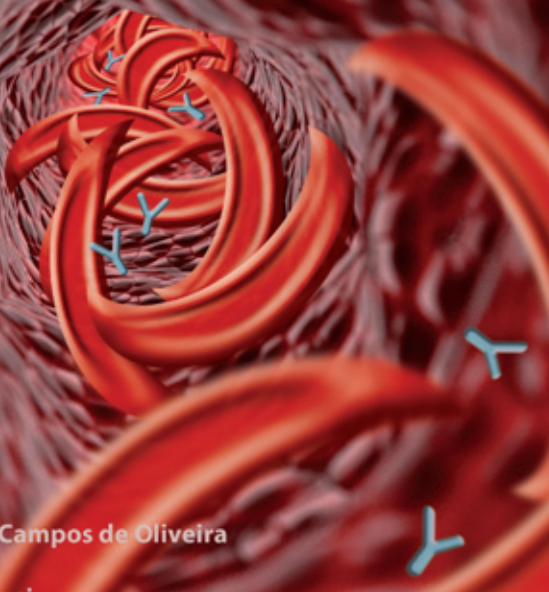
Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia



Organização
Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira
Flávia Coelho Ribeiro
Alexandre Gomes Vizzoni

ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Presidente
Paulo Gadelha

ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO

Diretor
Paulo César de Castro Ribeiro

Vice-diretora de Ensino e Informação
Páulea Zaquini Monteiro Lima

Vice-diretora de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico
Marcela Alejandra Pronko

Vice-diretor de Gestão e Desenvolvimento Institucional
José Orbilio de Souza Abreu

Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia

Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira
Flávia Coelho Ribeiro
Alexandre Gomes Vizzoni
organização

Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
Rio de Janeiro2013
2013

Copyright © 2013 dos organizadores
Todos os direitos desta edição reservados à
Escola Politécnica da Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz

Coordenação editorial
Marcelo Paixão

Edição de texto
Lisa Stuart

Capa, projeto gráfico e diagramação
Maycon Gomes

Catalogação na fonte
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – Biblioteca Emília Bustamante

O48c Oliveira, Maria Beatriz Siqueira Campos de (org.)
Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia. / Organização de Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira, Flávia Coelho Ribeiro e Alexandre Gomes Vizzoni. - Rio de Janeiro: EPSJV, 2013.

156 p. : il.

1. Imunologia. 2. Hemoterapia 3. Pessoal de laboratório. 4. Segurança do sangue. 5. Exposição a agentes biológicos. I. Título. II. Ribeiro, Flávia Coelho. III. Vizzoni, Alexandre Gomes.

CDD 616.079

ISBN: 978.85.98768-69-4

Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
Avenida Brasil, n° 4.365 – Manguinhos
21040-360 Rio de Janeiro – RJ
☎ (21) 3865-9717

Sumário

7 **Prefácio**

Margarida de Oliveira Pinho

9 **Apresentação**

Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira
Flávia Coelho Ribeiro
Alexandre Gomes Vizzoni

11 **Bioquímica eritrocitária**

Elmo Eduardo de Almeida Amaral
Valter Viana de Andrade Neto

35 **Hematologia e imunologia aplicadas à imuno-hematologia**

Paulo Roberto S. Stephens
Flávia C. Ribeiro
Valmir L. da Silva
Marcos Antonio P. Marques

65 **Imuno-hematologia eritrocitária**

Alexandre Gomes Vizzoni
Paulo Marcelo T. Cotias

99 **Biossegurança em laboratórios de saúde**

Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira
Joseli Maria da Rocha Nogueira

153 **Os autores**

Prefácio

Ter sido convidada para prefaciar um livro sobre imuno-hematologia voltado para técnicos de laboratório foi muito gratificante, não só pelo tema, mas também pelo elevado nível técnico-científico da equipe de autores, integrantes do quadro de profissionais da Fundação Oswaldo Cruz, instituição reconhecida internacionalmente pela excelência de seu desempenho na pesquisa.

A imuno-hematologia constitui uma especialidade dentro da imunologia. Sua inclusão de forma mais específica na formação de técnicos de laboratório é de grande relevância para os laboratórios clínicos e para a medicina transfusional, um segmento da hemoterapia.

A imuno-hematologia é o estudo dos antígenos presentes nas hemácias (eritrócitos), dos anticorpos a eles correspondentes e de seu significado clínico. A descoberta dos primeiros grupos sanguíneos A, B e O, em 1901, pelo médico austríaco Karl Landsteiner, foi o marco entre a era empírica e a era científica na história da hemoterapia. O início da era científica possibilitou a descoberta de outros antígenos de grupos sanguíneos, utilizando-se o método sorológico para detectar aglutinação direta decorrente da reação antígeno–anticorpo. Em 1945, foi descrito por Coombs, Mourant e Race o teste de Coombs, preferencialmente chamado de teste de antiglobulina humana, uma das técnicas mais importantes usadas no estudo dos grupos sanguíneos humanos. O soro antiglobulina humana é utilizado para detectar anticorpos que não causam aglutinação direta das hemácias, o que revolucionou a sorologia dos grupos sanguíneos, possibilitando a descoberta de anticorpos produzidos por aloimunizações decorrentes de transfusão ou gestação.

Na última década, a biologia molecular foi responsável por mais um avanço, com especial foco no estudo da estrutura e função do material genético e seus produtos de expressão, as proteínas membranares, que geram os antígenos de grupos sanguíneos.

A compreensão da imuno-hematologia eritrocitária depende do conhecimento multidisciplinar em genética, imunologia e bioquímica, para apoio básico indispensável aos laboratórios de diagnóstico e, principalmente, aos serviços de hemoterapia.

A qualidade da imuno-hematologia na execução dos exames imuno-hematológicos – como tipagem sanguínea, prova de compatibilidade, pesquisa e identificação de anticorpos irregulares, teste direto de antiglobulina humana e fenotipagens – e na correta utilização do soro antiglobulina humana é fundamental para o diagnóstico da doença hemolítica perinatal, da anemia hemolítica autoimune e da conduta transfusional nos transplantes ABO e/ou Rh incompatíveis, contribuindo para a segurança transfusional.

A importância da imuno-hematologia para a formação de técnicos de laboratório fez os autores escreverem este livro. E a inclusão de um capítulo sobre biossegurança complementa e contribui para a adoção de boas práticas de laboratório.

Por causa da minha experiência na área de hemoterapia, com ênfase em imuno-hematologia, e também como docente, contribuindo na formação e na capacitação de profissionais da saúde, tenho a satisfação de cumprimentar os autores, que, oportunamente, decidiram preencher esta lacuna, de forma simples e clara, possibilitando o avanço no conhecimento da imuno-hematologia para a formação de técnicos de laboratório.

Dra. Margarida de Oliveira Pinho
Responsável pelo Laboratório de Imuno-hematologia
do Serviço de Hemoterapia
do Instituto Nacional do Câncer (Inca)

Apresentação

Este livro é fruto do trabalho coletivo de profissionais de diferentes unidades da Fiocruz com um mesmo objetivo: o do ensino de qualidade para técnicos de laboratório. Professores da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV), da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Ensp), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), do Instituto Fernandes Figueira (IFF) e do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (Ipec) se uniram para elaborar o livro *Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia*, que pretende atender a demanda nacional dos cursos técnicos na área. Além disso, a presença no Curso de Imuno-Hematologia da EPSJV de estudantes provenientes de países africanos de língua portuguesa fortalece a necessidade de uma produção didática para esses alunos, reforçando a cooperação técnica internacional firmada entre a Fiocruz e esses países.

A área de imuno-hematologia é complexa. Abarca a origem e as funções das células sanguíneas e a interação molecular entre antígenos e anticorpos que são a base para o entendimento de questões fundamentais na prática do serviço de saúde e para a decisão de transfundir considerando a necessidade do paciente, o risco e o benefício. Nessa perspectiva, o livro introduz aos técnicos de laboratório, por meio de uma linguagem clara, objetiva e acessível, conteúdos teóricos para a compreensão das bases da imuno-hematologia básica e aplicada.

Os capítulos 1 e 2 resgatam conceitos básicos de bioquímica, imunologia e hematologia, tais como biossíntese dos grupos sanguíneos, características das células sanguíneas e bases dos testes laboratoriais em imuno-hematologia eritrocitária. O capítulo 3 dá continuidade à análise das aplicações práticas dos principais antígenos de grupos sanguíneos eritrocitários – sistemas ABO, Rh e outros –, importantes na hemoterapia, dos princípios e fundamentos técnicos da rotina imuno-hematológica e bases para a sua aplicação aos processos imuno-

hematológicos. O capítulo 4 aborda a biossegurança, apresentando um panorama geral das normas internacionais, publicadas periodicamente pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e das normas nacionais, recomendadas pelo Ministério da Saúde, para profissionais da área da saúde, enfocando principalmente agentes e riscos a que estão expostos esses trabalhadores.

Este livro pretende preencher uma lacuna na área da produção de livros técnicos, ao atender a demanda do técnico de laboratório especialista na área de imuno-hematologia por um material direcionado para o seu trabalho, mas com conteúdo abrangente e com bastante fundamentação teórica.

Pela realização de mais um sonho, agradecemos à Fiocruz, instituição à qual nos orgulhamos de pertencer, à direção da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, que incentivou e apoiou a produtiva parceria que culminou na produção deste livro, aos queridos colegas, autores e revisores dos capítulos, responsáveis diretos pela idealização e realização desta obra, à doutora Margarida Pinho, que gentilmente aceitou o convite para prefaciar esta edição, e um agradecimento especial a Josane Ferreira Filho, que secretariou este livro com carinho e eficiência.

Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira
Flávia Coelho Ribeiro
Alexandre Gomes Vizzoni

Bioquímica eritrocitária

Elmo Eduardo de Almeida Amaral
Valter Viana de Andrade Neto

Introdução

A membrana plasmática é importante para a vida da célula, pois, além de englobar e definir seus limites, ela mantém as diferenças essenciais entre os meios intra e extracelular. Podemos definir a membrana plasmática como um filme muito fino, composto de lipídeos e proteínas que permanecem unidos por interações não covalentes.

A composição da membrana plasmática do eritrócito contém 39,5% de proteínas, 35,1% de lipídeos e 5,8% de carboidratos – esses últimos presentes no lado extracelular da bicamada lipídica.

Os lipídeos da membrana plasmática se arranjam numa camada dupla contínua, com espessura de aproximadamente 5 nm. Essa bicamada lipídica é responsável pela estrutura fluida da membrana e serve como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis. As proteínas presentes na bicamada lipídica atuam como mediadoras para praticamente todas as outras funções da membrana, entre elas o transporte de moléculas específicas através da bicamada lipídica. Também atuam como ligantes estruturais que conectam o citoesqueleto, por meio da bicamada lipídica, tanto à matriz celular quanto às células adjacentes, servindo como receptores para a detecção e a transdução de sinal, fazendo a célula interagir com o ambiente que a envolve. Quando comparamos a camada interna (camada citosólica) e a camada externa (camada extracelular) da bicamada lipídica, encontramos diferenças na composição dos lipídeos. Essas diferenças refletem as várias funções das duas monocamadas da membrana plasmática.

Todos os lipídeos que formam a membrana plasmática são anfipáticos (ou anfifílicos), isto é, apresentam uma parte hidrofóbica (apolar) e uma parte hidrofílica (polar). Essa característica anfipática dos lipídeos é responsável pela formação espontânea da bicamada lipídica em ambiente aquoso. Isso faz que a porção hidrofílica esteja voltada para a água, enquanto a porção hidrofóbica está voltada para o interior.

Existem três principais classes de lipídeos de membrana: os fosfolipídeos, o colesterol e os glicolipídeos. Os fosfolipídeos são os lipídeos mais abundantes – representam 60% dos lipídeos de membrana. Eles apresentam uma extremidade polar (cabeça polar) e duas caudas apolares, compostas de hidrocarbonetos. As caudas apolares normalmente são ácidos graxos, que podem apresentar diferentes números de átomos de carbono, variando assim o seu comprimento. Uma cauda pode ser insaturada e a outra, saturada. Essas diferenças na saturação e no comprimento dos ácidos graxos presentes nos fosfolipídeos influenciam na fluidez da membrana plasmática (fig. 1).

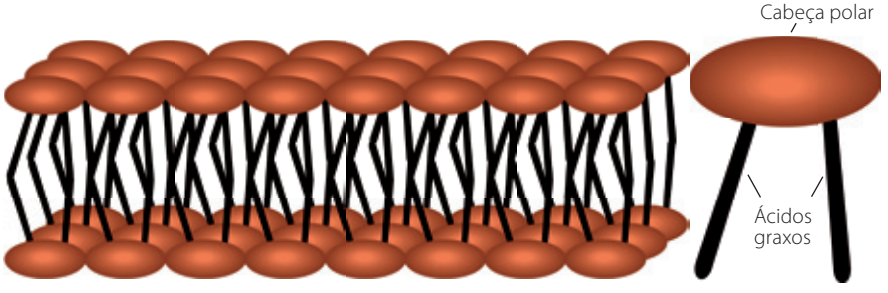


Figura 1. Fosfolipídeos que compõem a bicamada lipídica.

A membrana plasmática contém 30% de colesterol. A finalidade do colesterol na membrana plasmática é diminuir a permeabilidade da membrana a pequenas moléculas. Isso acontece porque o colesterol interage com os fosfolipídeos presentes na bicamada lipídica: com o seu anel esteroide rígido e em forma de placa, o colesterol posiciona-se na bicamada lipídica, interagindo com a cadeia de ácido graxo do fosfolipídeo e ocasionando a redução da sua mobilidade.

Os glicolipídeos, que representam 10% dos lipídeos da membrana plasmática, são lipídeos que contêm açúcar. Essas moléculas são encontradas exclusivamente na camada extracelular (camada externa) da membrana plasmática. Eles têm como função permitir que a célula interaja com o ambiente extracelular.

Os aminoácidos são moléculas que têm na sua estrutura um grupamento carboxílico, um grupamento amino e um grupamento R diferenciado substituinte, todos ligados ao carbono α. A substituição do grupamento R faz que existam vinte tipos de aminoácidos.

As proteínas são macromoléculas biológicas presentes em todas as células. Elas possuem grande variedade de funções biológicas. Todas as proteínas são formadas a partir do mesmo conjunto de vinte aminoácidos, ligados covalentemente e linearmente, sendo a linearidade da ligação dos aminoácidos característica de cada proteína.

A maior parte das proteínas da membrana plasmática do eritrócito pode ser dividida em proteínas periféricas e proteínas integrais. As proteínas periféricas são proteínas presentes no lado citosólico da bicamada lipídica que não atravessam a membrana plasmática do eritrócito. Como exemplo de proteínas periféricas, podemos citar as espectrinas. As proteínas integrais estão inteiramente embebidas na bicamada lipídica. Elas atravessam a membrana plasmática e são encontradas tanto na porção extracelular quanto na porção intracelular (camada citosólica). As proteínas integrais podem atravessar a membrana uma única vez ou várias vezes. Chamamos domínio transmembranar cada uma das passagens da proteína através da membrana. Como exemplo de proteínas integrais, temos as glicoforinas (fig. 2).

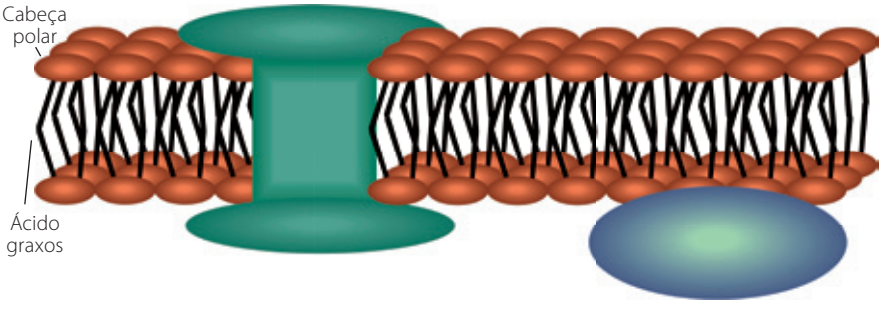


Figura 2. Tipos de proteínas encontradas na membrana plasmática dos eritrócitos: em azul, as proteínas periféricas, ligadas à membrana plasmática dos eritrócitos apenas em um dos lados da membrana; em verde, as proteínas integrais, que atravessam toda a bicamada lipídica e podem ser encontradas nos dois lados da membrana.

De acordo com a sua função, as proteínas também podem ser divididas em três grupos: proteínas estruturais integrais de membrana (ban-

da 3 – glicoforina); proteínas do citoesqueleto (banda 4.1 – espectrina, actina); proteínas de ancoragem (anquirina).

Banda 3 é uma proteína majoritária integral de membrana presente na membrana celular dos eritrócitos. É composta de 911 aminoácidos e apresenta de 12 a 14 domínios transmembranares. A região da proteína voltada para o citosol – chamada domínio citoplasmático – está associada a diversas proteínas. Esse domínio é responsável pela ancoragem de várias proteínas, como a anquirina, a proteína 4.2 e proteínas do citoesqueleto.

A banda 3 existe na forma de dímero – duas formas idênticas das mesmas proteínas unidas – ou na forma de tetrâmero – quatro bandas 3 unidas, formando uma única proteína.

As glicoforinas A são proteínas integrais de membrana que contêm um resíduo de ácido siálico. Os resíduos de ácido siálico (fig. 3) são abundantes na membrana plasmática do eritrócito: 60% da carga negativa presente na membrana do eritrócito são provenientes da presença do ácido siálico. A manutenção da carga negativa nos eritrócitos é importante nas interações eritrócito–eritrócito e eritrócito–células sanguíneas, como veremos mais adiante.

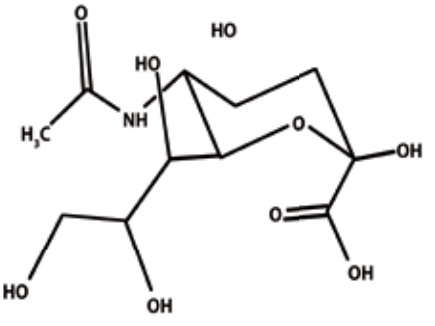


Figura 3. Estrutura química do ácido siálico.

A glicoforina A ou sialoglicoproteína é formada por 131 aminoácidos e apresenta apenas um domínio transmembranar. A glicoforina A está intimamente ligada à proteína banda 3, que é importante para a síntese e a estabilidade da glicoforina A.

Apesar de o ácido siálico presente na glicoforina A ser responsável pela carga negativa da membrana plasmática dos eritrócitos, células deficientes em glicoforina A não apresentaram mudanças na carga da superfície da membrana plasmática.

O citoesqueleto da membrana plasmática do eritrócito é formado por três proteínas principais: a espectrina, a proteína 4.1 e a actina. Essas proteínas, presentes no lado citosólico da bicamada lipídica, formam uma rede horizontal, essencial na manutenção da forma característica da hemácia.

A espectrina é constituída por duas cadeias – as cadeias α e β – que se unem para formar uma estrutura heterodimérica. Os heterodímeros ligam-se cabeça com cabeça, formando uma estrutura tetramérica. As extremidades caudais de quatro ou cinco tetrâmeros estão agrupadas pela ligação com filamentos curtos de actina e com a proteína 4.1. Essa união forma o que chamamos de complexo de junção. O resultado final do complexo de junção é uma estrutura maleável, em forma de rede, que recobre toda a superfície citosólica da membrana plasmática do eritrócito. É essa estrutura que permite às hemácias suportarem a pressão quando passam através de capilares muito finos (fig. 4).

O citoesqueleto está ligado à membrana plasmática mediante a interação entre proteínas. A anquirina e a proteína 4.2 são as responsáveis por essa interação. Essas proteínas ligam a banda 3 ao complexo de junção. Especificamente, a anquirina é uma proteína de ancoragem que promove a ligação da banda 3 com a espectrina. A ligação da banda 3 com a espectrina por meio da anquirina também reduz a difusão da banda 3 pela bicamada lipídica (fig. 4).

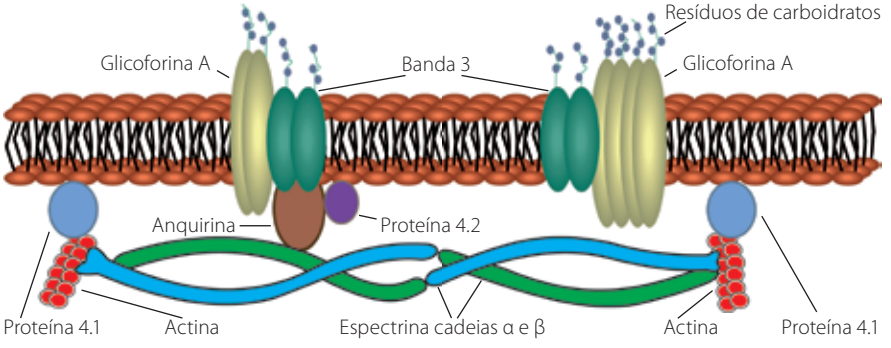


Figura 4. Estrutura da membrana plasmática do eritrócito.

Algumas anomalias na forma da membrana plasmática do eritrócito – por exemplo, a esferocitose e a eliptocitose – podem ser decorrentes de defeitos nas proteínas que compõem a bicamada lipídica.

Quadro 1. Anomalias nas formas da membrana plasmática do eritrócito ocasionadas por defeito nas proteínas.

Proteína afetada	**Anormalidade**
Anquirina	esferocitose
Banda-3	esferocitose
Espectrina	esferocitose, eliptocitose
Proteína 4.1	esferocitose, eliptocitose

Outra anomalia da membrana plasmática observada é a alteração na composição lipídica causada por anomalias congênitas ou pela mudança nos quantitativos de colesterol e fosfolipídeos. Por exemplo, o grande aumento seletivo do colesterol pode causar a formação de acantócitos.

1. Características bioquímicas da reação antígeno–anticorpo: ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas, forças de van der Waals e ligações hidrofóbicas

Os linfócitos do sistema imune atuam identificando e combatendo uma ampla quantidade de patógenos; eles se desenvolveram para reconhecer grande número de diferentes antígenos – ou seja, toda partícula ou molécula capaz de iniciar uma resposta imune –, provenientes de bactérias, vírus e outros organismos causadores de doença. A resposta imune específica é realizada de forma coletiva e coordenada por moléculas e células, cada uma das quais realiza uma função. Os linfócitos B reconhecem os antígenos por intermédio de moléculas de reconhecimento chamadas imunoglobulinas (Ig). Essas proteínas atuam de forma específica a uma ampla variedade de antígenos: cada Ig produzida possui especificidade única. As imunoglobulinas que possuem a mesma especificidade de antígeno são secretadas como anticorpos por linfócitos B diferenciados ou plasmócitos (linfócitos B ativados). Esses anticorpos ligam-se ao seu antígeno específico e representam a principal função efetora dos linfócitos B na resposta imune. Os linfócitos B são as únicas células capazes de produzir anticorpos.

A secreção de anticorpos é ativada pelo contato com algum antígeno. As funções efetoras dos anticorpos são desencadeadas quando

ocorre a sua ligação com o antígeno específico. Vários efeitos biológicos dos anticorpos são conhecidos: neutralização do antígeno, opsonização, ativação de fatores do complemento, entre outros. A qualidade e a quantidade de anticorpos produzidos que circulam no nosso sangue ao final de uma resposta contra determinado antígeno estão reguladas por um sistema de controle muito elaborado e complexo.

Para entender como ocorre a ligação antígeno–anticorpo, antes é preciso analisar a estrutura típica de uma molécula de anticorpo. Os anticorpos são moléculas solúveis, secretadas em grande quantidade pelos linfócitos B; têm a forma de um Y (fig. 5). A estrutura do anticorpo permite que ele exerça duas funções: de ligação a uma variedade de antígenos e de ligação a um número limitado de células e moléculas efetoras. Cada função é exercida por diferentes porções da molécula. As extremidades dos dois braços do Y variam dependendo da molécula de anticorpo, e são designadas regiões V – região amino (N) terminal variável. Essas extremidades estão envolvidas na ligação ao antígeno, ao passo que a base do Y, ou região C – região carboxi (C)-terminal constante –, é conservada e interage com outras moléculas e células efetoras do sistema imune.

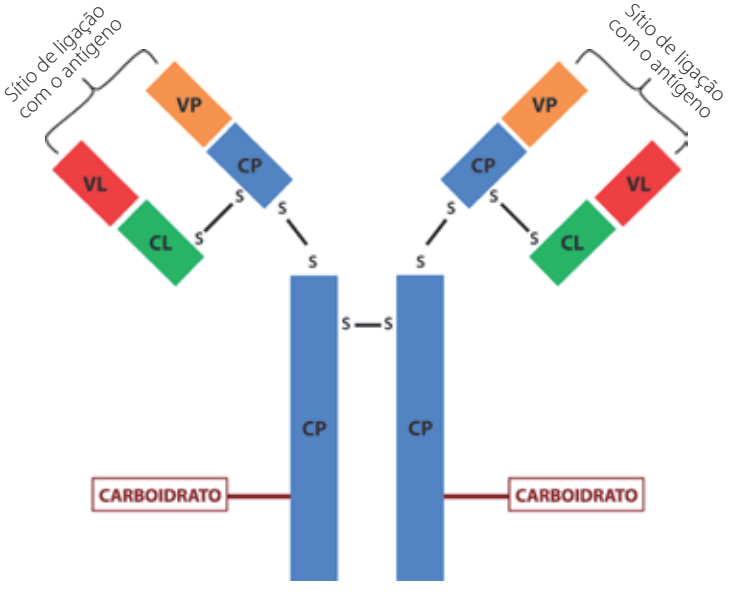


Figura 5. Estrutura da molécula de anticorpo: CP – cadeia pesada constante; CL – cadeia leve constante; VP – cadeia pesada variável; VL – cadeia leve variável; S–S – ligações dissulfídricas.

A estrutura básica da molécula de imunoglobulina consiste em quatro cadeias polipeptídicas – no caso da IgG, com cerca de quinhentos aminoácidos – sendo duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H), unidas por ligação covalente – as pontes dissulfídicas –, formando uma proteína globular. Em cada molécula de imunoglobulina, as duas cadeias pesadas e as duas cadeias leves são idênticas, de modo que uma molécula de anticorpo possui dois sítios de ligação ao antígeno. A haste do Y é denominada fragmento Fc (do inglês *fragment crystallizable*); definida pela estrutura de sua cadeia pesada, ela é responsável pela atividade biológica (função efetora) dos anticorpos.

Diferenças estruturais na região Fc definem os cinco subtipos principais, ou classes, de imunoglobulinas: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. Esses subtipos diferem entre si em tamanho, carga elétrica, composição de aminoácidos e conteúdo de carboidratos. Os braços das moléculas de imunoglobulina são denominados fragmentos Fab (do inglês *fragment antigen binding*) e constituem a região de ligação com o antígeno. As moléculas de imunoglobulina, ou anticorpos, apresentam diferenças na sequência de aminoácidos nas porções Fab, em regiões denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs, do inglês *complementary determinig region*).

Essas regiões formam uma superfície complementar para o epítopo – o sítio ou local de ligação do antígeno com o anticorpo. No antígeno, o epítopo determina a especificidade do anticorpo, conferindo atividade específica nos domínios de ligação. A diversidade nesses sítios de ligação ao antígeno garante que haja um repertório quase ilimitado de especificidades de anticorpos. As CDRs determinam a conformação dos sítios de ligação antígeno–anticorpo.

Os antígenos podem se unir ao anticorpo de diferentes maneiras. A variação nas sequências dos domínios de cadeia variável do anticorpo determina a especificidade em relação ao antígeno. As regiões de cadeia variável de um anticorpo são diferentes para cada molécula de anticorpo, e essa variação é concentrada em alguns locais. As regiões localizadas na sequência hipervariável formam o sítio de ligação com o antígeno. A ligação antígeno–anticorpo é feita de forma reversível e pode ser entendida como uma interação de macromoléculas com seus ligantes em geral. O complexo antígeno–anticorpo exibe alto grau de complementaridade química e estrutural, com interação das suas superfícies.

O princípio básico da termodinâmica na interação antígeno–anticorpo é o mesmo daquele de uma reação de ligantes reversíveis. A reação antígeno–anticorpo obedece ao princípio da lei de ação das massas. A constante de equilíbrio (Keq) mede a afinidade intrínseca do anticorpo pelo antígeno. A Keq é definida como a concentração de ligação [ac-ag] sobre a concentração de [ag] e [ac]. Esta é a fórmula da constante de equilíbrio:

$$Keq = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[ac - ag]}{[ac] - [ag]}$$

Os anticorpos ligam-se aos antígenos pelo contato, nas CDRs, com os aminoácidos, porém os detalhes da ligação dependem do tamanho e da forma do antígeno. As cadeias leves e pesadas das CDRs criam um sítio de ligação com o antígeno. As sequências das CDRs diferem entre os anticorpos, assim como as formas criadas por essas CDRs. Como ideia geral, os anticorpos se unem a ligantes cujas superfícies lhes sejam complementares.

As forças de ligação envolvidas nas interações específicas entre antígenos e anticorpos não apresentam ligação covalente de natureza físico-química. Essas interações específicas envolvem uma variedade de forças e podem ser desfeitas por altas concentrações de sal, pH extremo, temperatura, detergente e, algumas vezes, competição com altas concentrações do próprio epítopo puro. As forças envolvidas nessas condições interferem na interação antígeno–anticorpo, ocasionando o seu rompimento.

Na figura 6, estão exemplificadas as diferentes forças envolvidas na ligação antígeno–anticorpo. As forças eletrostáticas – ligação iônica – podem ser repulsivas ou atrativas, dependendo de sua ação sobre cargas iguais ou sobre cargas de sinais opostos. Interações eletrostáticas entre antígeno e anticorpo são resultado da presença de um ou mais sítios ionizados do epítopo. Esses sítios são tipicamente formados por grupos COO^- e NH_2^+ ou NH_3^+ de aminoácidos de moléculas de antígeno ou anticorpo (nos quais o antígeno é uma proteína ou peptídeo), ou similarmente, alterando estruturas de carboidratos ou outros antígenos não proteicos. Um átomo de hidrogênio compartilhado entre átomos eletronegativos (F, N, O) leva à formação das ligações de hidrogênio.

Na prática, o encaixe de ligações de H entre epítopo e anticorpo possui pequena relevância, porque nem todas as ligações de hidrogênio são realmente feitas.

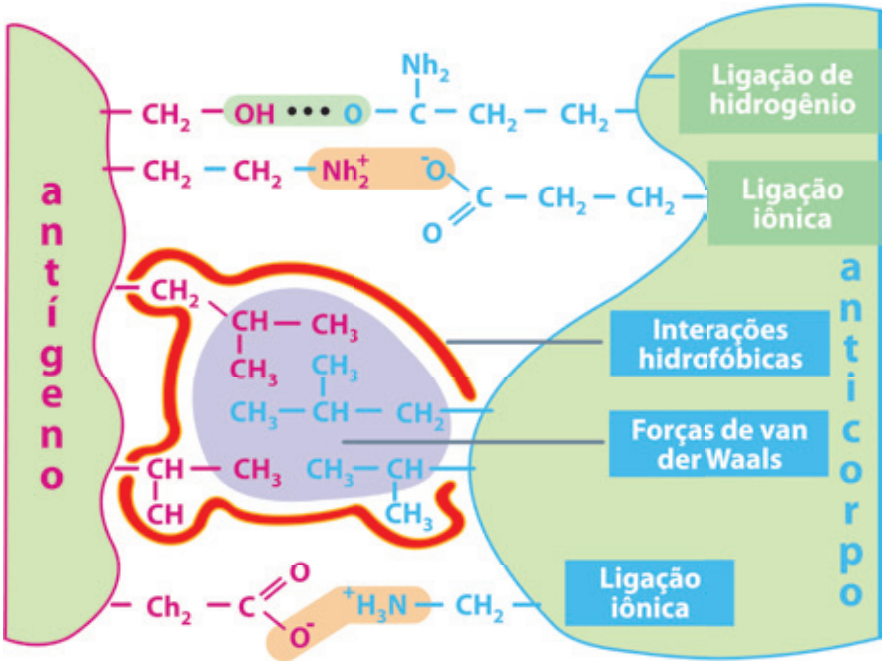


Figura 6. Forças de interação antígeno–anticorpo.

As forças de van der Waals, ou forças eletrodinâmicas, são flutuações nas nuvens de elétrons em torno de moléculas polarizando de maneira oposta os átomos vizinhos. Há uma atração geral entre todos os átomos e moléculas que ficam suficientemente perto para que ocorra a ligação. Em solução aquosa, essas forças são frequentemente atrativas e representam menos de 10% da interação total.

As forças hidrofóbicas, ou interações atrativas ácido–base, são grupos hidrofóbicos interagindo desfavoravelmente com a água que tendem a se agrupar para a exclusão de moléculas de água. A atração também envolve forças de van der Waals.

