

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ

***"Efeito do Uso da Eritropoetina Humana Recombinante no
Grau de Sensibilização Contra Antígenos do Sistema HLA
em Pacientes em Tratamento Hemodialítico".***

Paulo Hércules Biagi Salineiro

Fortaleza - Ceará

1999

Paulo Hércules Biagi Salineiro

***"Efeito do Uso da Eritropoetina Humana Recombinante no
Grau de Sensibilização Contra Antígenos do Sistema HLA
em Pacientes em Tratamento Hemodialítico".***

**Monografia apresentada como requisito
final do XIII Curso de Especialização em
Hematologia e Hemoterapia.**

ORIENTADORES:

Dr. Henry de Holanda Campos

Dra. Silvia Fernandes Ribeiro da Silva

Dra. Sônia Leite da Silva

Fortaleza - Ceará

1999

AGRADECIMENTOS

- ⇒ À todos os funcionários do HEMOCE que, cada um à sua maneira, contribuíram para a realização do curso.
- ⇒ À todos que ministraram aulas e transmitiram sua experiência e seus conhecimentos.
- ⇒ À Dra. Alana Jocelina Montenegro de Castro e Dra. Fanca Felizardo Guerreiro pelos valiosos ensinamentos na Hematologia Prática.
- ⇒ Ao Dr. Herivaldo Ferreira da Silva pelos exemplos de profissionalismo, humildade e dedicação.
- ⇒ Aos colegas Solidônio e Luciano pelo companheirismo e incentivo.
- ⇒ Ao Dr. Sérgio S. Yamada pela amizade e pela disponibilidade em colaborar na conclusão deste trabalho.
- ⇒ Aos colegas do Hemocentro Regional de Maringá que colaboraram para que meu afastamento fosse possível.
- ⇒ À equipe do Laboratório de Histocompatibilidade da Universidade Federal do Ceará pela simpatia e amizade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

⇒ À Deus pelo dom da vida.

⇒ Aos meus pais por me receberem neste mundo e pelo cuidado, amor e dedicação com que conduziram a formação do meu caráter.

⇒ À minha esposa, Ana Paula, pela companhia e dedicação. Por Ana Luísa, significado maior de nossas vidas.

⇒ À Dra. Fc^a Vânia Barreto A.F. Gomes pela oportunidade de cursar a XIII Turma do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia.

⇒ À Célia, Viviane, Jeovany e Stela pela amizade dedicada e carinhosa.

⇒ Aos meus orientadores, Dr. Henry Campos, Dra. Sônia Leite e Dra. Silvia Fernandes pela paciência, orientação e empenho na conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

	Resumo	
I	Introdução	8
II	Objetivos	15
III	Materiais e Métodos	16
IV	Resultados	24
V	Discussão	33
VI	Conclusão	37
	Summary	38
	Referências Bibliográficas	39

"O homem culto e seguro de seus conhecimentos jamais os antepõe aos olhos de ninguém; ao contrário, dissimula-os".

*Gonzales Pecotche
(Sabedoria Logosófica)*

RESUMO

Para examinar o efeito da eritropoetina recombinante humana (r-HuEPO) no grau de sensibilização contra antígenos do Sistema HLA, em pacientes em tratamento hemodialítico, analisamos retrospectivamente dados de 267 pacientes submetidos rotineiramente a análise de painéis de linfócitos (PRA).

O estudo foi realizado em pacientes candidatos a transplante renal no Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará, no período de agosto de 1986 a março de 1998.

Os resultados demonstram que os pacientes que receberam transfusões sangüíneas e posteriormente foram tratados com r-HuEPO apresentaram uma queda significativa dos níveis de PRA ($10,46 \pm 2,59$), enquanto que aqueles que receberam somente transfusões sangüíneas apresentaram uma elevação destes níveis ($26,48 \pm 3,4$) e a diferença entre estes dois grupos foi significativa ($p < 0,001$).

Concluimos que, o tratamento com r-HuEPO, por reduzir as necessidades transfusionais, reduz a exposição a antígenos estranhos e desta forma reduz a sensibilização de pacientes candidatos a transplante renal.

I- INTRODUÇÃO

As manifestações hematológicas associadas com a insuficiência renal foram inicialmente descritas por Bright, em 1836, quando observou palidez no desenvolvimento da doença de Bright. Brown and Roth, em 1922, relataram que a anemia da nefrite crônica ocorria devido a uma diminuição na atividade medular e Parsons e Ekola-Strolberg, em 1933, observaram que os baixos níveis de hemoglobina na azotemia apresentavam os mesmos significados prognósticos indesejáveis das elevadas concentrações de creatinina sérica⁴⁵.

A anemia da insuficiência renal é uma desordem complexa determinada por uma variedade de fatores. Embora o defeito primário seja a diminuição da eritropoiese conseqüente à incapacidade do rim doente de secretar quantidades suficientes de eritropoietina, um número de outros fatores podem agravar o quadro, tais como hemólise, sangramentos, deficiência de ferro e ácido fólico. Finalmente, variações no volume plasmático provocados pela própria doença ou o seu tratamento (hemodiálise) produzem alterações indesejáveis no hematócrito se a massa de células vermelhas permanecer constante^{12,14,36,45,47,55,57}.

À medida que a função renal se deteriora o hematócrito declina, podendo chegar a níveis tão baixos quanto 15 a 20%. O típico paciente de hemodiálise apresenta hemoglobina em torno de 7 g/dl e estes níveis de anemia estão freqüentemente associados a fadiga, dispnéia e diminuição da tolerância a

exercícios físicos. A correção parcial da anemia sugere que outros sintomas relatados por pacientes urêmicos, tais como distúrbios do sono, anorexia e disfunção sexual, também estejam relacionados à anemia⁴⁵.

A adaptação fisiológica à anemia severa inclui um aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, aumento da atividade cardíaca e redistribuição do fluxo sanguíneo do tecido extravascular para os órgãos internos. Como consequência desta adaptação desenvolve-se uma hipertrofia ventricular esquerda, que por sua vez representa um prognóstico independente de mortalidade nos pacientes portadores de insuficiência renal crônica, já que a doença cardiovascular é responsável por cerca de 50% dos óbitos registrados. O impacto adverso da anemia no prognóstico da doença é máximo quando os níveis de hemoglobina estão abaixo de 8 g/dl e menores quando superiores a 10 g/dl^{19,45}.

As transfusões sanguíneas eram o único recurso de que se dispunha até os meados da década de 80 para corrigir a anemia e controlar a tendência hemorrágica apresentada pelos pacientes com insuficiência renal crônica. Além da sua eficácia no tratamento da anemia, alguns autores demonstraram, no mesmo período, o efeito benéfico da transfusão sanguínea na sobrevida do transplante renal. Os resultados destes estudos levaram à adoção de protocolos transfusionais sistemáticos na preparação do paciente candidato a transplante renal visando induzir tolerância ao enxerto^{16,17,38,39,51,56}. Hoje sabe-se que a utilização sistemática de transfusões incorrem em riscos importantes que devem ser considerados, como a transmissão de doença de Chagas e sífilis, doenças virais tais como hepatite (B e C), AIDS, HTLV I e II, reações hemolíticas,

tromboflebitas, sobrecarga de ferro e sensibilização a antígenos do Sistema HLA ^{14,34,36,55,57}

Desde sua descoberta, em 1958, o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), ou sistema HLA (human leucocyte antigen), é considerado um importante marcador de sobrevida dos transplantes, apresentando até hoje um papel de destaque entre os sistemas biológicos envolvidos nos processos de rejeição. Os antígenos ou moléculas HLA são altamente polimórficas e são encontradas em quase todas as células do organismo, funcionando assim como alo-antígenos ⁴⁹.

