transfusions. In: BURT, R. K.; DEEG, H. J.; LOTHIAN, S. T.; SANTOS, G. W (Ed.). **Bone arrow transplantation**. ! ed. New York: Landes, 1996. p.54-68
- 145 SCHIFFER, C. A.; AISNER, J.; WIERNIK, P. H. Platelet transfusion therapy for patients with leukemia. In: GREEWALT, T. J.; JAMIESON, G. A. (Eds.). **The blood platelet in transfusion therapy**. New York: Liss, 1978. p.267.
- 146 DALY, P. A.; SCHIFFER, C. A.; AISNER, J.; WIERNIK, P. H. One-hour porttransfusion increments are valuable in predicting the need for HLA-matched preparations. **JAMA**, v. 243, suppl. 5, p 435-438, 1980.
- 147 KICKLER, T. S. Platelet immunology. In: ANDERSON, K.; NESS, P. M. (Eds.). **Scientific basis of transfusion medicine**. Philadelphia: WB Saunder, 1994. p.304

- 148 PAULA, G. G.; NOVARETTI, M. C.; POZZI, D. H. B.; CHAMONE, D. A. F. Study of the platelet refractiriness in patients submitted to bone marrow transplant from day 0 to day 50. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 26, n. 1, p. 3-12, 2004.
- 149 DUTCHER, J. P.; LINHXTENFELD, J. L.; WIERNIK, P. H. Long-follow-up of patients with leukemia receiving platelet transfusions: identification of a large group of patients who do not become alloimmunized. **Blood**, v. 58, p. 1007-1011, 1981.
- 150 DUTCHER, J. P.; SCHIFFER, C. A.; AISNER, J.; WIERNIK, P. H. Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of a dose-response relationship. **Blood**, v. 57, p. 395-398, 1981.
- 151 MUELLER-ECKHARDT, C. Histokompatibilität und Thrombozytentransfusion. **Blut**, v. 34, p. 261-270, 1980.
- 152 LANGENSCHIEDT, F.; KIEFEL, V.; SANTOSO, S.; MUELLER-ECKHARDT, C. Platelet Transfusion refractoriness associated with two rare platelet-specific alloantibodies ( anti-Bak<sup>a</sup> and anti-PL<sup>A2</sup>) and multiple HLA antibodies. **Transfusion**, v. 28, p. 597-600, 1988.
- 153 KICKLER, T. S.; KENNEDY, S. D.; BRAINE, H. G. Alloimmunization to platelet specific antigens on glycoprotein IIb-IIIa and Ib/IX in multitransfused thrombocytopenic patients. **Transfusion**, v. 30, p. 622, 1990.
- 154 NOVOTNY, V. M. J.; VAN DOORN, R.; WITVLIET, M. D.; CLAAS, F. H. J.; BRAND, A. Occurrence of allogeneie HLA and non-HLA antibodies after transfusion of prestorage filtered platelets and red blood cells: a prospective study. **Blood**, v. 85, n. 7, p. 736-741, 1995.

- 155 SANZ, C.; FREIRE, C.; ALCORTA, I.; ORDINAS, A.; PEREIRA, A. Platelet-specific antibodies in HLA-immunized patients receiving chronic platelet support. **Transfusion**, v. 41, n. 6, p. 762-765, 2001.
- 156 PEGELS, J. G.; BRUYNES, E. C. E.; ENGELFRIET, C. P.; Von dem BORNE, A. E. Sorological studies in patients on platelet and granulocyte substitution therapy. **Br. J. Haematol.**, v. 52, p. 59-68, 1982.
- 157 KLEIN, C. A.; BLAJCHMAN, M. A. Alloantibodies and platelet destruction. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 8, p. 105, 1982.
- 158 SIRCHIA, G.; PARRAVICINI, A.; REBULLA, P.; GREPPI, N.; SCALAMOGNA, M.; MORELATI, F. Effectiveness of red blood cells filtered through cotton wool to prevent (antileukocyte antibody production in multitransfused patients). **Vox Sang.**, v. 42, p. 190-197, 1982.
- 159 MURPHY, M. F.; METCALFE, P.; THOMAS, H.; EVE, J.; ORD, J.; LISTER, T. A.; WATERS, A. H. Use of leucocyte-poor blood components and HLA-matched-platelet donors to prevent HLA alloimmunization. **Br. J. Haematol.**, v. 62, p. 529-534, 1986.
- 160 ANDREU G, DEWAILLY J, LEBERRE C.; QUARRE MC; BIDET ML; TARDIVEL R; DEVERS L; LAM Y; SOREAU E; BOCCACCIO C. Prevention of HLA immunization with leucocyte-poor packed red cell and platelet concentrates obtained by filtration. **Blood**, v. 72, n. 3, p. 964-969, 1988.
- 161 OKSANEN, K.; KEKOMAKI, R.; RUUTU, T.; KOSKIMIES, S.; MYLLYLA, G. Prevention of alloimmunization in patients with acute leukemia by use of white cell-depleted blood components-a randomized trial. **Transfusion**, v. 31, n. 7, p. 588-594, 1991.

