

VERA LÚCIA MEDEIROS DE ALMEIDA

- ELUIÇÃO DE ANTICORPOS -

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE

DON, ÉTER E CALOR

TRABALHO APRESENTADO COMO REQUISITO
FINAL AO CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA,
CONVÊNIO UFC-MEC-DIO III

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - CEARÁ

1987

À Dra. Mafisa Fujita.

Minha eterna gratidão por todo o bem que me fez, lutando, lado a lado, em função deste trabalho de pesquisa.

Que o Altíssimo se digne de dar Sua benção sobre este trabalho que comungamos com muito amor e dedicação e possamos conseguir novos horizontes com futuras descobertas tão necessárias quão urgentes em prol da humanidade.

Um beijo da aluna

Vera Lúcia Medeiros de Almeida

O meu agradecimento mui especial aos ilustres Doutores:

- José Amauri Soares;
- Lisieux Neves;
- Vilany Franco Pereira da Silva e
- Mirna de Moura Gondim pela inestimável colaboração com que me prestigiaram neste trabalho.

Um abraço sincero da
Vera Lúcia Medeiros de Almeida

Aos ilustres mestres Doutores:

- Murilo Martins;**
- Helena Pitombeira;**
- Neuma Cunha, que, com suas sábias lições, pródigas em experiências, me transmitiram sadias diretrizes para conduzir a difícil tarefa de sondar os provocadores dos males humanos, minha gratidão sincera.**

Vera Lúcia Medeiros de Almeida

- ELUIÇÃO DE ANTICORPOS -

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DCM, ÉTER E CALOR *

VERA LÚCIA MEDEIROS DE ALMEIDA **

R E S U M O

Neste trabalho comparamos resultados obtidos através de três métodos de eluição (DCM, Éter e Calor) e verificamos a superioridade do DCM em relação aos outros dois, pois possibilita uma melhor recuperação e identificação de anticorpos. Estes resultados, quando comparados com a literatura internacional são bastantes similares.

* Trabalho realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

** Farmacêutica Bioquímica do Hospital Geral de Fortaleza (INAMPS) e do Hospital Cura D'Ars.

Í N D I C E

01. INTRODUÇÃO	01
02. MATERIAL E MÉTODOS	05
03. RESULTADOS	06
04. DISCUSSÃO	08
05. CONCLUSÃO	11
06. SUMMARY	12
07. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

1. INTRODUÇÃO

A demonstração dos primeiros anticorpos de grupos sanguíneos, se justapõe à descoberta do sistema ABO em 1900 por Landsteiner, que incitado pelos trabalhos de Sandois em 1875 e reconhecendo as diferenças entre espécies, através do mais simples plano de trabalho permitiu o contato entre entrócitos e soros de diferentes indivíduos, fazendo, assim, a maior descoberta no campo da Imunohematologia: os antígenos e anticorpos do sistema ABO (14, 22, 25, 28).

Mais de 20 anos se passaram, quando em 1927 ocorreu a Landsteiner e Levine que eles eram capazes de revelar outros antígenos de grupos sanguíneos, injetando coelhos com eritrócitos humanos. Os anticorpos obtidos identificaram 3 novos antígenos humanos: M, N e P (2, 3, 4, 24).

Anticorpos demonstrando o polimorfismo Rh no homem foram descobertos de 2 maneiras diferentes: Landsteiner e Weiner (1940-1941), injetaram entrócitos de macaco Rhesus em coelhos e testaram o soro resultante contra entrócitos humanos. Entrementes, Levine e Stetson (1939) descobriram um anticorpo (que subsequentemente provou ser anti-Rh) no soro de uma mulher que tinha parido recentemente um feto morto (8, 12).

Entre 1946 e 1967 os sistemas de grupos sanguíneos Kell, Duffy, Diego, Cartwright, Xg, Dombrock e Colton (26) foram descobertos, em cada caso, com o uso do teste de aglutinação indireta (35), todos eles através de DHRN (23) ou provas cruzadas incompatíveis.