Como fonte de imunização a antígenos do sistema HLA podemos citar a perda de enxerto por rejeição, gestações e exposição a hemoderivados (concentrado de hemácias, leucócitos e plaquetas). As gestações constituem a forma mais comum e natural de sensibilização e se deve à passagem de pequenas quantidades de sangue do feto para a circulação materna, na fase final da gestação. Assim a mãe recebe doses sensibilizantes de antígenos que o feto herdou do pai (haplótipo HLA paterno) e que são distintos dos dela. Metade das mulheres com duas ou mais gestações apresentam níveis elevados de sensibilização com anticorpos anti-HLA detectáveis ^{9,37,48,54}.

As transfusões de sangue representam a segunda causa mais comum de sensibilização e, apesar da capacidade de imunização de uma única transfusão ser pequena, é muito significativa, uma vez que esta é realizada em caráter de incompatibilidade com os antígenos do Sistema HLA. Sabe-se que quanto maior o número de transfusões maior o risco de alo-imunização do indivíduo ^{8,9,11,18,19,23,34,37,46}. Em 1989, Silva e cols. mostraram que 124 dos 244

(51%) pacientes portadores de insuficiência renal crônica que receberam pelo menos 1 transfusão sanguínea apresentavam anticorpos anti-HLA⁵⁰.

A terceira forma de sensibilização é a ocorrência de transplantes prévios, sendo a forma mais efetiva de sensibilização, devida ao número de antígenos apresentados ao receptor e ao tempo de exposição deste àqueles antígenos^{9,46}.

Pacientes submetidos a mais de um estímulo tornam-se hipersensibilizados. Assim, poucas transfusões podem levar um paciente a um estado de hipersensibilização se precedidas de uma ou mais gestações ou mesmo de um transplante^{34,37,40,46}.

A hiperimunização aos antígenos do Sistema HLA em candidatos a transplante renal diminui as chances de transplante, levando o indivíduo a permanecer longos anos em listas de espera por doador imunologicamente compatível³⁷.

Inúmeras pesquisas foram realizadas no sentido de reduzir o risco acarretado pelas transfusões de sangue, destacando-se o estudo da eritropoetina humana (EPO), um hormônio glicoprotéico que estimula a produção de células vermelhas. Este hormônio foi inicialmente demonstrado na circulação por Reissmann em 1950, e Erslev em 1953. Subseqüentemente, Jacobson e cols. em 1957, demonstraram a sua produção pelo rim. Nos mamíferos adultos a EPO é produzida quase que totalmente pelos rins (mais de 90%) e uma pequena parte (inferior a 10%) pelo fígado. Na vida fetal, o fígado é responsável pela quase totalidade da produção do hormônio^{12,31}.

A estimulação para a produção de EPO é a hipóxia, definida como diminuição da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue (células vermelhas), diminuição da tensão arterial de oxigênio ou uma afinidade aumentada da hemoglobina pelo oxigênio. A EPO normalmente é produzida em pequenas quantidades e os níveis plasmáticos se situam entre 15 e 20 mU/ml. A anemia acarreta elevação destes níveis, com aumentos de até cem vezes o valor normal. O rim doente, por sua vez, não é capaz incrementar a produção da EPO em resposta à anemia^{10-12,44}.

O gene da EPO humana foi isolado e clonado pela primeira vez em 1983 por Lin e cols. e posteriormente por Jacobs e cols. em 1985 e Powel e cols. em 1986. Desde 1985 a eritropoetina humana recombinante (r-HuEPO) está disponível para ensaios clínicos e, a partir de 1989, passou a ser utilizada para tratamento clínico^{11,57}.

Estudos realizados em ratos e cães normais tiveram início em 1985 e demonstraram que a r-HuEPO estimulava a eritropoiese de maneira dose dependente. Reticulócitos e hematócrito aumentam proporcionalmente à dose e um estado policitêmico pode se instalar com a continuidade do tratamento. Efeitos tóxicos não foram observados¹².

Os primeiros testes clínicos em humanos anêmicos, com níveis de hematócrito inferiores a 25%, submetidos a hemodiálise, foram realizados por Eschbach e cols.¹⁴, e por Winearls e cols. em 1986. Apesar de utilizarem protocolos com doses diferentes de r-HuEPO, os resultados obtidos foram semelhantes, indicando que a r-HuEPO era eficaz no tratamento da anemia da insuficiência renal crônica. Estudos posteriores confirmaram que a r-HuEPO é

utilizada com boa resposta terapêutica em todos os pacientes de hemodiálise que não apresentavam anemia complicada por fatores tais como: deficiência de ferro, processos inflamatórios e infecciosos (bactérias e vírus), intoxicação pelo alumínio, hemorragias, neoplasias, hemoglobinopatias, hiperparatireoidismo ou disfunção medular^{12,29,31}.

Eschbach e cols. em 1987, relatam ainda que doses iguais ou superiores a 50 unidades por quilograma (U/Kg) de r-HuEPO provocam aumentos consistentes na contagem corrigida de reticulócitos e nos níveis médios de hematócrito. Pacientes recebendo esta dose de r-HuEPO não mais necessitaram transfusões sanguíneas.

Outros ensaios clínicos se seguiram, envolvendo pesquisadores nos Estados Unidos⁵⁷, Canadá³⁵, Suíça^{52,53}, França⁷, e o marcante aumento nos níveis de hematócrito associado à substancial melhora na qualidade de vida dos pacientes levaram a acreditar que a r-HuEPO revolucionaria o tratamento dos pacientes portadores de insuficiência renal crônica^{11,13,14}. As promessas incluíam a correção da anemia, com conseqüente eliminação das transfusões e seus efeitos indesejáveis (sobrecarga de ferro, sensibilização a antígenos do Sistema HLA, transmissão de doenças), e maior reabilitação do doente, proporcionando melhor capacidade para exercícios físicos, melhora do apetite, recuperação do sono e da capacidade cognitiva, maior interesse e desempenho sexual, diminuição dos estados depressivos, maior disposição para o trabalho e melhores relações pessoais^{2,6,15,21,32,33,58}.

Assim, a introdução da r-HuEPO no tratamento dos pacientes portadores de insuficiência renal crônica poderia corrigir a anemia sem a

necessidade de recorrer a transfusões sanguíneas, reduzindo o risco de sensibilização aos antígenos HLA e aumentando as chances de receber um enxerto renal.

Este estudo tem por objetivo determinar o grau de sensibilização dos pacientes portadores de insuficiência renal crônica candidatos a transplante renal e avaliar o impacto do tratamento da r-HuEPO nestes níveis de sensibilização.

II- OBJETIVOS

Constituem objetivos deste estudo:

- 1.Determinar o grau de sensibilização dos pacientes portadores de insuficiência renal crônica candidatos a transplante renal no Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará;
- 2.Avaliar a influência do tratamento da anemia com r-HuEPO nos níveis de sensibilização destes pacientes.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES - O estudo compreende a análise retrospectiva da reatividade contra painel de linfócitos testada em 267 pacientes portadores de insuficiência renal crônica, candidatos a transplante renal no Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, no período de agosto de 1986 a março de 1998.