- 162 WILLIAMSON, L. M.; WIMPERIS, J. Z.; WILLIAMSON, P.; COPPLESTONE, J. A.; GOOI, H. C.; MORGENSTERN, G. R.; NORFOLK, D. R. Bedside filtration of blood products in the prevention of HLA alloimmunization – a prospective randomized study. Alloimmunisation study Group. **Blood**, v. 83, n. 10, p. 3028-3035, 1994.
- 163 SINTNICOLAAS, K.; VAN MARWIJK KOOIJ, M.; VAN PROOIJEN, H. C.; VAN DIJK, B. A.; VAN PUTTEN, W. L.; CLAAS, F. H.; NOVOTNY, V. M.; BRAND, A. Leukocyte depletion of random single-donor platelet transfusions does not prevent secondary human leukocyte antigen-alloimmunization and refractoriness: a randomized prospective study. **Blood**, v. 85, n. 3, p. 824-828, 1995.
- 164 ISHIDA, A.; HANDA, M. [The efficacy of leukodepleted platelet transfusion]. **Nippon Rinsho**, v. 55, n. 9, p. 2385-2391, 1997.
- 165 SLICHTER, S. J. Platele refractoriness and alloimmunization. **Leukemia**, v. 12, suppl. 1, p. 51-53, 1998.
- 166 PIETERSZ, R. N.; VAN DER MEER, P. F.; SEGATCHIAN, M. J. Update on leucocyte depletion of blood components by filtration. **Transf. Sci.**, v. 19, suppl. 4, p. 321-328, 1998.
- 167 TARDIF, G. N.; MCCALMON Jr., R. T. Successful renal transplantation in the presence of donor specific HLA IgM antibodies. **Transplant. Proc.**, v. 27, n. 1, p. 664-665, 1995.
- 168 DUQUESNOY, R. J.; MARRARI, M. Determination of HLA-A,B residue mismatch acceptability for kidneys transplanted into highly sensitized patients. **Transplantation**, v. 63, n. 12, p. 1743-1751, 1997.

- 169 HOWARD, J. E.; PERKINS, H. A. The natural history of alloimmunization to platelets. **Transfusion**, v. 18, p. 496-503, 1978.
- 170 SPECK, B.; GLUCKMAN, E.; HAAK, H. L.; Van ROOD, J. J. Treatment of aplastic anemia with ALG with or without marrow infusion. **Lancet**, v. 2, p. 1145-1148, 1977.
- 171 FRICKHOFEN, N.; KALTWASSER, J. P.; SCHREZENMEIER, H.; RAGHAVACHAR, A.; VOGT, H. G.; HERRMANN, F.; FREUND, M.; MEUSERS, P.; SALAMA, A.; HEIMPEL, H. Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin and methylprednisolone with or without cyclosporine. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 1297-1304, 1991.
- 172 ROSENFELD, S. J.; KIMBALL, J.; VINING D.; YOUNG, N. S. Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. **Blood**, v. 85, p. 3058-3065, 1995.
- 173 CAMPOS, H. H. **Freqüência de antígenos e genes HLA em amostra de população do Ceará**. 1998, Fortaleza. Tese para fins de concurso para provimento de cargo de professor titular de Clínica Médica - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.
- 174 TERASAKI, P. I.; MICKEY, M. R.; YAMASAKI, J. N.; VREDEVOE, D. L. Maternal-fetal incompatibility. I. Induction of HLA antibodies and possible association with congenital anomalies. **Transplantation**, v. 9, p. 538-543, 1970.
- 175 KEKOMÄKI, S.; VOLIN, L.; KOISTINEN, P.; KOIVUNEN, E et al. Successful treatment of platelet transfusion refractoriness: the use of platelet transfusions matched for both human leukocyte antigens (HLA) and human platelet