As forças de interação mencionadas acima contribuem para a ligação antígeno–anticorpo; a distância entre as moléculas de antígeno e as do anticorpo podem alterar as forças envolvidas na ligação específica e é importante ferramenta no estudo dessas interações.

As interações eletrostáticas ocorrem entre cadeias laterais de aminoácidos carregados. Nas ligações de hidrogênio e nas forças de van der Waals de menor alcance, também podem ocorrer interações entre dipolos elétricos. Altas concentrações de sal e pH extremos enfraquecem as interações eletrostáticas e/ou as ligações de hidrogênio, rompendo a ligação antígeno–anticorpo. Essas duas interações, a interação eletrostática entre cadeias laterais com carga e as ligações de hidrogênio, possuem características específicas, fortalecendo completamente a interação.

Para alguns antígenos, as interações hidrofóbicas certamente são as responsáveis pela maior parte da energia de ligação. Moléculas de água que são captadas na interface do antígeno e do anticorpo podem contribuir para a ligação, especialmente entre resíduos de aminoácidos polares.

Interações de van der Waals e interações hidrofóbicas agem sobre distâncias muito pequenas e servem para unir superfícies de formatos complementares. A interação entre essas forças depende muito do anticorpo específico e do antígeno envolvido. Os anticorpos possuem muitos aminoácidos aromáticos em seus sítios de ligação com o antígeno; esses aminoácidos participam principalmente na formação das forças de van der Waals e nas ligações hidrofóbicas, mas podem também formar ligações de hidrogênio.

A complementaridade total da superfície tem um papel importante nas interações antígeno–anticorpo, mas ligações hidrofóbicas e interações eletrostáticas específicas parecem determinar a especificidade ou a afinidade do anticorpo. As ligações antígeno–anticorpo consistem principalmente de forças eletrostáticas e forças polares, em todas as proporções possíveis.

As interações antígeno–anticorpo, como mencionado anteriormente, dependem de alguns fatores, como especificidade (determinada pela combinação das estruturas reativas do antígeno e do anticorpo), reversibilidade (determinada pela dissociação do complexo antígeno-anticorpo), equilíbrio (determinado pela constante de associação K do complexo antígeno-anticorpo), exotermia (liberação de calor pelas reações antígeno–anticorpo), afinidade (força de atração entre o antígeno e o anticorpo), avidez (força de união entre o antígeno e o anticorpo).

A membrana dos eritrócitos é formada por proteínas, que são subdivididas por grupos funcionais e estruturais, e carboidratos, que podem funcionar como antígenos, estimulando o sistema imune.

Os anticorpos produzidos se ligam aos componentes da membrana da hemácia reconhecidos como antígenos. A interação antígeno–anticorpo observada é realizada pelas forças descritas acima.

As proteínas presentes na membrana eritrocitária desempenham diversos papéis, como os de receptoras do complemento 1 (proteína regulatória), receptoras de quimiocina e aquaporinas (proteínas que formam canais para o transporte da água), receptoras de adesão, de banda 3 (proteína que forma canais para ânions) e de glicoporina A e transportadoras de ureia, dentre outros. Algumas proteínas da membrana eritrocitária, reconhecidas como antígenos, estão envolvidas na formação de complexos imunes e na regulação do complemento, causando destruição das hemácias – por exemplo, a proteína receptora de complemento 1 (CR1), importante na aderência imune.

Como já mencionado, banda 3 e glicoporina A (GPA) são as duas proteínas integrais mais abundantes na membrana dos eritrócitos. Observa-se a produção de anticorpos contra essa proteína das hemácias em condições fisiológicas e patológicas.

A produção de anticorpos contra os componentes da membrana eritrocitária pode causar anemias hemolíticas. Essa condição, que pode ser hereditária ou adquirida, resulta do aumento no ritmo de destruição dos eritrócitos. Dentre as anemias hemolíticas adquiridas, podemos citar as autoimunes, aloimunes (reações hemolíticas em transfusões de sangue) e aquelas associadas ao uso de drogas.

As anemias hemolíticas autoimunes são causadas pela produção de anticorpos contra proteínas da membrana dos eritrócitos do próprio organismo. Essas proteínas são reconhecidas pelos anticorpos como antígenos, como um corpo estranho, e isso leva, então, à destruição das hemácias. O autoanticorpo liga-se a estruturas da membrana dos eritrócitos, principalmente da circulação periférica. Esses anticorpos são principalmente IgM bastante eficientes na fixação de complemento, ocorrendo hemólise extra e intravascular.

As anemias hemolíticas aloimunes são observadas em reações a transfusões de sangue, quando os anticorpos produzidos pelo doador reagem com os eritrócitos do receptor da transfusão. Os anticorpos do doador reconhecem as estruturas da membrana da hemácia – proteínas, carboidratos etc. – como um antígeno, e isso ocasiona a destruição das hemácias.

Anemias hemolíticas também podem ser induzidas por alguns fármacos. A penicilina, por exemplo, pode ligar-se à membrana dos eritrócitos, e dessa forma induzir a produção de anticorpos contra o complexo penicilina + eritrócito, levando a um quadro de hemólise.

Podemos compreender, então, a relevância do estudo dos antígenos das hemácias, que fornecem ferramentas importantes para a investigação da superfície dos glóbulos vermelhos e são muito úteis como marcadores genéticos na família e em estudos populacionais e forenses.

2. Potencial zeta

A superfície da célula possui carga elétrica que é principalmente conferida por sítios terminais das glicoproteínas e dos glicolipídeos. Essa carga é geralmente negativa, e seu grau de negatividade pode variar de acordo com o número e a carga de íons expressos na superfície. A membrana plasmática possui gangliosídeos (cerca de 6% ou menos), os quais são glicoesfingolipídeos que contêm cabeças oligossacarídicas polares. Essas cabeças carregam uma carga negativa através de seus resíduos de ácido siálico. As glicoproteínas de membrana são as principais responsáveis pela carga negativa da superfície celular.

A carga negativa da superfície celular varia não só entre diferentes tipos de célula, mas também nas diferentes fases do ciclo de desenvolvimento de um mesmo tipo de célula. Existe uma correlação entre o estado de maturação da célula e a intensidade de ligação de partículas de ferritina cationizada (FC) à superfície de células hematopoiéticas. Essa intensidade de ligação à FC varia de acordo com a carga de superfície de cada célula. Quanto maior a quantidade de carga negativa maior será a ligação da FC.

Todas as células da medula óssea apresentam ligação para a ferritina cationizada na sua superfície. A extensão de ligação a partículas de FC difere de célula para célula e está relacionada ao estágio de maturação das células de uma dada linhagem. As séries neutrofílica e mieloblástica possuem moderada ligação com a FC, ao passo que promielócitos e mielócitos ligam-se apenas minimamente. A ligação de FC é aumentada sequencialmente em metamielócitos, neutrófilos segmentados e bastões. Eosinófilos e mielócitos eosinofílicos apresentam padrões

similares de diferenciação de membrana, mostrando afinidade de ligação semelhante; já os basófilos apresentam ligação mais forte à FC do que outras células precursoras de granulócitos. Os linfócitos ligam-se fortemente à FC, ao passo que os monócitos e seus precursores, apenas moderadamente. A intensidade de ligação de células nucleadas eritrocitárias é semelhante à dos linfócitos. A intensidade de ligação dos pró-eritroblastos e normoblastos à FC é idêntica no início, mas vai aumentando na fase final dos normoblastos e diminuindo em seguida nos reticulócitos e eritrócitos maduros.

Essa propriedade de superfície, de ligação e afinidade pela ferritina cationizada, que está diretamente relacionada com a interação célula–célula ou célula–substrato, é também conhecida como tensão superficial. Ela resulta, principalmente, da exposição superficial de segmentos moleculares hidrofóbicos (aminoácidos hidrofóbicos) de glicoproteínas. As hemácias comportam-se como partículas eletronegativas, e os grupos carboxílicos ($COOH^-$) das sialoglicoproteínas integrantes da membrana eritrocitária são os maiores responsáveis pela eletronegatividade.

Como cargas iguais se repelem, os eritrócitos em suspensão permanecem separados uns dos outros em meio salino. Os eletrólitos contidos no meio envolvem cada hemácia como uma nuvem de íons positivos que se torna menos densa à medida que se distancia do glóbulo. Na figura 7, observamos a representação esquemática do eritrócito em solução fisiológica.

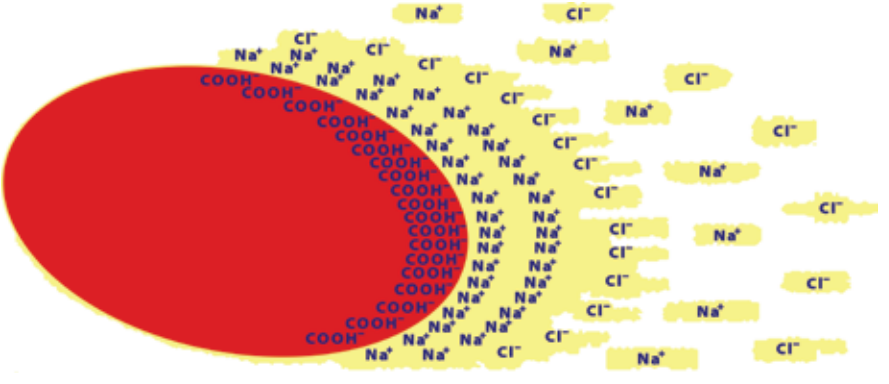


Figura 7. Eritrócito em solução fisiológica (NaCl 0,85%).

A diferença de potencial entre a nuvem de cátions atraídos pelas cargas elétricas negativas da membrana eritrocitária e o meio é chamada de potencial zeta. O potencial zeta é a medida da interação das forças de atração de van der Waals e as forças eletrostáticas, ou seja, é a medida do potencial elétrico que circunda as partículas em suspensão de um coloide. Quanto maior é o potencial zeta mais estável é um coloide, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras, e essa força supera a tendência natural à agregação, o que significa menor agregação e menor coagulação.

O potencial zeta se reduz a partir da superfície da partícula e se torna zero onde a concentração de cargas elétricas é igual. O potencial zeta aumenta à medida que diminui a distância em relação à superfície da partícula, e a sua redução se consegue pelo ajuste do pH próximo do ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico é o valor de pH em que uma molécula – por exemplo, um aminoácido ou uma proteína – apresenta carga elétrica igual a 0, ou seja, um pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos. O potencial zeta pode ser reduzido pela adição de íons ou coloides com carga oposta ao sistema coloidal. Quanto o potencial zeta se aproxima de zero (perto do ponto isoelétrico), o sistema está menos estável, podendo ocorrer a coagulação; quanto maior a diferença de potencial, mais estável é o sistema.

O sangue é um exemplo de coloide biológico sujeito ao potencial zeta. Se o potencial zeta estiver baixo, pode haver agregação eritrocitária, alteração no fluxo nos vasos sanguíneos e até trombose. Os sistemas coloidais (como o sangue) são mantidos estáveis por meio de uma pequena carga elétrica que conserva as partículas afastadas umas das outras. Essa carga elétrica gera uma diferença de potencial na superfície das partículas coloidais.

Por terem grande quantidade de ácido N-acetilneuramínico e outros grupos carregados negativamente ancorados na superfície de outras glicoproteínas de membrana, os eritrócitos possuem carga negativa elevada, ou seja, um potencial zeta elevado.

O potencial zeta pode ser determinado experimentalmente e, como reflete a carga efetiva nas partículas, correlaciona-se com a repulsão eletrostática entre as cargas e com a estabilidade da suspensão. Determinando-se o potencial zeta, é possível estimar a carga de superfície de partículas como as hemácias. Algumas técnicas utilizadas atualmen-

te para medir o potencial zeta são eletroforese, eletro-osmose, potencial de esgotamento e potencial de sedimentação.

A eletroforese é a técnica mais utilizada para medir o potencial zeta. Ela consiste da medição da mobilidade eletroforética das partículas carregadas em uma suspensão aquosa (as partículas eletricamente carregadas movimentam-se sob a ação de um campo elétrico aplicado). Quando um campo elétrico é aplicado através de um eletrólito, partículas carregadas em suspensão são atraídas para o campo de carga oposta. A velocidade da partícula no campo é definida como mobilidade eletroforética, que é a relação entre a velocidade da partícula e o campo elétrico aplicado, e é convertida em potencial zeta, a partir da equação de Helmholtz-Smoluchowski. Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas se deslocam em direção aos eletrodos de carga. O potencial zeta, que está relacionado com a força de repulsão entre as hemácias, pode ser calculado através da seguinte fórmula, desenvolvida por Pollack:

$$Z = \frac{\gamma}{D\sqrt{\mu}},$$

onde:

Z = potencial zeta
γ = eletronegatividade da hemácia
D = constante dielétrica do meio
μ = força iônica do meio.

O potencial zeta de um sistema pode ser modificado de duas maneiras:

1) Redução da carga elétrica das hemácias (γ), que pode ser obtida: por fixação de anticorpos – como os epítopos dos anticorpos são carregados positivamente, quando se fixam à membrana eritrocitária neutralizam as cargas dos antígenos específicos, reduzindo o potencial zeta; ou por tratamento enzimático – a adição de enzimas proteolíticas, como a tripsina, remove fragmentos de proteínas da membrana, clivando glicoproteínas da superfície celular e diminuindo a carga negativa da membrana plasmática dos eritrócitos.

2) Variação da composição do meio: pela adição de substâncias macromoleculares – como albumina bovina, polietilenoglicol (PEG), polibreno – que alteram a constante dielétrica do meio (D) (quanto maior a constante dielétrica do meio, menor será o potencial zeta e, consequentemente, maior será a sensibilização/aglutinação das hemácias);

3) Modificação da força iônica (μ), utilizando-se, por exemplo, solução de baixa força iônica.

Outros fatores podem modificar o valor do potencial zeta: pH – modifica a constante de equilíbrio; temperatura; exposição aguda ao frio – alterações no potencial zeta na membrana dos eritrócitos são observadas durante a exposição ao frio, podendo ocorrer a prevenção da agregação eritrocitária; concentração de sais; concentração de íons; efeito do palmitato, modificando o potencial de membrana do eritrócito, dentre outros. Medicamentos, como a vancomicina, um antibiótico policatiônico que pode causar agregação espontânea nos eritrócitos por causa da diminuição do potencial zeta, também podem influenciar na agregação das hemácias.

Grande parte das doenças, como a hipertensão arterial, a doença obstrutiva coronariana, a diabetes e algumas infecções, apresenta aumento de agregação eritrocitária, portanto potencial zeta diminuído.

Evidências quantitativas e qualitativas mostram alteração de proteínas da membrana dos eritrócitos em pacientes com diabetes. A *diabetes mellitus* tipo 2 é uma síndrome responsável pelo desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardíacas. Evidências mostram que a diabetes é uma desordem de estresse oxidativo que produz espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), contribuindo para o início e a progressão de aterosclerose e outras complicações. A hiperglicemia observada nesses pacientes induz um estresse oxidativo que provoca alteração nas propriedades dinâmicas e eletrocinéticas das hemácias. O potencial zeta pode ser utilizado para o diagnóstico de doenças hemolíticas e para estudos de permeabilidade da membrana e de alterações que levam à destruição de eritrócitos. Por causa da alteração no comportamento dinâmico e eletrocinético da bicamada lipídica dos

eritrócitos, levando à alteração no potencial zeta, e que resulta da hiperglicemia dos pacientes com diabetes, o potencial zeta pode ser usado como marcador para o diagnóstico de doença cardiovascular em pacientes diabéticos.

Pacientes que são homozigotos para hemoglobina CC, ou seja, portadores de hemoglobinopatia C, causada pela substituição de ácido glutâmico por lisina da cadeia β da hemoglobina, e que apresentam cristais nos eritrócitos e uma leve anemia hemolítica têm alteração na estrutura da membrana e na carga de superfície dos eritrócitos. Para avaliar essas alterações, foi utilizado um ensaio de mobilidade eletroforética para determinar o potencial zeta de eritrócitos normais (AA) e de eritrócitos portadores da hemogloblina CC. Foram observadas diferenças nas suas estruturas de membrana associadas a alterações da fisiologia de células inteiras. Nos eritrócitos com hemoglobina CC, existe uma mudança na força repulsiva das hemácias como resultado da redução no potencial zeta. Essa diferença no potencial zeta pode ser reflexo da associação de proteínas do plasma nas membranas desses eritrócitos.

Enzimas proteolíticas são utilizadas com frequência na sorologia para identificação de grupos sanguíneos. O tratamento com essas enzimas permite que o eritrócito se torne aglutinável por anticorpo que não consegue efetuar a aglutinação em eritrócitos normais. Muitos estudos têm sido realizados para explicar esse mecanismo pela interferência do potencial zeta. O fenômeno da não aglutinação dos eritrócitos com determinados anticorpos é causado pela redução do potencial zeta das células vermelhas do sangue.

A neuraminidase, enzima que remove o ácido N-acetilneuramínico ou o ácido siálico, causa a redução da carga de superfície da membrana dos eritrócitos. Essa remoção do ácido siálico permite que os eritrócitos possam ser aglutinados por algumas substâncias – como o dextran, um polissacarídeo natural. Em eritrócitos não tratados com a enzima neuraminidase, o dextran promove o aumento do potencial zeta, provavelmente por causa da diminuição da força iônica, provocando a desagregação desses eritrócitos. Esse resultado demonstra a importância do ácido siálico e do potencial zeta para a manutenção da homeostasia das células sanguíneas e como as alterações nos eritrócitos podem afetar a aglutinação.

O potencial zeta é um fenômeno fundamental, com importante implicação na estabilidade dos coloides existentes na natureza. Quanto maior o valor absoluto de potencial zeta, maior a probabilidades de que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem e essa força supera a tendência natural de agregação. O potencial zeta está presente no sangue, mantendo o equilíbrio do meio e controlando a agregação e a coagulação sanguíneas.

Referências bibliográficas

Ackerman, G. A. Surface Differentiation of Developing Hematopoietic Cells in Normal Human Bone-Marrow. *Anatomical Record*, v. 181, n. 2, p. 520, 1975.

_____. Surface Differentiation of Hematopoietic Cells Demonstrated Ultrastructurally with Cationized Ferritin. *Cell and Tissue Research*, v. 159, n. 1, p. 23-37, 1975.

Adak, S.; Chowdhury, S.; Bhattacharyya, M. Dynamic and Electrokinetic Behavior of Erythrocyte Membrane in Diabetes Mellitus and Diabetic Cardiovascular Disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1.780, n. 2, p. 108-115, 2008.

Alberts, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*. Nova York: Garland Science, 2004.

Berliner, S. et al. Increased Erythrocyte Adhesiveness/Aggregation in the Peripheral Venous Blood of Patients with Ischaemic Heart Disease and an Eventful Course. *Acta Cardiologica*, v. 56, n. 2, p. 121-126, 2001.

Carel, J. Van Oss; Van Regenmortel, Marc H. V. *Immunochemistry*. Nova York: Marcel Dekker, 1994.

Daniels, G. Functional Aspects of Red Cell Antigens. *Blood Reviews*, v. 13, n. 1, p. 14-35, 1999.

Davies, D. R.; Cohen, G. H. Interactions of Protein Antigens with Antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 1, p. 7-12, 1996.

De Oliveira, S.; Saldanha, C. An Overview about Erythrocyte Membrane. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v. 44, n. 1, p. 63-74, 2010.

Dierickx, D. et al. Autoimmune Hemolytic Anemia. *Journal of Internal Medicine*, v. 266, n. 5, p. 484-491, 2009.

Garratty, G. Immune Hemolytic Anemia Associated with Drug Therapy. *Blood Reviews*, v. 24, n. 4-5, p. 143-150, 2010.

Gedde, M. M.; Huestis, W. H. Membrane Potential and Human Erythrocyte Shape. *Biophysical Journal*, v. 72, n. 3, p. 1.220-1.233, 1997.

Girello, A. L.; Kühn, T. I. B. *Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária*. São Paulo: Editora Senac, 2002.

Goldin, Y. et al. Rheological Consequences of Acute Infections: The Rheodifference between Viral and Bacterial Infections. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v. 36, n. 2, p. 111-119, 2007.

Goodnow, C. C. et al. Control Systems and Decision Making for Antibody Production. *Nature Immunology*, v. 11, n. 8, p. 681-688, 2010.

Guzelsu, N.; Wienstien, C.; Kotha, S. P. A New Streaming Potential Chamber for Zeta Potential Measurements of Particulates. *Review of Scientific Instruments*, v. 81, n. 1, p. 015.106, 20 Jan. 2010. Disponível em: http://rsi.aip.org/resource/1/rsinak/v81/i1/p015106_s1. Acesso em: 2 out. 2012.

Hoffbrand, A. V. et al. *Fundamentos em hematologia*. Porto Alegre: Artmed, 2008.

Hyono, A. et al. Analysis of Enzyme-Treated Red Blood Cell Surface and Haemagglutination Using a Theory of Soft Particle Electrophoresis. *Vox Sanguinis*, v. 95, n. 2, p. 131-136, 2008.

Jacobson, K. et al. Revisiting the Fluid Mosaic Model of Membranes. *Science*, v. 268, n. 5.216, p. 1.441-1.442, June 1995.

Jager, U. Autoimmune Hemolytic Anemia in Solid Tumors: An Underdiagnosed Phenomenon? *Wiener Klinische Wochenschrift*, v. 122, n. 7-8, p. 192-193, 2010.

Jan, K. M.; Chien, S. Influence of Ionic Composition of Fluid Medium on Red-Cell Aggregation. *Journal of General Physiology*, v. 61, n. 5, p. 655-668, 1973.

_____; _____. Role of Surface Electric Charge in Red Blood-Cell Interactions. *Journal of General Physiology*, v. 61, n. 5, p. 638-654, 1973.

Janeway, C. A. et al. *Imunobiologia*: o sistema imune na saúde e na doença. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

Jayavanth, S.; Park, B. C. Microrheologic Dysfunctions in Blood during Malaria. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 45, n. 45, p. 111-120, 2007.

Johnson, S. T. Drug-induced Immune Hemolytic Anemia. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 40, n. 3, p. 205-207, 2009.

Kaszuba, M. et al. High-concentration Zeta Potential Measurements Using Light-Scattering Techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series A – Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 368, n. 1.927, p. 4.439-4.451, 2010.

Konstantinova, E. et al. Rheological Properties of Blood and Parameters of Platelets Aggregation in Arterial Hypertension. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v. 35, n. 1-2, p. 135-138, 2006.

Lisowska, E. Antigenic Properties of Human Glycophorins – An Update. In: Wu, A. M. *Molecular Immunology of Complex Carbohydrates* 2. Nova York: Springer Science–Business Media, 2001. p. 155-169.

Lloyd, C. W. Sialic Acid and Social Behavior of Cells. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 50, n. 3, p. 325-350, 1975.

_____; Cook, G. M. W. Membrane Glycoprotein-Containing Fraction which Promotes Cell Aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 67, n. 2, p. 696-700, 1975.

Mozes, N.; Rouxhet, P. G. Methods for Measuring Hydrophobicity of Micro organisms. *Journal of Microbiological Methods*, v. 6, n. 2, p. 99-112, 1987.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5. ed. Nova York: W. H. Freeman, 2008.

Ohno, H. et al. Changes in Zeta-Potential of the Red-Cell Membrane in Humans during Acute Exposure to Cold. *Japanese Journal of Experimental Medicine*, v. 55, n. 5, p. 207-209, 1985.

Pantaleo, A. et al. Naturally Occurring Anti-band 3 Antibodies and Red Blood Cell Removal under Physiological and Pathological Conditions. *Autoimmunity Reviews*, v. 7, n. 6, p. 457-462, 2008.

Poole, J. Red Cell Antigens on Band 3 and Glycophorin A. *Blood Reviews*, v. 14, n. 1, p. 31-43, 2000.

Puthenparambil, J.; Lechner, K.; Kornek, G. Autoimmune Hemolytic Anemia as a Paraneoplastic Phenomenon in Solid Tumors: A Critical Analysis of 52 Cases Reported in the Literature. *Wiener Klinische Wochenschrift*, v. 122, n. 7-8, p. 229-236, 2010.

Riddick, T. M. Control of Emulsion Stability through Zeta Potential. *Soap and Chemical Specialities*, v. 45, n. 10, p. 77, 1969.

_____; Ravina, L. A. Electrophoresis. *Industrial and Engineering Chemistry*, v. 62, n. 7, p. 70-73, July 1970.

Rothman, J. E.; Lenard, J. Membrane Asymmetry. *Science*, v. 195, n. 4.280, p. 743-753, Feb. 1977.

Schaffazick, S. R. et al. Physicochemical Characterization and Stability of the Polymeric Nanoparticle Systems for Drug Administration. *Quimica Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

Singer, S. J.; Nicolson, C. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, v. 175, p. 720-731, 1972.

Sundberg, E. J. Structural Basis of Antibody-Antigen Interactions. *Methods in Molecular Biology*, v. 524, p. 23-36, 2009.

_____ et al. Estimation of the Hydrophobic Effect in an Antigen-Antibody Protein-Protein Interface. *Biochemistry*, v. 39, n. 50, p. 15.375-15.387, 2000.

Tanner, M. J. A. The Major Integral Proteins of the Human Red-Cell. *Baillieres Clinical Haematology*, v. 6, n. 2, p. 333-356, 1993.

Tokumasu, F. et al. Altered Membrane Structure and Surface Potential in Homozygous Hemoglobin C Erythrocytes. *Plos One*, v. 4, n. 6, 2009. Disponível em: http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0005828. Acesso em: 2 out. 2012.

Vanoss, C. J.; Mohn, J. F.; Cunningham, R. K. Influence of Various Physicochemical Factors on Hemagglutination. *Vox Sanguinis*, v. 34, n. 6, p. 351-361, 1978.

Wautier, M. P. et al. Modulation of RAGE Expression Influences the Adhesion of Red Blood Cells from Diabetic Patients. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v. 35, n. 3, p. 379-386, 2006.

Webster, D. M.; Henry, A. H.; Rees, A. R. Antibody-Antigen Interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 4, n. 1, p. 123-129, 1994.

William, E.; Paul, M. D. Fundamental Immunology. 4. ed. Nova York: Lippincott Willians & Wilkins, 1999.

Williams, L.; Domen, R. E. Zeta-Potential and Vancomycin-Red Blood-Cell Interactions. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 114, n. 12, p. 1.262-1.263, 1990.

Wilson, I. A. et al. Structural Aspects of Antibodies and Antibody-Antigen Complexes. *Ciba Foundation Symposia*, v. 159, p. 13-39, 1991.

Zavodnik, I. B. et al. The Effects of Palmitate on Human Erythrocyte Membrane Potential and Osmotic Stability. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, v. 56, n. 5, p. 401-407, 1996.

Zeltser, D. et al. The Erythrocyte Adhesiveness/Aggregation Test in the Peripheral Blood of Patients with Ischemic Brain Events. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 103, n. 5, p. 316-319, 2001.

Hematologia e imunologia aplicadas em imuno-hematologia

Paulo Roberto Soares Stephens
Flávia Coelho Ribeiro
Valmir Laurentino da Silva
Marcos Antonio Pereira Marques

Este capítulo objetiva dar subsídios aos estudantes para o entendimento de algumas associações da imuno-hematologia com outras áreas, como a imunologia e a hematologia. Para isso, é necessário descrever determinados mecanismos imunológicos e, também, conceitos hematológicos, mostrando os aspectos mais importantes dessas áreas. Este capítulo permite que o aluno compreenda os conceitos básicos da imuno-hematologia sem o auxílio de bibliografia suplementar.

A hematologia é uma área da ciência que estuda as células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas), assim como a hemostasia. Essas células encontram-se imersas no plasma, líquido constituído basicamente de água, sais minerais, lipídeos, glicídeos e proteínas que formam o sangue. Após sofrer coagulação, o plasma passa a ser representado pelo soro e pelo coágulo. O soro apresenta composição menos rica que a do plasma, pois, ao ser formado, o coágulo incorpora e consome algumas substâncias. O enfoque da hematologia neste capítulo será o estudo dos eritrócitos, incluindo a eritropoese, a estrutura, a função e as alterações morfológicas dessas células.

A imunologia é a área da ciência que estuda os mecanismos imunológicos relacionados às células e às moléculas do sistema imune. O enfoque neste capítulo será o de introduzir as reações imunológicas (hipersensibilidade, autoimunidade e ação do sistema complemento) aos antígenos eritrocitários.

1. Hematologia

1.1 A eritropoese

A eritropoese é o processo pelo qual os eritrócitos se formam, amadurecem e passam a fazer parte do sangue circulante. Esse processo ocorre, no indivíduo adulto, na medula óssea vermelha dos ossos longos e chatos por intermédio da linhagem eritroblástica. Nos fetos e em anemias graves, esse processo pode ocorrer no fígado e no baço. A formação dessas células é um processo contínuo, por causa da necessidade diária de reposição das hemácias que compensa a destruição fisiológica e não fisiológica delas. A regulação da eritropoese se dá pelo hormônio eritropoetina, produzido principalmente pelas células renais peritubulares. A síntese desse hormônio é determinada pela quantidade de oxigênio nos tecidos, e também pode ser estimulada por outros hormônios, como o hormônio estimulante da tireoide (TSH, do inglês *thyroid-stimulating hormone*). Em regiões onde existe baixa tensão de oxigênio, como em altitudes elevadas, ocorre um estímulo para que a produção de hemácias seja aumentada que ocasiona um maior transporte de oxigênio para os tecidos. Na figura 1, é possível observar a relação entre a produção de hemácias, o transporte de O_2 e a produção de eritropoetina.

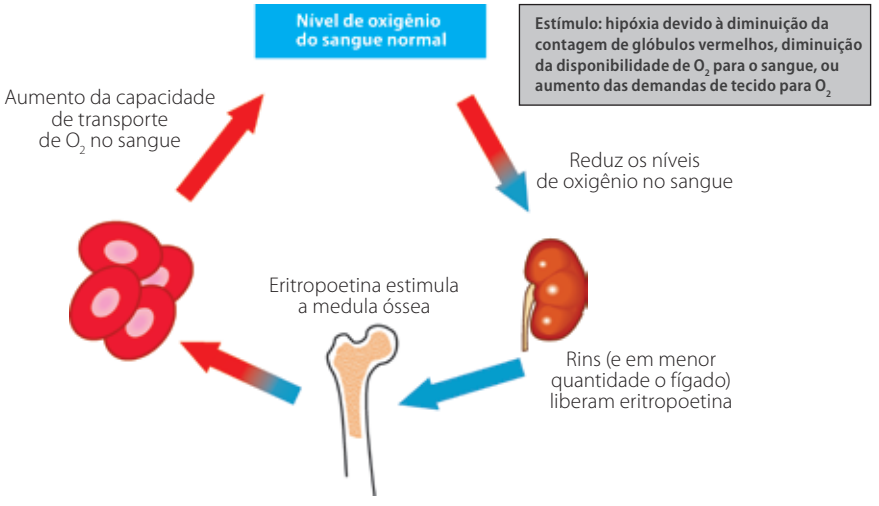


Figura 1. Correlação entre a produção de hemácias, o transporte de O_2 e a produção de eritropoetina.
Fonte: Reproduzido de Teva, Fernandez e Silva, 2009.

Os diferentes estágios de desenvolvimento da linhagem eritrocitária são caracterizados por alterações nucleares e citoplasmáticas. A medula óssea vermelha está envolvida nas seguintes atividades: produção, maturação, reserva, amadurecimento, estoque e liberação de células. Essas atividades nos permitem compreender melhor o processo de formação celular para sua reposição no sangue periférico, podendo também ser aplicada à linhagem mieloide. Desse modo, é possível observar na medula óssea nitidamente as três etapas fundamentais no desenvolvimento da eritropoese: diminuição do tamanho celular, perda da basofilia citoplasmática e picnose nuclear, e sua posterior expulsão, ainda na fase de eritroblasto ortocromático. À medida que a célula se desenvolve, ela passa por todas essas etapas até ser liberada na circulação.