Foram excluídos do estudo todos os pacientes que receberam um transplante prévio e que perderam a função do enxerto, retornando ao tratamento hemodialítico. Um total de 267 pacientes candidatos a transplante renal foram analisados, sendo 142 (53,2%) do sexo masculino e 125 (46,8%) do sexo feminino, com média de idade de $33,28 \pm 0,80$ anos, com idade mínima de 5 anos e máxima de 66 anos. O tempo de hemodiálise foi de $12,92 \pm 1,28$ meses, variando de 0 a 120 meses.

Os pacientes foram divididos em quatro grupos, de acordo com o tratamento recebido no período de abrangência do trabalho:

Grupo I - Constituído por 107 (40,1%) pacientes que receberam somente transfusões sanguíneas durante o período de acompanhamento, que variou de 0 a 99 meses, com uma média de $17,25 \pm 2,30$ meses. A idade média dos pacientes foi de $34,84 \pm 1,32$ anos, variando de 5 a 66 anos; 56 (52,3%) pacientes eram do sexo masculino e 51 (47,7%) do feminino.

Grupo II - Constituído de 26 (9,7%) pacientes que receberam

somente eritropoetina recombinante humana durante o período de acompanhamento, que variou de 0 a 17 meses, com uma média de $3,30 \pm 0,69$ meses. A idade média do grupo foi de $36,12 \pm 2,58$ anos, variando de 19 a 64 anos, sendo 17 (65,4%) pacientes do sexo masculino e 9 (34,6%) do feminino.

Grupo III - Constituído de 74 (27,7%) pacientes submetidos a transfusões sangüíneas e que, após a instituição do tratamento com eritropoetina recombinante humana, não mais receberam transfusões durante o período de acompanhamento, que variou de 0 a 106 meses, com média de $10,13 \pm 2,19$ meses. A idade média do grupo foi de $32,83 \pm 1,37$, variando entre 8 a 60 anos, sendo 40 (54,1%) pacientes do sexo masculino e 34 (45,9%) do feminino.

Grupo IV - Constituído de 60 (22,5%) pacientes que necessitaram de transfusões sangüíneas apesar do tratamento com eritropoetina recombinante humana, durante o período de acompanhamento, que variou de 0 a 120 meses, com média de $12,78 \pm 2,69$ meses. A idade média do grupo foi de $29,95 \pm 1,67$ anos, variando de 9 a 56 anos, sendo 29 (48,3%) pacientes do sexo masculino e 31 (51,7%) do feminino.

MÉTODOS - A determinação do PRA foi realizada no laboratório de Histocompatibilidade do Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-renais da Universidade Federal do Ceará.

Amostras de sangue foram coletadas no momento em que o paciente se candidata a transplante renal (**PRA inicial**) e, posteriormente, a cada 3 meses

ou 10 a 15 dias após transfusão de sangue. O resultado da última amostra foi designado **PRA final**.

Técnica - Dez a quinze mililitros (ml) de sangue foram coletados para determinação do PRA. O sangue colhido foi deixado à temperatura ambiente por 30 minutos para a completa retração do coágulo e posteriormente centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos. Depois de separado, o soro era estocado a -20.º C até o momento da utilização, quando eram descongelados em grupos, procedendo-se à pesquisa de anticorpos linfocitotóxicos anti-HLA.

Microseringas de Hamilton de 50 microlitros (μ l) foram utilizadas para depositar 1 μ l do soro não diluído de cada paciente em uma das escavações das 50 microplacas de Terasaki, de maneira que cada soro ocupasse sempre a mesma posição em cada uma das microplacas. Cada microplaca recebia então as células de um doador diferente, sabendo-se que estes doadores haviam sido previamente fenotipados e selecionados de modo a se obter as diversas especificidades dos *loci* A e B.

Controles positivo e negativo foram colocados em cada microplaca, obedecendo à mesma regra estabelecida para os soros a serem testados ou seja, cada controle ocupava sempre a mesma escavação em todas as microplacas. Como controle negativo utilizou-se soro de indivíduos do sexo masculino, grupo sanguíneo AB, que nunca tinham sido transfundidos. O soro era inativado a 56.ºC por 30 minutos. Como controle positivo foi utilizado um *pool* de soros provenientes de indivíduos que apresentavam positividade em PRA superior a

60%.

A **TABELA 1** apresenta as especificidades dos *loci* A e B representados no painel de linfócitos. Este painel foi selecionado através da fenotipagem de indivíduos candidatos a doador de órgãos. Para reconhecimento dos antígenos, foram utilizadas duas baterias de anticorpos anti-HLA denominadas FT/FGM 13 A e FT/FGM 13 B, provenientes do Laboratório de Histocompatibilidade do Hospital Saint-Louis – Paris, França. Após a fenotipagem dos candidatos, 42 foram selecionados com o objetivo de se obter uma melhor representatividade das diversas especificidades dos *loci* A e B, seguindo os critérios sugeridos por A. Zachary e Degelo ⁵⁹.

TABELA 1 - Especificidade dos *loci* A e B presentes no painel de linfócitos, representando aproximadamente 90% dos fenótipos possíveis

<i>Locus</i> A	Frequência do Antígeno		<i>Locus</i> B	Frequência do Antígeno
A1	07		B51	07
A2	19		B52	02
A3	07		B7	05
A9	04		B8	02
A23	01		B44	08
A24	07		B45	02
A10	01		B13	01
A25	02		B14	02

A26	02	B62	03
A34	02	B63	02
A11	02	B38	03
A19	02	B39	03
A30	03	B57	04
A31	05	B58	01
A28	07	B18	06
A32	02	B49	02
A33	01	B50	02
<i>A blank</i>	07	B55	03
		B56	02
		B27	02
		B35	08
		B37	02
		B60	02
		B61	01
		B42	04
		B70	01
		B53	02
		<i>B blank</i>	05

A suspensão de linfócitos (antígenos) utilizada na técnica foi obtida a partir da coleta de 20 ml de sangue do doador do painel com 0,2 µl de heparina sódica e diluído em volumes iguais de solução de Hank's com pH 7,2. Seis ml desta solução eram colocados em um tubo cônico de 10 ml e a estes , adicionava-se 3 ml de Ficol-Hypaque (densidade 1.077). O tubo era submetido a 20 minutos de centrifugação a 1.800 rpm a 18°C, para a obtenção do anel de linfócitos, que se localiza entre o plasma sobrenadante e a camada de Ficol-Hypaque .

O anel de linfócitos era aspirado com pipeta de Pasteur e ressuspendido em solução de Hank's. Nova centrifugação era realizada por 10 minutos a 1.800 rpm e 18°C. O procedimento era repetido mais uma vez e o sedimento ressuspendido novamente em solução de Hank's. A concentração de células era determinada através de contagem em câmara de Newbauer, ajustando-se através de rediluições ou concentrando-se, até se obter entre 2×10^6 e 3×10^6 células por mm^3 .

Em cada escavação da placa de Terasaki, onde encontravam-se depositados os soros a serem testados, era colocado o volume de 1 µl da suspensão de linfócitos obtida acima, sendo para tal utilizada uma microseringa multicanal de Hamilton de 50 µl. Seguia-se um período de incubação a 26°C por 60 minutos (formação do complexo antígeno-anticorpo), após o qual eram adicionados 3 µl de complemento a cada escavação. Nova incubação era procedida, desta vez por 120 minutos (lise celular). Após esta segunda incubação eram adicionados 3 µl de uma solução aquosa de eosina a 5% e seis minutos após, 6 µl de formol 30% (pH 7,2).