- alloantigens (HPA) in alloimmunized patients with leukaemia. **Eur. J. Haematol.**, v. 60, p. 112-118, 1998.
- 176 CONTRERAS, M. Diagnosis and treatment of patients refractory to platelet transfusions. **Blood Rev.**, v. 12, p. 215-221, 1998.
- 177 DAUSSET, J.; NENNA, A.; BRECY, H. Leucoagglutinins. **Blood**, v. 9, p. 696, 1954.
- 178 PAYNE, R.; ROLFS, M. R. Fetomartenal leucocyte incompatibility. **J. Clin. Invest.**, v. 37, p. 1756, 1958.
- 179 BRAND, A.; CLAAS, F. H. J.; VOOGT PJ, et al. Alloimmunization alter leukocyte-depleted multiple random donor platelet transfusión. **Vox Sang.**, v. 54, p. 160-166, 1988.
- 180 CASTLE , S. Clinical relevance of agerelated immune dysfunction. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, p. 578, 2000.
- 181 GLOBERSON, A.; EFROS, R. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. **Immunol. Today**, v. 21, p. 515, 2000.
- 182 GINALDI, L.; LORETO, M. F.; CORSI, M. P.; MODESTI, M.; DE MARTINIS, M. Immunosenescence and infectious diseases. **Microbes Infect.**, v. 3, n. 10, p. 851-857, 2001.
- 183 AISNER, J. Clinical use of platelet transfusions for patients with cancer. In: SCHIFFER, C. A (Ed.). **Platelet physiology and transfusion**. Washington, DC: American Association of Blood Banks, 1978. p. 39.
- 184 MURPHY, M. F.; WALLINGTON, T. B.; KELSEY, P.; BOULTON, F.; BRUCE, M.; COHEN, H.; DUGUID, J.; KNOWLES, S. M.; POOLE, G.; WILLIAMSON,

- L. M. Guidelines for the clinical use of red cell transfusions. **Br. J. Haematol.**, v. 113, p. 24-31, 2001.
- 185 ALVARADO, J.; DJERASSI, I.; FARBER, S. Transfusión of fresh concentrated platelets to children with acute leucemia. **J. Pediatr.**, v. 67, p. 13-22, 1965.
- 186 CAVINS, J. A.; FARBER, S.; ROY, A. J. Transfusión of fresh platelet concentrates to adult patients with thrombocytopenia. **Transfusion**, v. 8, p. 24-27, 1968.
- 187 STORB, R.; THOMAS, E. D.; BUCKNER, C. D.; CLIFT, R. A.; DEEG, H. J.; FEFER, A.; GOODELL, B. W.; SALE, G. E.; SANDERS, J. E.; SINGER, J.; STEWART, P.; WEIDEN, P. L. Marrow transplantation in thirty "untransfused" patients with severe aplastic anemia. **Ann. Inter. Med.**, v. 92, p. 30-36, 1980.
- 188 CHAMPLIN, R. E.; HOROWITZ, M. M.; VANBEKKUN, D. W.; CAMITTA, B. M.; ELFENBEIN, G. E.; GALE, R. P.; GLUCKMAN, E.; GOOD, R. A.; RIMM, A. A.; ROZMAN, C. Graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: risk factors and treatment results. **Blood**, v. 73, p. 606-613, 1989.
- 189 SNIECINSKI, I.; O'DONNELL, M. R.; NOWICKI, B.; HILL, L. R. Prevention of refractoriness and HLA-alloimmunization using filtered blood products. **Blood**, v. 71, p. 1402, 1988.
- 190 SAARINEN, U. M.; KEKOMÄKI, R.; SIIMES, M. A.; MYLLYLÄ, G. Effective prophylaxis against platelet refractoriness in multitransfused patients by use of leukocyte-free blood components. **Blood**, v. 75, p. 512, 1990.
- 191 VAN MARWIJK-KOOY, M.; VAN PROOIJEN, H. C.; MOES, M.; BOSMA-STANTS, I.; AKKERMAN, J. W. N. Use of leukocyte-depleted platelet concentrates for the prevention of refractoriness and primary HLA