Com a evolução tecnológica, a transfusão de sangue ganhou espaço na medicina e seu uso como não poderia deixar de ser, veio evidenciar suas complicações precoces e tardias, preocupando sobremaneira aqueles que lidam com mais pro

ximidade com esse problema - os imunohematologistas. Logo ficou claro os malefícios e os riscos da terapêutica inerentes a qualquer medida transfusional terapêutica, dentre outros aqueles relacionados à injeção de antígenos estranhos com a subsequente formação de anticorpos (19, 29, 30). Se por um lado, na transfusão terapêutica raciocinarmos utopicamente com a possibilidade de transfundir sangue com mesmo fenótipo do receptor, no que tange à transfusão feto-materno isso é inevitável. Ao contrário, os esforços têm que ser direcionados no sentido de uma conduta profilática e um acompanhamento criterioso de gestantes e recém-nascidos, com um aparato técnico-científico capaz de detectar os fatores envolvidos na DHRN e assegurar uma escolha correta e apropriada na eventualidade de uma transfusão de troca, de um produto sanguíneo, isento do anticorpo que está causando tal enfermidade (21).

Um terceiro problema de importância relevante ligado à agressão de eritrócitos por anticorpos séricos, está relacionado à anemia hemolítica auto-imune em que o indivíduo, por mecanismos diversos, passa a formar anticorpos contra seus próprios antígenos (17, 33). Este é um problema crucial para o imunohematologista, pois a decisão precisa na escolha do sangue é crítica para o paciente e deve-se ter critérios rígidos nesta determinação, necessitando-se de lançar mão de técnicas mais sofisticadas.

Desta maneira, fazem-se necessários desenvolvimentos profundos na área da identificação de anticorpos de grupos sanguíneos, tornando-se inevitável uma compreensão mais extensa da natureza da reação antígeno/anticorpo (30).

Na sorologia de grupos sanguíneos, a interação entre os antígenos eritrocitários e o anticorpo correspondente é normalmente detectada pela observação de aglutinação específica dos eritrócitos (38). A reação fundamental é simples

mente a combinação de antígenos com anticorpos a qual pode ou não ser seguida por aglutinação.

Antígenos e anticorpos não formam pontes covalentes. Ao contrário, a natureza complementar das estruturas correspondentes no AG e AC, capacita os determinantes antigênicos a ficarem em uma estreita aposição com o sítio de ligação na molécula do anticorpo e então antígeno e anticorpo podem se manter juntos por pontes intermoleculares relativamente fracas. Estas pontes incluem: cargas opostas de grupos iônicos, pontes de hidrogênio, pontes hidrofóbicas e forças de Van Der Waals (13, 17).

O conhecimento dos efeitos destas várias condições físicas na fixação do anticorpo, pode ser útil para o imunohematologista, pois desde que a combinação do AC com seu AG é uma reação química reversível, uma alteração destas condições pode resultar na liberação do AC (13). Sob condições adversas, o complexo AG-AC se quebrará e o AC será liberado no meio circundante (eluato) (33)

Portanto, a eluição é um método pelo qual o AC que já tinha formado o complexo AG-AC com o AG correspondente é liberado e recuperado (9, 10). A adsorção pode ter sido "in vivo" (Por exemplo: auto-imune) ou "in vitro" e existem várias razões para se realizar uma eluição (35):

- 1) demonstrar e identificar o AC nos eritrócitos da criança com DHPN se o soro da mãe é inacessível, o eluato pode ser usado para as provas de compatibilidade de exsangüineo-transfusão (15).

- 2) para demonstrar e identificar o AC que está produzindo um teste de Coombs positivo na anemia hemolítica adquirida ou em suspeitas de reação transfusional (7).

- 3) para produzir pequenas quantidades de preparações de AC isoladas após a mistura de AC ter sido separa-

da por adsorção às células de fenótipo apropriado.

4) para liberar eritrócitos de AC adsorvidos (geralmente auto-AC, ativo a frio), deixando-os assim disponíveis para testes posteriores ou para auto-absorção de soro.