O reticulócito, célula precursora dos eritrócitos, amadurece ainda na medula óssea. Essas células são encontradas no sangue periférico na proporção de até 1,5%, sendo de extrema importância para a avaliação terapêutica da anemia, pois sinalizam o comportamento da medula óssea do paciente ante a terapêutica utilizada. Abaixo são descritas as principais células que representam as fases de diferenciação do eritrócito, com as suas respectivas características básicas.

a) Hemocitoblasto

Apresenta um diâmetro superior a 140 μ, com citoplasma basofílico. O núcleo celular, que tem cromatina fina e delicada, encontra-se bem no centro da célula; o núcleo pode apresentar de dois a três nucléolos bem visíveis. Os hemocitoblastos apresentam ribossomos em sua estrutura citoplasmática; estão presentes na medula na porcentagem de 0,5 a 1%.

b) Pró-eritroblasto

Apresenta contorno irregular com proeminências, citoplasma basofílico e núcleo com membrana fina e delicada, contendo geralmente dois nucléolos, que podem estar muito ou pouco visíveis.

c) Eritroblasto basófilo

Essas células têm citoplasma basófilo e com cromatina mais condensada, sem a presença de nucléolos visíveis. Apresentam uma área esbranquiçada, perinuclear, como resultado do início da condensação da cromatina nuclear.

d) Eritroblasto policromatófilo

Célula menor que a sua precursora, possui cromatina mais condensada. O citoplasma apresenta cor acinzentada característica, em decorrência do início do processo de hemoglobinização da célula.

e) Eritroblasto ortocromático

Apresenta cromatina condensada, sendo que, nessa fase, o núcleo se desloca em direção à membrana citoplasmática. As contrações e ondulações do citoplasma levam à extrusão do núcleo. O citoplasma é acidófilo, por causa da presença da hemoglobina.

f) Reticulócito

Nesse estágio, a célula ainda permanece de um a dois dias na medula óssea antes de migrar para o sangue. A identificação dessa célula requer o emprego do corante azul de cresil brilhante, que a torna azulada, como resultado da presença dos fragmentos de RNA que se coram, exibindo o aspecto de retículo filamentoso. Nessa fase, algumas células já circulam no sangue periférico, recebendo o nome de eritrócitos policromatófilos, que são maiores que os eritrócitos maduros.

g) Eritrócito ou hemácia

A perda dos resíduos nucleares e a redução do tamanho dos reticulócitos caracterizam os eritrócitos. Em mamíferos, apresentam forma de discos bicôncavos anucleados. A coloração vermelha é conferida pela hemoglobina, que ocupa um terço do volume da célula. A principal característica fisiológica dos eritrócitos é a maleabilidade, ou deformabilidade, que facilita a sua passagem pelos capilares. Na circulação, essas células são viáveis por um período médio de 120 dias. Após a perda da maleabilidade, os eritrócitos são retirados da circulação e levados para o baço, onde ocorre a hemocaterese1.[1]

É importante ressaltar que os eritrócitos podem sofrer alterações fisiológicas e morfológicas durante a sua produção. As alterações morfológicas podem ser agrupadas em três grandes grupos:

- anisocitose: alteração no tamanho da hemácia, que pode ser microcítica, normocítica ou macrocítica;

[1] Destruição das hemácias por células fagocíticas.

- anisocromasia: alteração na cor da hemácia, de acordo com a carga de hemoglobina, podendo ser hipocrômica, normocrômica ou hipercrômica;

- poiquilocitose: alteração na forma da hemácia, que pode apresentar forma de foice, na anemia falciforme, dacriócitos, estomatócitos etc.

1.2 Estrutura do eritrócito

Os eritrócitos são células bicôncavas, com diâmetro médio de 7,2 μ e com vida média de 120 dias. Essas células encontram-se no sangue de um indivíduo adulto normal na quantidade de 4,5 a 6,5 x 10^6/mm^3; essa quantidade varia segundo o gênero: a mulher apresenta quantidade menor de eritrócitos.

Os eritrócitos são responsáveis pelo transporte de gases respiratórios, como o oxigênio (O_2) e o gás carbônico (CO_2). Para o transporte desses gases, o eritrócito carreia O_2 dos alvéolos pulmonares para os tecidos. Nesse local, o CO_2 é captado e levado aos alvéolos, a fim de que ocorra a troca gasosa.

O principal componente do eritrócito é a hemoglobina (Hb), que é responsável pela cor vermelha do sangue por causa da presença do ferro (Fe) e tem peso molecular aproximado de 64.500 Da. A produção de hemoglobina é iniciada na medula óssea, na fase de eritroblasto policromático. Nesse processo, é utilizado o ferro captado da circulação, obtido por meio da alimentação. A molécula de hemoglobina é composta de globina – uma proteína com dois pares de cadeia de aminoácidos, chamadas α e β, e quatro grupos heme, os quais apresentam um átomo de ferro cada um. O grupo heme, uma porfirina,[2] contém um átomo de ferro no estado ferroso (Fe 2+), localizado no centro da molécula, e é sintetizado em todas as células do organismo. A maior porcentagem de Hb de um indivíduo adulto normal é a Hb-A, que apresenta as características já mencionadas. Apenas aproximadamente 2% das hemoglobinas são do tipo A_2. Essa hemo-

[2] Classe de moléculas orgânicas formadas por quatro anéis pirrólicos, que geralmente albergam no centro um íon metálico, como o ferro.

globina tem quatro pares de cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo alfa e duas do tipo delta. Outro tipo de hemoglobina é a do tipo F, presente durante a vida fetal até aproximadamente um ano de vida e que também possui quatro pares de cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo alfa e duas do tipo gama. Essa hemoglobina possui maior afinidade pelo O_2 do que os outros tipos de hemoglobina, e permite mais captação do O_2 pelo feto.

Estudos científicos acerca das hemoglobinas descreveram dezenas de moléculas com estrutura alterada, sendo que em aproximadamente 10% desses casos foram observadas, como resultado, alterações funcionais e clínicas no indivíduo. As alterações genéticas no cromossomo 11 ocorrem devido à presença das Hb-SS ou Hb-AS, que acarretam, respectivamente, a anemia falciforme ou traços dessa doença, por causa das alterações dos eritrócitos.

As alterações na molécula de globina também podem levar a anemias, como é o caso das talassemias (anemia de Cooley). A doença, que ocorre predominantemente em populações do Mediterrâneo, África e Ásia, é decorrente das modificações nas cadeias alfa e beta que constituem a globina. Como resultado, observa-se o surgimento de globina com pigmentação e funções alteradas.

A associação do CO_2 com a hemoglobina forma um complexo chamado carboxi-hemoglobina, que impede a ligação do ferro com o oxigênio. No entanto, desde que haja disponibilidade adequada de oxigênio para o indivíduo respirar, essa reação é reversível. Nesse caso, cada molécula de O_2 se liga a um átomo de ferro presente em cada grupo heme da hemoglobina, formando o complexo chamado oxi-hemoglobina.

Para a liberação do oxigênio, é necessário o cofator 2-3 difosfoglicerato (2,3-DPG), encontrado no interior dos eritrócitos, que altera a hemoglobina geometricamente, tornando-a deoxi-hemoglobina. Esse cofator tem potencial de reduzir a força de ligação entre o oxigênio e a hemoglobina, permitindo a liberação desse gás para os tecidos.

Um importante fator que influencia a captação do oxigênio é a pressão atmosférica, pois, à medida que ela diminui, ocorre menor liberação de oxigênio para os tecidos. Dessa forma, o organismo produz mais 2,3-DPG a fim de compensar a baixa pressão de O_2 (hipóxia).

1.3 Antígenos da membrana eritrocitária

Os aglutinogênios eritrocitários são estruturas macromoleculares que podem ser de natureza proteica, glicídica ou glicoproteica. Localizados na superfície da membrana, possuem funções fisiológicas específicas, podendo atuar na estrutura celular e no transporte – como as moléculas de adesão com ação enzimática.

Na função estrutural, podemos citar as glicoforinas, que são proteínas altamente glicosiladas, importantes na manutenção da carga negativa do glicocálix. A interação da glicoforina com a fosfoproteína da membrana eritrocitária, juntamente com o complexo espectrina-actina (proteínas estruturais), desempenha papel importante na manutenção da forma celular e na estabilidade da membrana.

Uma alteração quantitativa dessas proteínas resulta na característica diminuição da estabilidade da membrana, o que leva à alteração na forma discoide das hemácias, formando-se eliptócitos (fig. 2) em graus variados na poiquilocitose.

Outra proteína de importância é a banda 3, que funciona como ponto de ancoragem para o citoesqueleto da membrana, mediante a interação com a anquirina. Determinados resíduos da banda 3 são cofacilitadores dos eritrócitos na retirada de gás carbônico dos tecidos, subsequentemente liberando oxigênio nos pulmões por meio da anidrase carbônica. Apresenta também três interações com a glicoforina as quais sugerem que sua presença ou ausência pode alterar a eficácia do transporte de ânions. Uma das funções mais importantes está associada à atividade hemocaterética, quando a proteína banda 3 liga-se a resíduos desnaturados de hemoglobina, formando agregados que geram epítopos na superfície eritrocitária e podem ser reconhecidos por autoanticorpos da classe IgG, que promovem a sua remoção da circulação sanguínea.

Dentre as alterações mais conhecidas da forma (poiquilocitose), estão a esferocitose e a estomatocitose (fig. 3), que são alterações causadas pela interação da anquirina e da banda 3 com o complexo proteico Rh; por causa dessa interação, indivíduos com fenótipo nulo podem ter uma síndrome caracterizada por anemia hemolítica crônica, de intensidade variável, cujo resultado é o aumento da fragilidade osmótica e anormalidades na morfologia dos eritrócitos.

Na acantocitose, a ausência da proteína Xk, chamada de fenótipo McLeod, é caracterizada pela associação de acantocitose, distrofia muscular e cardiopatia. Nos eritrócitos, a proteína Xk está ligada à glicoproteína Kell por uma ponte de dissulfeto, formando um complexo que afeta suas expressões reciprocamente.

2. Imunologia

2.1 Antígenos

Convencionou-se denominar antígeno a qualquer substância solúvel, celular ou particulada, que pode ser especificamente ligada aos anticorpos ou receptores de células T (TCR, do inglês *T cell receptor*) previamente sensibilizados. Existem dois tipos de antígenos: a) o antígeno completo, que reúne propriedades imunogênicas e antigênicas, ou seja, a capacidade de induzir resposta imune específica (fala-se então de imunógeno e imunogenicidade), bem como a competência para interagir com anticorpos e receptores de linfócitos sensibilizados (antigenicidade); b) o antígeno incompleto, ou hapteno, dotado apenas de antigenicidade, que é a capacidade de interagir com os anticorpos e TCRs que lhe correspondem, mas não é capaz de estimular uma resposta imunológica.

Os sítios de ligação dos anticorpos e dos receptores de antígeno de células T interagem com o determinante antigênico ou epítopo, a menor área da molécula de antígeno, responsável pela ligação ao TCR ou ao anticorpo. A presença de vários determinantes iguais é chamada de polivalência ou multivalência, e cada um pode interagir com a região variável das moléculas de TCR. As superfícies celulares, incluindo os eritrócitos, geralmente possuem grande quantidade de antígenos que reúnem vários determinantes antigênicos. Os determinantes antigênicos de proteínas, glicoproteínas ou lipoproteínas tanto podem ser formados pela sequência de aminoácidos (determinantes sequenciais) quanto por aminoácidos adjacentes (determinantes não sequenciais), não ligados por ligações peptídicas, que se encontram próximos por causa da preservação da estrutura da molécula.

A estimulação de linfócitos de uma espécie animal com proteína de outro animal da mesma espécie resulta em uma resposta imune muito baixa, frequentemente indetectável. Por sua vez, se essas proteínas forem inoculadas em animal de outra espécie, tendem a desencadear reações imunitárias bastante elevadas. Isso acontece porque quanto mais próxima for a relação filogenética, menor será o estímulo e vice-versa. Embora esse atributo da relação filogenética reflita boa parte das aplicações imunológicas, não pode ser tomado como regra. A rejeição de transplantes e a reação por incompatibilidade em transfusões de sangue são causadas por uma resposta imune potente aos antígenos que compõem o complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatilibily complex*) e às células do tecido transplantado, bem como pelas diferenças nos antígenos do grupo sanguíneo do doador. Essas diferenças são ditas alogênicas, e a resposta imune que esses antígenos induzem é chamada alorreação. Antígenos como as moléculas correspondentes ao MHC e ao grupo sanguíneo, que variam entre membros de uma mesma espécie, são denominados aloantígenos.

Para a maioria dos antígenos proteicos, quanto maior for a molécula, maior será o número de epítopos e quanto maior a complexidade, maior será a imunogenicidade. Um antígeno complexo contém vários determinantes antigênicos; os determinantes mais eficientes na indução da resposta imune são chamados imunodominantes.

A imunogenicidade e a antigenicidade de uma proteína não dependem apenas de sua estrutura primária (isto é, da sequência de aminoácido), mas também das estruturas secundárias, terciárias e até quaternárias. A configuração espacial e a acessibilidade de diversos epítopos em uma única molécula de proteína permitem a ligação do anticorpo de várias formas, desde que esse sítio de ligação esteja acessível na superfície da molécula-alvo da resposta imunitária.

As reações dos anticorpos são mais intensas ao interagirem com antígenos homólogos (antígenos específicos que induziram a formação desses anticorpos), quando comparadas às reações ante os antígenos heterólogos (reações cruzadas), em virtude da similaridade entre os determinantes antigênicos de antígenos diferentes.

2.1.1 Antígenos eritrocitários

Os antígenos presentes nos eritrócitos e nas plaquetas desempenham papel preponderante na prática transfusional, pela sua capacidade de induzir resposta imunitária. A utilização de sangue seja com a intenção de salvar vidas, seja com propósito vitalizante e rejuvenescedor, como praticado por antigas civilizações – egípcia, grega, romana –, invariavelmente era malsucedida, pois não se conhecia o sistema da circulação sanguínea, o sangue nem sempre era administrado por via endovenosa e frequentemente se utilizava sangue de outras espécies animais.

A demonstração por William Harvey (1578-1657) da circulação contínua do sangue através do sistema vascular contribuiu para a administração intravenosa de medicamentos e possibilitou a realização das primeiras transfusões sanguíneas entre animais, de modo que já no século XVII se injetavam substâncias no interior da corrente sanguínea com alguns êxitos e muitos fracassos. Assim, era de uso corrente injetar vinho nos cães de caça para o tratamento de algumas enfermidades.

Johann Daniel Major (1634-1693) administrava medicação intravenosa mediante o uso de finos cilindros de prata. Sugeriu, como haviam feito outros autores, que era possível injetar sangue nas veias, mas não há provas de que o tenha feito em homens. No século XVII, Richard Lower (1631-1691) foi, talvez, o primeiro a realizar uma transfusão de um animal para outro – segundo Samuel Pepys (1633-1703), administrou sangue de ovelha num jovem com a intenção de mudar seu caráter. Desconhecem-se os resultados de tal experimento.

Jean-Baptiste Denis (1643-1704) é considerado o primeiro a realizar uma transfusão humana. Em 1667, administrou três frascos de sangue de carneiro a um rapaz de vida agitada, com a finalidade de suavizar seu caráter violento (torná-lo "manso como um cordeirinho"). Isso produziu no jovem grave reação que culminou na sua morte. No julgamento que se seguiu, Denis foi exonerado de toda a culpa, mas a Faculdade de Paris proibiu futuras transfusões. Dez anos mais tarde, o Parlamento as declarou ilegais. O governo italiano também proibiu as transfusões de pessoa a pessoa, mas a Real Sociedade de Londres não colocou objeção a elas.

Durante os séculos XVIII e XIX, ficou demonstrado, mediante transfusões experimentais em animais e também em homens, que o sangue

retirado de animais podia ser restituído a eles; que o sangue transportava o oxigênio; e que o sangue não coagulava se houvesse extração de seu conteúdo de fibrina, podendo ser administrado, assim, a animais. Finalmente, ficou demonstrado que as transfusões de animais para o homem eram perigosas, mas durante muitos anos as transfusões de sangue e as injeções intravenosas de diversas soluções eram às vezes acompanhadas de reações febris, interpretadas como algo inerente à natureza do processo. Assim, pouco a pouco, foram iniciadas as transfusões de homem a homem. Cientistas como Blundell, Ponfick, Landis, Arthur e Pager demonstraram os efeitos fisiológicos e químicos das transfusões, mas foram os trabalhos imunológicos de Ehrlich, Bordet e Gengou, entre outros, que permitiram a Karl Landsteiner (1868-1943) descrever a existência dos grupos sanguíneos, classificando-os, e isso possibilitou a incorporação da transfusão sanguínea na prática médica.

Em 1901, Landsteiner descreveu os tipos A, B e O das hemácias; posteriormente, Decastello e Sturli descreveram o tipo AB. Assim, uma pessoa com o antígeno A em suas células sanguíneas tem anticorpos contra o antígeno B no soro ou plasma, e o indivíduo com antígeno B tem anticorpos contra o antígeno A. O "doador universal", termo inventado por Ruben Ottenberg em 1911, não tem antígenos em suas células, mas tem anticorpos circulantes contra A e B no plasma ou no soro. As transfusões de sangue incompatível causam reações gravíssimas, acarretando lesões renais e, por vezes, levando à morte. Porém, isso não era conhecido até 1908, quando Ottenberg começou a testar o sangue do doador e do receptor antes de cada transfusão. No entanto, ainda que não se proceda à determinação prévia de incompatibilidade como resultado da distribuição matemática dos grupos sanguíneos, as reações de incompatibilidade não ocorrem com frequência, e cerca de um terço das transfusões casuais não apresentava incompatibilidades ABO. Contudo, e apesar da preocupação de estabelecer a tipagem dos grupos sanguíneos e sua equiparação, até que métodos de comprovação dos diferentes tipos de hemácias fossem descobertos, ocasionalmente havia graves reações não explicáveis.

Hoje em dia, mais de 600 antígenos eritrocitários foram descritos, antígenos esses que, em suas diferentes combinações, obedecendo a um padrão de herança mendeliana, geram mais de 300 mil combinações fenotípicas.

2.2 Anticorpos

Os anticorpos, sintetizados por linfócitos B e plasmócitos, são glicoproteínas com função imunitária. Ao interagirem com antígenos específicos, promovem a ativação de vários mecanismos efetores: ativação da via clássica do sistema complemento, opsonização dos antígenos para fagocitose e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, do inglês *antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*). Essas ações que resultam em proteção são as mesmas que resultam em reações adversas na hemoterapia, em doenças hemolíticas autoimunes, na doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) e em reações a tecidos transplantados.

As funções dos anticorpos são exercidas em sítios estruturalmente separados na molécula. A região que se liga ao antígeno varia amplamente, sendo conhecida como região variável, ou região V. A região que participa da função efetora é conhecida como região constante, ou região C, e ela se mantém preservada, embora tenha cinco formas principais especializadas na ativação de diferentes mecanismos efetores.

As moléculas de anticorpos apresentam notável diversidade por causa de um mecanismo que faz os genes expressos nas moléculas serem reunidos por rearranjos de DNA que juntam dois ou três diferentes segmentos para formar um gene de região variável. Rearranjos nucleicos subsequentes podem reunir o gene da região variável a qualquer gene da região constante, formando os diferentes isotipos: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (ver fig. 4).

A imunoglobulina é formada estruturalmente por duas cadeias leves (L, do inglês *light*) idênticas e por duas cadeias pesadas (H, do inglês *heavy*) também idênticas (fig. 2). As cadeias leves estão ligadas às cadeias pesadas por pontes dissulfídicas. Cada uma das duas cadeias, leve e pesada, possui uma região variável e outra constante. Logo, uma imunoglobulina apresenta uma região constante (C_L) e uma região variável (V_L) na cadeia leve; as mesmas características estão presentes na cadeia pesada, que tem uma região constante (C_H) e uma região variável (V_H).

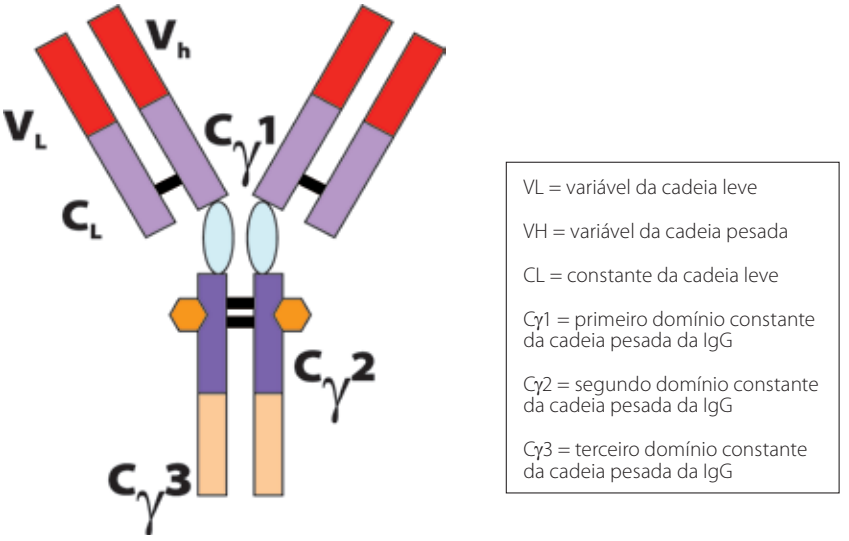


Figura 2. Estrutura básica de uma molécula de IgG.
Fonte: Reproduzido de Teva, Fernandez e Silva, 2009.

A molécula de imunoglobulina pode ser digerida por enzimas proteolíticas (fig. 3), como a papaína e a pepsina. A papaína cliva a molécula em três fragmentos: dois chamados Fab (do inglês *fragment antingen binding*), que se ligam ao antígeno específico, e um fragmento Fc (do inglês *fragment crystallizable*), chamado fragmento cristalizável por formar cristais quando armazenado em locais frios. Já a pepsina cliva na mesma região, mas na porção carboxiterminal das pontes dissulfídicas, produzindo o $(Fab)_2$, no qual os dois braços do anticorpo se encontram unidos.

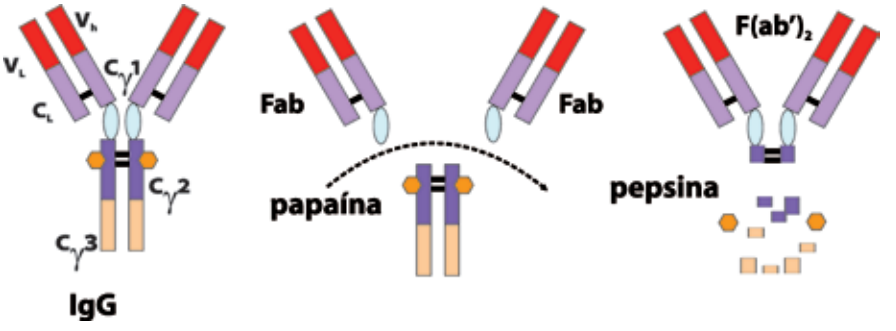


Figura 3. Fragmentos enzimáticos da molécula de imunoglobulina, após ativação enzimática.
Fonte: Reproduzido de Teva, Fernandez e Silva, 2009.

2.2.1 Geração da diversidade na resposta imune humoral e maturação da afinidade[3]

Para produzir uma molécula de Ig, ocorrem combinações ao acaso dos diferentes componentes gênicos, levando à enorme diversidade, com muitas moléculas de Igs, cada uma com afinidade única e especificidade acurada em resposta a um antígeno.

A imunoglobulina IgM é produzida como receptor de membrana durante as fases iniciais do linfócito B e há mudança de isotipo nessa célula quando estimulada pelo antígeno. Isso permite a manutenção da região variável específica para o antígeno correspondente, garantindo a especificidade ao antígeno correspondente, nos diferentes isotipos, e orientando as suas distintas funções efetoras.

A afinidade do anticorpo ao antígeno na resposta primária é menor do que na resposta secundária. Na resposta primária, o anticorpo da classe IgM tende a ser de afinidade relativamente baixa e pode contar com avidez adicional, decorrente da sua estrutura pentamérica. Na resposta secundária, IgG e outras classes de imunoglobulinas tendem a ter afinidade maior.

2.2.2 Distribuição e propriedades dos isotipos

Os agentes infectoparasitários se alojam em sítios do organismo que lhes proporcionem as melhores condições de sobrevivência. Desse modo, os anticorpos também devem alcançar as várias partes do organismo a fim de controlar ou inativar tais agentes.

Os anticorpos apresentam variações denominadas isotípicas que lhes permitem, entre outras características, melhor adequação aos diferentes sítios do organismo.

Os primeiros anticorpos a serem produzidos numa resposta imune humoral são sempre da classe IgM. Eles são produzidos antes que a célula B tenha sofrido hipermutação somática; portanto, tendem a ser de baixa afinidade, como visto anteriormente. A IgM forma pentâmeros nos quais os dez sítios de ligação com o antígeno podem se unir simultaneamente a antígenos multivalentes, como os polissacarídeos de parede celular bacteriana. Essa estrutura pentamérica também

[3] Parte do texto deste item foi reproduzida de Teva, Fernandez e Silva, 2009.

torna a IgM capaz de ativar o complemento de maneira mais eficaz, e isso contribui para o controle mais eficiente de uma infecção. Quanto à IgD, não se conhece muito bem a sua função, mas ela parece exercer um papel na diferenciação dos linfócitos B induzida pelo antígeno.

O principal isotipo de imunoglobulina no sangue e nos fluidos extracelulares é a IgG, com todas as suas subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). A IgG tem propriedades diversas, dentre elas, confere proteção ao feto, pois é a única classe de imunoglobulina humana que pode ser transportada através da placenta diretamente para a corrente circulatória do feto. A IgG também atua na neutralização de toxinas, na imobilização de bactérias, na sensibilização para células NK, na ativação do complemento e na opsonização. A IgA é a principal imunoglobulina presente em secreções externas, como saliva, muco, suor, suco gástrico e lágrimas. Além disso, é a principal imunoglobulina contida no colostro e no leite, e constitui a principal fonte de proteção contra patógenos no intestino do neonato.

A IgE está difundida de maneira moderada nos espaços extravasculares e sua principal propriedade é a sensibilização de mastócitos e basófilos que promove a reação inflamatória mediante a liberação de mediadores químicos, como a histamina – que provoca vasodilatação –, e permite a passagem de anticorpos através dos vasos sanguíneos em direção à área lesada e fatores quimioatraentes que recrutam fagócitos para o local de infecção. Além disso, podem participar em processos alérgicos e na eliminação de helmintos.

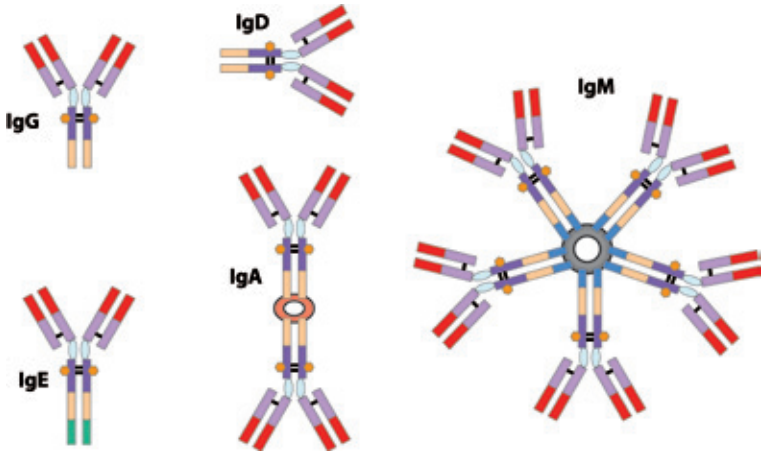


Figura 4. Isotipos de imunoglobulinas humanas.
Fonte: Reproduzido de Teva, Fernandez e Silva, 2009.

2.2.3 Anticorpos monoclonais

Em 1975, Georges Köhler e César Milstein planejaram um método para a preparação do anticorpo monoclonal (Ac Mo), por meio da fusão da célula B ativada normal produtora de anticorpo com uma célula de mieloma (uma célula plasmática cancerosa). Nesse evento, produziram uma célula híbrida (hibridoma) que possuía as propriedades de crescimento imortal da célula do mieloma de secreção de anticorpo produzido pela célula B.

Após a obtenção dos hibridomas, eles devem ser diluídos e distribuídos em placas de cultura apropriada, na concentração de 0,5 célula por poço. Tal procedimento nos dará a certeza de que o anticorpo produzido é oriundo de um único clone e, como não existe meia célula, teoricamente teremos um poço vazio e outro com apenas uma célula. Feito isso, cada hibridoma, após multiplicação e produção de anticorpo, será examinado por teste sorológico tendo em vista a identificação dos hibridomas desejados, ou seja, aqueles que sintetizam o anticorpo monoclonal que reage com o antígeno correspondente. Uma vez identificados os hibridomas, são induzidos à proliferação, e se tornam, assim, uma fonte inesgotável de anticorpos altamente específicos.

Os Ac Mo são muito úteis como reagentes para testes de diagnóstico, exames de imagem e procedimentos terapêuticos na prática médica. No diagnóstico, podem ser utilizados para detecção de gravidez, diagnóstico de diversos microrganismos patogênicos, medidas de níveis sanguíneos de várias drogas, tipagem sanguínea, tipagem de antígenos de histocompatibilidade, caracterização fenotípica de diversos tipos celulares e detecção de antígenos produzidos por determinados tumores. Por exemplo, para esse último propósito, Ac Mo radiomarcados podem ser utilizados *in vivo* na detecção ou localização de antígenos tumorais. Isso permite diagnóstico precoce de alguns tumores primários ou metastáticos em pacientes sob investigação. Na imunoterapia, o Ac Mo específico para determinado antígeno tumoral de superfície acoplado a um quimioterápico ou radioterápico pode ser potente agente terapêutico.

2.2.4 Anticorpos antieritrocitários

a) Aloanticorpos

A presença de anticorpos antieritrocitários secundários à gravidez, transfusão sanguínea ou transplante de órgãos pode comprome-

ter transfusões subsequentes e, em algumas situações, até uma futura gravidez. Esses anticorpos são chamados de aloanticorpos.

Aloanticorpo é o nome dado a qualquer anticorpo surgido em um membro de uma espécie contra um antígeno alotípico de outro membro da mesma espécie. Os aloanticorpos correspondentes aos antígenos de grupo sanguíneo podem ser divididos em duas categorias: naturais e imunes. Os anticorpos chamados de naturais existem em baixos títulos no plasma de uma pessoa normal e são o resultado de estimulação espontânea das bactérias que compõem a microbiota intestinal e que expressam moléculas com elevada homologia aos antígenos de grupo sanguíneo. Quando a criança nasce, suas hemácias contêm as moléculas grupo-específicas às quais seu sistema imune é tolerante por lhe serem próprias. No entanto, o soro do recém-nascido não contém as aglutininas, de síntese própria, para o sistema ABO. A partir do 3º ao 6º mês de idade, geralmente, podem-se detectar os aloanticorpos anti-A (em crianças B), anti-B (em crianças A) ou ambos os aloanticorpos (em crianças O), em decorrência principalmente da crescente microbiota intestinal. Nos indivíduos A e B, esses anticorpos naturais são predominantemente IgM.

Os indivíduos de grupo sanguíneo O possuem ainda outro tipo de anticorpo natural, designado anti-A,B. Anti-A,B é geralmente IgG e possui atividade sorológica não encontrada em misturas de anti-A e anti-B (de pessoas B e A, respectivamente). Assim, fazendo-se reagir o soro de indivíduos O com hemácias A e, em seguida, eluindo-se esse anticorpo das hemácias, verifica-se que o eluato reage não apenas com hemácias A, mas também com hemácias B, embora mais fracamente.

Os anticorpos anti-Lewis podem ser encontrados em indivíduos Le (a-b-), são da classe IgM geralmente e fixam complemento. Indivíduos não secretores de Lewis podem apresentar anticorpos naturais anti-Leb, enquanto os secretores podem apresentar anti-Lea.

Os anticorpos dirigidos contra as substâncias de grupo que se desenvolvem por transfusão de sangue incompatível ou por gravidez heteroespecífica (por exemplo, feto B em mãe A ou O, feto Rh+ em mãe Rh-) são designados anticorpos imunes e são predominantemente da classe IgG.

Além dos anticorpos naturais e imunes encontrados em indivíduos A, B ou O, outros soros e reagentes podem ser utilizados nas tipagens dos diferentes grupos sanguíneos.

Assim, a especificidade H pode ser reconhecida por certas lectinas (extraídas de *Ulex europeus* e *Lotus tetragonolobus*) que aglutinam hemácias contendo H e não aglutinam células de indivíduos com fenótipo de Bombaim. O soro de enguias e certos soros bovinos também podem reagir com a substância H. Lectina extraída de *Bandeiraea simplicijolia* aglutina predominantemente hemácias B e, em menor escala, AB; já a lectina de *Dolichos biflorus* aglutina hemácias A.

Os aloanticorpos do sistema Rh, ao contrário do que ocorre com os do sistema ABO, não existem de forma natural no soro. São predominantemente IgG e não fixam complemento. Esses anticorpos são encontrados em casos de imunização com antígenos do sistema Rh (em casos de transfusões incompatíveis e em multíparas cujos fetos apresentem especificidade Rh diferente da mãe).

Hemácias podem ser fenotipadas quanto ao sistema Rh utilizando-se antissoros específicos. Assim, o soro anti-D reage somente com hemácias Rh+. O soro anti-C reage com hemácias Rh+ e Rh-, desde que apresente o antígeno C, e o soro anti-E também reage com hemácias Rh+ e Rh-.