As microplacas eram guardadas a 4°C e a leitura realizada após 24 horas em microscópio de contraste de fase.

A técnica seguida para determinação dos antígenos HLA dos doadores do painel, bem como a pesquisa de anticorpos linfocitotóxicos anti-HLA dos pacientes em estudo foi descrita por Terasaki em 1964^{3,27} e adaptada por Hors em 1979²².

A intensidade da reação é medida pela percentagem de células mortas, ou seja, que sofreram lise celular e se coraram pela solução aquosa de eosina a 5% . O escore utilizado para tal classificação é o seguinte:

ESCORE 0: não legível

ESCORE 1: 0 a 10% de células coradas = negativo

ESCORE 2: 11 a 20% de células coradas = negativo duvidoso

ESCORE 4: 21 a 50% de células coradas = positivo fraco

ESCORE 6: 51 a 80% de células coradas = positivo

ESCORE 8: 80 a 100% de células coradas = positivo forte

Foram consideradas positivas as reações com escore 4, ou seja, com percentagem de células coradas superior a 20%. O caráter e a especificidade da sensibilização não foram estudados, visto que não constituem o objetivo do presente trabalho.

Para a análise da mudança de painéis por faixa, convencionou-se os seguintes valores:

painel baixo: positividade inferior a 20%;

painel médio: positividade entre 20 e 50%;

painel alto: positividade superior a 50%.

O valor do PRA foi determinado pela relação entre número de reações positivas e o número de células testadas e expresso em valores percentuais.

Análises Estatísticas - Análises estatísticas foram realizadas empregando-se o teste de Qui-quadrado de independência e o teste de Mann-Whitney-U, para avaliar se dois grupos independentes possuíam mensurações semelhantes, tendo sido considerados significantes as associações cujas probabilidades (valor p) de ocorrer pelo acaso foram iguais ou menores que 0,05. Na digitação dos dados e análises estatísticas foram empregados, respectivamente, os programas de computação Word for Windows, Excel for Windows e SPSS, versão 7.5. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

IV- RESULTADOS

Nos 267 pacientes estudados, o número médio de células do painel em que se observaram reações positivas no primeiro soro foi de $4,23 \pm 0,46$, com variação de 0 a 42, sendo que haviam sido testadas a média de $34,18 \pm 0,34$ células, com variação de 25 a 45 (**GRÁFICO 1**). No soro final este número foi de $6,54 \pm 0,67$, com variação de 0 a 43, sendo que haviam sido testadas a média de $38,91 \pm 0,28$ células, com variação de 28 a 48 (**GRÁFICO 2**).

Seis pacientes foram excluídos da análise do soro final já que se dispunha apenas da amostra do soro inicial.

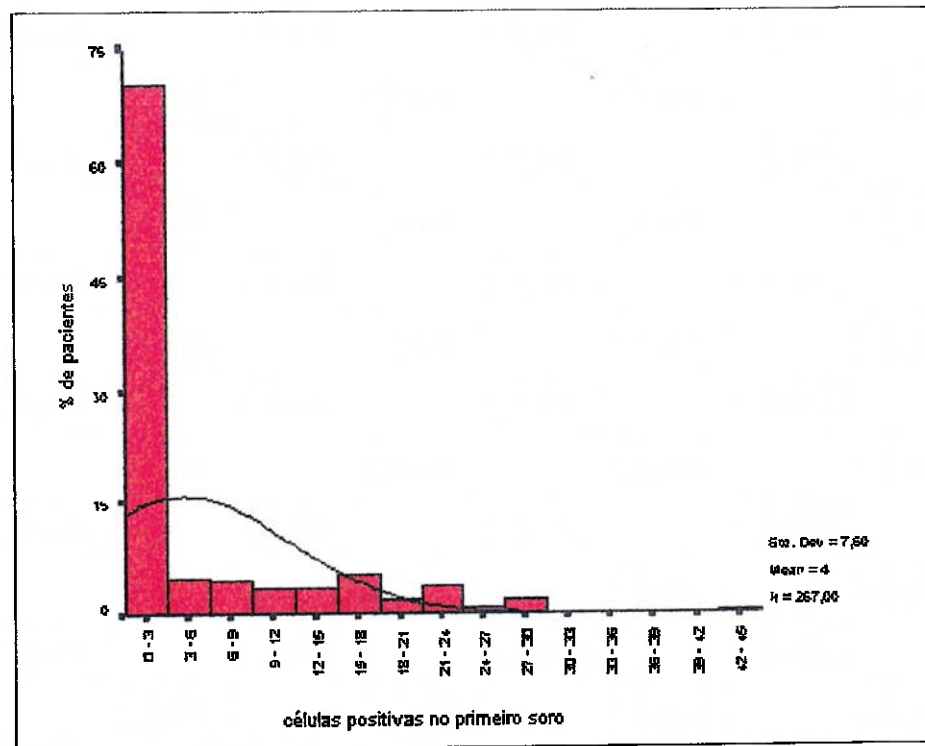


GRÁFICO 1 - Número de células do painel com reação positiva no soro inicial dos 267 pacientes portadores de insuficiência renal crônica.

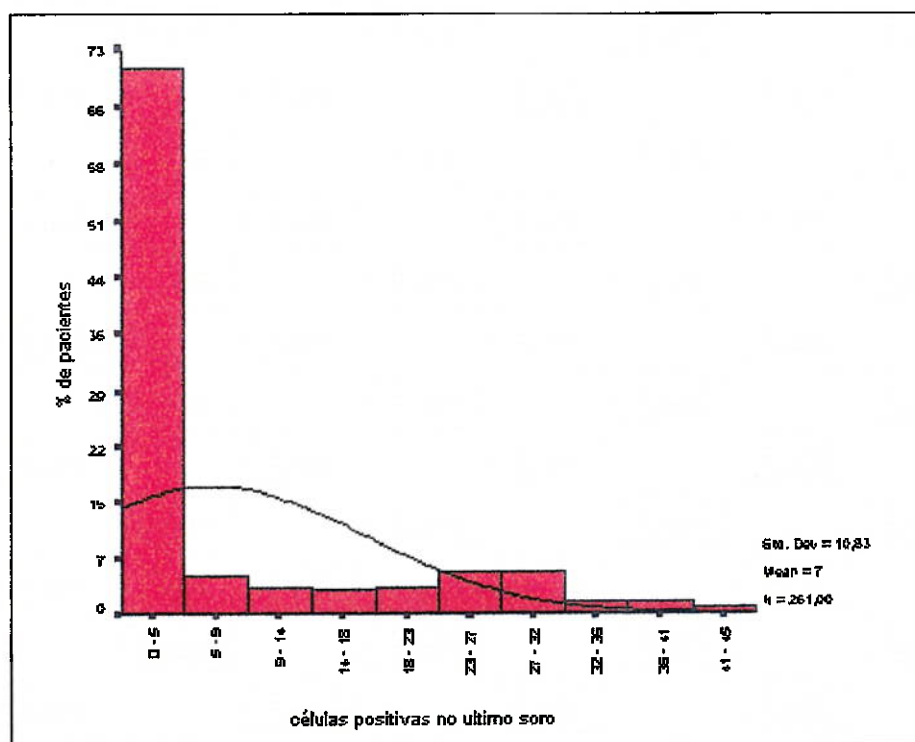


GRÁFICO 2 - Número de células do painel com reação positiva no soro final dos 261 pacientes portadores de insuficiência renal crônica.