5) para demonstrar que, células adsorveram um AC e conseqüentemente possuem o AG, apesar de não aglutinarem com o AC correspondente. Isto geralmente é feito com AG fraco do sistema ABO.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas ao longo dos anos, na tentativa de se alcançar a melhor qualidade na liberação de anticorpos adsorvidos.

Este trabalho portanto se propõe a um estudo comparativo de 3 técnicas diferentes, no sentido de se investigar a eficácia de cada uma em particular, e de se obter informações próprias de nossa experiência de trabalho e uma adaptação satisfatória ao nosso meio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 03 amostras de hemácias de pacientes portadores de AHAI por auto-anticorpos quentes e 10 amostras de hemácias sensibilizadas por alo-anticorpos quentes "in-vitro".

Foram preparados eluatos de 3 amostras simultaneamente, em igual quantidade de células sensibilizadas e testadas pelos três métodos de eluição:

- 1) **DCM - Dichloromethane** - CH_2Cl_2 , bp 39,75C
S.S. Ellisor, L. Papenfus, E. Sugawara, and
R. Azzi. ARC Blood services, Central California
Region, San José, CA (11).
- 2) **ÉTER** - éter etílico anidro (31)
Técnica modificada por Marsh.
- 3) **CALOR** - Técnica de Landsteiner - Miller (16)

Tentativas foram feitas para recuperar estes anticorpos por eluição e identificá-los através de um painel de hemácias (procedência Santa Catarina, contendo 12 hemácias tipo 0+, com antígenos de maior significância clínica) (1, 5) e a seguir, testes de anti-gama globulina humana (procedência biotest) (18, 37).

3. RESULTADOS

Das 13 amostras examinadas, em 8 delas (He - 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12), a técnica de eluição pelo DCM mostrou-se superior na recuperação e na identificação dos anticorpos.

Na hemácia nº (13) houve melhor recuperação dos AC pela técnica do DCM, mas, em nenhum dos métodos foi possível a identificação dos mesmos.

Nas He (1, 2, 5, 7) a técnica, pelo DCM foi semelhante à do éter. Em todas as amostras, ambas as técnicas (DCM e ÉTER) mostraram-se superiores à técnica de Landsteiner (calor).

(Vide tabela I anexa).

**TABELA I - COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES TÉCNICAS
DE ELUIÇÃO E INTENSIDADE DE RECUPERAÇÃO
DOS ANTICORPOS.**

HEMÁCIAS	MÉTODO	CALOR	ÉTER	DCM	MÉTODO	ANTICORPOS
1		+ 3	+ 4	+ 4		anti - D
2		0	+ 4	+ 4		anti - D
3		+ 1	+ 3	+ 4		anti - D
4		+ 1	+ 2	+ 3		anti - D
5		+ 2	+ 4	+ 4		anti - CD
6		+ 3	+ 3	+ 4		anti - CD
7		0	+ 4	+ 4		anti - CDE
8		0	+ 1	+ 4		anti - CDE
9		0	+ 3	+ 4		anti - c
10		0	+ 1	+ 3		anti - K
11	*	+ 1	+ 2	+ 4		anti - c
12	*	0	+ 1	+ 4		anti - e
13	*	+ 2	+ 3	+ 4		inespecífico

* Hemácias de pacientes portadores de anemia hemolítica auto imune (AHA1)

4. DISCUSSÃO

Diversos métodos de eluição de anticorpos têm sido usados em imunohematologia por muitos anos, utilizados de modo diferente pelos diversos laboratórios de referência, segundo sua experiência própria. Os métodos mais populares têm sido: o calor, a utilização de álcool, éter, ácido e, desde 1982, a utilização do DCM (diclorometano) (11). Na presente pesquisa, tivemos como objetivo a comparação de 3 destes métodos (calor, éter e DCM) com relação à sua eficácia no que diz respeito à recuperação de anticorpos.