- alloimmunization: a prospective, randomized trial. **Blood**, v. 77, p. 201-205, 1991.
- 192 KAO, K. J.; SCORNIK, J. C. Achúrate quantitation of the low number of white cells in white cell-depleted blood components. **Transfusion**, v. 29, p. 774-777, 1989.
- 193 KICKLER, T. S.; BELL, W.; NESS, P. M.; DREW, H.; PALL, D. Depletion of white cells from platelet concentrates with a new adsorption filter. **Transfusion**, v. 29, p. 411-414, 1989.
- 194 VAN PROOYEN, H. C.; VAN MARWIJK-KOOY, M.; VAN WEELDEN, H.; AARTS-RIEMENS, M. I.; BORGHUIS, L.; AKKERMAN, J. W. N. Evaluation of a new UVB sauce for irradiation of platelet concentrates. **Br. J. Haematol.**, v. 75, p. 573, 1990.
- 195 SCHIFFER, C. A.; DUTCHER, J. P.; AISNER, J.; HOGGE, D.; WIERNIK, P. H.; REILLY, J. P. A randomized trial of leucocyte-depleted platelet transfusión to modif. Alloimmunization in patients with leucemia. **Blood**, v. 62, p. 815-820, 1983.
- 196 YANKEE, R. A.; GRUMET, F. C.; ROGENTINE, G. M. Platelet transfusión therapy. The selection of compatible platelet donors for refractory patients by lymphocyte HLA typing. **N. Engl. J. Med.**, v. 281, p. 1208-1212, 1969.



## Anexos

---

**ANEXO A**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar do estudo de pesquisa de livre e espontânea vontade.

**Estudo Comparativo da Incidência dos Anticorpos Anti-HLA de Classe I nos Pacientes Portadores de Anemia Aplástica e Síndrome Mielodisplástica.**

Leia atentamente as informações abaixo e faça todas as perguntas que desejar para que as informações fiquem bem entendidas.

Responsáveis:

- Pesquisadora: Dra. Daisy Maria Meireles Arruda,
- Orientador: Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu,

Eu \_\_\_\_\_, prontuário número \_\_\_\_\_, estou concordando em participar deste estudo de pesquisa que vai ser realizado pela Dra. Daisy de livre e espontânea vontade.

Estou de acordo com os itens relacionados abaixo:

1. No dia em que eu comparecer ao laboratório de hematologia para realizar exames de rotina, colherei uma amostra extra de sangue (tubo com 5 ml de sangue total) para participar do estudo da Dra. Daisy.
2. Estou ciente que poderá ser necessário colher uma segunda amostra de sangue total (5ml ).
3. Estou ciente que não vou ter nenhum prejuízo financeiro.
4. Estou de acordo que o resultado da pesquisa de anticorpos não vai interferir no meu tratamento até que sua utilidade tenha sido comprovada
5. Obtive todas as explicações necessárias para decidir se desejo ou não participar dessa pesquisa.

6. Estou sabendo que posso deixar de participar do estudo a qualquer momento sem ter que dar explicações e que não vai atrapalhar meu tratamento.
7. Estou ciente que o resultado do exame será mantido em completo sigilo e que meu médico assistente terá acesso ao resultado.
8. Caso eu tenha algum problema relacionado ao estudo de ordem médica posso procurar o ambulatório de Hematologia no HEMOCE ou contactar a Dra. Daisy pelos telefones 3261 25 93 (Residência), 3281 58 10 (laboratório de HLA) ou celular 9996 36 23.
9. Caso eu tenha algum problema com o estudo que estou participando entrarei em contato com a secretaria da Comissão de Ética (fone 4001.9330) para reclamação.

Fortaleza, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_

---

Assinatura do Paciente

---

Assinatura do Acompanhante



**ANEXO B**

**FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE**

**Paciente:** \_\_\_\_\_

**Data do Nascimento:** \_\_\_\_\_

**Gênero:** \_\_\_\_\_

**Grupo Sanguíneo:** \_\_\_\_\_ **Fator Rh:** \_\_\_\_\_

**Nº Prontuário:** \_\_\_\_\_

**Endereço:** \_\_\_\_\_

**Telefone para contato:** \_\_\_\_\_

**Diagnóstico:** \_\_\_\_\_

**OBS:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE**

**Paciente:** \_\_\_\_\_

**Data do Nascimento:** \_\_\_\_\_

**Gênero:** \_\_\_\_\_

**Grupo Sanguíneo:** \_\_\_\_\_ **Fator Rh:** \_\_\_\_\_

**Nº Prontuário:** \_\_\_\_\_

**Endereço:** \_\_\_\_\_

**Telefone para contato:** \_\_\_\_\_

**Diagnóstico:** \_\_\_\_\_

**OBS:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**ANEXO C**  
**DADOS DA HISTÓRIA CLÍNICA**

Paciente: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

Tempo de Doença: \_\_\_\_\_

Medicação: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Transfusões? ( ) NÃO ( ) SIM. Reação transfusional? ( ) NÃO ( ) SIM.

Quantas:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Tipos de transfusão:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Tipos de concentrados sanguíneos:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Concentrados Disleucotizados: ( ) NÃO ( ) SIM.**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



*Daisy Maria Meireles Arruda*