Dois tipos de anticorpos anti-Rh podem ser obtidos por imunização: a) anticorpos que em solução salina aglutinam hemácias; e b) anticorpos designados "incompletos" e que somente aglutinam hemácias caso elas estejam diluídas em altas concentrações de albumina ou caso as hemácias tenham recebido tratamento prévio com certas enzimas proteolíticas. Os anticorpos, equivocadamente designados "incompletos", podem ainda ser usados nas tipagens do sistema Rh, utilizando-se o teste de Coombs indireto.

Quanto aos anticorpos dirigidos para os antígenos do sistema Duffy, anti-Fya e anti-Fyb, sabe-se que o primeiro é relativamente raro e a maioria é imune ao isotipo IgG, podendo ser encontrado alguns naturais do isotipo IgM. Tanto anti-Fya quanto anti-Fyb são passíveis de causar reação transfusional e DHRN.

Os anticorpos dirigidos contra antígenos Kidd são clinicamente significantes, resultando de transfusões ou gestações; além de serem capazes de fixar complemento, constituem causa frequente de reação transfusional hemolítica tardia com hemólise intravascular e insuficiência renal aguda. Além disso, são capazes de provocar DHRN.

Os anticorpos que reagem aos antígenos do sistema MNSs (anti-M, anti-N, anti-S, anti-s e anti U) podem ser naturais ou imunes. Os natu-

rais não são encontrados em todos os indivíduos nos quais falta o antígeno correspondente, como ocorre com o sistema ABO. Os anticorpos desse sistema são encontrados raramente. O anti-M é o mais comum. A transfusão incompatível para esses anticorpos causa reações transfusionais, algumas vezes graves. Os anti-S, anti-s e anti-U são os que mais se relacionam à DHRN quando comparados aos anti-M e anti-N.

b) Autoanticorpos

A doença hemolítica nos adultos e nos recém-nascidos pode ser causada pela presença de autoanticorpos antieritrocitários. Tais anticorpos, ligados à membrana eritrocitária *in vivo*, podem ser detectados no teste direto de antiglobulina. Esses anticorpos podem ser IgM ou IgG. No que se refere à IgG, é importante determinar a sua subclasse, porque a sequestração dos eritrócitos sensibilizados depende da subclasse do anticorpo. Isto decorre das diferenças existentes na capacidade de ativar o complemento e de se ligar aos receptores Fc dos fagócitos. De modo geral, a ação hemolítica das subclasses da IgG abrange um espectro de elevado a reduzido, na seguinte ordem: IgG3>IgG1>IgG2>IgG4.

Uma das características dos autoanticorpos antieritrocitários consiste na sua natureza físico-química: em sua maioria (80 a 90%), eles reagem mais favoravelmente com seus alvos em temperaturas que giram em torno de 37ºC, sendo esses anticorpos denominados autoanticorpos quentes. Os demais, chamados de autoanticorpos frios, são autoaglutininas frias, ou crioglobulinas, que reagem com seus alvos em temperaturas abaixo de 37ºC, apresentando reatividade ótima entre 0ºC e 5ºC (quadro 1).

As anemias hemolíticas mediadas por anticorpos quentes resultam da presença de IgG que revestem os eritrócitos circulantes, em geral dirigidos contra os antígenos Rhesus. Esses eritrócitos opsonizados são sequestrados no baço e, em certos casos, no fígado por macrófagos residentes nesses órgãos.

As autoaglutininas frias são anticorpos da classe IgM, dirigidos contra a membrana das hemácias. Ocorrem na população normal, porém nunca em títulos superiores a 1/32. Interferem na tipagem sanguínea, na prova cruzada, em análises hematológicas e em reações imunológicas. A anemia hemolítica por anticorpos frios pode ser crônica, caso em que ocorre com mais frequência como doença primá-

ria. Pode manifestar-se também como uma complicação transitória e autolimitada de infecção por determinados agentes. Altos títulos surgem em infecções pelo *Mycoplasma pneumoniae*, influenza, vírus Epstein-Barr, bem como em doenças do colágeno, linfomas e, ocasionalmente, na cirrose.

Quadro 1. Principais causas das anemias hemolíticas autoimunes.

Tipo "quente"	**Tipo "frio"**
Primária ou idiopática	Primária ou idiopática
Secundária:	Secundária:
. lúpus eritematoso sistêmico e outros distúrbios do tecido conjuntivo	. pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae*
. outras doenças autoimunes, por exemplo, hepatite autoimune	mononucleose infecciosa
. leucemia linfocítica crônica	. leucemia linfocítica crônica
. linfoma não Hodgkin	linfoma maligno
. teratoma de ovário	. colite ulcerativa
. fármacos (metildopa, fludarabina)	. hemoglobinúria paroxística ao frio: doença rara que pode ser primária ou estar associada a infecções

2.3 Complexo principal de histocompatibilidade

Todo organismo multicelular possui algum sistema de defesa que identifica os agentes infecciosos e parasitários e elimina-os do hospedeiro. Os grandes vertebrados têm um sistema imune mais evoluído que lhes permite discriminar o que é estranho do que não é estranho e ter uma resposta seletiva. A vantagem de tal imunidade específica é a rápida adaptação do sistema imune aos agentes patogênicos mais frequentemente encontrados no meio ambiente local. Essa capacidade resulta do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*), cujos produtos desempenham um papel no reconhecimento intercelular e na discriminação entre o próprio e o não próprio. A

identificação das moléculas do MHC ocorreu após investigação da sua função na resposta imunológica aos tumores, na rejeição de transplantes de pele e no controle da resposta imune.

2.3.1 Estrutura das moléculas do MHC

Os genes que codificam as moléculas do MHC estão localizados no cromossomo 6 humano e no cromossoma 17 em camundongos, e são denominados, respectivamente, antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *human leukocyte antigens*) e de histocompatibilidade (H-2). O MHC pode ser dividido em quatro subconjuntos de genes ou classes: classes I, II, III e IV, sendo que os de classe I e II estão ligados ao processamento e à apresentação de antígenos, enquanto os genes que compõem as classes III e IV codificam para outras proteínas, algumas delas relacionadas com a resposta imune, tais como componentes do sistema complemento, algumas citocinas etc. Em humanos, existem três *loci* gênicos que codificam as moléculas de classe I, denominados HLA-A, HLA-B e HLA-C, e três *loci* gênicos do MHC de classe II, denominados HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. Normalmente, um indivíduo herda duas cópias de cada *locus* gênico (uma de cada progenitor). Assim, em humanos, temos seis *loci* de classe I e seis *loci* de classe II. Todos esses *loci* apresentam alto grau de polimorfismo, ou seja, têm múltiplos alelos na população. As moléculas do MHC de classe I, que estão presentes na maioria das células nucleadas, são reconhecidas principalmente pelo TCR de linfócitos T CD8, ao passo que as moléculas de classe II, presentes principalmente na superfície das células apresentadoras de antígenos profissionais, são reconhecidas pelo TCR dos linfócitos T CD4.

a) MHC de classe I

As moléculas do MHC de classe I são expressas na membrana celular da maioria das células nucleadas dos vertebrados. Sua estrutura é constituída por uma cadeia α de aproximadamente 45 kDa, que atravessa a membrana plasmática. A outra é a β2-microglobulina de 12 kDa, que se encontra fracamente ligada à membrana. Os genes que codificam a cadeia α (variável) estão localizados dentro da

região genômica do MHC, enquanto os genes que codificam a β2-microglobulina (invariável) estão localizados fora da região do MHC no cromossomo 15 humano. A cadeia α é formada por três segmentos: α1, α2 e α3. A região em que o peptídeo se liga corresponde à região amino-terminal e é composta pelos segmentos α1 e α2, que formam uma fenda ou bolsa onde ele se encaixa. O tamanho dessa fenda permite ligar peptídeos de 8 a 11 aminoácidos e corresponde à região do MHC de classe I que interage com o TCR do linfócito T. Por essa razão, os antígenos proteicos precisam ser processados a fim de gerar peptídeos suficientemente pequenos para se ligarem à molécula do MHC. A região invariável, que corresponde ao segmento α3, se liga ao correceptor CD8 do linfócito T. Essa ligação confere a especificidade da molécula de classe I com a célula T CD8. O domínio α3 também se liga de forma não covalente à molécula β2-microglobulina, sendo esse complexo estabilizado pelo peptídeo processado que se liga aos domínios α1 e α2. A molécula de MHC de classe I é expressa na superfície das células somente nessa forma estável.

b) MHC de classe II

As moléculas do MHC de classe II também são expressas na membrana celular, mas na superfície de células apresentadoras de antígenos profissionais. Essas células incluem as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B. A molécula de classe II é formada por uma cadeia α e uma β. A cadeia α tem 32-34 kDa; a cadeia β tem 29-32 kDa. As duas cadeias do MHC de classe II são codificadas dentro da região genômica do MHC e ambas são polimórficas, ou seja, são variáveis. As cadeias α e β na porção extracelular possuem domínios α1 e α2 e β1 e β2; a porção variável das duas cadeias são os segmentos α1 e β1. Os domínios α1 e β1 interagem para formar a fenda de ligação ao peptídeo, que estruturalmente é bastante similar à molécula do MHC de classe I. Nessa fenda ou bolsa, encaixa-se o peptídeo a ser apresentado à célula T. Assim, como seria de se esperar, essa também é a região da molécula do MHC de classe II que apresenta maior variabilidade. Na molécula de classe II, as extremidades da fenda de ligação do peptídeo são abertas; isso permite a ligação de peptídeos com 10 a 30 aminoácidos, mas pode ocorrer ligação de peptídeos maiores, o que não acontece com a molécula de classe I, que tem as extremidades fechadas.

2.3.2 Complicações hemotransfusionais relacionadas ao HLA

Várias complicações decorrentes das transfusões de produtos hemoterápicos estão associadas à incompatibilidade entre o HLA do doador e o do receptor. Múltiplas transfusões podem levar à sensibilização dos pacientes, que passam a desenvolver aloanticorpos contra antígenos de superfície das células alogênicas, principalmente contra antígenos correspondentes ao HLA. Desse processo podem advir graves complicações com importante significado clínico, como refratariedade plaquetária em pacientes trombocitopênicos, reação febril não hemolítica, insuficiência pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI, do inglês *transfusion related acute lung injury*) e o potencial para desenvolvimento da doença do enxerto *versus* hospedeiro, associada à transfusão (DEVH-AT), em pacientes imunodeprimidos.

A aloimunizacão pode ocorrer tanto pelos antígenos HLA classe I, presentes na superfície das plaquetas e leucócitos, quanto pelos antígenos HLA classe II, presentes na superfície de alguns leucócitos.

Uma das grandes preocupações da hemoterapia é minimizar ou evitar essa sensibilização. Alguns dos procedimentos indicados pela medicina transfusional foram apresentados com o propósito de diminuir a alossensibilização e garantir maior segurança para os pacientes politransfundidos. Dentre esses procedimentos, a aférese realizada em grandes centros hemoterápicos é, quando possível, a mais indicada, porém os métodos mais acessíveis incluem a filtração e a radiação.

2.4 Aspectos gerais do sistema complemento

O sistema complemento compreende um grupo de mais de quarenta proteínas presentes no plasma e encontradas na forma de pré-enzimas (zimogênios) as quais, ao reagirem sequencialmente, formam enzimas que, por sua vez, clivam outras pré-enzimas. Essas outras pré-enzimas se combinam e formam novas enzimas, em uma reação em cascata que culmina na lise celular.

Existem três mecanismos de ativação do sistema complemento: pelas vias clássica, alternativa e das lectinas. Em cada uma dessas vias, observamos uma sequência peculiar de proteínas, ou seja, apesar dos objetivos das três vias serem os mesmos (os de promover a lise), o início da formação das cascatas é constituído por uma sequência diferente de pro-

teínas. Além disso, para a ativação do sistema complemento pela via clássica, é necessária a presença do anticorpo ligado a um antígeno específico. Já nas outras duas vias, a ativação se dá apenas com a presença do antígeno. Por isso, as vias alternativa e das lectinas são mecanismos imunológicos mais simples e inerentes à imunidade inata.

As proteínas do sistema complemento são designadas pela letra C seguida de números – por exemplo, C3 – ou de letras e números, no caso de a proteína ter sofrido clivagem, por exemplo, C3b. O C3, que é clivado em condições fisiológicas gerando o subproduto C3b ou uma molécula similar – o C3i –, é o componente mais abundante do sistema complemento. As reações enzimáticas que ocorrem durante o processo de ativação desse sistema requerem a presença de alguns íons, como os de magnésio. A interação desses íons com determinadas proteínas do sistema propicia a formação de outras moléculas que apresentam atividade enzimática sobre algum substrato. Como exemplo dessa situação, temos a interação do componente C3 com o fator B, uma proteína presente no plasma. Essa interação é mediada pelo magnésio, e a formação desse complexo favorece a exposição, na proteína B, de um sítio que é reconhecido e clivado por outra proteína presente no sangue, o fator D. O produto final de toda essa reação é o complexo $\overline{\text{C3bBb}}$, que é a enzima C3 convertase. A representação desse complexo com um traço em cima caracteriza a sua atividade enzimática específica sobre o componente C3. Já as letras minúsculas, como o b, representam o subproduto, resultado da clivagem dos componentes C3 e B.

O excesso de enzimas C3 convertases aderidas aos carboidratos presentes na superfície dos microrganismos favorece a clivagem de moléculas C3, gerando os subprodutos C3b necessários à formação da enzima C3 convertase. Além disso, a deposição de C3b a C3 convertase gera outra enzima, chamada C5 convertase, cuja função é clivar o componente C5, gerando dois fragmentos: C5a e C5b. Esse último fragmento mantém-se ligado ao C3b de forma fraca. Subsequentemente, ocorre a ligação de C6 e C7 ao C5b. Finalmente, a ligação do C8 à membrana do microrganismo leva o C9 a sofrer alteração conformacional, transformando-se em uma molécula anfipática capaz de se inserir na bicamada lipídica e promover a polimerização em um complexo de ataque à membrana denominado MAC (do inglês *membrane attack*

complex). O canal transmembranar formado é permeável à água e a eletrólitos e, por causa da grande pressão osmótica coloidal no interior da célula, ocorre um influxo de Na+ e água, acarretando a lise celular.

A via clássica do sistema complemento, como mencionado, requer a presença do anticorpo ligado ao antígeno a fim de que a formação da cascata ocorra. Nessa fase inicial, o primeiro componente, chamado C1q, assemelha-se ao colágeno e consiste de seis cadeias polipeptídicas cada uma das quais possui uma subunidade de ligação ao anticorpo. Essa ligação de C1q à imunoglobulina ocorre no domínio constante 2 da cadeia pesada (C_H2), localizado na porção Fc da molécula. A região C_H2 da molécula é rica em prolina, e essa composição de aminoácidos faz que a molécula tenha flexibilidade naquele local, permitindo a exposição do sítio de ligação com o componente C1q. Porém, a mudança conformacional da molécula na região C_H2, que permite a ligação de C1q, só é possível pelo fato de a imunoglobulina estar ligada ao antígeno por intermédio de sua porção Fab.

Após a ligação de C1q à imunoglobulina, as outras duas subunidades do componente C1, C1r e C1s, assumem o sítio enzimático da enzima formada, a qual age em dois substratos: C4 e C2. Ambos os componentes são clivados em uma região, originando dois fragmentos: a e b. Após C4b ligar-se de forma covalente às hidroxilas e aminas existentes nas membranas dos microrganismos, o C2b liga-se ao C4b, de forma fraca, ligação essa dependente do cálcio. O produto dessa reação é a molécula C4b2a, enzima responsável por clivar o componente C3, gerando C3a e C3b. Esse último, por conter o radical tioéster, liga-se aos radicais amina e hidroxila da membrana. Diferentemente da via alternativa, nessa via a enzima C5 convertase é formada pelo C4bC2bC3b. A partir do MAC, ou seja C5bC6C7C8C9, a cascata apresenta a mesma sequência nas duas vias.

2.5 Aspectos gerais das reações de hipersensibilidade

As reações de hipersensibilidade foram descritas a partir da observação de que alguns indivíduos, após terem contato repetido com o mesmo antígeno, desencadeavam respostas imunológicas exacerbadas, contrariamente ao que se sabia acerca da memória imunológica, ou

seja, de que o indivíduo, ao entrar em contato pela segunda vez com o mesmo antígeno, em geral não apresenta nenhum sinal ou sintoma. De acordo com Coombs e Gell (1968), foram definidos quatro tipos de reação de hipersensibilidade: tipos I, II, III e IV. Exceto a reação de tipo IV, que é uma reação mediada por células e considerada tardia, as outras três reações são mediadas por anticorpos. No caso do tipo I, também conhecida como anafilática ou imediata, os anticorpos são da classe IgE; já as reações dos tipos II e III são mediadas por IgG e IgM. A ocorrência da reação de hipersensibilidade tipo I está associada à participação de mastócitos e basófilos, assim como de seus mediadores químicos, entre eles a histamina.

A diferença básica entre as reações de hipersensibilidade tipos II e III é a localização do antígeno. Na reação tipo II, o antígeno, que se localiza na superfície da célula, induz à formação de anticorpos naquele local, inclusive com a subsequente ativação do sistema complemento pela via clássica, levando à lise de toda a estrutura inserida naquele contexto. Já na reação tipo III, conhecida também como reação por imunocomplexo, o antígeno se encontra ligado a um anticorpo, formando um imunocomplexo livre e circulante. A deposição desses imunocomplexos em superfícies celulares, como as regiões das articulações e vasculares, pode levar, respectivamente, à artrite e à vasculite. Por causa da presença do imunocomplexo ligado aos tecidos, ocorre a ativação do sistema complemento pela via clássica, com consequente lise de toda aquela estrutura.

2.5.1 Reações transfusionais e hipersensibilidade tipo II

As hemácias dos seres humanos apresentam várias moléculas diferentes em sua superfície, muitas das quais estão envolvidas na caracterização dos grupos sanguíneos, como o grupo ABO e o fator Rh, dentre outros. A presença de um ou outro antígeno na superfície das hemácias – por exemplo, do grupo A – leva à formação, no organismo, de anticorpos, principalmente da classe IgM. Esses anticorpos são gerados como resultado de contatos prévios com antígenos de microrganismos presentes na flora intestinal, que apresentam similaridade estrutural com os carboidratos dos grupos sanguíneos e, portanto, ocasionam reatividade imunológica cruzada, que são os graves problemas decorrentes das transfusões sanguíneas incompatíveis.

2.5.2 Anemia hemolítica e hipersensibilidade tipo II

Nas reações de hipersensibilidade tipo II, evidenciamos o direcionamento de anticorpos a antígenos ligados às células ou tecidos do próprio indivíduo. Tais antígenos tornaram-se moléculas estranhas ao sistema imune pelo fato de terem sido alteradas de alguma forma – por exemplo, pela ligação com alguma droga ou antígenos microbianos. Caso a reação imunológica mencionada ocorra na hemácia, chamamos essa reação de anemia hemolítica. A agregação dos anticorpos aos antígenos eritrocitários reduz muito a vida média da célula, pois facilita o reconhecimento pelos fagócitos e, consequentemente, o seu transporte para o baço. Além da ação de células fagocíticas, pode ocorrer a ação do sistema complemento pela via clássica, levando à lise celular e, portanto, à anemia hemolítica, em se tratando de hemácias.

2.6 Aspectos gerais das reações autoimunes

As reações autoimunes são decorrentes da ação do sistema imunológico sobre estruturas próprias, ou seja, antígenos autólogos, causando danos teciduais. De modo geral, as reações autoimunes ocorrem pela participação de linfócitos autorreativos, células que escaparam da seleção negativa nos órgãos linfoides primários e secundários e que são capazes de reconhecer os antígenos endógenos, tornando efetiva a resposta imunológica. A seleção negativa que ocorre nos órgãos linfoides impede a maturação de linfócitos específicos aos autoantígenos, mecanismo conhecido como autotolerância imunológica. Por meio de mecanismos de anergia clonal, apoptose e supressão, é possível manter a autotolerância imunológica e, portanto, evitar processos autoimunes mediados pelos linfócitos autorreativos.

Os processos autoimunes são multifatoriais. Eles incluem aspectos genéticos – hormônio sexual feminino, HLA, repertório de linfócitos – e externos – processos infecciosos e inflamatórios. No caso dos processos infecciosos, pode-se observar o mimetismo molecular, que consiste na reatividade cruzada da célula imunológica com os epítopos dos antígenos, presente tanto no agente infeccioso (exógeno) quanto nos antígenos próprios (endógenos). Já nos processos inflamatórios decorrentes de alterações anatômicas, ocorre a exposição de sítios localizados em estruturas próprias que não haviam sido expostas antes ao sistema imunológico –

sendo passíveis, portanto, de resposta imune.

Os processos autoimunes podem ser classificados como fisiológicos e patológicos, e o potencial para a ocorrência desses processos é onipresente, pois reflete a diversidade dos receptores das células T e B. Em algumas situações esses processos são fisiológicos – por exemplo, a destruição de hemácias velhas (hemocaterese) que perderam a sua maleabilidade e, consequentemente, a função de transporte de gases respiratórios. Nesse caso, a retirada dessas células da circulação é um processo benéfico para o organismo, pois permite a renovação celular na circulação sanguínea.

A autoimunidade patológica é rara (em torno de 5%) e é resultante de complexas interações genéticas e de fatores do meio ambiente. O espectro das doenças autoimunes vai desde doenças órgão específicas – caso da anemia hemolítica autoimune –, órgão inespecíficas e as que incluem esses dois grupos.

2.6.1 Aspectos imunológicos da anemia autoimune

A anemia hemolítica autoimune (AHA) é uma doença pouco frequente, que ocorre na sua forma mais branda como anemia normocrômica compensada, mas pode se apresentar como doença hemolítica de grande gravidade, inclusive potencialmente fatal. Essa doença pode ser uma condição primária ou mesmo secundária a várias doenças inflamatórias, autoimunes ou infecciosas.

O processo de destruição dos eritrócitos, conhecido como hemólise, é caracterizado por uma reação imunológica direcionada a antígenos presentes na superfície dessas células. Nessa reação, predominam os autoanticorpos eritrocitários quentes, os quais são eficazes em temperaturas em torno de 37°C. Contudo, não se pode descartar a ocorrência da reação mediada pelos anticorpos conhecidos como frios, por agirem melhor em temperaturas abaixo de 37°C.

Em geral, os autoanticorpos quentes, as IgG, são direcionados para os antígenos do fator Rh presentes na superfície dos eritrócitos. Em decorrência desse processo, a ativação da via clássica do sistema complemento é deflagrada. Como resultado dessa reação, são evidenciados vários achados clínicos e laboratoriais – maior produção celular e diminuição de sua vida média, dentre outros.

Referências bibliográficas

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

Coombs, R. R. A.; Gell, G. H. *Clinical Aspects of Immunology*. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1968.

Lyons, A.; Petrucelli, J. *História da medicina*. São Paulo: Manole, 1997.

Pereira, I. B.; Cardoso, M. V. G. (org.). *Textos de apoio em hemoterapia*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. V. 1.

Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. *Imunologia*. 6. ed. São Paulo: Manole, 2003.

Silva, W. D.; Mota, I. *Bier*: imunologia básica e aplicada. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

Terr, A. I. et al. *Imunologia médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Teva, A.; Fernandez, J. C. C.; Silva, V. L. Imunologia. In: Molinaro, E. M.; Caputo, L. F. G.; Amendoeira, M. R. R. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*: volume 4. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio–Instituto Oswaldo Cruz, 2009. p. 19-124.

Zago, M. A.; Falcão, R. P.; Pasquini, R. *Hematologia*: fundamentos e prática. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

Imuno-hematologia eritrocitária

Alexandre Gomes Vizzoni
Paulo Marcelo T. Cotias

Introdução

A imuno-hematologia eritrocitária é uma ciência que estuda os grupos sanguíneos mediante a análise dos mais diversos antígenos eritrocitários e de seus correspondentes anticorpos séricos, estando diretamente relacionada a três disciplinas:

- Imunologia: que identifica os antígenos eritrocitários e os distribui em sistemas, e que estuda, também, as imunizações provocadas por esses antígenos e os problemas imunológicos resultantes das reações antígeno–anticorpo;

- Genética: que estuda a transmissão hereditária dos grupos sanguíneos de acordo com as leis de Mendel;

- Bioquímica: que estuda os antígenos inseridos na membrana eritrocitária como estruturas reativas (lipídeos, proteínas, glicídios).

As bases científicas da transfusão de sangue foram adquiridas somente no início do século XX. Os grupos sanguíneos A, B e O foram descritos, em 1901, por Landsteiner o grupo AB, por Decastello e Sturli em 1902.

As técnicas de hemaglutinação direta ou indireta permitiram o conhecimento dos grupos sanguíneos, sendo hoje relatados mais de 280 antígenos agrupados em 30 sistemas – notadamente o ABO, o Rh e o MNS, além de outros mais complexos.

1. Sistema ABO

É o mais importante e mais conhecido sistema de grupos sanguíneos. Em decorrência da presença de antígenos ABO na maioria dos tecidos do organismo, trata-se mais de um sistema de histocompatibilidade, do que simplesmente de um sistema de grupos sanguíneos.

Os genes ABO estão localizados no braço longo do cromossoma 9 (posição 9q34.1-q34.2), contando com quatro genes: A_1, A_2, B e O.

Os genes responsáveis pela síntese dos antígenos A e B das hemácias codificam a produção de enzimas denominadas glicosiltransferases, que são responsáveis por catalisar as reações entre o substrato e o açúcar receptor (transglicolização). A atividade das glicosiltransferases dos antígenos A e B varia em diversos subgrupos do sistema ABO.

As glicosiltransferases adicionam carboidratos terminais à substância H, que serve como estrutura básica para esses dois antígenos (fig. 1). O gene A, por meio da enzima alfa(1,3)N-acetilgalactosaminiltransferase, é responsável pela adição de N-acetil-D-galactosamina, formando o antígeno A; o gene B, por intermédio da enzima alfa 3-galactosiltransferase, adiciona D-galactose, formando o antígeno B. A substância H é formada pela ação da enzima alfa-2-L-fucosiltransferase, que adiciona L-fucose à galactose terminal. Essa enzima é codificada no *locus* FUT1 do cromossomo 19, na posição q13.3, sendo, portanto, geneticamente independente do *locus* ABO.

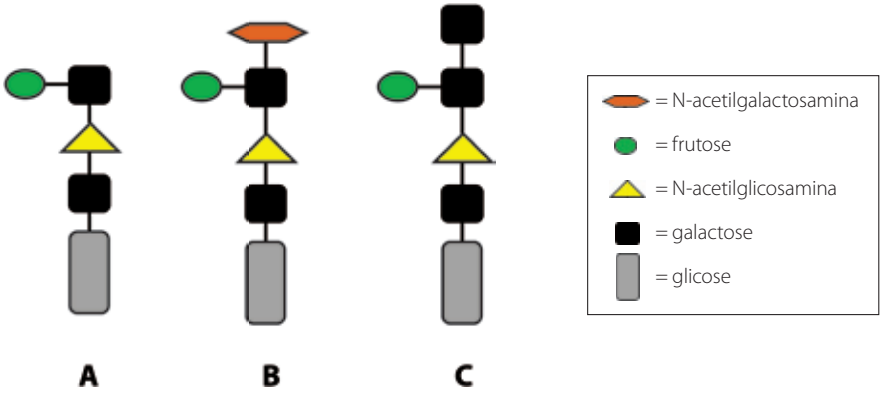


Figura 1. A) Antígeno H; B) antígeno A; C) antígeno B.

Quadro 1. Biossíntese dos antígenos ABO.

Locus	Transferase	Açúcar	Alelo
ABO	alfa-3-N-acetilgalactosaminiltransferase	N-acetil-D-galactosamina	A
	alfa-3-galactosiltransferase	D-galactose	B
	nenhuma	nenhum	O

Os antígenos do sistema ABO não estão restritos à membrana eritrocitária, sendo encontrados na saliva e nos líquidos biológicos de indivíduos que apresentem o gene secretor. São encontrados também na maioria das células epiteliais e endoteliais. Sua presença nos linfócitos e nas plaquetas parece estar relacionada à absorção do plasma.

Os antígenos ABO estão expressos desde a 5ª-6ª semanas de vida intrauterina, porém é somente ao redor dos 2 a 4 anos de vida que o número de sítios antigênicos apresenta expressão plena.

Os anticorpos ABO são dirigidos contra os antígenos ausentes nas hemácias do próprio indivíduo. São de classe IgM e IgG, ativos a 37ºC e capazes de fixar e ativar o complemento, provocando hemólises intravasculares severas em casos de incompatibilidades transfusionais. Também estão relacionados com a doença hemolítica do recém-nascido (DHRN), geralmente de intensidade leve.

Os anticorpos do sistema ABO aparecem espontaneamente depois dos 3-6 meses de idade, com pico de produção dos 5 aos 10 anos de idade e com diminuição progressiva na velhice. Uma das explicações para o seu aparecimento é a ampla distribuição de estruturas semelhantes a esses antígenos na natureza, principalmente nas bactérias. Por isso, esses anticorpos são chamados de ocorrência natural. As bactérias presentes no trato intestinal, na poeira e em alimentos promovem uma exposição constante de todos os indivíduos a essas estruturas, semelhantes aos açúcares A e B presentes nas hemácias.

A identificação dos fenótipos ABO (quadro 2) está relacionada à presença ou à ausência dos antígenos A e/ou B na membrana das hemácias (prova direta) e à detecção ou à ausência de anticorpos contra os antígenos eritrocitários que não estão presentes na superfície das hemácias (prova reversa).

Quadro 2. Principais fenótipos ABO.

Grupo ABO	Antígenos	Anticorpos	Genótipos possíveis
A_1	A_1	Anti-B	A^1A^1; A^1A^2; A^1O
B	B	Anti-A	BB; BO
AB	A_1 e B	Nenhum	A^1B
O	Nenhum	Anti-A, Anti-B e Anti-A,B	OO
A_2	A_2	Anti-B e eventual Anti-A_1	A^2A^2; A^2O
A_2B	A_2 e B	Nenhum e eventual Anti-A_1	A^2B

Diferentes expressões dos antígenos A ou B (variações quantitativas) podem ser encontradas na fenotipagem direta ABO. Essas diferenças podem revelar discrepâncias entre a prova direta e a prova reversa. Por exemplo, a prova direta, indicando o grupo sanguíneo A, além da presença de anticorpos no soro e/ou plasma do indivíduo a ser testado que aglutinam as hemácias fenotipadas da tipagem reversa do grupo A e B.

Embora sejam formados pelo mesmo açúcar, os subgrupos do grupo A apresentam diferenças quantitativas e qualitativas. Sabe-se que o gene A^1 difere do gene A^2 por uma deleção de base na região C-terminal, além de apresentar uma mutação que determina uma substituição de aminoácidos (prolina para leucina) na glicosiltransferase resultante.

O fenótipo A^2, comum em caucasianos, é detectado, sorologicamente, por meio da capacidade desses eritrócitos aglutinarem com o soro anti-A e de não aglutinarem com o soro lectina anti-A^1 (*Dolichos biflorus*), ao contrário do fenótipo A^1, cujas hemácias são aglutinadas na presença desse reagente. A elucidação de subgrupos sanguíneos pode ser realizada mediante fenotipagem das amostras com lectinas anti-A^1 e anti-H (*Ulex europaeus*), além de técnicas de fixação e eluição e pesquisa de antígenos na saliva de indivíduos secretores.

A ausência do gene H – e, consequentemente, do antígeno H –, denominada fenótipo Bombaim ou O_h, foi descrita em 1952. Esse fenótipo distingue-se pela perda total da atividade das transferases ABH nos eritrócitos e nas secreções corpóreas e pelas grandes quantidades de anticorpos anti-H. Por causa da presença do antígeno H na superfície dos seus eritrócitos, indivíduos com fenótipos Bombaim são incompatíveis com os eritrócitos de doadores do tipo O.

Quadro 3. Identificação dos principais subgrupos ABO.