Surpreendentemente, encontramos poucos trabalhos comparativos na literatura. Hughes Jones et alli realizaram um trabalho comparativo em 1963, relacionando os méritos do método de Landsteiner e Miller (1925) (16) (eluição pelo calor), com aqueles de eluição pelo éter (Rubin, 1963) (31), pelo álcool (Weiner, 1957) e com métodos de eluição ácida. Hughes Jones defende os métodos de eluição ácida como os melhores na recuperação de anticorpos, mas deve-se salientar que o mesmo estudou apenas anticorpos anti-D, não estudando outros especificidades que podem apresentar resultados bem diversos.

Os diversos autores concordam que a eluição pelo calor (apesar das modificações sugeridas por Marsh, 1977), produz um eluato bem mais fraco que o encontrado através da eluição pelo éter. Sublinham-se, porém, as grandes desvantagens do éter: tendência a ferver durante o aquecimento e a possibilidade de explosão.

Outra desvantagem é a insensibilidade do método para eluir Anti-Ss (Bueno, 1979), além do risco de criar hábito na aspiração do éter no pessoal técnico do laboratório.

Na presente pesquisa confirmamos a superiorida-

de do éter em relação à eluição pelo calor, notando-se uma nítida supremacia na recuperação dos anticorpos e na qualidade do eluato. A técnica de eluição pelo DCM, porém, mostrou-se em nosso trabalho incontestavelmente superior aos outros 2 métodos, tanto na recuperação de anticorpos conhecidos em hemácias previamente bloqueadas, como na identificação de anticorpos no eluato de pacientes portadores de A.H.A.I. (20, 27, 34)

Em relação à técnica de eluição (36) pelo Diclorometano (DCM), diversos pesquisadores já demonstraram sua superioridade em relação a outras técnicas. Ellisor e colaboradores (11), em 1982, demonstraram que o DCM fornecia eluatos superiores, ou no mínimo iguais em qualidade, àqueles fornecidos pelas técnicas do éter, xylene, clorofórmio e outras em no mínimo 58,8% das amostras testadas (32). Em todos os casos testados (sejam de hemácias sensibilizadas "in vivo" por auto anticorpos ou bloqueadas "in vitro") o DCM fornece eluatos com uma quantidade de anticorpos demonstrável e aceitável.

Tal fato foi nitidamente reproduzido em nosso trabalho (vide tabela I anexa). A eluição pelo DCM mostrou uma maior capacidade de recuperação de anticorpos, possibilitando assim uma melhor caracterização dos mesmos.

Aliando-se a isto o menor consumo de tempo na realização do método, a facilidade de seu emprego e os custos financeiros reduzidos, temos no DCM uma excelente opção técnica e financeira. Uma única ressalva deve ser feita quanto à tendência à fervura do material, quando aquecido a 56°C, tendência esta facilmente interrompida, retirando-se o tubo do banho-maria. Por outro lado, o DCM não requer precauções especiais para estocagem, podendo ser mantido à temperatura ambiente sendo seu emprego mais seguro do que o do éter ou do xylene, por exemplo.

Por tudo isto, cremos que o DCM deve ser intro-

duzido nos diversos laboratórios especializados, bancos de sangue e hemocentros como a técnica de escolha para a realização de eluatos (6).

O número de amostras estudadas foi pequeno, devido à exiguidade de tempo, a de pacientes portadores de AHA e a de anti-sôros específicos para a sensibilização das hemácias "in vitro".

No entanto, pretendemos, para o futuro, aumentar a amplitude da pesquisa a fim de conseguir maior consistência nos resultados, que apesar de obtidos em um universo restrito foram semelhantes aos descritos na literatura internacional.

5. CONCLUSÃO

A eluição de anticorpos eritrocitários é um recurso imunohematológico extremamente importante. A qualidade e quantidade dos anticorpos eluídos são fatores críticos para uma boa identificação e conseqüentemente dependem da melhor técnica utilizada.

Concluimos que:

- a) A eluição pelo DCM é superior à do éter e do calor, mais econômica, de fácil execução e é realizada em tempos mais curtos.
- b) A eluição pelo éter embora seja satisfatória e superior à do calor, tem possibilidade de ebulição a 56°C e o perigo de explosão.
- c) A eluição pelo calor é menos sensível que as demais.