Como podemos observar na **TABELA 2**, a média de reação positivas no PRA com o **soro inicial** de cada paciente foi significativamente menor no grupo II ($1,22 \pm 0,85$) do que nos grupos I, III e IV ($15,50 \pm 2,43$; $11,60 \pm 2,55$; $15,68 \pm 3,24$, respectivamente - $p < 0,05$). A média de reação positiva com o **soro final** foi também significativamente menor no grupo II ($1,20 \pm 0,43$) do que nos grupos I ($26,48 \pm 3,4$ - $p < 0,001$) e IV ($18,21 \pm 3,65$ -

$p < 0,038$); e maior no grupo I quando comparada àquela do grupo III ($10,46 \pm 2,59 - p < 0,001$). Ao comparar a reatividade do soro inicial com a do soro final, observamos um aumento significativo na média de reações positivas do soro final no grupo I ($p < 0,001$). Nos demais grupos não houve diferença significativa entre as duas medidas (**GRÁFICO 3**).

TABELA 2 – Distribuição das médias de PRA inicial e final de acordo com os grupos de tratamento

PRA	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
	N = 107	n = 26	n = 74	n = 60
Inicial	$15,50 \pm 2,43^a$	$1,22 \pm 0,85^b$	$11,60 \pm 2,55^c$	$15,68 \pm 3,24^d$
Final	$26,48 \pm 3,43^e$	$1,20 \pm 0,43^f$	$10,46 \pm 2,59^g$	$18,21 \pm 3,65^h$

PRA = reatividade contra painel de linfócitos;

a X b – $p = 0,004$; **a X c** – $p = 0,265$; **a X d** – $p = 0,726$; **b X c** – $p = 0,028$; **b X d** – $p = 0,002$;

c X d – $p = 0,191$; **e X f** – $p = 0,000$; **e X g** – $p = 0,000$; **e X h** – $p = 0,071$; **f X g** – $p = 0,529$;

f X h – $p = 0,038$; **g X h** – $p = 0,076$

valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão

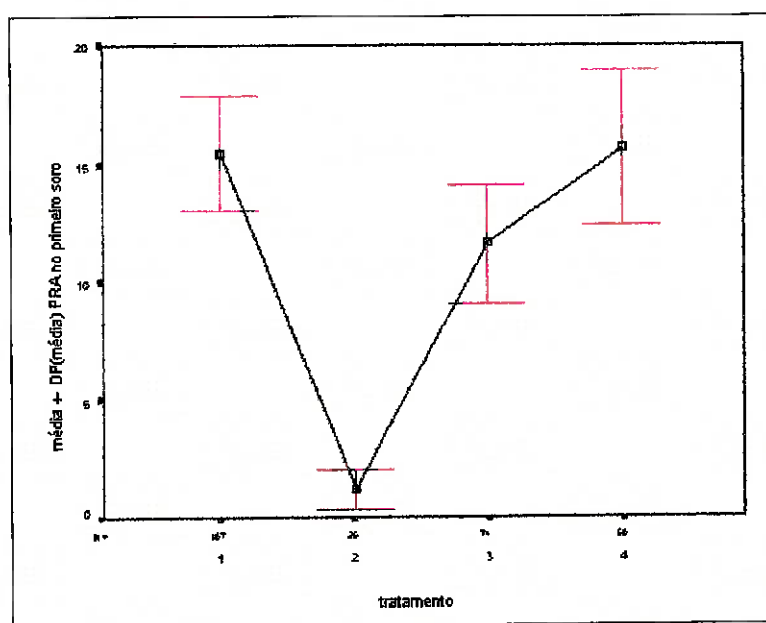


GRÁFICO 3 – Distribuição da média do PRA inicial de acordo com os grupos de tratamento

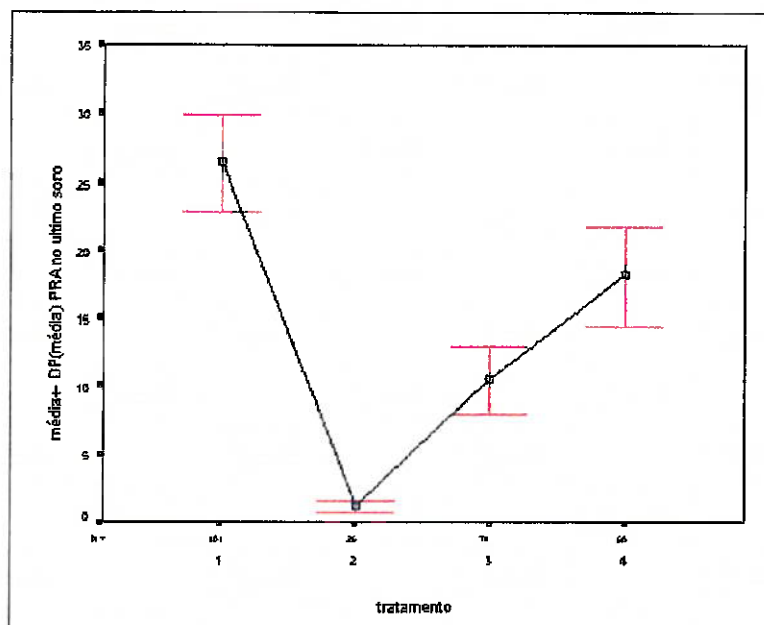


GRÁFICO 4 – Distribuição da média do PRA final de acordo com os grupos de tratamento

A análise dos resultados obtidos em 261 pacientes tendo como base a positividade contra PRA mostrou que em 24 (9,2%) deles a positividade contra PRA passou para uma faixa inferior, ou seja, de PRA alto para médio ou baixo ou de PRA médio para baixo, enquanto que em 38 (14,6%) a positividade passou para uma faixa superior (PRA baixo para médio ou alto ou PRA médio para alto) e em 199 (76,2%) pacientes a positividade contra PRA permaneceu inalterada.

Quando esta análise é feita dentro de cada grupo de tratamento, podemos observar que no grupo I, 16 (20,5%) pacientes passaram de um painel inicial baixo para um painel final médio ou alto (**TABELA 3**). No grupo II não

foi observada mudança significativa do painel (TABELA 4). No grupo III, 5 (71,4%) pacientes mudaram de um painel inicial alto para um painel final médio ou baixo, (TABELA 5). No grupo IV, 4 (50%) pacientes mudaram de um painel inicial alto para um painel final médio ou baixo, enquanto que 5 (11,9%) pacientes passaram de um painel inicial baixo para um painel final médio ou alto (TABELA 6).