Reações das hemácias com antissoros				Reações com hemácias-teste						
Fenótipos	Soro Anti-A	Soro Anti-B	Soro Anti-AB	Lectina Anti-A_1	Lectina Anti-H	Hem A_1	Hem A_2	Hem B	Hem O	Saliva do secretor
A_1	4+	0	4+	4+	0	0	0	4+	0	A e H
A_{int}	4+	0	4+	2+	3+	0	0	4	0	A e H
A_2	4+	0	4+	0	2+	*	0	4+	0	A e H
A_3	2+CM	0	2+CM	0	3+	*	0	4+	0	A e H
A_m	0/W	0	0/W	0	4+	0	0	4	0	A e H
A_x	0/W	0	1+/2+	0	4+	2+/0	0/1+	4+	0	H
A_{el}	0	0	0	0	4+	2+/0	0	4+	0	H
B	0	4+	4+	0	–	4+	4+	0	0	B e H
B_3	0	+/CM	2+/ CM	–	4+	4+	4+	0	0	B e H
B_m	0	0	0/W	–	4+	4+	4+	0	0	B e H
B_x	0	0/W	0/2+	–	4+	4+	4+	0	0	H

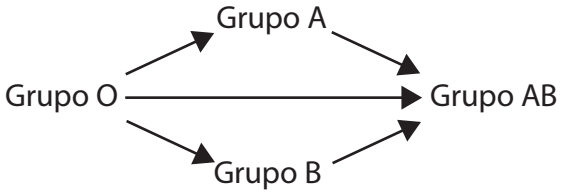
* a ocorrência de anticorpos anti-A1 nesses fenótipos é variável.
W = intensidade fraca (do inglês *weak*) de aglutinação.
CM = campo misto (presença de hemácias aglutinadas e hemácias livres).
Fonte: Adaptado de American Association of Blood Banks, 1996.

Outro variante deficiente do gene H é caracterizado como fenótipo para-Bombaim (Ah, Bh e ABh). Os eritrócitos de indivíduos portadores desse fenótipo apresentam quantidades mínimas dos antígenos A e B e pouco ou nenhum antígeno H. Esse fenótipo difere do fenótipo Bombaim clássico por apresentar uma transferase H com atividade muito fraca, o que leva as poucas quantidades de substância H produzidas a serem convertidas aos antígenos A e B pelas suas respectivas transferases.

Por causa da presença regular de anticorpos naturais hemolíticos no sistema ABO, é uma regra básica não transfundir hemácias portadoras de antígenos que possam ser reconhecidos pelos anticorpos do receptor. Assim, de acordo com essa norma, podemos estabelecer as seguintes regras de compatibilização no sistema ABO:

1) transfusões de isogrupos sempre que possível;

2) transfusões de heterogrupos apenas excepcionalmente, respeitando-se o seguinte esquema:



2. Sistema Rh

O sistema Rh é o mais complexo sistema de grupos sanguíneos, e, depois do sistema ABO, é o de maior importância clínica. Descoberto em 1939, tornou-se o sistema de grupo sanguíneo com mais alto polimorfismo entre os marcadores conhecidos da membrana eritrocitária. Até o presente momento, 49 antígenos foram identificados no sistema Rh, e os estudos genéticos e bioquímicos têm sido caracterizados pelas controvérsias.

O período de descoberta dos primeiros antígenos do sistema Rh (D, C, E, c, e) pode ser descrito pelo breve histórico a seguir:

- 1939: Levine e Stetson atribuem a causa da eritroblastose fetal de um recém-nascido à atividade de anticorpos maternos contra suas hemácias;

- 1940: Landsteiner e Wiener produzem, por imunização de coelhos com hemácias de macaco rhesus, soros anticorpos capazes de aglutinar 85% das hemácias humanas;

- 1941: Wiener e Levine publicam um trabalho preciso sobre doença hemolítica do recém-nascido provocada pelo anti-Rh, demonstrando como os indivíduos não portadores do antígeno Rh podem se imunizar e as consequências dessa imunização;

- 1941-1943: foram observados em indivíduos politransfundidos e em multíparas outros anticorpos capazes de aglutinar hemácias humanas cuja frequência variava em indivíduos Rh positivos e Rh negativos.

As complexidades sorológica e fenotípica associadas a esse sistema levaram à elaboração de nomenclaturas diferentes: o sistema Rh-Hr (Wiener), a terminologia CDE (Fischer e Race) e o sistema numérico (Rosenfield), que se basearam em diferentes teorias quanto à genética desse sistema de grupo sanguíneo (quadro 4).

Quadro 4. Nomenclaturas propostas para antígenos do sistema Rh.

Genótipos			
Ocorrência comum	Wiener	Fisher-Race	Rosenfield
	R^1r	DCe/dce	Rh:1,2,-3,4,5
	R^1R^1	DCe/DCe	Rh:1,2,-3,-4,5
	rr	dce/dce	Rh:-1,-2,-3,4,5
	R^1R^2	DCe/DcE	Rh:1,2,3,4,5
	R^2r	DcE/dce	Rh:1,-2,3,4,5
	R^2R^2	DcE/DcE	Rh:1,-2,3,4,-5
Ocorrência rara	$r'r$	dCe/dce	Rh:-1,2,-3,4,5
	$r'r'$	dCe/dCe	Rh:-1,2,-3,-4,5
	$r''r$	dcE/dce	Rh:-1,-2,3,4,5
	$r''r''$	dcE/dcE	Rh:-1,-2,3,4,-5
	R^0r	Dce/dce	Rh:1,-2,-3,4,5
	R^0R^0	Dce/Dce	Rh:1,-2,-3,4,5
	r^yr	dCE/dce	Rh:-1,2,3,4,5

Fonte: Adaptado de Harmening, 2006.

A localização cromossômica dos genes pode ser definida por 1p36-34. Mediante a análise do DNA genômico de diferentes fenótipos Rh, indivíduos RhD positivos possuem os genes RHD e RHCE, enquanto indivíduos RhD negativos apresentam somente o gene RHCE. Na maioria dos indivíduos RhD negativo o gene RHD está

deletado, portanto não existe o alelo d. O gene RHD codifica o polipeptídeo D, e o gene RHCE (alelos RHCe, RHcE, RHce e RHCE) codifica os polipeptídeos C/c e E/e.

Os genes RHD e RHCE apresentam um elevado grau de homologia, com uma variação de 36 aminoácidos em 416 posições. O polimorfismo E/e resulta da substituição de um único aminoácido no éxon 5, na quarta alça extracelular, quando da substituição de uma prolina (E) na posição 226 para uma alanina (e). No polipeptídeo Rh, que carreia os antígenos C e c, ocorre uma substituição de quatro aminoácidos em uma cadeia de 416 aminoácidos, embora apenas uma substituição pareça ser crítica para o polimorfismo C/c: a substituição de uma serina (C) na posição 103 por uma prolina (c). Por outra parte, o polipeptídeo codificado pelo gene RHD difere daquele codificado pelo RHCE em 36 aminoácidos.

Essas diferenças talvez possam explicar em parte a imunogenicidade do antígeno RhD, pois quando um indivíduo RhD negativo é exposto a hemácias RhD positivo, o seu sistema imune é estimulado por uma proteína que difere em 36 aminoácidos daquela que ele possui.

Na prática transfusional, o sistema Rh é o sistema mais importante depois do sistema ABO, tendo sido responsável por casos de doença hemolítica do recém-nascido de intensidade variável, chegando mesmo a ser grave e levar até a óbito fetal, além de ter sido responsabilizado por reações transfusionais hemolíticas que podem ser graves. Ainda que 49 antígenos estejam relacionados ao sistema Rh, apenas 5 (D, C, c, E, e) são responsáveis pela grande maioria dos problemas clínicos associados a esse sistema.

2.1 D fraco e D parcial

Os antígenos D fraco apresentam-se como uma expressão enfraquecida do antígeno D, reagindo de maneira variável com os antissoros anti-D comerciais. Normalmente esse antígeno não é detectado por técnicas de aglutinação direta, e sim por técnicas complementares, como tratamento enzimático das hemácias e técnica de Coombs indireto.

Esse fenótipo ocorre por uma variação qualitativa do antígeno RhD que produz uma alteração quantitativa de sítios antigênicos ex-

pressos na membrana eritrocitária. As hemácias contendo D fraco devem ser consideradas Rh positivas, podendo provocar, dessa forma, aloimunização transfusional ou feto-materna.

A incidência de D fraco tem sido descrita como presente em 0,2 a 0,5% da população da Europa e em 3% da população dos Estados Unidos. Aloanticorpos anti-D não ocorrem na maioria dos pacientes portadores de D fraco, mas alguns pacientes com fenótipo D fraco, incluindo aqueles com tipo 21, podem produzir anticorpos contra epítopos não próprios do antígeno D (McGann e Wenk, 2010).

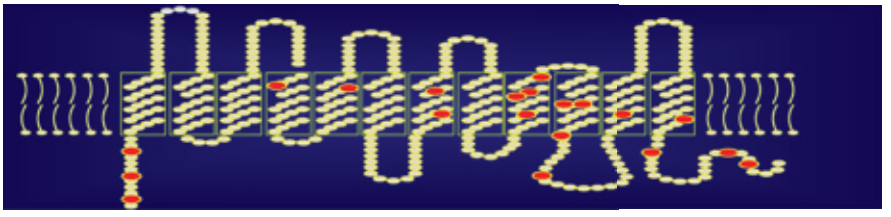


Figura 2. Pontos de substituição de aminoácidos na porção intracelular da membrana eritrocitária nos fenótipos D fraco.
Fonte: Adaptado de Flegel, 2007.

Antígenos D parciais apresentam alterações qualitativas e quantitativas quando comparados com o antígeno D normal. Essas alterações podem ser caracterizadas pela ausência de um ou mais epítopos do antígeno D que foram substituídos por epítopos da proteína CcEe e podem ocorrer por mutações de ponto missenses no gene RHD que levam a substituições de aminoácidos predominantemente nas alças extracelulares, mas também dispersas na proteína, por isso possuem epítopos alterados, com aminoácidos diferentes, que os reagentes monoclonais não reconhecem.

As mutações de ponto missenses podem ser únicas (uma única mutação num determinado éxon do gene RHD) ou dispersas (mais de uma mutação de ponto em mais de um éxon do gene RHD). As mutações podem ocorrer também por rearranjos gênicos entre os genes RHD e RHCE (alelos híbridos).

A diferenciação entre D fraco e D parcial por métodos sorológicos em nossa população é de difícil resolução, pois é possível encontrar mais de um tipo de D fraco numa mesma amostra, resultado de uma

grande miscigenação. Portadores do antígeno D parcial e alguns D fracos estão propensos a imunizações de anti-D. Consequentemente, uma correta classificação do antígeno pode evitar desperdício de unidades RhD negativas e/ou imunização decorrente de transfusão de hemácias RhD positivas. Os métodos moleculares podem confirmar ou excluir a presença desses antígenos; entretanto, não devem ser analisados de forma isolada, ou seja, sem a realização de testes sorológicos, pois nem sempre a presença do gene resulta na expressão da proteína. No sistema Rh ocorre essa exceção e há pessoas que possuem o gene RhD mas não expressam a proteína: são os famosos pseudogenes. Dessa forma, ao utilizarmos os métodos moleculares em imuno-hematologia, devemos confrontar os resultados dos testes (genótipos) com os fenótipos, que são evidenciados por testes de sorologia de grupos sanguíneos.

2.2 Anticorpos Rh

Os anticorpos anti-Rh resultam, praticamente, de uma aloimunização por transfusão sanguínea ou por gravidez, pertencendo quase sempre à classe IgG (IgG 1 ou IgG 3). Alguns anticorpos da classe IgM podem ocorrer transitoriamente no início da aloimunização. Raros anti-E e anti-C^w podem ser observados sem um estímulo antigênico conhecido, sendo considerados naturais.

A transfusão é a via mais frequente de imunização contra antígenos Rh. No caso específico do antígeno D, estima-se em 80% a probabilidade de imunização após uma transfusão incompatível. Já a imunização por gravidez representa a maioria dos casos de doença hemolítica do recém-nascido, sendo devida ao anti-D. Entretanto, com a profilaxia por imunoglobulinas anti-RhD, o número de aloimunizações maternas contra o antígeno D diminuiu, mas o mesmo não ocorreu com os antígenos E, c, e C.

Os anticorpos Rh são clinicamente significativos, reativos a 37ºC e na fase de antiglobulina humana (AGH). Em geral, esses anticorpos não fixam complemento, e a hemólise resultante de uma transfusão incompatível será extravascular, caracterizando uma reação transfusional hemolítica retardada.

O receptor da transfusão contendo antígeno Rh correspondente ao anticorpo previamente formado pode apresentar febre inexplicável, com

elevação da bilirrubina e redução da hemoglobina e haptoglobina. De modo usual, a técnica da antiglobulina direta (Coombs direto) apresenta resultado positivo principalmente por IgG, tendo os estudos de eluição importante papel na elucidação da especificidade do anticorpo.

3. Outros sistemas de grupos sanguíneos

3.1 Sistema P

O grupo sanguíneo P foi descrito em 1927 por Landsteiner e Levine. Em sua busca por novos antígenos, injetaram eritrócitos humanos em coelhos e produziram um anticorpo inicialmente chamado anti-P, que dividia os eritrócitos humanos em dois grupos: P+ e P-. Em 1959, Levine et al. (1951) descreveram o anticorpo anti-Tj^{a} (atualmente conhecido como anti-PP$_1$P^{k}).

A expressão de P_1 no desenvolvimento fetal é variável. O antígeno é encontrado em eritrócitos fetais desde a 12^{a} semana, mas sua expressão diminui com a idade gestacional (Ikin et al., 1961). O antígeno é fracamente expresso ao nascimento, e sua expressão completa acontece perto dos 7 anos.

O antígeno P_1 deteriora rapidamente quando estocado. Se células antigas são tipadas, ou utilizadas como controles para reagentes de tipagem ou na detecção de anti-P_1 no soro, podem ocorrer reações falso-negativas.

Anti-P_1 é um anticorpo da classe IgM comum, de ocorrência natural no soro dos indivíduos P_2 e não determina reação transfusional ou doença hemolítica perinatal. Apenas em raros casos trata-se de uma potente IgG ativa a 37ºC com importância transfusional. Esse anticorpo reage mediante a aglutinação direta em baixas temperaturas com hemácias P_1 positivas. Cerca de 20% dos doadores de sangue são P_1 negativos.

Habitualmente é uma aglutinina com fraca reação a frio em salina, não observada nos testes de rotina. A atividade do anticorpo pode ser contornada pelo uso de métodos de teste de pré-aquecimento.

Como a expressão do antígeno P_1 nos eritrócitos varia e se deteriora durante o armazenamento, anticorpos podem reagir apenas com as

células com expressão mais intensa ou com a adição de enzimas para intensificar as reações. O fornecimento de bolsas compatíveis a 37ºC e na fase de AGH é uma abordagem aceitável para a transfusão.

Raros exemplares de anticorpos P_1 que reagem a 37ºC podem causar destruição de eritrócitos *in vivo*; entretanto, há relatos de reação hemolítica transfusional imediata e tardia. A DHRN não está associada à anti-P_1, presumivelmente porque o anticorpo habitualmente é de natureza IgM.

3.2 Sistema MNSs

Após a descoberta do sistema ABO, a busca por novas especificidades de anticorpos por meio da imunização de coelhos com eritrócitos humanos foi iniciada por Landsteiner e Levine. Dentre os anticorpos recuperados dos soros desses coelhos, foram detectados anti-M e anti-N, ambos divulgados num artigo em 1927 (Landsteiner e Levine, 1927).

Com a implantação da técnica da antiglobulina em 1947, Walsh e Montgomery descobriram o antígeno S, que, embora distinto, era geneticamente ligado ao MN. Seu alelo "s" foi descoberto em 1951, e o sistema MN passou a ser conhecido como MNSs, um sistema de dois *loci*. Em 1953, Wiener comunicou a descoberta de um anticorpo para um antígeno de alta frequência, que foi denominado U. Esse antígeno encontra-se em uma glicoproteína bem caracterizada chamada MN-sialogligoproteínas (MN-SGP) ou glicoforina A (GPA).

3.2.1 Antígenos MNSs

Os antígenos MN podem ser detectados na 9ª semana de gestação e estão bem desenvolvidos ao nascimento. Uma vez que os antígenos MN estão na extremidade externa da GPA, podem ser facilmente destruídos ou removidos por enzimas proteolíticas. M e N são basicamente eritrocitários e estão localizados no cromossomo 4.

Embora dados mais antigos tenham sugerido a presença do antígeno M em linfócitos, M e N não foram detectados em linfócitos, monócitos ou granulócitos por citometria de fluxo e imunofluorescência. Antígenos MN foram detectados no epitélio e endotélio de capilares renais (Hawkins, 1985).

Os antígenos Ss, muito parecidos com os antígenos MN, estão localizados em uma glicoproteína menor chamada Ss-sialoglicoproteína (Ss-SGP) ou glicoforina B (GPB). Existem cerca de $2x10^5$ cópias de GPB por eritrócito, entretanto nem todas estão disponíveis para a ligação do anticorpo.

Os antígenos Ss encontram-se bem desenvolvidos ao nascimento e estão presentes nos eritrócitos a partir da 12ª semana de idade gestacional. São menos degradados por enzimas porque os antígenos estão localizados em um local mais remoto da glicoproteína e os locais sensíveis à enzima são menos acessíveis. A atividade de Ss pode ser destruída por papaína, ficina e bromelina, embora o grau de degradação dependa da concentração da solução enzimática, da sua duração e da proporção utilizada.

Ss são considerados antígenos eritrocitários, não sendo encontrados em plaquetas, linfócitos, monócitos ou granulócitos. Assim como MN, estão localizados no cromossomo 4.

3.2.2 Anticorpos anti-M

Os anticorpos anti-M são, em sua maioria, crioaglutininas reativas em salina, de ocorrência natural e sem importância transfusional.

A maioria dos exemplos de anti-M são IgG reativos a baixa temperatura (TA/4ºC), entretanto foram descritos casos raros reativos a 37ºC capazes de promover reação transfusional importante. Devido ao efeito de dose, anticorpos anti-M podem reagir melhor com hemácias M+N- (genótipo MM).

Anti-M muito fraco pode não reagir com hemácias M+N+, tornando difícil sua detecção no painel de identificação. A reatividade do anticorpo pode ser acentuada ao se aumentar a relação entre as células do painel e o volume de soro e/ou o tempo de incubação. Pode-se adicionar um meio potencializador como a albumina ou um meio de baixa força iônica (LISS, do inglês *low ionic strenght solution*).

Esse anticorpo pode ser detectado no plasma, que é ligeiramente mais ácido em decorrência do anticoagulante. Anti-M é raramente responsável por reações hemolíticas transfusionais, diminuição da sobrevida das células ou doença hemolítica do recém-nascido. É suficiente fornecer unidades compatíveis na prova cruzada a 37ºC

e na fase de antiglobulina sem ser necessária a fenotipagem para o antígeno M.

3.2.3 Anticorpos anti-N

Esse anticorpo é uma aglutinina fria reativa em salina, de classe IgG ou IgM, que não liga complemento e nem reage com hemácias tratadas previamente com enzimas. Anti-N demonstra efeito de dose, reagindo melhor com hemácias com fenótipo M-N+. Não é clinicamente significativo, a menos que reaja a 37ºC.

Anti-N é mais raro que anti-M. Numa série de 86 mil pacientes, foram detectados apenas dois exemplares de anti-N (Mollison, Engelfriet e Contreras, 1997). Também foi observado em pacientes renais, dialisados em equipamento esterilizado com formaldeído, independentemente do tipo MN.

3.2.4 Anticorpos anti-S e anti-s

Quase todos os exemplares de anti-S e anti-s são IgG; eles são reativos a 37ºC e na fase de antiglobulina. Alguns exemplares expressam reatividade ótima em temperaturas mais baixas (4ºC). Os anticorpos podem ou não reagir com hemácias previamente tratadas.

Embora detectados menos frequentemente que anti-M, anticorpos anti-S ou anti-s têm maior probabilidade de ser clinicamente significativos. Podem ativar o sistema complemento, tendo sido implicados em reação hemolítica grave causada por transfusão. Também causam DHRN.

Unidades de sangue selecionadas para transfusão devem ser negativas para o antígeno correspondente a esses anticorpos e compatíveis nas provas cruzadas. Tendo em vista que apenas 11% dos brancos e 3% dos negros são "s-", pode ser difícil obter sangue para um paciente com anti-s.

3.2.5 Anti-U

Anti-U é um anticorpo raro, encontrado na raça negra. Cerca de 1% dos negros americanos (e de 1 a 35% dos negros africanos) não apresenta o antígeno U, o que torna muito difícil encontrar sangue compatível. Pode determinar reação transfusional e DHRN. Habitualmente, os pacientes apresentam fenótipo S-s-U-.

3.3 Sistema Lutheran

Esse sistema foi descoberto em 1945, por causa da presença de anti-Lu^a, um antígeno de baixa frequência, no soro de um paciente após transfusão. Seu par antitético, um antígeno de alta frequência, também foi descoberto no mesmo ano, tendo recebido a denominação de anti-Lu^b. O sistema de grupo sanguíneo parecia completo até o início da década de 1960, quando Crawford et al. (1961) descreveram o primeiro fenótipo Lu(a-b-).

3.3.1 Antígenos Lu^a e Lu^b

Antígenos Lu^a e Lu^b são antígenos produzidos por genes codominantes alélicos. Não foi detectada a presença de antígenos Lutheran em plaquetas, linfócitos e monócitos, mas há presença no cérebro, pulmão, pâncreas, placenta (Reid e Lomas-Francis, 1997). Embora tenham sido detectados em eritrócitos fetais com apenas 10-12 semanas de gestação, estão fracamente desenvolvidos ao nascimento e não atingem níveis adultos até os 15 anos de idade.

Os antígenos demonstram efeito de dose, sendo notadas diferenças nítidas entre membros homozigotos e heterozigotos em uma mesma família.

3.3.2 Anticorpos anti-Lu^a

A maioria dos exemplares é de aglutininas de "ocorrência natural", com reação em salina e que reagem melhor em temperatura ambiente que a 37ºC. Alguns exemplares reagem a 37ºC e no teste de antiglobulina humana (AGH).

Frequentemente, o anti-Lu^a passa despercebido nos testes de rotina porque a maioria das células de triagem para anticorpos irregulares são Lu^a negativo.

A reatividade do anticorpo não é profundamente alterada pelas enzimas de rotina do banco de sangue. Em sua maioria, os anticorpos Lu^a não são clinicamente significativos em transfusão, e tendem a desaparecer alguns meses depois de terem sido detectados. Podem ocasionar DHRN, embora, na maioria dos casos, de forma branda.

3.3.3 Anticorpos anti-Lu^b

A maioria pertence à classe IgG, sendo reativos a 37ºC e na fase de AGH. São produzidos em resposta à gravidez ou à transfusão.

Anti-Lu^b reage com todas as células testadas exceto o autocontrole, sendo mais fracas as reações com células do cordão e com fenótipo em heterozigose Lu(a+b+).

Anti-Lu^b tem sido implicado na diminuição da sobrevida de células transfundidas e na icterícia pós-transfusional, mas não foi descrita a ocorrência de hemólise grave ou aguda. Pode ser considerado clinicamente significativo, mas não se deve deixar de administrar o sangue em situações de emergência apenas porque não puderam ser encontradas unidades compatíveis.

3.4 Sistema Kell

O sistema Kell é um sistema eritrocitário descoberto em 1946, após a implantação da técnica de Coombs, no soro de uma paciente, a sra. Kellacher, que reagiu com as hemácias de seu filho recém-nascido, de seu marido e de sua filha mais velha. É o terceiro mais importante e imunogênico sistema de grupos sanguíneos. Seu correspondente antitético foi descrito por Levine et al. (1949) e denominado k (cellano), sendo um antígeno de alta frequência.

3.4.1 Antígenos Kell

São codificados pelo gene KEL, que está localizado no braço longo do cromossoma 7. A expressão desses antígenos também é controlada por um gene regulador XK, localizado no braço curto do cromossoma X.

Os antígenos do sistema Kell não estão presentes em plaquetas, linfócitos, granulócitos ou monócitos. Podem ser detectados nas células fetais a partir da 10ª semana de gestação, estando bem desenvolvidos ao nascimento.

São antígenos extremamente imunogênicos, sendo o antígeno K o segundo mais imunogênico de todos os antígenos de grupos sanguíneos (o antígeno D é o mais imunogênico deles). Um paciente com fenótipo K(-) que receba uma única transfusão com a presença

do antígeno tem uma probabilidade de até 10% para a formação do anticorpo correspondente (Hughes-Jones e Gardner, 1971).

O antígeno K é de baixa frequência, ao passo que o antígeno k é de alta frequência e pode ser encontrado em aproximadamente 99,8% da população.

Os antígenos Kell não são desnaturados por enzimas como bromelina, ficina e papaína; entretanto, são inativados por tripsina, quimiotripsina, soluções de ditiotreitol (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), 2-aminoetilisotiourônio (AET) e ZZAP (que contém DTT e enzima proteolítica papaína ativada com cisteína).

3.4.2 Anticorpos Kell

Dentre os anticorpos irregulares mais detectados pelos serviços de hemoterapia, com exceção do anti-D, o anti-K é o anticorpo mais comumente encontrado. De forma geral, apresenta-se como um anticorpo de classe IgG reativo na fase de antiglobulina; no entanto, alguns poucos anticorpos aglutinam células suspensas em solução fisiológica.

Aproximadamente 20% dos anticorpos do sistema Kell fixam complemento até C3, mas não possuem capacidade hemolítica. Porém os anticorpos anti-K e anti-k têm sido implicados em casos de DHRN e envolvidos em reações transfusionais hemolíticas.

Alguns exemplares de anti-K reagem fracamente com hemácias suspensas em meios de baixa força iônica, como o LISS, e em alguns sistemas automatizados (Schultz, 1990).

O anti-K pode apresentar efeito de dose, embora a percepção desse efeito nem sempre seja evidente. Quase todos os autoanticorpos Kell estão associados aos antígenos de alta frequência do sistema Kell; no entanto, a identificação desses autoanticorpos revelou especificidades anti-K, anti-Kp^b e anti-K13 (Marsh, Dinapoli e Oyen, 1979).

3.5 Sistema Lewis

O sistema de grupo sanguíneo Lewis apresenta a característica de não ser produzido pelos eritrócitos e não estar integrado na estrutura membranar, o que o torna um sistema diferente dos demais. Os antígenos desse sistema são elaborados por células teciduais e secretados nos fluidos corporais, principalmente nas secreções e no plasma (Harmening, 2006).

O gene Lewis (Le) produz uma L-glicosiltransferase que acrescenta uma L-fucose a uma substância precursora básica para a produção dos antígenos do sistema Lewis. O gene Le encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 19 p13.3, estando ligado ao *locus* do complemento C3 (Oriol, Le Pendu e Mollicone, 1986).

Uma vez que os antígenos do sistema Lewis são produzidos por células teciduais, a produção dos antígenos é dependente tanto da herança dos genes Lewis quanto da herança do gene secretor (Sese) de substâncias ABH. Há uma interação gênica entre os genes Lewis e os genes ABO, uma vez que a quantidade de antígeno Lewis detectada no eritrócito é influenciada pelos genes ABO herdados.

3.5.1 Antígenos Lewis

A substância Le^a é secretada por todos os indivíduos, independentemente da presença do gene secretor, de modo que indivíduos não secretores (sese) de antígenos ABH podem conter antígenos Le^a nos fluidos corporais que serão posteriormente adsorvidos à membrana dos eritrócitos, produzindo o fenótipo Le(a+b-). Dessa forma, os indivíduos Le(a+b-) são não secretores de substâncias ABH (Henry, Oriol e Samuelson, 1995). A enzima Lewis está presente na saliva, no leite, nas glândulas submaxilares, na mucosa gástrica e em fluidos de cistos (Salmon, Cartron e Rouger, 1984).

A formação do antígeno Le^b está associada à interação dos genes Sese, ABO, Hh e Lewis. Cabe destacar que os antígenos Le^a e Le^b não são alelos. O resultado da interação gênica entre os genes Lele e Sese é a produção do fenótipo Le(a-b+).

O fenótipo Le(a-b-) não é decorrente da ausência do gene i (FUT 3), mas de mutações pontuais específicas no gene Le que vão originar uma transferase Lewis não funcional ou parcialmente ativa, determinando assim a expressão negativa nos eritrócitos (Henry, Oriol e Samuelson, 1995; Elmgren et al., 1996).

A diminuição dos antígenos Lewis tem sido demonstrada em mulheres grávidas, resultando no fenótipo Le(a-b-) no decorrer da gestação (Churchill e Kutz, 1988; Harmening, 2006). Pacientes com câncer, cirrose alcoólica, infecções virais e parasitárias podem não expressar os antígenos Lewis nos eritrócitos. Essa modificação do fe-

nótipo positivo para fenótipo negativo é decorrente de metabolismo lipídico anormal, por alterações de triglicerídeos e de proteínas de alta densidade (Henry, Oriol e Samuelson, 1995) e/ou outras alterações neoplásicas que ocorrem em pacientes com câncer (Langkilde, Wolf e Orntoft, 1990; Idikio e Manickavel, 1991).

Não são encontrados nos eritrócitos do sangue do cordão ou em recém-nascidos, de forma que, se forem testadas, essas células apresentarão o fenótipo Le(a-b-). Não demonstram efeito de dose nas reações sorológicas.

3.5.2 Anticorpos Lewis

São produzidos geralmente por indivíduos Le(a-b-) sem qualquer exposição prévia ao antígeno; frequentemente são de natureza IgM e não atravessam a placenta, não sendo, assim, responsáveis por DHRN.

São capazes de ativar o complemento, podendo provocar hemólise *in vitro* e *in vivo*. Apresentam reatividade exacerbada quando as células são tratadas por enzimas proteolíticas.

3.5.3 Anticorpo anti-Le^a

É o anticorpo mais frequente do sistema Lewis, sendo produzido por aproximadamente 20% dos indivíduos que apresentam fenótipo Le(a-b-). Embora na maioria das vezes o anticorpo seja uma IgM, foram relatados casos de anticorpos IgG após transfusões maciças contendo o antígeno Le^a (Cowles, Spitalnik e Blumberg, 1989).

O comportamento sorológico do anticorpo revela melhor afinidade por células suspensas em salina em temperatura ambiente, embora algumas vezes reaja a 37ºC e na fase da antiglobulina humana (AGH), podendo ocasionar reações transfusionais hemolíticas.

Anti-Le^a pode ser facilmente neutralizado por plasma ou saliva que contenha a substância Le^a. Indivíduos portadores do fenótipo Le(a-b+) não produzem anti-Le^a pelo fato de a estrutura do antígeno Le^a estar contida dentro do epítopo de Le^b e por apresentarem a substância Le^a no seu plasma e na sua saliva (Henry, Oriol e Samuelson, 1995; Petz et al., 1995).

3.5.4 Anticorpo anti-Le^b

Não é encontrado rotineiramente nos testes pré-transfusionais, sendo habitualmente uma IgM que não se fixa ao complemento tão facilmente quanto o anti-Le^a.

É produzido por indivíduos apresentando o fenótipo Le(a+b-) e ocasionalmente por indivíduos Le(a-b-). Pode ser neutralizado facilmente por plasma ou saliva contendo a substância Le^b.

3.5.5 Anticorpo anti-Le^x

Apresenta aglutinação com todos os eritrócitos Le(a-b+) e Le(a+b-), sendo formado em indivíduos de fenótipo Le(a-b-). Apresenta aglutinação de aproximadamente 90% dos sangues de cordão inicialmente fenotipados como Le(a-b-). Anti-Le^x não pode ser separado por técnicas de adsorção utilizando-se células Le(a+b-) ou de cordão.

3.6 Sistema Duffy

Foi identificado em 1950 em um paciente hemofílico chamado Duffy, que fora submetido a múltiplas transfusões, o primeiro exemplar de anti-Fy^a (Cutbush, Mollinson e Parkin, 1950). No ano posterior, Ikin et al. (1951) descreveram o anticorpo que definiu o seu par antitético, denominado anti-Fy^b, no soro de uma mulher multípara. Os principais antígenos do sistema Duffy na rotina imunohematológica são Fy^a e Fy^b. O gene Duffy está localizado perto do centrômero, no braço longo do cromossomo 1q22-23.

3.6.1 Antígenos Fy^a e Fy^b

Os antígenos Fy^a e Fy^b são produtos de alelos codominantes que residem em uma glicoproteína ácida (gp-Fy) que transpassa a membrana sete vezes e tem um N-terminal no domínio extracelular e um C-terminal no domínio intracelular.

Estão expressos em eritrócitos fetais a partir da 6^a semana de idade gestacional, estando bem desenvolvidos ao nascimento. Esses antígenos não foram detectados em plaquetas, linfócitos, granulócitos ou monócitos; entretanto, puderam ser detectados no cérebro, endotélio, baço, tireoide, timo e rins (Cartron e Rouger, 1995). São destruídos por

enzimas proteolíticas, como a papaína, bromelina, ficina e quimiotripsina, além do ZZAP, que tem a capacidade de clivar a IgG. Também são desnaturados por formaldeído ou pelo aquecimento a 56ºC durante 30 minutos (Harmening, 2006).

Antígenos Duffy se degradam com a estocagem, mesmo quando congelados. Possuem a capacidade de eluir dos eritrócitos estocados em meio com baixa concentração iônica ou pH baixo (Mollison, Engelfriet e Contreras, 1997).