6. SUMMARY

In the present work, we tried to demonstrate the superiority of one elution method (DCM) in relation to the others (Heat and ether methods). Our results showed a net superiority of the firstone, allowing a better recuperation of antibodies. We compared our findings with those related in the international literature and they were quite similar.

7. BIBLIOGRAFIA

- 01) AABB TECHNICAL MANUAL, Detection and identification of red red Blood cell antibodies, cap. 13
- 02) BALDWIN, Anna J.. Other Major Blood Group systems.
In: Pittiglio, D. Harmening. Modern Blood and Banking an Transfusion Practices. 2 ed. Philadelphia, F.A. Davis Com
pany, 1984, cap. 8, pag. 169-204
- 03) BEIGUELMAN, B., Farmacogenética e Sistemas Sanguíneos Eri
trocitários, Rio de Janeiro, Guanabara. Koogan S.A., 1983,
pag. 131-137, 148-149.
- 04) BEJANT, N.J. An Introduction to Immunohematology, 2 ed,
Philadelphia, 1982, pag. 98-99, 101-105, 112-113.
- 05) BOLETIM DA SBMM, vol. VI, novembro/84
nº 129 Laurend Marsh
- 06) BUENO, R., BARRATTY, G., PORTAWAY, N., Elution of anti-
body from red cells transfusion. 21:157, 1981.
- 07) CARVALHO, W.F., Prova da antiglobulina humana, Técnicas
Médicas de Hematologia e Imunohematologia, 4 ed, São Pau-
lo, Cooperativa Editora e de cultura médica Ltda, 1986,
cap. 41, pag. 210-213.
- 08) CASE, John. The Rh Blood Group System. In: Pittiglio, D.
Harmening. Modern Blood Banking and transfusion Practices.
2 ed. Philadelphia, F.A. Davis Company, 1984, cap. 6, pag
123-158.

- 09) DODD, B.E., Blood Group Topics, 1 ed. London, T and A, Constable Ltda, 1975
- 10) ELLISOR, S.S., Kits and Special Reagents: what to use and when. Blood Bank Reagents: what to use and when. 1 ed, Arlington, Virginia, American association of blood Banks, 1985, cap. 4, pag. 69-97
- 11) ELLISOR, S., PAPENFUS, L., SUGASAWARA, E., AZZI, R., Dichloromethane (DCM) elution procedure abstract. Transfusion, 22:409, 1982.
- 12) GONZAGA, A.L., PELLIZZA, S.M., BERTHIER, M.E.O., Manual de Imuno-hematologia, Centro de Hematologia Santa Catarina, 1 vol., Rio de Janeiro, 1977, pag. 59-74.
- 13) KAGAN, E.. Fundamentals of Blood Group Immunology. In: Pittiglio, D. Harmening. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 2 ed. Philadelphia, F.A. Davis Company, 1984, cap. 3, pag. 55-79.
- 14) KEYNES, G., Transfusion de Sangre, Madrid, Aguilar, S.A. de ediciones, 1953.
- 15) KLEMPERER, M.R., anemia hemolítica: defeitos imunológicos. In: Miller, D.R, Pearson, H.A., Hematologia Pediátrica, 4 ed. São Paulo, Guanabara. Koogan, 1982, cap. 10, pag. 238-257.
- 16) LANDSTEINER, K, MILLER, C.P. Jr., Serological Studies on the blood of primates. J. Exp. med. 42:853-862; 1925
- 17) MOLLISON, P.L.. Red Cell auto antibodies, polyagglutination and nonspecific agglutination. In: Blood Transfusion