TABELA 3 – Evolução dos painéis iniciais, segundo a faixa de positividade, nos 101 pacientes portadores de insuficiência renal crônica tratados somente com transfusões sanguíneas

Painel Final		Painel Inicial					
		baixo		médio		alto	
		N	%	n	%	n	%
	baixo	62	79,5%	2	16,7%	1	9,1%
	médio	6	7,7%	2	16,7%	1	9,1%
	alto	10	12,8%	8	66,7%	9	81,8%
Total		78	100,0%	12	100,0%	11	100,0%

TABELA 4 – Evolução dos painéis iniciais, segundo a faixa de positividade, nos 26 pacientes portadores de insuficiência renal crônica tratados somente com eritropoetina humana recombinante

Painel Final	Painel Inicial			
	Baixo		médio	
	N	%	n	%
baixo	25	100,0%	1	100,0%
Total	25	100,0%	1	100,0%

TABELA 5 – Evolução dos painéis iniciais, segundo a faixa de positividade, nos 74 pacientes portadores de insuficiência renal crônica tratados somente com transfusão sanguínea seguida de eritropoetina humana recombinante

Painel Final	Painel Inicial					
	baixo		médio		alto	
	n	%	n	%	n	%
baixo	52	91,2%	5	50,0%	4	57,1%
médio	2	3,5%	4	40,0%	1	14,3%
alto	3	5,3%	1	10,0%	2	28,6%
Total	57	100,0%	10	100,0%	7	100,0%

TABELA 6 – Evolução dos painéis iniciais, segundo a faixa de positividade, nos 60 pacientes portadores de insuficiência renal crônica tratados com eritropoetina humana recombinante e transfusão sangüínea ocasional

Painel Final		Painel Inicial					
		baixo		médio		alto	
		n	%	n	%	n	%
	baixo	37	88,1%	5	50,0%	2	25,0%
	médio	1	2,4%	2	20,0%	2	25,0%
	alto	4	9,5%	3	30,0%	4	50,0%
Total		42	100,0%	10	100,0%	8	100,0%

V- DISCUSSÃO

O complexo principal de histocompatibilidade do homem, o Sistema HLA, é o alvo principal de respostas imunes em transplantes, depois do grupo sanguíneo ABO. As proteínas de membrana do Sistema HLA, encontradas em todos os órgãos e tecidos humanos, funcionam com aloantígenos graças ao seu extremo polimorfismo. Dessa forma é comum encontrarmos nas filas de espera para transplantes, pacientes com anticorpos já formados contra antígenos do Sistema HLA, desenvolvidos após gestações, transplantes prévios e/ou transfusões^{46,48-50}.

Bender em 1984 relatou que a presença de anticorpos anti-HLA pré-formados no soro do pacientes candidato a transplante renal poderia levar a uma perda rápida do enxerto por rejeição hiperaguda. O PRA é a primeira avaliação a que um paciente encaminhado para transplante deve ser submetido para que se possa avaliar a sensibilização prévia contra antígenos HLA. Sabe-se que o encontro de altos níveis de PRA em candidatos a transplante renal diminui significativamente a possibilidade de transplante deste paciente com um potencial doador, o que faz com que esses pacientes representem um grupo com menores chances de transplante.

A introdução da r-HuEPO no final dos anos 80 como terapêutica no tratamento da anemia do paciente renal crônico diminuiu substancialmente a necessidade de transfusões sanguíneas nesta população. A queda significativa dos níveis de PRA observada no grupo III de nosso estudo reforça os dados da

literatura que mostram que a utilização da r-HuEPO interrompe o estímulo antigênico proporcionado pelas transfusões, com conseqüente diminuição dos níveis de sensibilização contra antígenos HLA.

O efeito do estímulo antigênico proporcionado pelas transfusões sobre a sensibilização do paciente pode ser ainda demonstrado em nosso estudo quando verificamos que o PRA observado nos soros iniciais dos pacientes dos grupos I, III e IV, que receberam 1 ou mais transfusões, é significativamente maior que o dos pacientes do grupo II, formado por indivíduos que nunca haviam sido transfundidos. Um reforço adicional a este conceito pode ser obtido quando comparamos o PRA médio observado nos soros finais dos grupos I ($26,48 \pm 3,42$) com o PRA médio do grupo III ($10,46 \pm 2,59$). Estes resultados estão de acordo com aqueles observados por Koskimies e cols. em 1990, que analisando a positividade contra PRA dos soros iniciais e finais de 16 pacientes tratados com r-HuEPO após o uso de transfusões, demonstraram que 62,5% dos pacientes apresentaram uma queda significativa dos níveis de sensibilização.

Quando comparamos os resultados do PRA dos soros iniciais e finais dentro de cada grupo, observamos um marcante aumento da positividade do PRA no grupo I quando comparado com os resultados observados nos grupos II e III, possivelmente devido à utilização constante de transfusões com conseqüente permanência de estímulo antigênico observada naquele grupo de pacientes. No grupo III, observou-se uma queda de positividade do PRA que, embora não alcance diferença estatisticamente significativa torna-se mais evidente quando comparamos os resultados dos painéis por faixa de positividade, onde alguns pacientes passam da faixa de alta (>50%) para faixa

de baixa positividade (<20%), numa redução significativa de sensibilização.

No grupo IV, formado por pacientes que durante o tratamento com r-HuEPO necessitaram de transfusões sanguíneas, não foi observado uma diferença significativa entre os níveis de PRA dos soros iniciais e finais, onde a alternância do tratamento possivelmente foi responsável pela permanência do estímulo antigênico acarretando uma semelhança dos níveis de PRA.

Mourad e cols. em 1992, em um estudo envolvendo 23 pacientes altamente sensibilizados (PRA>80%) observaram uma queda significativa na média de PRA neste grupo de pacientes ($88,13 \pm 1,7\%$ para $18,8 \pm 5,6\%$) após uso da r-HuEPO. Phelan e cols. em 1991 obtiveram resultados semelhantes aos destes autores, onde 20% dos pacientes tratados com r-HuEPO apresentaram redução do PRA.

Grimm e cols. em 1990, estudando cinco adolescentes dependentes de transfusões e que apresentaram pelo menos um transplante, verificaram que quando os pacientes foram submetidos ao tratamento com r-HuEPO, houve uma queda de $80 \pm 24\%$ no PRA inicial para $56 \pm 40,8\%$ ao final do estudo ($p<0,05$). O único paciente a receber transfusões adicionais manteve PRA em torno de 97%. Como grupo controle, cinco pacientes em tratamento contínuo com transfusões, mantiveram média de PRA acima de 86%.

Bárány e cols. em 1992, concluem como o principal achado clínico de seu trabalho, a diminuição gradativa nos títulos de anticorpos em indivíduos politransfundidos e que em alguns casos essa queda poderia chegar até a negatificação.

Além da interrupção de estímulos antigênicos, a presença de anticorpos anti-idiotipo no soro de pacientes sensibilizados tem sido largamente apontada como possível responsável pela queda significativa dos níveis de PRA em candidatos a transplante renal. MacLeod e cols. em 1989, observaram a presença de anticorpos anti-idiotipo no soro de pacientes desenvolvidos após transfusões sanguíneas e gestações. Estes autores, bem como Phelan e cols.⁴² relataram que possivelmente tais anticorpos apresentem papel imunossupressivo, já que nos pacientes estudados, estão relacionados com a perda da sensibilização.

Mourad e cols.³⁴ discutem a possibilidade da existência de fatores genéticos e a ocorrência de fatores não relacionados a transfusões como possíveis responsáveis pela manutenção de altos níveis de sensibilização. Por sua vez, Friedlaender e cols.¹⁸ tentam explicar a manutenção de altos níveis de sensibilização através da persistência de uma significativa expansão clonal de populações de linfócitos B e células T auxiliares que amplificam a resposta imune humoral com produção de anticorpos desenvolvidos mesmo que contra quantidades reduzidas de antígenos HLA provenientes de transfusões sanguíneas.

Em conformidade com os resultados dos pesquisadores acima citados, nosso trabalho demonstra o efeito benéfico do uso da r-HuEPO no tratamento da anemia do paciente portador de insuficiência renal crônica, reduzindo as necessidades transfusionais e o risco de sensibilização do paciente, propiciando a este melhores possibilidades de receber um transplante renal.