Há associação entre os antígenos Duffy e a infecção pelo parasito causador da malária, estando resistentes à infecção por *P. vivax* os indivíduos negros americanos e africanos com fenótipo Fy(a-b-).

3.6.2 Anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b

Geralmente pertencem à classe IgG e reagem melhor à fase da antiglobulina humana, sendo rara a ligação ao complemento. Alguns anticorpos podem apresentar reatividade na fase salina, principalmente após estímulo secundário.

Os anticorpos podem apresentar efeito de dose e não reagem com hemácias tratadas por enzimas, sendo essa uma característica útil na análise da identificação de múltiplos anticorpos no soro que contenha anti-Fy^a ou anti-Fy^b.

Estão associados a reações transfusionais hemolíticas com grau moderado de hemólise. Na presença de anticorpos anti-Fy^a ou anti-Fy^b no soro do paciente, o mesmo deve obrigatoriamente receber sangue com ausência do antígeno correspondente.

Anticorpos Duffy estão implicados em reações transfusionais tardias, principalmente em pacientes com anemia falciforme e múltiplos anticorpos apresentando o fenótipo Fy(a-b-) (Harmening, 2006).

Anti-Fy^a é um anticorpo encontrado com certa frequência e que pode causar reação transfusional hemolítica (RTH) e algumas vezes DHRN.

Anti-Fy^b é um anticorpo pouco frequente, porém imune. Em raras ocasiões foi relacionado com RTH de leve a severa e ocasionalmente pode causar DHRN de intensidade leve.

3.6.3 Anticorpo anti-Fy^3

É produzido por indivíduos com fenótipo Fy(a-b-) que não expressam nenhuma glicoproteína Duffy. Reagem com fenótipos Fy(a+b-) e Fy(a-b+) e, como os antígenos Fy^3 não são destruídos por tratamento enzimático, esses anticorpos mantêm a sua reatividade mesmo quando as células Fy^3 são tratadas por enzimas proteolíticas.

3.7 Sistema Kidd

O sistema Kidd foi descoberto em 1951, após a implantação da técnica de Coombs em uma paciente (sra. Kidd) que gerou um feto com DHRN, em decorrência de um anticorpo então denominado anti-Jk^a (Allen, Diamond e Niedziela, 1951). Posteriormente foi revelado o anti-Jk^b.

3.7.1 Antígenos Jk^a e Jk^b

Os antígenos Jk^a são detectados em eritrócitos fetais a partir da 11^a semana de idade gestacional; para o antígeno Jk^b, essa detecção é possível a partir da 7^a semana.

Antígenos Jk^a e Jk^b estão bem desenvolvidos ao nascimento e não são alterados por enzimas proteolíticas, ZZAP, DTT, AET e difosfato de cloroquina. Os antígenos Jk^a têm maior expressão na membrana eritrocitária quando presentes em indivíduos homozigóticos (Jk^aJk^a) quando comparados com indivíduos que apresentam os antígenos em heterozigose (Jk^aJk^b) (Masouredis et al., 1980).

Os antígenos não são encontrados em plaquetas, linfócitos, monócitos ou granulócitos usando-se técnicas sensíveis de radioimunoensaio ou de imunofluorescência (Mollison, Engelfriet e Contreras, 1997).

3.7.2 Anticorpos anti-Jk^a e anti-Jk^b

O anticorpo anti-Jk^a é um perigoso anticorpo encontrado no soro humano que pode determinar severa reação hemolítica transfusional imediata ou tardia. É uma IgG e reage melhor com AGH poliespecífica; em geral, fixa complemento e, em alguns casos, determina ligeira hemólise ou aglutinação direta com hemácias tratadas com enzimas.

Anticorpos anti-Jk^b podem determinar reação hemolítica transfusional imediata ou tardia e raramente estão relacionados à DHRN. Geralmente são uma IgG detectada pela técnica de Coombs indireto.

A reatividade desses anticorpos pode ser acentuada pelo uso de soluções de baixa força iônica (LISS) ou polietilenoglicol (PEG), mediante o aumento do volume de soro a ser acrescentado no teste – ou seja, utilizam-se 4 gotas em vez de 2, procurando aumentar a relação entre o anticorpo e o antígeno.

Apresentam a propriedade de demonstrar efeito de dose, o que dificulta a identificação desses anticorpos para imuno-hematologistas iniciantes. Observa-se, ainda, a necessidade de utilizar uma amostra recente para identificação desses anticorpos.

Anticorpos Kidd podem causar reações hemolíticas transfusionais especialmente do tipo tardio. Observa-se, em alguns casos, a ocorrência de hemólise intravascular em reações graves, embora a remoção desses anticorpos possa ocorrer no nível extravascular pelo fígado.

Os títulos de anti-Jk^a e anti-Jk^b declinam rapidamente *in vivo*. Isso significa que um anticorpo identificado num primeiro momento pode não ser perceptível posteriormente, o que torna a verificação dos registros dos pacientes com esses anticorpos previamente formados uma necessidade que não deve ser negligenciada.

Anti-Jk^3 é um anticorpo pertencente à classe IgG que reage com a antiglobulina. Indivíduos portadores desse anticorpo apresentam o fenótipo nulo (Jk^a-Jk^b-). O anti-Jk^3 está associado à DHRN leve e a reações hemolíticas transfusionais tardias.

3.8 Coleção de grupo sanguíneo I

A existência de crioaglutininas no soro de pessoas com anemia hemolítica adquirida é conhecida há muito tempo. Wiener, Unger e Feldman (1956) nomearam essas crioaglutininas como antígeno I, de "individualidade".

O anticorpo reagiu com apenas 5 de 22 mil amostras de sangue testadas – ou seja, a maioria das amostras era I+. Acredita-se que as amostras I não reativas possuíam um raro gene homozigoto, produtor do antígeno "i". Verificou-se que muitas crioaglutininas tinham especificidade para I.

Tendo em vista que I e i não são antígenos antitéticos distintos produzidos por genes alelos, eles não são classificados como um sistema, e sim como uma coleção.

3.8.1 Antígenos Ii

Tanto os antígenos I quanto os antígenos i são encontrados em alta frequência na população. Ao nascimento, os eritrócitos do recém-nato são ricos em i; já I praticamente não é detectável. Durante os primeiros 18 meses de vida, a quantidade de i decresce lentamente, ao passo que I vai aumentando até serem atingidas as proporções normais de um adulto.

Algumas pessoas parecem não mudar sua situação com relação a i depois do nascimento. Esses indivíduos constituem o raro fenótipo i adulto ou fenótipo I negativo (Harmening, 2006).

3.8.2 Anticorpos anti-I

O anti-I é um autoanticorpo que pode ser benigno ou patológico (Beck, 1991; Issitt, 1998). Ele apresenta reações fortes com células de adultos e reações fracas com células de cordão. A utilização de métodos enzimáticos e albumina na identificação dos anticorpos podem acentuar a reatividade de anti-I.

De forma habitual, é uma aglutinina fraca da classe IgM, reativa em salina e de ocorrência natural, que não é detectada em testes de rotina, pois geralmente reage apenas a 4ºC e, em alguns casos, a temperatura ambiente.

Anticorpos patológicos são aglutininas da classe IgM mais potentes, com títulos mais altos e com uma faixa térmica mais ampla de reatividade (até 32ºC).

A produção de autoanti-I pode ser estimulada por microrganismos que contêm o antígeno similar a I em sua superfície. Pacientes com *Mycoplasma pneumoniae* formam, frequentemente, fortes crioaglutininas com especificidade para I.

3.8.3 Anticorpos anti-i

Na maioria, o anticorpo anti-i é um autoanticorpo IgM que reage melhor com células suspensas em salina a 4ºC. Exemplares potentes

estão associados a mononucleose infecciosa, leucemias mielóides, reticuloses e cirrose alcoólica.

Títulos altos e ampla faixa térmica podem contribuir para a hemólise, mas, tendo em vista que a expressão de i é fraca, raramente causam hemólise significativa. Também foi descrito anti-i de classe IgG, que foi associado à DHRN.

4. Teste da antiglobulina humana

A técnica de antiglobulina para a detecção de anticorpos do sistema Rh não aglutinantes que se apresentavam de forma fraca foi descrita primeiramente por Coombs, Mourant e Race (1945). No ano seguinte, os mesmos pesquisadores descreveram o uso de antiglobulina humana na detecção da sensibilização *in vivo* das hemácias de bebês com DHRN (Coombs, Mourant e Race, 1946).

A técnica de antiglobulina pode ser utilizada na detecção de hemácias sensibilizadas por aloanticorpos, autoanticorpos e/ou componentes do complemento. A sensibilização pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro*. A detecção da sensibilização das hemácias *in vitro* é determinada pela técnica de antiglobulina indireta ou Coombs indireto, e pode ser aplicada para os testes de compatibilidade, triagem de anticorpos, identificação de anticorpos, fenotipagem de hemácias e estudos de titulação de anticorpos, ao passo que a sensibilização *in vivo* é realizada pela técnica de antiglobulina direta (TAD) ou Coombs direto.

4.1 Características importantes da técnica de antiglobulina direta (TAD)

- Método de pesquisa de hemácias sensibilizadas *in vivo* por IgG e/ou frações de complemento;
- Importante no auxílio ao diagnóstico de anemia hemolítica autoimune, DHRN, hemólise induzida por drogas e reações hemolíticas pós-transfusionais;

- Lavar as hemácias é importante, pois globulinas e substâncias como lipídeos, proteínas presentes no plasma, podem neutralizar o soro antiglobulina humana, provocando resultados falso-negativos; além disso, as cargas elétricas das substâncias bioquímicas do plasma formam o potencial zeta, um potencial que interfere no processo de sensibilização e aglutinação. Outro composto responsável por interferências nesse teste é a geleia de Wharton, um tecido conjuntivo mucoso presente no sangue coletado de cordão umbilical que gera resultados falso-positivos;

- A demora na realização do teste pode ocasionar falsos resultados, pois as amostras estocadas há muito tempo e em condições diferentes das ideais tendem à eluição natural dos anticorpos que inicialmente estavam ligados à hemácia;

- A centrifugação inadequada pode promover falsos resultados.

A interpretação de TAD positivo exige conhecimento do diagnóstico do paciente e da história gestacional e transfusional, e avaliação das medicações em uso, assim como a informação de presença de anemia hemolítica autoimune. O resultado sorológico do teste apenas não é diagnóstico. Ele deve ser avaliado em conjunto com os dados clínicos e demais dados laboratoriais: hematócrito, bilirrubina, haptoglobina e contagem de reticulócitos.

Testes pré-transfusionais em pacientes com autoanticorpos podem apresentar os seguintes problemas:

1) autoanticorpos reativos a frio podem apresentar autoaglutinação, causando tipagens ABO e Rh errôneas;

2) eritrócitos fortemente cobertos por globulinas podem sofrer aglutinação espontânea, com reagentes usados para tipagens;

3) a presença de autoanticorpos livres no soro pode dificultar a identificação de anticorpos irregulares e a realização de provas cruzadas.

Embora a resposta a esses problemas sorológicos seja importante, o adiamento da transfusão na esperança de encontrar sangue sorolo-

gicamente compatível pode, em alguns casos, causar maior dano ao paciente. Avaliar bem cada caso na clínica transfusional é importante para o bom aproveitamento da transfusão sem o agravamento do estado clínico do paciente.

5. Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares

A detecção e a identificação dos anticorpos são as duas áreas mais interessantes em toda a imuno-hematologia, em especial para os iniciantes. Elas representam grande desafio para o estudante que está aprendendo os princípios e procedimentos do banco de sangue. Na maioria das amostras de sangue testadas em um laboratório de imuno-hematologia é feita uma triagem de anticorpos no soro desses pacientes. Em geral, essa detecção de anticorpo compreende a triagem do soro do paciente testado contra duas ou três hemácias fenotipadas do grupo O de um reagente de avaliação. As hemácias reagentes também são referidas como painel de triagem ou seleção. Elas são sempre do grupo O (para que possíveis anticorpos anti-A e anti-B dos indivíduos a serem testados não interfiram na detecção dos anticorpos) e contêm os antígenos mais comumente encontrados e clinicamente importantes. Essas células são encontradas por meio de teste de fabricação comercial. Um diagrama relacionando a constituição antigênica de cada célula de avaliação é fornecido com cada exemplar pelo fabricante (quadro 5).

Quadro 5. Perfil antigênico das hemácias de triagem: diagrama para triagem de anticorpos.

Sistemas	Rh					Kell		MNS				Kidd		Duffy		Lewis		P	Lutheran	
Células	D	C	E	c	e	K	k	M	N	S	s	Jk^a	Jk^b	Fy^a	Fy^b	Le^a	Le^b	P_1	Lu^a	Lu^b
I	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+
II	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+

Antígenos destruídos pelo tratamento com enzimas proteolíticas.

Anticorpos irregulares podem ocorrer em 0,3% a 2% da população em geral (Giblett; 1977; Boral e Henry, 1977), embora essa prevalência possa estar aumentada em determinados grupos de pacientes, principal-

mente os politransfundidos e os portadores de anemia falciforme (Orlina, Sosler e Koshy, 1991).

Os testes de detecção de anticorpos usando métodos em tubo de ensaio podem ser realizados por diferentes técnicas. Entretanto, qualquer que seja a metodologia empregada, ela deve ser capaz de detectar anticorpos clinicamente significantes através da fase de temperatura ambiente, incubação a 37ºC e utilização da antiglobulina humana. Dependendo do tipo de potencializador utilizado na reação, determinadas fases podem ser suprimidas, como a supressão da leitura a 37ºC quando utilizamos o PEG.

Toda pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) positiva deve ter a especificidade do anticorpo investigada. Esse procedimento é realizado pela identificação de anticorpos irregulares (IAI) por meio de um painel de hemácias industrializadas, contendo de 10 a 30 frascos de hemácias do grupo O de diferentes indivíduos, previamente fenotipados para os principais sistemas sanguíneos. Esse painel geralmente é denominado painel de identificação de anticorpos (quadro 6).

Quadro 6. Perfil antigênico das hemácias de identificação de anticorpos: diagrama para identificação de anticorpos irregulares.

Sistemas	Rh					Kell		MNS				Kidd		Duffy		Lewis		P	Lutheran	
Células	D	C	E	c	e	K	k	M	N	S	s	Jk^a	Jk^b	Fy^a	Fy^b	Le^a	Le^b	P_1	Lu^a	Lu^b
1	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+
2	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+
3	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+
4	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+
5	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+
6	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	0	+
7	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+
8	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+
9	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+
10	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+
11	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+

Antígenos destruídos pelo tratamento com enzimas proteolíticas.

A avaliação e a interpretação dos resultados do painel devem ser realizadas utilizando-se diagrama elaborado da forma acima, procurando-se

assegurar a identificação apropriada sem que as especificidades passem despercebidas ou possam estar encobertas por outros anticorpos. É importante avaliar a presença de autoanticorpos quando o resultado negativo do autocontrole e o painel apresentando reações positivas indiquem a presença de aloanticorpos.

Outra abordagem deve dizer respeito às fases e à intensidade das reações encontradas, pois reações de mesma intensidade sugerem a presença de apenas um anticorpo – embora possam ocorrer exceções –, e as reatividades em determinadas fases revelam o comportamento sorológico dos anticorpos. Dessa forma, anticorpos direcionados contra antígenos destruídos por tratamento enzimático podem apresentar reatividade nas fases de temperatura ambiente, térmica e de antiglobulina, mas não reagirão quando se faça um painel enzimático.

Os anticorpos são excluídos quando há ausência de reatividade do soro do paciente com uma célula portadora do antígeno correspondente. Atenção especial deve ser dada às células heterozigotas, pois determinados anticorpos podem apresentar efeito de dose e não reagir com as hemácias teste.

Sempre que possível, deve ser feita a fenotipagem do paciente; a ausência no paciente do antígeno correspondente ao anticorpo identificado demonstra que os resultados de identificação estão corretos (quando se considera um autocontrole negativo).

É possível que seja necessário testar o soro do paciente contendo determinado anticorpo com um número suficiente de amostras (três, no mínimo) com o antígeno correspondente e com outras em que o antígeno esteja ausente a fim de se comprovar a especificidade suspeita.

Deve-se considerar que a presença de múltiplos aloanticorpos pode ocorrer quando o padrão de reatividade não se encaixe na reatividade de um único anticorpo suspeito, ou quando ocorrem variações nas intensidades das reações que não podem ser explicadas com base na dose (homozigose ou heterozigose) do antígeno. Assim, outras técnicas adicionais ou o encaminhamento da amostra para um centro de referência podem ser necessários.

Referências bibliográficas

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

Allen, F. H.; Diamond, L. K.; Niedziela, B. A New Blood Group Antigen. *Nature*, Londres, n. 167, p. 482, 1951.

Alvarez, A. et al. Relative Sensitivity of Direct Antiglobulin Test, Antibody's Elution and Flow Cytometry in the Serologic Diagnosis of Immune Hemolytic Transfusion Reaction. *Haematologica*, Pavia (Itália), v. 85, n. 2, p. 186, 2000.

American Association Of Blood Banks. *Technical Manual*. 12. ed. Bethesda: AABB, 1996.

Beck, M. L. The I blood group collection. In: Moulds, J. M.; Woods, L. L. (org.). *Blood Groups*: P, I, Sda and Pr. Arlington: American Association of Blood Banking, 1991.

Boral, L.; Henry, I. B. The Type and Screen: A Safe Alternative and Supplement in Selected Surgical Procedures. *Transfusion*, Malden (Massachusetts), v. 17, p. 163, 1977.

Cartron, J. P.; Rouger, P. *Blood Cell Biochemistry*. Nova York: Plenum, 1995. V. 6: Molecular Basis of Human Blood Group Antigens.

Churchill, W. H.; Kutz, S. R. *Transfusion Medicine*. Oxford: Blackwell, 1988.

Coombs, R. A. A.; Mourant, A. E.; Race, R. R. *In Vivo* Isosensitisation of Red Cells in Babies with Haemolytic Disease. *Lancet*, Londres, v. 264, p. 264-266, Feb. 1946.

_____; _____; _____. A New Test for the Detection of Weak and "Incomplete" Rh Agglutinins. *British Journal of Experimental Pathology*, Londres, v. 26, n. 4, p. 255-266, 1945.

Cowles, J. W.; Spitalnik, S. L.; Blumberg, N. The Fine Specificity of Lewis Blood Group Antibodies. Evidence for Maturation of the Immune Response. *Vox Sanguinis*, Basel (Suíça), v. 56, n. 2, p. 107-111, 1989.

Crawford, M. N. et al. The Phenotype Lu(a-b-) together with Unconventional Kidd Groups in One Family. *Transfusion*, Malden (Massachusetts), v. 1, p. 228, 1961.

Cutbush, M.; Mollinson, M.; Parkin, D. M. A New Human Blood Group. *Nature*, Londres, n. 165, p. 188, 1950.

Duran, J. A.; Rodrigues, M. J. Teste de antiglobulina directo: ausência de significado clínico como teste pré-transfusional. *Revista ABO Nacional*, n. 1, p. 9-15, mar. 2000.

Elmgren, A. et al. DNA Sequencing and Screening for Point Mutations in the Human Lewis (FUT3) Gene Enables Molecular Genotyping of the Human Lewis Blood Group System. *Vox Sanguinis*, Basel (Suíça), v. 70, p. 97, 1996.

Escola Politécnica De Saúde Joaquim Venâncio (org.). *Textos de apoio em hemoterapia*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. V. 1.

Flegel, W. A. The Genetics of the Rhesus Blood Group System. *Blood Transfusion*, Milão, v. 5, n. 2, p. 50-57, Apr. 2007.

Giblett, E. R. Blood Group Alloantibodies: An Assessment of Some Laboratory Practices. *Transfusion*, Malden (Massachusetts), v. 17, n. 4, p. 299, 1977.

Girello, A. L.; Kuhn, T. I. B de. *Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária*. São Paulo: Editora Senac, 2002.

Harmening, D. *Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão*. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

Hawkins, P. et al. Localization of MN Blood Group Antigens in Kidney. *Transplantation Proceedings*, Houston, v. 17, n. 2, p. 1.697-1.700, 1985.

Henry, S.; Oriol, R.; Samuelson, B. Lewis Histo-blood Group System and Associated Secretory Phenotypes. *Vox Sanguinis*, Basel (Suíça), v. 69, n. 3, p. 166-182, 1995.

_____ et al. A Second Nonsecretor Allele of the Blood Group α(1,2) Fucosyltransferase Gene (FUT2). *Vox Sanguinis*, Basel (Suíça), v. 70, p. 21, 1996.

Hughes-Jones, N. C.; Gardner, B. The Kell System: Studies with Radioactively Labelled Anti-K. *Vox Sanguinis*, Basel (Suíça), v. 21, p. 154, 1971.

Idikio, H. A.; Manickavel, V. Lewis Blood Group Antigens (a and b) in Human Breast Tissues: Loss of Lewis-n in Breast Cancer Cells and Correlation with Tumor Grade. *Cancer*, v. 68, n. 6, p. 1.303, 1991.

Ikin, E. W. et al. P1 Antigen in the Human Foetus. *Nature*, Londres, n. 192, p. 883, 1961.

_____ et al. Discovery of the Expected Haemagglutinin Anti-Fy^{b}. *Nature*, Londres, n. 168, p. 1.077-1.078, Dec. 1951.

Issitt, P. D.; Anstee, D. J. *Applied Blood Group Serology*. 4. ed. Durham: Montgomery Scientific, 1998.

Landsteiner, K.; Levine, P. Further Observations on Individual Differences of Human Blood. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Malden (Massachusetts), v. 24, p. 941, 1927.

Langkilde, N. C.; Wolf, H.; Orntoft, T. F. Lewis Negative Phenotype and Bladder Cancer. *Lancet*, Londres, v. 14, n. 335, p. 926, Apr. 1990.

Levine, P. et al. A New Human Hereditary Blood Property (Cellano) Present in 99.8% of All Bloods. *Science*, Washington, v. 109, p. 464-466, 1949.

_____ et al. Isoimmunization by a New Blood Factor in Tumor Cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Malden (Massachusetts), v. 77, n. 3, p. 403-405, 1951.

Marsh, W. L.; Dinapoli, J.; Oyen, R. Autoimmune Hemolytic Anemia Caused by Anti-K13. *Vox Sanguinis*, Basel (Suíça), v. 36, p. 174, 1979.

Masouredis, S. P. et al. Quantitative Immunoferritin Microassay of Fy^{a}, Fy^{b}, Jk^{a}, U and Di^{b} Antigen Site Numbers on Human Red Cells. *Blood*, Washington, v. 56, p. 969-977, 1980.

Mcgann, H.; Wenk, R. E. Alloimunization to the D Antigen By a Patient With Weak D Type 21. *Immunohematology*, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 27-29, 2010.

Mollison, P. L.; Engelfriet, C. P.; Contreras, M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. Londres: Blackwell Scientific, 1997.

Nathalang, O. et al. Comparison between the Conventional Tube Technique and the Gel Technique in Direct Antiglobulin Tests. *Vox Sanguinis*, Basel (Suíça), v. 72, n. 3, p. 169-171, 1997.

Novaretti, M. C. Z. *Curso de imuno-hematologia avançada*. São Paulo: Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, 1998.

Oriol, R.; Le Pendu, J.; Mollicone, R. Genetics of ABO, H, X and Related Antigens. *Vox Sanguinis*, Basel (Suíça), v. 51, p. 161, 1986.

Orlinda, A.; Sosler, S. D.; Koshy, M. Problems of Chronic Transfusion in Sickle Cell Disease. *Journal of Clinical Apheresis*, Malden (Massachusetts), v. 6, p. 243-263, 1991.

Petz, L. D. et al. *Clinical Practice of Transfusion Medicine*. 3. ed. Nova York: Churchill Livingstone, 1995.

Reid, M. D.; Lomas-Francis, C. The *Blood Group Antigens Facts Book*. Nova York: Academic Press, 1997.

Salmon, C.; Cartron, J. P.; Rouger, P. *The Human Blood Groups*. Nova York: Masson Publisher, 1984.

Schultz, M. H. Serology and Clinical Significance of Kell Blood Group System Antibodies. In: Laird-Fryer, B. et al (org.). *Blood Group System*: Kell. Arlington: American Association of Blood Banks, 1990.

The American National Red Cross. *Immunohematology methods and procedures*. Rockville: The American National Red Cross, 1993.

Wendell, R. F. *Clinical Immunohematology*: Basic Concept and Clinical Applications. Oxford: Blackwell Scientific, 1991.

Wiener, A. S.; Unger, L. J.; Feldman, J. Type-specific Cold Auto-antibodies as a Cause of Acquired Hemolytic Anemia and Hemolytic Transfusion Reactions: Biologic Test with Bovine Red Cells. *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v. 44, n. 2, p. 221-240, 1956.

Biossegurança em laboratórios de saúde

Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira
Joseli Maria da Rocha Nogueira

A biossegurança em laboratórios de saúde é um tema complexo e abrangente que inclui conceitos relacionados a biossegurança, bioética, contenção e infraestrutura laboratorial, boas práticas laboratoriais etc. (Borba et al., 2009).

No Brasil, a normatização de segurança em laboratórios de saúde segue parâmetros internacionais, entre outros, da Organização Mundial de Saúde (OMS), dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês Centers for Disease Control and Prevention) e dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH, do inglês National Institutes of Health), os dois últimos órgãos do governo americano, e normas brasileiras que podem ser gerais, como as definidas pelo Ministério da Saúde por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e as normas regulamentadoras (NR) do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE). Além desses parâmetros, existem normas específicas, geralmente fixadas pela própria instituição de saúde, com o objetivo de atender as recomendações nacionais e internacionais e as peculiaridades de cada setor.

Tanto a OMS quanto o Ministério da Saúde publicam, periodicamente, manuais sobre segurança em laboratórios de saúde. É importante que os laboratórios conheçam essas normas e as mantenham atualizadas. Segundo a Anvisa, as boas práticas de laboratório (BPL) são princípios aplicáveis a laboratórios de serviços, de controle de qualidade e de pesquisas, relacionados à saúde humana, vegetal e animal e ao meio ambiente (Borba et al., 2009).

A biossegurança e suas aplicações evoluíram muito com o passar dos anos. No Brasil, ela está atrelada legalmente aos organismos geneticamente modificados (OGMs) e às células-tronco embrionárias pela lei nº 11.105/2005, que estabelece

> [...] normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, tendo como diretrizes o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, e a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente. (Brasil, 2005)

Estabelece também normas de uso, apenas para fins de pesquisa e terapia, de "células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento" (Brasil, 2005).

Na área da saúde, a biossegurança está contextualizada na prevenção de acidentes e agravos gerados por agentes de riscos biológicos, químicos, físicos, ergonômicos e psicossociais, no âmbito ocupacional, comunitário e ambiental (Borba et al., 2009).

Nesse sentido, podemos definir a biossegurança como sendo "a condição de segurança alcançada por um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, minimizar ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal, vegetal e o ambiente, bem como afetar um trabalho a ser realizado" (Brasil, 2010b).

O decreto nº 3.029, de 6 de abril de 1999, aprovou o regulamento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, visando à necessidade de prevenir e reduzir os riscos à saúde e ao meio ambiente. A partir daí, a diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso de suas atribuições, aprovou várias resoluções da diretoria colegiada (RDCs) com o intuito de estabelecer normas e padrões sobre limites de contaminantes, resíduos tóxicos, desinfetantes, metais pesados e outros materiais que envolvam risco à saúde.

A RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010, estabelece o regulamento sanitário para serviços que desenvolvam atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e seus componentes, e para procedimentos transfusionais. Segundo essa resolução, o serviço deve disponibilizar os equipamentos de proteção individual e coletiva necessários para a segurança dos seus funcionários e deve haver treinamento periódico de toda a equipe acerca dos procedimentos de biossegurança.

As normas legais são instrumentos de ação sanitária que regulamentam as características de instalações físicas e infraestrutura para estabelecimentos de saúde. Essas normas, em conjunto com as normas regulamentadoras do Ministério do Trabalho e Emprego[1] e com as normas de biossegurança, "devem nortear o funcionamento de laboratórios especializados para que a qualidade e o desempenho humano materializem a efetivação dos objetivos na evolução da pesquisa e na melhoria da saúde das populações" (Bahia, 2001, p. 61).

Com base nessa complexidade temática, entendemos que a biossegurança deve considerar as várias dimensões que norteiam a questão, sejam elas referentes a procedimentos (boas práticas) ou à infraestrutura (instalações físicas e equipamentos de proteção), ou, ainda, associadas à informação/educação (qualificação das equipes), reconhecendo-se que o gerenciamento e a organização do trabalho também devem ser analisados como possíveis objetos geradores de acidentes, doenças e sofrimentos ou como integrantes fundamentais de um programa de biossegurança nas instituições.

Quando pensamos em escrever um capítulo sobre segurança laboratorial dentro do segmento da hemoterapia, e mais especificamente da imuno-hematologia, tivemos a certeza que não poderíamos falar apenas das patologias ocupacionais, mas principalmente dos acidentes de trabalho associados a esse segmento e suas consequências, que muitas

[1] Em relação às normas regulamentadores que podem estar relacionadas com o tema da biossegurança, destacamos: NR1: Informação sobre riscos e cumprimento de recomendações; NR5: comissão interna de prevenção de acidentes (Cipa); NR6: Equipamentos de proteção individual; NR7: Programa de Controle Médico e Saúde Ocupacional (PCMSO); NR8: Edificações; NR9: Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA); NR10: Instalações e serviços em eletricidade; NR15: Atividades e operações insalubres; NR16: Atividades e operações perigosas; NR17: Ergonomia; NR19: Explosivos; NR20: Líquidos combustíveis e inflamáveis; NR23: Proteção contra incêndios; NR24: Condições sanitárias e de conforto nos locais de trabalho; NR25: Resíduos industriais; NR26: Sinalização de segurança; e NR32: Segurança e saúde no trabalho em estabelecimentos de assistência à saúde.

vezes podem ser graves. A prevenção é um item de absoluta importância ao se trabalhar com essas metodologias e com qualquer material de origem humana, principalmente sangue e hemoderivados.

Podemos conceituar a segurança do trabalho, de modo geral, como um conjunto de medidas adotadas visando prevenir, minimizar e/ou controlar acidentes de trabalho e doenças ocupacionais, bem como proteger a integridade e a capacidade produtiva do trabalhador.

Inicialmente, é necessário definir adequadamente os conceitos de doença ocupacional e de acidente de trabalho, pois, apesar de distintos, podem ocasionar alguma confusão. As doenças ou patologias ocupacionais são aquelas que se originam do exercício de determinadas profissões por uma ação lenta e contínua, sendo comprovadas pela relação causa–efeito. Em outras palavras, são enfermidades especificamente ocasionadas por determinado trabalho ou pelas condições insalubres em que ele se realiza (Brasil, 1999b).

Na atualidade, para evitar enganos dentro dos conceitos, alguns autores optaram por considerar os problemas relacionados ao trabalho dentro da mesma categoria; todavia preferimos manter essa divisão, de forma a que o leitor perceba bem essa diferença e possa se prevenir de forma mais adequada.

1. Doenças ocupacionais

Quando falamos de doenças ocupacionais, estamos nos referindo tanto àquelas ocasionadas por agentes biológicos quanto às decorrentes de fatores físicos e químicos associados ao risco do trabalho (Brasil, 2001a). Como nem sempre é fácil definir uma patologia como ocupacional, o conhecimento dos fatores desencadeantes em cada uma das atividades de trabalho, seus meios de prevenção e o diagnóstico precoce são uma excelente associação para prevenir essas doenças.

Entre as patologias ocupacionais mais conhecidas, podemos citar as pneumoconioses, que são doenças do trato respiratório associadas à acumulação de determinadas partículas nos pulmões ou às reações dos tecidos na sua presença. Sua prevenção depende da natureza do agente nocivo. Assim, além da ventilação adequada para o trabalho em lugares insalubres, os trabalhadores devem ter à sua dis-

posição equipamentos de proteção individual (EPIs) e equipamentos de proteção coletiva (EPCs), educação e medicina preventiva.

1.1 Doenças ocupacionais causadas por agentes físicos

Além das pneumoconioses, outras patologias ocupacionais estão associadas a agentes físicos, como calor, frio, radiações, ruídos e trepidações.

1.1.1 Temperatura

Nos laboratórios, os trabalhadores podem estar submetidos a altas temperaturas – os profissionais que trabalham com esterilização, por exemplo. Esse tipo de atividade exige um local específico para a instalação de fornos e autoclaves, que não devem ficar na mesma área física dos laboratórios que realizam técnicas de imuno-hematologia e dos bancos de sangue. Nesses ambientes, o mais comum é a necessidade de se trabalhar em baixas temperaturas, tanto pela própria refrigeração do local quanto pelas atividades desenvolvidas em câmaras frias ou manipulando produtos criopreservados. Dois exemplos de doenças que podem estar relacionadas a esse tipo de atividade são a urticária física, ocasionada pelo calor ou pelo frio (CID-L50.2), e a geladura (*frostbite*) superficial (CID-T33) ou com necrose de tecidos (CID-T34), que são lesões localizadas resultantes da ação direta da exposição ao frio, por período curto ou longo, a temperaturas abaixo dos 0ºC (Brasil, 1999c).