- in clinical medicine. 7 ed. Oxford, Blackwell, 1983, cap. 10, pag. 382-413.
- 18) MOURA, R.A.A., Imunohematologia, Técnicas de laboratório, 2 ed., São Paulo, Livraria Atheneu, 1982, cap. 34, pag. 633-635.
- 19) NAKAMURA, R.M. e TUCKER, E.S.. Os anticorpos como reagentes. Diagnosticos Clinicos e Conduta Terapeutica por Exames Laboratoriais. In: Henry, J.B. 16 ed. Vol. 2. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1983, cap. 35. pag. 1291-1322.
- 20) OLIVEIRA, H.P., Anemia Hemolitica III - anemias imunohemolíticas. Hematologia Clínica, 2 ed, São Paulo, Livraria Atheneu, 1983, cap. 10, pag. 197-201.
- 21) OLIVES M.M.. Enfermedad Hemolitica Neonatal. In: El Problema Rh. 1 ed. Barcelona, Editorial Jims, 1973, cap. 7, pag. 73-129.
- 22) ORTHO DIAGNOSTICS, Antigenos e Anticorpos de Grupos Sanguineos aplicados aos sistemas ABO e Rh, 3 ed. São Paulo, Johnson and Johnson, 1978, pag. 37-71.
- 23) ORTHO DIAGNOSTICS, Antigenos e Anticorpos de Grupos Sanguineos aplicados à doença hemolitica do recém-nascido, 3 ed, São Paulo, Johnson and Johnson, 1978, pag. 53-66.
- 24) ORTHO DIAGNOSTICS, Antigenos e Anticorpos de Grupos Sanguineos aplicados aos testes de compatibilidade, 3 ed, São Paulo, Johnson and Johnson, 1978, pag. 47 a 67.
- 25) PITTIGLIO, Denise Harmening. The ABO Blood Group System. In: Pittiglio, D. Harmening. Modern Blood Bankin and Trans

- fusion Practices. 2 ed. Philadelphia, F.A. Davis Company, 1984. cap. 5, pag. 89-121.
- 26) PITTIGLIO, Denise Harmening. Misceellaneous Blood Group Systems. In: Pittiglio, D. Harmening. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 2 ed. Philadelphia, F.A. Davis Company, 1984, cap. 9. pag. 205-211.
- 27) PRETTI, F.A. e LIMEIRA, T.G.. Anemias hemolíticas adquiridas. In: Marinho, H.M. Hematologia. 1 ed. São Paulo. Editora Sarvier, 1984, cap. 4, pag. 27-31.
- 28) RACE, R.R., SANGER, R., Blood Groups in man, 6ed, Oxford, Blackwell, 1975, pag. 4 e 5.
- 29) ROESEL, C.E.. Reações Antígeno-Anticorpo e provas sorológicas para diagnóstico. Imunologia, 1 ed. São Paulo, McGraw Hill, 1981, cap. 4, pag. 97-145.
- 30) ROIT, I.M.. Interação de Antígeno e Anticorpo. Imunologia 4 ed., São Paulo, Livraria Atheneu, 1983, cap. 6, pag. 123-151.
- 31) RUBIN, H., Antibody elution from red blood cells, J. Clin. Path. 16: 70-73; 1963.
- 32) STANLEY, S.R., Prática de imnohematologia, Lynch: Técnicas de Laboratório, 4 ed., São Paulo, Editora Manole, 1986, Secção III, pag. 712-761.
- 33) STEANE, S.. Red Blood Cell autoantibodies. In: Pittiglio, D. Harmening. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 2 ed. Philadelphia, F.A. Davis Company, 1984. cap. 19, pag. 423-445.

- 34) SWISHER, S.N.. Erythrocyte disorders - anemias due to increased erythrocyte destruction mediated by antibodies.
In: Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., Rundles, R. W.. Hematology, Mc GrawHill, 1972, cap. 57, pag. 486-510.
- 35) TECHNICAL MANNUAL, 7 ed, Washington, D.C., American association of Blood Banks, 1977.
- 36) TECHNICAL MANNUAL, 8 ed, Washington, D.C., American association of Blood Banks, 1981, pag. 390-391.
- 37) ZATZ, I., A prova da antiglobulina de Coombs, Transfusão de Sangue, 3 ed., São Paulo, Editora-LEAM, 1969, cap. 3, pag. 29-36.
- 38) ZMIJEWSKI, C.M., FLLETCHER, J.L., Immunoematology, 2 ed, New York, Appleton - Century - Crojts, 1972.