VI- CONCLUSÕES

1. Os pacientes que receberam somente transfusões sangüíneas apresentam maior taxa de sensibilização, com aumento nos níveis de PRA de $15,50 \pm 2,43$ para $26,48 \pm 3,40$ ($p < 0,001$).
2. A introdução da r-HuEPO permitiu a interrupção do estímulo antigênico com queda significativa no grau de sensibilização . O retorno do estímulo antigênico através de transfusões nos pacientes em uso de r-HuEPO, acarreta nova elevação dos níveis de sensibilização.

A introdução da r-HuEPO no tratamento da anemia dos pacientes com insuficiência renal crônica permite eliminar as necessidades transfusionais e suas inconveniências, além do estímulo antigênico, reduzindo a sensibilização do paciente que terá melhores chances de se submeter a um transplante renal.

VII- SUMMARY

To examine whether recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) results in decreased presensitization to foreign HLA antigens, we retrospectively analyzed data from 267 patients who had undergone routine panel reactive antibody (PRA) screening.

We studied chronic dialysis patients awaiting for renal transplantation in university hospital Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, between august 1986 and march 1998.

The results indicate that the patients treated with transfusions and later treated with r-HuEPO present a significant drop in PRA ($10,46 \pm 2,59$) while patients treated with trasnfusions only, present an increase in PRA ($26,48 \pm 3,4$) and that this diference was significant ($p < 0,001$).

The introduction of r-HuEPO therapy has dramatically reduced blood transfusions requirements on chronic dialysis patients, resulting in less exposure to foreign HLA antigens, following less sensitization in this patients group.

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BÁRÁNY, P.I., FEHRMAN, I., GODOY, C. Long-term effects on lymphocytotoxic antibodies and immune reactivity in hemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. **Clin., Nephrol.**, v.37, n.2, p.90-96, 1992.
2. BÁRÁNY, P., PETTERSON, E., BERGSTRÖN, J. Erythropoietin treatment improves quality of life in hemodialysis patients. **Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.**, n.131, p.55-60, 1990.
3. BENDER, K. HLA system. **Biotest. Bull.**, v.2, p.64-116, 1984.
4. BRAUN, G.E., ROTH, G.M. The anaemia of chronic nephritis. **Arch. Intern. Med.**, v.30, p.817-840, 1933.
5. BRIGHT, R. apud REMUZZI, G. ROSSI, E.C. The anaemia of renal failure. In: BRENNER, E. **Rector's The Kidney**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. v.2.
6. CANADIAN ERYTHROPOIETIN STUDY GROUP. Association between recombinant human erythropoietin and quality of life and exercise capacity of patients receiving hemodialysis. **Br. Med. J.**, v.300, n.6724, p.573-578, 1990.
7. CANAVO, B., POLITO-BOULOUX, C., MION, C. et al. Recombinant human erythropoietin: 18 month's experience in hemodialysis patients.

- Am. J. Kidney Dis.**, v.15, n.2, p.169-175, 1990.
8. DEIERHOI, M.H., SHROYER, T.W., HUDSON, S.L., BARGER, B.O., BARBER, W.H., CURTIS, J.J., JULIAN, B.A., DIETHELM, A.G. Sustained high panel reactive antibody levels in highly sensitized patients: significance of continued transfusions. **Transplant. Proc.**, v.21, n.1, p.771-772, 1989.
 9. DEIERHOI, M.H., BARGER, B.O., HUDSON, S.L., SHROYER, T.W., DIETHELM, A.G. The effect of erythropoietin and blood transfusions on highly sensitized patients on a single cadaver renal allograft waiting list. **Transplantation**, v.53, n.2, p.363-368, 1992.
 10. ERSLEV, A. J. Humoral regulation of red cell production. **Blood**, v.8, p.349-357, 1953.
 11. ESCHBACH, J.W. Erythropoietin: the promise and the facts. **Kidney Int. Suppl.**, v.45, n. 44, p.570-576, 1994.
 12. ESCHBACH, J.W., ADAMSON, J.W. Recombinant human erythropoietin: implications for nephrology. **Am. J. Kidney Dis.**, v.11, n.3, p.203-209, 1988.
 13. ESCHBACH, J.W., ABDULHADI, M.H., ADAMSON, J.W., et al. Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal disease. **Ann. Intern. Med.**, v.111, p.992-1000, 1989.
 14. ESCHBACH, J.W., EGRIE, C.J., DOWNING, M.R., BROWNE, J.K., ADAMSON, J.W. Correction of the anaemia of end-stage renal disease

with recombinant human erythropoietin. Results of combined phase I and II clinical trial. **N. Engl. J. Med.**, v.316, n.2, p.73-78, 1987.

15. EVANS, R.W., RADER, B., MANNINEN, D.L., et al. The quality of life of hemodialysis recipients treated with recombinant human erythropoietin. **JAMA**, v.263, n.6, p.825-830, 1990.
16. FAUCHET, R., WATTELET, J., GENETET, B., CAMPION, J.P., LAUNOIS, B., CARTIER, F. Role of blood transfusions and pregnancies in kidney transplantations. **Vox Sang.**, v.37, p.222-228, 1979.
17. FEHRMAN, I., GROTH, C.G., LUNDGREN, G., MAGNUSSON, G., RINGDEN, O., MÖLLER, E. Effect of blood transfusions on immune response and kidney graft survival. **Transplant. Proc.**, v.14, n.1, p.156-159, 1982.
18. FRIEDLAENDER, M.M., AZEM, O., RUBINGER, D., BRAUTBART, C. Effect of recombinant human erythropoietin therapy on panel reactive antibodies in chronic hemodialysis patients. **Isr. J. Med. Sci.**, v.32, p.730-736, 1996.
19. GRIMM, P.C., SEKIYA, N.M., ROBERTSON, L.S., ROBINSON, B.J., ETTINGER, R.B. Recombinant human erythropoietin decreases HLA sensitization and may improve renal allograft outcome: involvement of anti-idiotypic antibodies. **Transplant. Proc.**, v.23, n.1, p.407-408, 1991.
20. GRIMM, P.C., SINAI-TRIEMAN, L., SEKIYA, N.M., ROBERTSON, L.S., ROBINSON, B.J., FINE, R.N., ETTINGER, R.B. Effects of recombinant

human erythropoietin on HLA sensitization and cell mediated immunity.
Kidney Int., v.38, p.12-18, 1990.

21. GUTHRIE, M., CARDENAS, D., ESCHBACH, J.W., HALEY, N.R., ROBERTSON, H.C., EVANS, R.W. Effects of erythropoietin on strength and functional status of patients on hemodialysis. **Clin. Nephrol.**, v.39, n.2, p.97-102, 1993.
22. HORS, J. Microlymphocytotoxicite (groupage pour les antigenes HLA de locus A, B et C) **Tecnicien Biol.**, v.516, p.497-497, 1979.
23. IWAKI, Y., CECKA, J.M., TERASAKI, P.I. **Clinical transplants**. Los Angeles: Ucla Tissue Typing Laboratory, 1988. cap. 30: The transfusion effect, p.283-292.
24. JACOBS, K., SHOEMAKER, C., RUDERSDORF, R., Et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. **Nature**, v.313, p.806-810, 1985.
25. JACOBSON, L.O., GOLDWASSER, E., FRIED, W., PLZAK, L. Role of the kidney in erythropoiesis. **Nature**, v.179, p.633-634, 1957.
26. KOSKIMIES, S., LAUTENSCHLAGER, I., GRÖNHAGEN-RISKA, C., HÄYRY, P. Erythropoietin therapy and the antibody levels of highly sensitized patients awaiting kidney transplantation. **Transplantation**, v.50, n.4, p.707-709, 1990.
27. LAVEENSTEIN, K.J. Lymphocytotoxicity test for typing. In: MALLORY, D. & FAWLETT, K. HLA techniques for blood bankers. Arlington,

Virginia, 1984. Cap. 3, p.33-76.