1.1.2 Radiações

Chamamos atenção, também, para o risco das radiações, muitas vezes usadas com fim de esterilização ou diagnóstico. Tanto as radiações ionizantes – como os raios-X – quanto as não ionizantes – como os raios ultravioleta (UV) – podem ser perigosas para os trabalhadores. No segmento laboratorial, a exposição à radiação UV, bastante utilizada como germicida em laboratórios, é um risco para os profissionais e pode gerar não só problemas dermatológicos, mas até mesmo o câncer.

1.1.3 Ruídos e trepidações

No que diz respeito ao ruído, as normas do Ministério do Trabalho NR15 (Brasil, 2008a) e NR9 (Brasil, 1994) estabelecem que o limite acei-

tável no banco de sangue é de 50 decibéis, com o limite de conforto situado na faixa dos 40 decibéis. Logo, esse fator, apesar de não ser dos mais graves, pode ter consequências na saúde do trabalhador a longo prazo. As atividades desenvolvidas nos bancos de sangue não oferecem, no entanto, risco de perda auditiva, uma vez que em geral os ruídos ficam abaixo do permitido por lei. E, em comparação com outros tipos de laboratório principalmente da área de produção, ruídos e trepidações – como os causadas por centrífugas, exaustores e cabines de segurança – não representam um risco tão grande de aquisição de doenças ocupacionais. Todavia o profissional deve ficar atento e informar qualquer possível desconforto à sua gerência.

1.1.4 Ergonometria

A ergonomia objetiva modificar os sistemas de trabalho para adequar a atividade neles existentes às características, habilidades e limitações das pessoas, com vistas aos seus desempenhos eficientes, confortáveis e seguros (Hermosilla, 2006). O sentido do termo ergonometria vai além da definição de ergonomia, pois inclui também a ideia de prevenção e cuidado. Podemos dizer que a ergonometria é um ramo da ergonomia que visa principalmente ajustar o ambiente ao indivíduo. Em locais de trabalho, as máquinas e mobiliários devem estar de acordo com o biotipo de cada trabalhador para que ele não venha a ter problemas ósseos, musculares ou até mesmo de constituição.

Como todo trabalhador, o técnico de laboratório também está exposto a problemas ergonômicos que podem, ao longo do tempo, causar danos graves. Para que isso não aconteça, os bancos utilizados ao se trabalhar em bancadas devem ser altos e com possibilidade de ajuste de acordo com as necessidades de cada trabalhador (estatura, peso etc.). O mobiliário deve seguir as normas básicas de ergonometria.

A lesão por esforço repetitivo (LER) que acomete profissionais da área, ou, na terminologia mais atual, o distúrbio osteomuscular relacionado ao trabalho (Dort), doença ocupacional com maiores índices de notificação na previdência social, podem ser evitados com medidas preventivas, como imposição de limites de horas diárias na mesma posição e instrução quanto à correta postura. Sugere-se como medida preventiva

para profissionais que trabalham em bancadas a preocupação de manter eventualmente intervalos alternados, com alongamento e relaxamento dos braços, punhos, mãos e, principalmente, da coluna.

2. Acidentes de trabalho

Os acidentes de trabalho, diferentemente das doenças ocupacionais, ocorrem não por uma exposição prolongada, mas por um agravo imprevisto no exercício da atividade e que pode ser extremamente desastroso, principalmente para profissionais que lidam com fluidos biológicos como o sangue. Sabemos que, em laboratórios de imunohematologia, o sangue é testado amplamente, não só quanto aos sistemas antigênicos (ABO, Rh etc.) e anticorpos, mas também quanto a possíveis doenças transmissíveis por meio dele, como hepatite e Aids, entre outras. A exposição acidental do profissional a sangue contaminado pode acarretar sérios prejuízos à sua saúde, de acordo com os agentes que venham a ser transmitidos.

Em todos os casos, o uso adequado de equipamentos de proteção, a imunização e o conhecimento dos riscos são fundamentais, em qualquer área, para o desempenho seguro das atividades específicas; entretanto, lembramos que, na área de laboratório, um pequeno descuido pode trazer consequências muito graves para a saúde do trabalhador. Nesse contexto, destacamos os técnicos de laboratório de análises clínicas, principalmente os que coletam, analisam e processam sangue e seus derivados, inclusive os profissionais de bancos de sangue, porque estão especialmente expostos a doenças de cunho ocupacional e a acidentes de trabalho.

Esses profissionais devem possuir uma carteira de vacinação que contemple os principais agentes imunopreveníveis. No Brasil, o programa de vacinação do Ministério da Saúde (Toscano e Kosim, 2003) começa no primeiro mês de vida do bebê e segue ao longo de toda a vida do indivíduo. Os profissionais de saúde, além do esquema normal de vacinação, devem estar imunizados contra aqueles agentes que representem risco em sua atividade. Destacamos, assim, a necessidade da vacina antitetânica, que deve ser administrada a cada dez anos, e da vacina contra o vírus da hepatite B (HBV), que deve

ser administrada em três doses (0, 1 e 6 meses), com a realização do esquema vacinal completo necessária para a imunização (Garcia e Facchini, 2008).

O laboratório, por si só, já possui características críticas, tais como o manejo de materiais perfurocortantes, de vidrarias diversas e de produtos químicos prejudiciais à saúde. Somando-se a isso, ainda temos a rotina e, muitas vezes, uma carga excessiva de trabalho, que acabam gerando um ambiente propício a acidentes. Esses riscos são ampliados quando as dependências do laboratório estão no interior de um hospital, pois pacientes com doenças infectoparasitárias funcionam como constantes fontes de contaminação de pessoas, materiais e ambientes. Além disso, como já foi dito, os trabalhadores dessa área, independentemente do *layout* do laboratório, lidam com materiais potencialmente infectados, e a exposição a possíveis agentes etiológicos pode ocasionar sérios agravos.

Os profissionais da área de saúde que trabalham em bancos de sangue e laboratórios de hematologia, como já comentamos, estão também expostos, direta e/ou indiretamente, a riscos químicos diversos. Em muitos casos, cilindros de gás comprimido, assim como botijões de nitrogênio líquido e de reagentes químicos utilizados na rotina de diferentes análises, estão localizados, de forma inadequada, na área comum dos laboratórios de biodiagnóstico. Dessa forma, o conhecimento dos riscos inerentes aos produtos químicos é fundamental para o profissional de saúde de maneira geral.

2.1 Riscos químicos

Os produtos químicos podem ser classificados de diferentes formas, e isso causa muitas divergências e problemas normativos. A variação nas informações sobre o risco dos diversos produtos químicos existentes traduz-se não apenas em problemas de segurança (países que não têm exigências específicas podem possuir rótulos ou fichas que trazem diferentes informações para o mesmo produto químico), mas também em questões de natureza comercial (substâncias restritas apenas em alguns países). Além disso, o número de produtos químicos existentes e a velocidade com que novos produtos são criados dificultam a regulamentação de todos os produtos quí-

micos perigosos. Acredita-se que a maioria das substâncias químicas atualmente em utilização não tenha sido submetida a ensaios de toxicidade (Di Vitta, 2005).

Segundo o *Manual de biossegurança* do Núcleo de Biossegurança da Fundação Oswaldo Cruz (s.d.), risco químico é o perigo a que determinado indivíduo está exposto ao manusear produtos químicos que podem prejudicar sua saúde ou causar danos físicos. Os danos físicos relacionados à exposição química incluem desde irritação dos olhos e da pele e queimaduras, até outros de maior severidade, causados por incêndio ou explosão. Os danos à saúde podem ocorrer por exposição de curta ou longa duração a produtos tóxicos; as vias de penetração no organismo podem ser a inalação, a absorção e a ingestão, resultando em doenças respiratórias crônicas, doenças do sistema nervoso, doenças nos rins e fígado, e até mesmo alguns tipos de câncer. Em outras palavras, o risco é igual ao perigo associado à exposição (risco = perigo x exposição). Portanto, a boa comunicação quanto aos perigos alerta o profissional para que ele possa reduzir ao mínimo a sua exposição, diminuindo, assim, o risco inerente à atividade.

2.1.1 Símbolos de risco

Representados geralmente no interior de figuras geométricas, os símbolos de risco são pictogramas (símbolos que representam um objeto ou um conceito) que devem ser utilizados para informar sobre uma propriedade importante de um produto, ou mesmo para simbolizar o risco inerente a determinado local. No caso de produtos químicos, muitas vezes os símbolos comunicam o principal risco que a substância representa quando entramos em contato com ela (por exemplo, explosão, queimadura e intoxicação).

No Brasil, os símbolos de risco correspondem à norma NBR-7500, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), mas existem normativas internacionais, como as sugeridas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), pela Organização Internacional do Trabalho (OIT) e pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ) (World Health Organization, International Programme on Chemical Safety e International Labour Organization, 2003). Segun-

do esses organismos, os símbolos e indicações de perigo que devem ser utilizados são:

- corrosivo (código C): um símbolo de um ácido ativo;
- explosivo (código E): uma bomba detonante;
- comburente ou oxidante (código O): uma chama acima de um círculo;
- inflamável (não possui código), facilmente ou altamente inflamável (código F) e extremamente inflamável (código F+): uma chama;
- tóxico (código T) e muito tóxico (código T+): representação de uma caveira sobre tíbias cruzadas;
- irritante (código Xi) ou nocivo (código Xn): uma cruz de Santo André;
- perigoso para o ambiente (código N): representação de agravos a um peixe e a uma árvore.

Quadro 1. Símbolos internacionais de risco químico: definição, precaução e exemplos.

Símbolo e nome	Definição / precaução	Exemplos
Corrosivo	**Classificação**: nesse grupo estão incluídos, principalmente, ácidos, anidridos e álcalis. Podem causar destruição de tecidos vivos e/ou materiais inertes, ocasionar danos aos recipientes e contaminar as áreas de armazenagem. **Precaução**: deve-se evitar o contato com olhos, pele e roupa, e também impedir a inalação, mediante medidas de proteção especiais, como máscara com filtros específicos.	Ácido clorídrico Ácido fluorídrico

 Explosivo	**Classificação**: são compostos químicos extremamente instáveis e sensíveis a choques ou fricções, e que podem explodir sob o efeito de calor excessivo. **Precaução**: frascos com esse tipo de material devem ser mantidos longe de fontes de calor e armazenados em local ventilado e isolado da ação do fogo, do calor e de faíscas. Em caso de cilindros de gases comprimidos, deve-se também evitar pancadas. Esse composto pode facilitar a combustão, dificultando a extinção de algum provável incêndio. Em geral os peróxidos também são irritantes do aparelho respiratório, pele e olhos.	Nitroglicerina Trinitrotolueno (TNT)
 Comburente ou oxidante	**Classificação**: produto químico que alimenta a combustão (ato de queimar – processo de combinação de uma substância com o oxigênio). O material pode iniciar ou facilitar a combustão quando em contato com substâncias inflamáveis, dificultando o combate ao fogo. **Precaução**: evitar contato com substâncias combustíveis que possam desencadear um incêndio. A longo prazo, o uso de produtos oxidantes pode danificar metais e outras superfícies (Oliveira e Nogueira, 2009). A utilização de EPIs é fundamental para a segurança do trabalhador.	Oxigênio Nitrato de potássio Peróxido de hidrogênio
 Inflamável	**Classificação**: materiais inflamáveis; para rotular as substâncias e formulações com a notação de "inflamável", seu ponto de fulgor deve estar entre + 21°C e + 55°C. **Precaução**: evitar contato dos produtos com materiais ignitivos. Manipular longe de chamas ou calor. Manipular com proteção adequada e em capela de ar forçado ou exaustão.	Óleo de terebentina

 Altamente inflamável	**Classificação**: materiais altamente inflamáveis, gases inflamáveis, combustíveis líquidos; substâncias e preparações que podem se aquecer e, finalmente, inflamar-se em contato com o ar a uma temperatura normal, sem fornecimento de energia; substâncias sólidas que podem inflamar-se facilmente por breve ação de uma fonte incandescente e que continuam a arder ou a se consumir após o afastamento da fonte; substâncias em estado líquido cujo ponto de fulgor seja inferior a 21ºC; ou substâncias gasosas inflamáveis em contato com o ar a pressão normal, ou que, em contato com a água ou o ar úmido, desenvolvam gases facilmente inflamáveis em quantidades perigosas. **Precaução**: evitar contato dos produtos com materiais ignitivos. Essas substâncias devem ser manipuladas longe de chamas ou de emissores de calor. Quando voláteis, manipular com proteção adequada e em capela de ar forçado ou exaustão. Todas essas substâncias devem ser adequadamente identificadas.	Benzeno Etanol Acetona
 Extremamente inflamável	**Classificação**: substâncias e formulações líquidas cujo ponto de fulgor se situa abaixo de 0ºC, possuindo também baixa temperatura de ebulição (abaixo de 35ºC). Gases extremamente inflamáveis formam facilmente com o ar uma mistura explosiva em condições normais. **Precaução**: igual ao anterior.	Hidrogênio Propano Éter dietílico
 Tóxico	**Classificação**: substâncias e preparações que, por inalação, ingestão ou penetração cutânea, podem implicar riscos graves (agudos ou crônicos) ou mesmo morte. **Precaução**: todo o contato com o corpo humano deve ser evitado, observando-se também cuidados especiais com produtos cancerígenos, teratogênicos ou mutagênicos.	Cloreto de bário Monóxido de carbono Metanol

Muito tóxico	**Classificação**: substâncias e preparações que, por inalação, ingestão ou penetração cutânea, podem implicar riscos graves (agudos ou crônicos) ou mesmo morte. **Precaução**: todo o contato com o corpo humano deve ser evitado, observando-se também cuidados especiais com produtos cancerígenos, teratogênicos ou mutagênicos.	Cianureto Trióxido de arsênio Nicotina
Irritante	**Classificação**: substâncias e preparações não corrosivas que, por contato imediato, prolongado ou repetido com a pele ou as mucosas, podem provocar reação inflamatória. **Precaução**: os gases não devem ser inalados, e o contato com a pele e os olhos deve ser evitado.	Cloreto de cálcio Carbonato de sódio
Nocivo	**Classificação**: substâncias e preparações que, por inalação, ingestão ou penetração cutânea, podem implicar riscos de gravidade limitada; **Precaução**: deve ser evitado o contato com o corpo humano, assim como a inalação dessa substância.	Etanol Diclorometano Cloreto de potássio
Perigoso para o ambiente	**Definição**: a liberação da substância no ambiente pode provocar dano ao ecossistema a curto ou longo prazo, contaminando corpos d'água, solo e animais. **Precaução**: por causo do seu risco potencial, não deve ser liberada em encanamentos, solo ou ambiente. Esse tipo de composto deve ser tratado antes de ser descartado, ou então guardado e entregue a local onde receberá tratamento adequado.	Hicrocarbonetos de petróleo Cianureto de potássio Tetracloreto de carbono

Fonte: König, 2009.

Quadro 2. Esquema simplificado de incompatibilidades dos produtos químicos e que deve ser adotado em áreas de estocagem de substâncias químicas.

Fonte: Carvalho, 1999.

Além dos símbolos químicos de periculosidade descritos acima, outros pictogramas de perigo, como presença de material radioativo ionizante ou material infectante/risco biológico, são de uso obrigatório já a partir da porta do laboratório em que o risco exista.

Símbolo internacional da presença de radiação ionizante

Símbolo internacional de perigo biológico (*biohazard*)

2.2 Riscos biológicos

Os técnicos de saúde que coletam e manipulam sangue e seus derivados estão expostos a vários tipos de acidentes. Um deles é o contato

acidental com materiais biológicos. Para isso, é importante a vacinação contra os agentes imunopreveníveis, o conhecimento do ciclo biológico dos microrganismos possivelmente infectantes e de suas vias de contaminação e o uso correto dos EPIs.

Podemos definir materiais biológicos como qualquer material que contenha informação genética e seja capaz de autorreprodução ou de ser reproduzido em um sistema biológico (Brasil, 2010a). Essa informação genética pode ser proveniente de microrganismos (agentes biológicos), entre eles bactérias, fungos, vírus, príons e protozoários.

A melhor prevenção contra os riscos biológicos é não se acidentar. Para isso, além dos cuidados mencionados, o profissional de saúde deve estar concentrado no seu trabalho e ter conhecimento das normas de biossegurança. Nessa área, o uso de luvas é indispensável, além de óculos de segurança ou protetor facial, para proteção dos olhos e rosto. A caixa de descarte de material perfurocortante, com dispositivo para encaixe de agulha, deve conter no seu interior solução de hipoclorito de sódio a 2% para descontaminação do material. Lembramos que o recapeamento de agulhas é terminantemente proibido pelas normas de biossegurança. Além do sangue, ainda podemos ter amostras biológicas provenientes de fluidos corporais, peças cirúrgicas e biópsias.

2.2.1 Avaliação de risco

Para uma avaliação de risco mais precisa, principalmente no que se refere aos agentes biológicos, alguns critérios devem ser considerados. O primeiro ponto que destacamos é a virulência do agente biológico, por ser um parâmetro importante na classificação do risco biológico, como descreveremos mais abaixo. Outros critérios que também devem ser considerados na avaliação de risco são o modo de transmissão do microrganismo, sua capacidade de sobrevivência no ambiente, o volume do material manipulado, a dose infectante, a origem do agente biológico, a disponibilidade de medidas profiláticas e a existência ou não de tratamento eficaz.

Os profissionais que trabalham diretamente com sangue devem não apenas conhecer em profundidade o ciclo biológico dos possíveis microrganismos infectantes, mas também participar constantemente de

cursos de desenvolvimento profissional e de congressos na área, para estarem sempre atualizados, uma vez que novas descobertas são feitas a cada dia, modificando paradigmas historicamente conhecidos.

Um exemplo desse fato é a transmissão do *Trypanosoma cruzi* por via oral. Segundo Dias (2006), em alimentos como o leite ou caldo de cana, à temperatura ambiente, o parasita pode manter-se viável por 24 horas ou mais. Em acidentes de laboratório, a contaminação oral foi comprovada em técnicos que se infectaram pela ingestão de formas de cultura ou de sangue contaminado (Dias, 2000). Assim, confirma-se que os fluidos biológicos podem funcionar como veículo de contaminação por diversas vias de penetração – aérea, cutânea, ocular, oral –, apresentando a capacidade de conter organismos de diferentes classes de risco, como protozoários, vírus e bactérias.

Alguns vírus são responsáveis por graves doenças, tanto pelo elevado índice de mortalidade quanto por não existirem tratamentos eficazes até o momento. Isso representa um alto risco para os trabalhadores da área da saúde.

Estudos comprovam que o vírus Ebola, que causa quadros gravíssimos nos seres humanos, parasita animais selvagens no continente africano, com os quais mantém relação pouco agressiva. Ao explorar as florestas, o ser humano destrói o ambiente natural do vírus, causando um desequilíbrio ecológico, ao mesmo tempo em que proporciona a ele a possibilidade de adaptação a novos reservatórios, podendo gerar novas patologias. Daí o termo "vírus emergente".

Outro vírus de classe 4 que causa quadro semelhante ao Ebola é o Marburg, bastante conhecido pelos profissionais de saúde. Ele se manifestou pela primeira vez na cidade alemã de Marburg, de onde se originou o seu nome, por causa do manejo inadequado realizado pelo técnico responsável pelos animais de laboratório; ao final desse surto, 31 pessoas haviam sido infectadas e 7 morreram – daí a importância de se conhecer os riscos inerentes às profissões ligadas à área da saúde e atender as normativas de biossegurança (Klenk e Feldmann, 2004).

Alguns organismos bacterianos também podem representar risco para quem trabalha em laboratórios de análises clínicas. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos pode propiciar a seleção de bac-

térias cada vez mais resistentes. Em vários hospitais brasileiros já se tem notícia da existência, atualmente, de diferentes tipos de bactérias multirresistentes, entre elas o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), a mesma espécie resistente à vancomicina (VRSA) e a *Klebsiella pneumoniae*, que possui a enzima carbapenemase (KPC). Essa última vem sendo chamada pela mídia de "superbactéria", pois a carbapenemase gera resistência da bactéria às penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e ao aztreonam, todos eles antimicrobianos (Hirsch e Tam, 2010).

Na atualidade, essas bactérias são consideradas muito perigosas para pacientes com sistema imunológico debilitado. Além disso, seu contágio ocorre de forma direta, podendo ser transmitidas por um simples aperto de mão. Com base nisso, a lavagem cuidadosa das mãos com detergente neutro e a higienização com desinfetante devem ser ações obrigatórias e rotineiras no ambiente laboratorial. Profissionais de saúde que executam coletas sanguíneas em quartos e enfermarias de hospitais também devem seguir rigorosamente as normas de biossegurança para evitar o agravamento desse quadro e sua disseminação.

Um trabalho publicado na revista *Nature* (Jones et al., 2008) analisou 335 doenças emergentes no período 1940-2004. O estudo reuniu pesquisadores da Sociedade Zoológica de Londres, da Escola de Ecologia da Universidade da Georgia, do Centro para o Recolhimento de Informação Internacional em Ciências da Terra (Ciesin) e do Consórcio para uma Medicina Ambiental, do Wildlife Trust, e serviu, principalmente, para elaborar mapas que identificaram os "pontos quentes" (*hotspots*) do planeta, aquelas localidades onde futuras doenças infecciosas emergentes podem surgir.

A cartografia das zonas de risco significa um avanço na prevenção de patologias importantes, uma vez que será possível prever, de forma científica, onde as doenças surgirão. De acordo com esse trabalho, a principal ameaça para a saúde pública vem de zonas onde a população cresce e avança para áreas de matas e florestas virgens, causando modificações na geografia local ou alterações na biodiversidade da vida selvagem. Dessa forma, a melhor maneira de prevenir a emergência de doenças infecciosas é proteger o desenvolvimento das zonas ricas em biodiversidade (Jones et al., 2008).

Além disso, os pesquisadores também concluíram nessa pesquisa que 60% das doenças emergentes são originárias de doenças de animais que podem ser transmissíveis ao homem (zoonoses), a maioria delas (71%) proveniente de patógenos com uma fonte de vida selvagem. Segundo Jones et al. (2008), as zonas em que há mais riscos de zoonoses são a totalidade do Sudeste Asiático, o subcontinente indiano, o delta da Nigéria e a região dos Grandes Lagos africanos.

Outro ponto importante destacado pelos pesquisadores é o aumento das doenças emergentes, cuja origem reside na resistência de alguns agentes aos tratamentos, principalmente em decorrência da utilização crescente de antibióticos nos países ricos. A pesquisa mostra ainda que a década de 1980 conheceu um aumento de novas patologias, provavelmente devido à pandemia de Aids, que tem como característica fundamental a diminuição da imunidade; já os anos 1990 foram marcados por um pico de doenças vetoriais causadas, por exemplo, por mosquitos – o que pode estar relacionado com as alterações climáticas.

Os Centros de Controle de Doenças e Prevenção dos Estados Unidos publicaram, em 1988, a lista dos fluidos corpóreos para os quais devem ser aplicadas precauções: sangue, líquido cérebro-espinhal, líquido pleural, líquido sinovial, fluido pericárdico, fluido peritoneal, fluido amniótico, sêmen e secreção vaginal. Segundo o CDC, as precauções só se aplicam a urina, fezes, leite humano, saliva, secreções nasais, pus, suor, lágrimas ou vômito se esses fluidos contiverem sangue. Além dessas amostras biológicas, podem ser fonte de contaminação aerossóis, poeira, alimentos, água e instrumentos de laboratório (Mamizuka et al., 2000).

Por último mas não menos importante, é preciso levar em conta os fatores inerentes a cada indivíduo, tais como susceptibilidade, genética, condição imunológica, idade, sexo, exposição prévia, gravidez, lactação, consumo de álcool e de medicamentos e higiene pessoal. Somado a isso, enfatiza-se a experiência, a concentração e a qualificação dos profissionais, principalmente no que concerne à percepção dos riscos e aos cuidados em seguir as normas de biossegurança, incluindo o uso de equipamento de proteção individual e coletiva de forma correta.

Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2007a), os agentes biológicos que afetam os seres vivos e o ambiente são classificados da seguinte forma:

- **Classe de risco 1:** risco baixo individual e risco baixo para a coletividade – compreende os agentes biológicos conhecidos por não originarem doenças de forma natural em pessoas ou animais adultos sadios. Exemplos: *Lactobacillus* sp., *Escherichia coli* K12.

- **Classe de risco 2:** risco moderado individual e risco limitado para a comunidade – compreende os agentes biológicos que causam infecções no homem ou nos animais e que possuem potencial de propagação limitada na comunidade e no meio ambiente. Além disso, para esses agentes existem medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. Exemplos: *Schistosoma mansoni*, *Entamoeba histolytica.*

- **Classe de risco 3:** risco individual alto e risco moderado para a comunidade – compreende os agentes biológicos potencialmente letais que podem ser transmitidos por via respiratória para o homem ou animais, causando patologias para as quais existem usualmente medidas de tratamento e/ou de prevenção. Se disseminados na comunidade e no meio ambiente, representam risco de grau moderado, visto que podem se propagar de pessoa a pessoa. Exemplos: *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis.*

- **Classe de risco 4:** alto risco individual e para a comunidade – compreende os agentes biológicos de transmissão desconhecida ou com grande poder de transmissibilidade por via respiratória. Não se conhece até o momento nenhuma medida profilática ou terapêutica eficaz contra sua infecção. Causam graves doenças em humanos e animais, com alta capacidade de disseminação na comunidade e no meio ambiente. Essa classe inclui principalmente os vírus. Exemplos: vírus Ebola, vírus Marburg.

- **Classe de risco especial:** alto risco de causar doença animal grave e de disseminação no meio ambiente – compreende agentes biológicos de doença animal não existentes no país, e que, embora não sejam obrigatoriamente patógenos de importância para o homem, podem gerar graves perdas econômicas e/ou na produção de alimentos. Exemplos: vírus da cólera suína, vírus da peste aviária.

2.2.2 Observações sobre a classificação dos agentes biológicos

Quando mais de uma espécie de um mesmo gênero tem potencial patogênico, serão apontadas aquelas mais importantes. As demais serão representadas pelo nome do gênero seguido da denominação "sp.", com a qual se indica que outras espécies do gênero podem ser patogênicas.

A classificação de parasitas e as medidas de contenção associadas a eles aplicam-se apenas para os estágios de seus ciclos em que eles sejam infecciosos para o homem ou os animais.

Os agentes pertencentes à classe especial precisam ser manuseados obrigatoriamente em laboratório com nível de biossegurança 4 (NB-4) antes de circularem no país, devendo ter sua importação limitada e sujeita à prévia licença das autoridades competentes. Caso sejam isolados dentro do território nacional, deverão ser tratados no laboratório com nível de biossegurança determinado pelos critérios que orientam seu nível de risco.

Nessas classificações, foram considerados somente os possíveis efeitos dos agentes em indivíduos sadios. Os possíveis efeitos em casos de portadores de transtornos imunológicos, com patologia prévia, em uso de medicação, durante a gravidez ou em fase de lactação não foram avaliados.

O estabelecimento de uma analogia direta entre a classe de risco do agente biológico e o nível de biossegurança é uma dificuldade frequente no momento de definir o nível de contenção. Por exemplo, estabelecer que, para os agentes biológicos da classe de risco 3, deve-se trabalhar em um laboratório NB-3, sem considerar o procedimento diagnóstico que será utilizado, pode culminar em gastos desnecessários, o que remonta ao que foi dito no início deste capítulo sobre gerência, conhecimento e organização. Assim, dependendo da técnica utilizada para a realização do diagnóstico, um laboratório NB-2 poderia ser suficiente nesse caso. Da mesma forma, um agente de classe de risco 2 que deva ser cultivado em grandes concentrações ou volumes provavelmente vai requerer um laboratório NB-3.

2.2.3 Níveis de biossegurança

Os laboratórios podem ser classificados de acordo com o nível de biossegurança, que está relacionado com as normas que eles devem seguir, os equipamentos de segurança – como EPIs e EPCs – de que devem dispor e o projeto arquitetônico do laboratório.

É preciso não confundir o nível de segurança de um laboratório com o risco biológico de qualquer microrganismo nele manipulado. Mesmo que, em geral, se trabalhe com organismos altamente perigosos em laboratórios de alto nível de biossegurança, não há qualquer problema de se trabalhar com microrganismos de risco 1 nesses ambientes. O contrário não é verdadeiro, dado que microrganismos de risco 3 ou 4 só devem ser manipulados com contenção.

Os laboratórios podem ser divididos em laboratórios básicos ou de contenção, e subdivididos de acordo com os níveis de biossegurança em quatro níveis: NB-1 a NB-4. Podemos observar as mesmas categorias definidas com outras siglas, como P (proteção) ou BSL (*biosafety level*), dependendo do país em que está localizado o centro de pesquisa e da norma seguida por ele.

Esses níveis crescentes em razão do nível de proteção e complexidade permitem avaliar em que ambiente é mais adequada a manipulação deste ou daquele material de acordo com o risco e/ou o microrganismo presente na amostra. Quando não se conhece o potencial patogênico do material a ser manipulado, deve-se proceder à análise criteriosa de todas as condições experimentais a fim de se determinar o ambiente adequado (Fundação Oswaldo Cruz, 1998).

Como já foi dito, entre as regras básicas para o trabalho em qualquer nível de biossegurança laboratorial, estão as de considerar todo material biológico como infeccioso, trabalhar sempre com muita atenção, sempre lavar as mãos após os procedimentos, nunca sair do laboratório com jaleco (ou avental), nunca pipetar com a boca, sempre observar os sinais de aviso de risco e relatar qualquer acidente imediatamente ao supervisor do laboratório. Além disso, o treinamento quanto às precauções e aos procedimentos de biossegurança é indispensável.

Laboratórios básicos: níveis de biossegurança 1 e 2

A denominação laboratório NB-1 se aplica geralmente aos laboratórios de ensino básico, para os quais não é exigido nenhum projeto arquitetônico especial, mas sim um bom planejamento espacial e funcional, com a adoção de boas práticas laboratoriais. Nesses ambientes, geralmente são manipulados somente microrganismos pertencentes à classe de risco 1.

A designação laboratório NB-2 se aplica comumente aos laboratórios clínicos ou hospitalares de níveis primários de diagnóstico. Além das boas práticas, é preciso que esse tipo de laboratório adote o uso de barreiras físicas, como cabine de segurança biológica e equipamentos de proteção individual; o desenho, as instalações e a organização do laboratório também possuem regras obrigatórias mais consistentes que as do laboratório NB-1, como sistema elétrico de emergência, acesso restrito a pessoas autorizadas, portas automáticas e estrutura física de fácil higienização.

Laboratórios de contenção: níveis de biossegurança 3 e 4

O laboratório NB-3 é considerado de contenção. Para esse tipo de laboratório, são requeridos, além dos itens referidos no nível de biossegurança 2, desenho e construção laboratoriais especiais, como ventilação própria com pressão negativa e instalação de filtros HEPA (do inglês *high-efficiency particulate air)* nas entradas e saídas de ar, com prevenção de refluxo. Deve ser mantido controle rigoroso quanto à operação, manutenção e inspeção das instalações e equipamentos. Além disso, o pessoal técnico não pode trabalhar sozinho e deve receber treinamento específico sobre procedimentos seguros na manipulação de grandes volumes e altas concentrações de microrganismos da classe de risco 2, bem como para microrganismos de risco 3, uma vez que laboratórios desse nível de biossegurança têm autorização para manipular agentes desse grupo de risco. O laboratório também deve contar com áreas separadas para a troca de roupa e deve-se utilizar protetor para os sapatos; em alguns casos, é recomendado o uso de dois pares de luvas na manipulação do material (Fundação Oswaldo Cruz, 1998).

O laboratório NB-4 é o de nível de contenção mais alto. Nesse ambiente, a fonte de todo o ar provido aos profissionais deve ser externa ao laboratório, e o controle de entrada e saída da ventilação deve ser feito com filtro absoluto tipo HEPA. A manipulação ocorre em câmaras de segurança biológica de nível 3. Além disso, o laboratório deve estar posicionado geograficamente em áreas que ofereçam menor probabilidade de dispersão de agentes de alto risco e ser funcionalmente independente de outras áreas necessárias às boas práticas, como centrais de preparação de material. Esses laboratórios requerem, além dos requisitos físicos e operacionais dos níveis de contenção 1, 2 e 3,

barreiras de contenção (instalações, desenho e equipamentos de proteção) e procedimentos especiais de segurança, como autoclaves de porta dupla e tratamento obrigatório do esgoto. Somente nesse tipo de laboratório podemos trabalhar com microrganismos da classe de risco 4.