- 28.LIN, F.K., SUGGS, S., LIN, C.H., Et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, n.22, p.7580-7584, 1985.
- 29.MACDOUGALL, I.C. How to get the best out of r-HuEPO. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.10, suppl.2, p.85-91, 1995.
- 30.MACLEOD, A.M., AL-MUZAIRAI, I.A., INNES, A., POWER, D.A., STEWART, K.N., CATTO, G.R.D. Modulation of lymphocytotoxic activity in highly sensitized patients by anti-idiotypic antibodies. **Transplant. Proc.**, v.21, n.1, p.756-757, 1989.
- 31.MARKHAN, A., BRYSON, H.M. Epoetin alfa: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in nonrenal applications. **Drugs**, v.49, n.2, p.233-254, 1995.
- 32.MAYER, G., THUM, J., CADA, E.M., STUMMVOL, H.K., GRAF, H. Working capacity is increased following recombinant human erythropoietin treatment. **Kidney Int.**, v.34, n.4, p.525-528, 1988.
- 33.McMAHON, L.P., DAWBORN, J.K. Subjective quality of life assessment in hemodialysis patients at different levels of hemoglobin following use of recombinant human erythropoietin. **Am. J. Nephrol.**, v.12, n.2, p.162-169, 1992.
- 34.MOURAD, G., CRISTOL, J.P., CHONG, G., LORTHO, R., ARGILES, A., SEIGNALET, J., MION, C. Disappearance of anti-HLA antibodies in

- highly sensitized patients treated with erythropoietin. **Transplant. Proc.**, v.24, n.6, p.2512-2513, 1992.
- 35.MUIRHEAD, N., LAUPACIS, A., WONG, C. Erythropoietin for anaemia in hemodialysis patients: result of a maintenance study (The Canadian Erythropoietin Study Group). **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.7, p.811-816, 1992.
- 36.MUIRHEAD, N., BARGMAN, J., BURGESS, E., JINDAL, K.K., LEVIN, A., NOLIN, L., PARFREY, P. Evidence-based recommendations for the clinical use of recombinant human erythropoietin. **Am. J. Kidney Dis.**, v.26, n.2 suppl.1, p.S1-S24, 1995.
- 37.NEUMANN, J., ABBUD FILHO, M., GARAS, V. D. **Transplante de órgãos e tecidos**. São Paulo: Sarvier, 1985. 465p.
- 38.OPELZ, G., TERASAKI, P.I. Improvement of kidney-graft survival with increased numbers of blood transfusions. **N. Engl. J. Med.**, v.299, n.15, p.799-803, 1978.
- 39._____. Dominant effect of transfusions on kidney graft survival. **Transplantation**, v.29, n.2, p.153-158, 1980.
- 40.OPELZ, G., GRAVER, B., MICKEL, M.R., TERASAKI, P.I. Lymphocytotoxic antibody responses to transfusions in potential kidney transplant recipients. **Transplantation**, v.32, n.3, p.177-183, 1981.
- 41.PARSONS, L., EKOLA-STROLBERG, M. Anaemia in azotemia. **Am. J. Med. Sci.**, v.185, p.181-190, 1933.

- 42.PHELAN, D.L., HIBBETT, S., WETTER, L., HANTO, D.W., MOHANAKUMAR, T. Recombinant erythropoietin: does it really effect sensitization. **Transplant. Proc.**, v.23, n.1, p.409-410, 1991.
- 43.POWELL, J.S., BERKNER, K.L., LEBO, R.V., ADAMSON, J.W. Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mamalian cells and chromossome localization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, p.6465-6469, 1986.
- 44.REISSMANN, K.R. Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiatic rats during hipoxia. **Blood**, v.5, p.372-380, 1950.
- 45.REMUZZI, G., ROSSI, E.C. The anaemia of renal failure. In: BRENNER E **RECTOR'S The kidney**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. v.2.
- 46.SANFILIPPO, F., VAUGHN, W.K., BOLLINGER, R.R., SPEES, E.K. Comparative effects of pregnancy, transfusions and prior graft rejection on sensitization and renal transplants results. **Transplantation**, v.34, n.6, p.360-366, 1982.
- 47.SHAW, A.B. Haemolysis in chronic renal failure. **Br. Med. J.**, v.2, p.213-216, 1967.
- 48.SILVA, S.F.R. **Anticorpos anti-HLA: influência do número de gestações na produção de anticorpos anti-HLA**. Fortaleza, 1987. Monografia (Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia) – Universidade Federal do Ceará.
- 49.SILVA, S.F.R., SILVA, S.L., CAMPOS, H.H. **Reatividade contra painel**

de linfócitos em candidatos a transplante renal. Fortaleza, 1998.

- 50.SILVA, S.F.R., VIEIRA, M.L.C., CAVALCANTE, M.C.S., ARRUDA, D.M.M., EVANGELISTA Jr, J.B., MARQUES, R. B., CAMPOS, H.H. **Characterization of anti-HLA antibodies (LAB) in renal transplant candidates.** Fortaleza, 1989.
- 51.SPEES, E.K., VAUGHN, W.K., NIBLACK, G., Et al. Effects of blood transfusions on cadaver renal transplantation. **Transplantation**, v.30, n.6, p.455-463, 1980.
- 52.SUNDAL, E., BUSINGER, J., KAPPELER, A. Treatment of transfusion-dependent anaemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin. A European Multicenter Study in 142 patients to define dose regiment and safety profile. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.6, p.955-965, 1991.
- 53.SUNDAL, E., KAESER, V. Correction of anaemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin: safety and efficacy of one year 's treatment in a European Multicenter Study of 150 hemodialysis-dependent patients. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.4, p.979-987, 1989.
- 54.TING, A.E., WELCH, K. HLA matching and crossmatching in renal transplantation. In: MORRIS, P. **Kidney transplantation: principles and practice.** Philadelphia: W. B. Saunders, 1994.
- 55.USO da eritropoietina recombinante humana no tratamento da anemia da insuficiência renal crônica. EPREX r-HuEPO. São Paulo: CILAG [19..?]

(Monografía Clínica).

56. WILLIAMS, K.A., TING, A., CULLEN, R., MORRIS, P.J. Transfusions: their influence on human renal graft survival. **Transplant. Proc.**, v.11, n.1, p.175-178, 1979.
57. WINEARLS, C.G., OLIVER, D.O., PIPPARD, M. J., REID, C., DOWNING, M.R., COTES, P.M. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic hemodialysis. **Lancet**, v.2, p.1175-1177, 1986.
58. WOLCOTT, D.L., MARSH, J.T., LA RUE, A., CARR, C., NISSENSON, A.R. Recombinant human erythropoietin treatment may improve quality of life and cognitive function in chronic hemodialysis patients. **Am. J. Kidney Dis.**, v.14, n.6, p.478-485, 1989.
59. ZACHARY, A.A., DEGELO, C.L., KAIHOE, D.G., BRAUN, W.E. Investigación de anticuerpos HLA en sueros. In: ROSE, N.R., FRIEDMAN, H. **El laboratorio en inmunología clínica**. 2.ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1984. cap.128, p.1063-1075.