2.2.4 Resíduos provenientes do laboratório e seu descarte correto

Como comentado anteriormente, todo e qualquer material, seja ele biológico, químico ou de outra categoria, deve ser avaliado quanto ao risco para a saúde do ambiente e para os seres vivos. Todavia, devemos nos preocupar com essas substâncias não só no âmbito do laboratório e de sua manipulação, mas também no que diz respeito à sua disposição na forma de resíduo. A classificação inicial dos tipos de resíduos de serviços de saúde foi estabelecida pela RDC nº 33/2003, da qual, após longa discussão técnica, originou-se a RDC nº 306/2004. Essa resolução aplica-se a todos os resíduos gerados pela área da saúde, inclusive em trabalhos de campo e nos serviços de acupuntura e tatuagem. Essa resolução só não se aplica aos resíduos de fontes radioativas seladas, que são da alçada da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

É importante, nesse caso, a existência de um plano gestor (manejo, segregação, acondicionamento, identificação, coleta, armazenamento, transporte, tratamento e disposição final de todos os resíduos) por parte do estabelecimento gerador; esse plano deve ser composto de técnicas, processos e procedimentos que assegurem a minimização de riscos ao ambiente e à saúde pública. A disposição dos resíduos deve considerar a responsabilidade solidária entre gerador e poder público.

Classificação dos diferentes tipos de resíduo

Grupo A – resíduos com a presença de agentes biológicos potencialmente infectantes, identificados pelo símbolo da substância infectante (constante da NBR-7500 da ABNT);

Grupo B – resíduos contendo substâncias químicas (resíduos químicos), identificados pelo símbolo de risco associado, de acordo com a NBR-7500 da ABNT, e com a discriminação da substância química e frases informando o tipo de risco;

Grupo C – resíduos com radionuclídeos (rejeitos radioativos) (norma CNEN-NE-6.02);

Grupo D – resíduos comuns;

Grupo E – materiais perfurocortantes, com presença de agentes biológicos; devem ser acrescidos da inscrição "PERFUROCORTANTE".

Classificação dos resíduos sólidos

Grupo A – risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente decorrente de agentes biológicos:

- sangue, hemoderivados, bolsas de sangue etc.;
- animais de experimentação, carcaças e vísceras, e materiais contactantes (cama e forrações);
- excreções, secreções e líquidos orgânicos (quando coletados);
- meios de cultura e vacinas;
- material descartável que tenha tido contato com matéria orgânica, como esparadrapo, gaze, gesso, luvas etc.;
- membros humanos, produtos de fecundação e peças anatômicas;
- resíduos de áreas de isolamento: fraldas, papéis sanitários, absorventes higiênicos etc.;
- filtros de gases aspirados e de aparelhos de ar condicionado de áreas de isolamento;
- resíduos de laboratórios de análises clínicas ou ambulatórios;
- lodo de tratamento de esgoto de unidades de saúde;
- resíduos do grupo D (ver abaixo) contaminados por material biológico.

Grupo B – risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente decorrente das características químicas do resíduo:

- quimioterápicos e materiais descartáveis por eles contaminados;
- perfurocortantes contaminados com quimioterápico ou outro produto químico;
- resíduos farmacêuticos: droga vencida, contaminada, interditada ou não utilizada;
- antimicrobianos e hormônios sintéticos;
- mercúrio de amálgamas e outros resíduos de metais pesados;
- saneantes e domissanitários;
- líquidos reveladores de filmes;
- resíduos do grupo D (ver abaixo) contaminados por material químico;
- demais produtos considerados perigosos pela norma da ABNT NBR-10004, tais como resíduos tóxicos, corrosivos, inflamáveis e reativos.

Grupo C – risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente decorrente das características radioativas do resíduo:

- rejeitos radioativos, materiais radioativos ou contaminados com radionuclídeos provenientes de laboratórios de análises clínicas ou de serviços de medicina nuclear e radioterapia, em conformidade com a norma CNEN-NE-6.05;
- serviços com atividade em medicina nuclear devem observar ainda a norma CNEN-NE-3.05;
- todos os resíduos dos grupos A, B e D contaminados por radionuclídeos: seringas, fármacos, compressas, vestimenta, luvas, sapatilhas etc.

Grupo D – resíduos comuns e todos os que não se enquadrem nos grupos anteriores, porém, quando gerados em estabelecimentos de saúde de áreas endêmicas definidas pelo Ministério da Saúde serão considerados como do tipo A:

- sobras de alimento que tenham tido contato com secreções, excreções e outros fluidos corpóreos (excluem-se os alimentos provenientes de áreas de isolamento);
- papéis sanitários de funcionários ou pacientes que não estejam em área de isolamento;
- embalagens secundárias de quaisquer medicamentos ou de produto médico-hospitalar, frascos plásticos de soros, vidros ou plásticos de medicamentos ou outro produto não incluído no grupo B (após o esvaziamento, são considerados materiais recicláveis).

Grupo E – risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente em decorrência do risco associado a características perfurocortantes:

- materiais perfurocortantes, como objetos e instrumentos contendo cantos, bordas, pontos ou protuberâncias rígidas e agudas capazes de cortar ou perfurar: lâmina de barbear, bisturi, agulhas, escalpes, ampolas, pipetas, vidro quebrado etc.; podem ser descartados separadamente, no local de sua geração, imediatamente após o uso, em recipientes com tampa, de paredes rígidas, resistentes não só a punctura, ruptura e vazamento, mas também ao processo de esterilização, devidamente identificados com o símbolo internacional de risco biológico acrescido da inscrição "PERFUROCORTANTE" e de informação sobre os riscos adicionais, químico ou radiológico.

Gerenciamento de resíduos

Após a segregação, deve-se proceder ao acondicionamento dos resíduos seguindo a RDC nº 306:

- agulhas descartáveis (grupo E) devem ser desprezadas juntamente com as seringas, quando descartáveis, sendo proibido reencapá-las ou proceder à sua retirada manualmente

- recipientes coletores para resíduos do grupo E devem ser confeccionados em material resistente desenvolvido especialmente para a utilização em serviços de saúde e possuir desconectador de agulhas;

- o volume dos recipientes coletores ou de acondicionamento deve ser compatível com a geração diária desse tipo de resíduo;

- os recipientes devem ser preenchidos somente até dois terços de sua capacidade, ou o nível de preenchimento deve ficar a 5 cm de distância da boca do recipiente;

- os recipientes coletores devem estar localizados o mais próximo possível da área de uso dos materiais a serem descartados neles;

- é expressamente proibido o esvaziamento desses recipientes para o seu reaproveitamento;

- resíduos sólidos dos grupos A, B e C devem ser dispostos em sacos biodegradáveis de cor branco-leitosa, com rótulos do símbolo de risco biológico e a expressão RESÍDUO BIOLÓGICO, RESÍDUO TÓXICO ou RESÍDUO RADIOATIVO de acordo com as suas características;

- no caso de resíduos classificados no grupo D, eles devem ser acondicionados em sacos plásticos transparentes de cor clara, exceto branca;

- a identificação de resíduos do grupo D destinados à reciclagem ou à reutilização deve ser feita nos recipientes e nos abrigos de guarda de recipientes, usando-se o código de cores, e suas correspondentes nomeações, baseado na resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) nº 275/2001 (Brasil, 2001c), e símbolos do tipo de material reciclável:

  I – azul: papéis
  II – amarelo: metais
  III – verde: vidros
  IV – vermelho: plásticos
  V – marrom: resíduos orgânicos
  VI – cinza: demais resíduos do grupo D.

No caso das cores das lixeiras utilizadas para segregar o material a ser reciclado, segue-se a mesma lógica de cores e numeração; apenas no item VI, lixeiras que contêm refugos que devem ser enviados ao aterro sanitário, a cor cinza é substituída por preto.

Tipo de resíduo	Descrição	Acondicionamento
Grupo A1 Biológico	Resíduos que necessitam de tratamento prévio (autoclavação); Sobras ou amostras utilizadas para exames imunohematológicos; Segmentos de hemocomponentes utilizados para provas de compatibilidade; Soroteca de pacientes e plasmateca de doadores.	Lixeira com tampa e pedal; Identificar, na frente, com símbolo de risco biológico; Tampa: deve trazer etiqueta com descrição dos resíduos; Saco branco-leitoso, com símbolo de risco biológico; Recolhimento quando atingir 2/3 de sua capacidade ou ao menos uma vez por dia.
Grupo A4 Biológico	**NÃO** necessitam tratamento prévio: • luvas; • algodão; • gaze; • cartões e microplacas usadas em exames imuno-hematológicos em doadores e pacientes.	Lixeira com tampa e pedal; Identificar na frente com símbolo de risco biológico; Tampa: deve trazer etiqueta com descrição dos resíduos; Saco branco-leitoso, com símbolo de risco biológico; Recolhimento quando atingir 2/3 de sua capacidade ou ao menos uma vez por dia.
Grupo D	Resíduos que não apresentam risco biológico e podem ser equiparados a resíduos domiciliares: • papel higiênico; • papel-toalha utilizado para secar as mãos; • material administrativo; • sobras de alimentos; • resíduos provenientes da copa.	Lixeira com tampa e pedal; Identificar na parte da frente com símbolo de lixo comum. Tampa: deve trazer etiqueta com descrição dos resíduos; Saco plástico; Recolhimento quando atingir 2/3 de sua capacidade.

Grupo E	Resíduo perfurocortante com risco biológico: • agulhas; • seringas; • lancetas; • tubos de vidro; • frascos de vidro vazio; • tubos quebrados • todo material com risco de acidente perfurocortante ou escarificante.	Coletor de perfurocortante: recipientes rígidos, resistentes a punctura, ruptura e vazamentos, com símbolo de resíduo biológico e inscrição "RESÍDUO BIOLÓGICO", acrescida de "PERFUROCORTANTE". As caixas ou recipientes devem ser lacrados quando atingirem 2/3 de sua capacidade e colocados em saco branco-leitoso, com símbolo de risco biológico.

2.2.5 Acidente de trabalho por materiais perfurocortantes

Segundo Shimizu e Ribeiro (2002), a principal causa de contato acidental com materiais biológicos em laboratório são agulhas contaminadas. Segundo esses autores, diversos estudos mostram que os acidentes provocados por agulhas resultam, geralmente, da prática de reencape de agulhas antes do descarte, do uso de luvas de procedimentos de tamanho incorreto, da falta de habilidade e concentração do técnico e da agitação psicomotora do paciente.

Um alerta dessa pesquisa diz respeito ao baixo registro oficial de acidentes, aumentando, com isso, a subnotificação dos acidentes causados por materiais perfurocortantes e fluidos biológicos. Os autores atribuem esse problema à pouca importância que os profissionais da equipe de saúde dão a esse tipo de acidente, por causa da percepção equivocada de que a lesão é pequena e que, por isso, não ocasionará danos para a sua saúde.

Em relação aos agentes biológicos, Shimizu e Ribeiro (2002) destacam estudos que mostram que a cada 1.000 punções acidentais ocorrem de 1 a 4 soroconversões positivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Já a contaminação de profissionais de saúde por vírus da hepatite B (HBV), por causa do seu grande poder infectante, é bem mais alta, com um risco médio de infecção de cerca de 3%. As consequências da infecção pelo HBV são muito variáveis, e o indivíduo infectado pode vir a se tornar um portador assintomático (Stephens et al., 2009). No entanto, esse fato é atenuado pela existência de vacina contra a he-

patite B, que faz parte do calendário obrigatório para os trabalhadores da saúde. O vírus da hepatite C, segundo essa mesma pesquisa, tem um índice de infecção um pouco mais baixo, ficando em torno de 1,8%. Infelizmente, ainda não existe vacina para a hepatite C.

No caso de acidente com materiais perfurocortantes que contenham fluidos biológicos, o profissional é orientado pelo serviço médico a avaliar a necessidade de iniciar o tratamento contra HIV (entre 1 a 2 horas após o acidente) enquanto a amostra ainda está sendo analisada. Caso a mesma seja positiva para HIV, o trabalhador deve dar continuidade ao tratamento com orientação médica. A duração da quimioprofilaxia é, em média, de um mês (Brasil, 2001a). "A indicação do uso de antirretrovirais deve ser baseada em uma avaliação criteriosa do risco de transmissão do HIV em função do tipo de acidente ocorrido e da toxicidade dessas medicações" (Maia, 2002, p. 21).

O vírus da hepatite D é defectivo, pois necessita do vírus da hepatite B para se replicar e, por isso, só pode ser adquirido junto com o vírus da hepatite B (coinfecção) ou por portador crônico desse tipo de hepatite. As vias de transmissão são semelhantes às do vírus da hepatite B, sendo a exposição percutânea a mais importante. As medidas de controle são as mesmas utilizadas para a hepatite B, inclusive a vacina (Stephens et al., 2009).

A Sociedade Brasileira de Infectologia e o CDC têm demonstrado preocupação com os acidentes causados por agulhas, sobretudo no que se refere à notificação e à monitoração dos acidentados, bem como à adoção de medidas-padrão pelos trabalhadores da saúde, visando à prevenção tanto da transmissão do vírus HIV quanto das hepatites B e C.

Nessa perspectiva, listamos a seguir, sob a forma de itens, as recomendações sobre biossegurança baseadas principalmente em publicação da Organização Mundial de Saúde (2004).

- O principal ponto para a prática da segurança biológica é a avaliação dos riscos. Para isso, o responsável pelo laboratório deve assegurar-se da realização de avaliações de riscos adequadas e trabalhar em estreita ligação com a comissão de segurança e o pessoal da instituição, a fim de assegurar a disponibilidade de equipamento e instalações apropriadas para apoiar as atividades em questão.

- Nunca pipetar com a boca. Existem os mais diversos formatos de dispositivos que podem ser acoplados à pipeta e, com isso, proporcionar um procedimento seguro e eficaz.

- É obrigatório utilizar câmaras de segurança biológica sempre que se manuseie material infeccioso, principalmente se houver alto potencial de produção de aerossóis.

- É importante que as autoclaves e as câmaras de segurança biológica sejam validadas com métodos apropriados antes de serem utilizadas. A recertificação deve ser feita, segundo as instruções do fabricante, a intervalos periódicos.

- Deve ser feito um cronograma de vacinação para o pessoal que trabalha nos laboratórios, constando as vacinas obrigatórias para a área da saúde, tais como vacina contra hepatite B e antitetânica. Além disso, é preconizada a vacinação especial para determinados serviços, tais como vacina antirrábica, para profissionais que trabalham com experimentação animal, e vacina contra febre amarela, para profissionais que trabalham na produção desse imunobiológico. Cada peculiaridade do serviço deve ser avaliada por uma comissão médica.

- É importante que haja vigilância apropriada da saúde do pessoal do laboratório, de modo a se detectarem precocemente infecções adquiridas no local; além disso, deve haver regras rígidas visando excluir as pessoas altamente susceptíveis (mulheres grávidas e pessoas imunodeficientes) de trabalhos laboratoriais de alto risco.

- É essencial assegurar uma formação contínua *in loco* sobre medidas de segurança. Um programa eficaz nessa área começa pelos responsáveis dos laboratórios, que devem assegurar a integração de práticas e procedimentos laboratoriais seguros na formação básica do pessoal.

- A esterilização pelo calor, em autoclave, é o método preferencial para todos os processos de descontaminação.

- Deve-se adotar um sistema de identificação e separação de materiais e recipientes infecciosos que siga os regulamentos nacionais e internacionais de descarte.

- As agulhas hipodérmicas, uma vez utilizadas, não devem ser reintroduzidas nos seus invólucros, partidas ou retiradas das seringas descartáveis. Todo o conjunto deve ser colocado num recipiente para descartáveis.

- As seringas descartáveis utilizadas, com ou sem agulhas, devem ser colocadas em recipientes para descartáveis e incineradas, após descontaminação em autoclave.

- É preciso preparar e implantar programa específico sobre proteção biológica em laboratório segundo as exigências do serviço, o tipo de trabalho realizado e as condições locais.

- As precauções de segurança, tal como técnicas de assepsia e práticas microbiológicas seguras, devem fazer parte do trabalho de rotina de laboratório.

- Deve estar afixada no laboratório uma cópia dos procedimentos necessários em caso de derrames; todo o pessoal do laboratório deve ler e compreender esses procedimentos.

2.2.6 Checklist recomendado pela Organização Mundial de Saúde (2004) para o trabalho em laboratório

1) Para o seu trabalho normal, todos os profissionais dispõem de roupa de proteção, com modelos e tecidos aprovados, tais como batas, jalecos, aventais, luvas?

2) Para trabalhar com produtos químicos perigosos, o pessoal dispõe de roupa e equipamento de proteção suplementar?

3) Os trabalhadores dispõem de óculos de proteção e protetor facial?

4) Existem locais para lavagem dos olhos?

5) Existem chuveiros de emergência?

6) A proteção contra radiações está de acordo com as normas nacionais e internacionais, inclusive com o fornecimento de dosímetros?

7) O laboratório dispõe de máscaras respiratórias que são regularmente limpas, desinfetadas, verificadas e guardadas em condições de limpeza e higiene?

8) Essas máscaras são providas de filtros apropriados – por exemplo, filtros HEPA para retenção de microrganismos e filtros especiais para gases e partículas?

9) As máscaras se adaptam bem aos seus usuários (conforto e utilidade)?

2.2.7 Equipamentos de proteção individual

Com o objetivo de aplicar a norma regulamentadora NR6, o texto da portaria da Secretaria de Inspeção do Trabalho (SIT) nº 25, de 15 de outubro de 2001 (Brasil, 2001d), considera equipamento de proteção individual todo dispositivo ou produto, de uso individual pelo trabalhador, destinado à proteção de riscos capazes de ameaçar a segurança e a saúde no trabalho.

Para a comercialização de EPIs, é necessário atender a essa norma e obter um certificado de aprovação, que deverá ser expedido/renovado/fiscalizado por órgão competente em segurança e saúde no trabalho do Ministério do Trabalho e Emprego. O mesmo órgão deve definir os prazos de validade desses certificados, cabendo ao fabricante desses itens providenciar instruções em português, incluindo orientação de utilização e manutenção e restrições de uso.

Compete ao Serviço Especializado em Engenharia de Segurança e em Medicina do Trabalho (SESMT) ou à comissão interna de prevenção de acidentes (Cipa), nas empresas desobrigadas de manter o SESMT, recomendar ao empregador o EPI adequado ao risco existente em determinada atividade.

Criado em 17 de dezembro de 1996, o Conselho Deliberativo da ABNT aprovou, em reunião ordinária, a criação do Comitê Brasileiro de Equipamentos de Proteção Individual (ABNT/CB-32), visando agilizar a elaboração e a revisão das normas de equipamentos de proteção individual.

Fazem parte da lista de EPIs de uso em laboratórios jalecos ou roupas de proteção, máscaras cirúrgicas e com filtros, proteção auditiva, luvas de segurança, óculos de segurança e protetor facial.

a) Avental ou roupas de proteção

Os jalecos devem ser de algodão, com mangas longas e comprimento na altura do joelho; os profissionais de laboratório devem usar calça comprida e jaleco de manga longa, de tecido resistente e cor clara, específico para uso do funcionário do serviço, de forma a identificá-lo de acordo com a sua função; sugere-se que esses EPIs devem ser descontaminados antes da lavagem, e que se a lavagem ocorrer na residência do trabalhador, o mesmo deve realizá-la de forma individual e não juntamente com outras roupas que não sejam de serviço; os aventais devem ficar no ambiente do laboratório e não devem ser utilizados fora do serviço em espaços comuns, como corredores e refeitórios; aventais descartáveis não protegem contra substâncias químicas, são altamente inflamáveis e devem ser usados uma única vez.

b) Luvas

Existem quatro parâmetros para medir a eficácia das luvas:

1) bloqueio: capacidade de impedir o contato;

2) permeação: velocidade com que um produto passa através da mesma;

3) tempo de resistência: tempo decorrido entre o contato inicial com o lado externo da luva e a detecção do produto na parte interna da luva;

4) degradação: mudanças em quaisquer propriedades físicas da luva.

Materiais (nenhuma luva pode proteger de todos os produtos):

- látex: adequadas à proteção biológica e para uma ampla variedade de solventes orgânicos, ácidos e bases; todavia, são permeáveis em diferentes graus a produtos químicos;

- nitrílica: inadequadas para soluções aquosas; indicadas para uso prolongado com alguns produtos químicos, sendo consideradas de bom uso em solventes aromáticos e halogenados;

- PVA: bom uso para ácidos e bases, ruim para a maioria dos solventes orgânicos;
- PVC: bom uso para ácidos, bases, peróxidos, hidrocarbonetos, alcoóis e fenóis, e ruim para solventes aromáticos e halogenados;
- neoprene: bom uso para ácidos e bases diluídos, péssimas para solventes orgânicos.

c) Equipamentos de proteção ocular e facial

São utilizados para proteção contra impactos de partículas, luminosidade intensa, radiação ultravioleta ou radiação infravermelha. A norma técnica aplicável é a ANSI.Z.87.1/1989 (Fundação Oswaldo Cruz, 2003a). Os óculos devem ser usados em todas as atividades de risco, como manipulação de produtos biológicos e de produtos químicos, além daquelas que portam risco de radiação – nesse caso, são recomendados óculos especiais, com indicação de proteção contra radiação.

Características:

- não devem distorcer as imagens ou limitar o campo visual;
- devem ser resistentes aos produtos que serão manuseados;
- devem ser confortáveis e de fácil limpeza e conservação;
- devem ter lente panorâmica incolor, ser de plástico resistente e atóxico, com armação flexível e proteção lateral.

d) Máscaras e respiradores

Por causa da similaridade visual de certos respiradores descartáveis e de muitas máscaras cirúrgicas e de procedimento, suas diferenças nem sempre são bem entendidas. Entretanto, eles são muito diferentes na vedação facial, no tempo de uso e, principalmente, na finalidade de uso. Os respiradores são projetados para auxiliar na redução da exposição respiratória do usuário a contaminantes dispersos no ar, tais como partículas, gases ou vapores. Alguns tipos são capazes de reter partículas menores que 100 μm de tamanho. Isso inclui aerossóis que podem conter material biológico, como fungos *Bacillus anthracis* e *Mycobacterium*

tuberculosis e vários vírus. As máscaras cirúrgicas e de procedimento não têm propriedades de filtração ou vedação facial adequadas para fornecer proteção respiratória ao usuário. São usadas para ajudar a prevenir a contaminação do ambiente de trabalho ou campo estéril com partículas grandes geradas pelo usuário – por exemplo, saliva e muco. Máscaras cirúrgicas também podem ser usadas para ajudar a reduzir o risco de projeções ou respingos de sangue, fluidos corpóreos, secreções e excreções atingirem a boca ou o nariz do usuário.

A utilização correta desses EPIs é recomendada, juntamente com as capelas de exaustão, sempre que no laboratório forem manuseadas substâncias químicas com alto teor de evaporação, ou na presença de alta contaminação biológica. Elas podem ser de proteção total (boca, nariz e olhos) ou proteção facial (boca e nariz).

Quando necessário, devem estar disponíveis no laboratório respiradores com filtros de acordo com a necessidade de uso, e os filtros fora da validade ou que estejam saturados devem ser obrigatoriamente substituídos por novos.

Quadro 4. Particularidades e diferenças entre máscaras e respiradores.

	Máscara cirúrgica	**Respirador**
Composição	Em geral tripla camada de não tecido.	Tripla camada de não tecido e filtro especial com tratamento eletrostático.
Tipo de proteção	Protege de infecções por inalação de gotículas.	Protege de infecções por inalação de aerossóis contendo agentes biológicos (vírus, bactérias, fungos).
	Reduz o risco de projeções ou respingos de sangue, fluidos corpóreos e secreções atingirem a boca e o nariz do usuário.	Reduz o risco de projeções ou respingos de sangue, fluidos corpóreos e secreções atingirem a boca e o nariz do usuário.
	Minimiza a contaminação do ambiente com secreções respiratórias (por exemplo, saliva e muco).	Minimiza a contaminação do ambiente com secreções respiratórias.
Certificações e registros	Possui registro no Ministério da Saúde. Não é considerado pela Anvisa um equipamento de proteção respiratória.	Considerado pela Anvisa equipamento de proteção respiratória desde que com o certificado de aprovação emitido pelo Ministério do Trabalho e com registro do Ministério da Saúde.

Descarte	Imediato, após atendimento, sendo importante a lavagem das mãos após o descarte.	Imediato, após atendimento, sendo importante a lavagem das mãos após o descarte.
Recomendação de uso	Normalmente recomendado por enfermeiros/médicos do setor de controle de infecção.	Normalmente recomendado por profissionais de segurança do trabalho que detém conhecimento de programas de proteção respiratória e/ou por enfermeiras do setor de controle de infecção.
Diferenças de uso	Composta por um filtro comum, chamado de não tecido. Pode ter uma ou mais camadas. Proteção mais limitada porque a vedação no rosto é precária nesse tipo de máscara	É tecnicamente denominada respirador. É formada por filtros especiais com poder de filtrar partículas extremamente pequenas, como é o caso de vírus, bactérias e outros agentes biológicos. Proteção mais adequada, porém exige o uso correto, especialmente quanto ao ajuste no rosto. Também são considerados respiradores outros equipamentos com outros níveis de proteção, como respiradores com filtros químicos, respiradores motorizados, equipamentos de ar mandado.

Fonte: 3M do Brasil, 2009.

e) Protetores auditivos

São recomendados para uso em locais cujos níveis de pressão sonora sejam superiores aos estabelecidos pela NR15 (anexo I e II), podendo ser conjugados com capacete e protetor facial (Fundação Oswaldo Cruz, 2003b). Seu uso em laboratórios só está indicado nos casos em que existam equipamentos que produzam alto grau de ruído, tais como centrífugas, exaustores e cabines de segurança. Nos bancos de sangue, esse tipo de risco não representa um grave problema; no entanto, os protetores auditivos devem ser fornecidos ao trabalhador caso ele solicite (norma técnica aplicável: ANSI.S.12.6/1997).

2.2.8 Equipamentos de proteção coletiva (EPCs)

Esses equipamentos, também destinados a proteger a integridade física dos profissionais ou minimizar os efeitos de um agravo, não pro-

tegem necessariamente ao mesmo tempo toda a equipe de trabalho (como um exaustor); muitas vezes são apenas de uso coletivo (como no caso do chuveiro).

a) Chuveiros e lava-olhos

Chuveiros e lava-olhos de emergência ou segurança são equipamentos especificamente projetados para fornecer um fluxo de água abundante e de baixa pressão, suficiente para remover qualquer tipo de contaminante ou calor, sem causar o agravamento de possíveis lesões.

Os lava-olhos podem estar acoplados ao chuveiro ou ter forma de bisnagas de pressão, que são recipientes portáteis pequenos, feitos de material flexível e que projetam fluxos de água quando apertados, prestando-se ao objetivo de livrar os olhos de partículas e contaminantes sem necessidade de instalação hidráulica no local de trabalho.

Por serem equipamentos de emergência, devem estar preparados para uso imediato a qualquer instante, estando sempre presentes em locais de manuseio de produtos químicos e em situações de risco de contaminação ou de queimaduras por calor.

b) Cabines de segurança biológica (CBSs) e fluxos laminares[2]

As cabines de segurança biológica e as capelas de fluxo laminar são usadas para manipulação de agentes biológicos, produção de diluentes e imunobiológicos, meios de cultura e diversos materiais que precisam ser processados em ambiente estéril. Além disso, algumas capelas de fluxo laminar, não apenas protegem o operador da exposição de produtos biológicos, como também precisam garantir a segurança do produto e do ambiente. Existem diferentes modelos de cabines, mas todos possuem filtros absolutos ou filtros HEPA, que apresentam alta eficiência – no mínimo 99,97% de partículas com até 0,3 μm coletadas – e devem ser substituídos periodicamente, de acordo com a sua saturação.

Os fluxos, chamados de "bancada limpa", podem ser encontrados em dois modelos, que não são de câmaras de biossegurança, pois ou liberam ar filtrado (HEPA) para a superfície de trabalho ou para o operador:

a) fluxo vertical: protege, principalmente, o operador das substâncias que ele está manuseando;

[2] Parte do texto deste item foi reproduzida de Oliveira e Nogueira, 2009.

b) fluxo horizontal: protege, principalmente, o produto que está sendo processado; somente podem ser envasados ou manipulados materiais que não apresentem riscos de contaminação para o operador.

As cabines se segurança biológica podem ser divididas em três classes, sendo que a classe II tem várias subdivisões:

Classe I: fornece segurança pessoal e ambiental, mas não do produto, funcionando como uma coifa provida de filtro HEPA para proteção ambiental; sua utilidade no laboratório é muito limitada; geralmente é usada para acondicionar equipamentos que podem gerar aerossóis, como centrífugas.

Classe II: essa classe, que engloba cabines que fornecem proteção pessoal, ambiental e do produto, pode ser subdividida em vários tipos (A, B1, B2 e B3). O ar é captado pela grelha frontal, protegendo o operador, e passa por filtros HEPA, diminuindo a contaminação na superfície interna de trabalho. Na câmara de tipo A, a mais comum nos laboratórios brasileiros por causa do fator custo/benefício, o ar filtrado é recirculado ao laboratório. Nas câmaras do tipo B, o ar é eliminado para o exterior do prédio. Dentre as do tipo B, a B1 é a mais simples, funcionando como a do tipo A, porém com exaustão externa. No tipo B2, não há nenhuma recirculação de ar dentro da câmara; o ar é filtrado na entrada, com retenção biológica e química, e antes de ser eliminado para o exterior. Na B3, a câmara mais cara dessa categoria, o cuidado para não haver nenhum tipo de vazamento de resíduo químico ou biológico é maior, protegendo o ambiente com maior eficácia.

Classe III: fornece proteção máxima para o ambiente e o operador; construída para atividades NB4, é fechada hermeticamente e possui visor fixo e luvas resistentes de borracha acopladas. Seu acesso é feito por caixa de porta dupla, que poderá ser descontaminada após a operação. Além dos filtros, possui um incinerador de ar.

c) Capelas de exaustão[3]

Equipamento imprescindível em laboratórios onde se manuseiem produtos químicos ou particulados, a capela de exaustão também pode ser chamada de capela química ou gabinete de exaustão. É um gabinete que deve ser ventilado e projetado de forma que o sistema leve para fora do edifício os efluentes indesejáveis provocados por qualquer procedimento efetuado no seu interior.

O sistema de exaustão da capela só deve ser desligado 10 a 15 minutos após o término dos trabalhos, para que todos os gases sejam exauridos. Ao fazer operações nas capelas, deve-se manter as janelas das mesmas com o mínimo de abertura possível, deixando na capela apenas o material a ser analisado.

d) Extintor de incêndio

Esse EPC é de extrema importância em qualquer ambiente de trabalho, e não só no laboratório (mas nele principalmente). É necessário identificar bem o tipo de incêndio que se vai combater antes de escolher o agente extintor ou equipamento de combate ao fogo. Um erro na escolha pode tornar inútil o combate às chamas ou mesmo piorar a situação, majorando ainda mais o fogo por espalhamento, ou criando novas causas de incêndio (curtos-circuitos). Os incêndios, em seu início, são relativamente fáceis de controlar. Quanto mais rápido o ataque às chamas, maiores serão as possibilidades de reduzi-las e eliminá-las.

O aparelho contém diferentes tipos de produto ou uma mistura deles: água, espuma, pó químico, dióxido de carbono (CO_2) e gases, entre outros. Esses diferentes tipos de agentes extintores são usados de acordo com o tipo específico de incêndio.

Classes de incêndio

A: ocorrem em materiais de combustão fácil com a propriedade de queimarem em sua superfície e em profundidade, deixando resíduos.
Exemplo: tecidos, madeira, papel, fibras etc.;

B: ocorrem em inflamáveis e produtos que queimam somente em sua superfície, sem deixar resíduos.
Exemplo: óleos, graxas, vernizes, tintas, gasolina etc.;

[3] Parte do texto deste item foi reproduzida de Oliveira e Nogueira, 2009.

C: ocorrem em equipamentos elétricos energizados.
Exemplo: motores, transformadores, quadros de distribuição, fios etc.;

D: ocorrem em elementos pirofóricos, aqueles que se inflamam espontaneamente em contato com o ar.
Exemplo: magnésio, zircônio, titânio etc.

Uso e tipos de extintores portáteis

- o extintor tipo "espuma" é usado em fogos classes A e B;
- o extintor tipo "dióxido de carbono" é utilizado, preferencialmente, nos fogos classes B e C, embora possa ser usado também nos fogos classe A em seu início;
- o extintor tipo "químico seco" deve ser empregado nos fogos classes B e C; as unidades de tipo maior, com 60 a 150 kg, devem ser montadas sobre rodas;
- nos incêndios classe D, será usado o extintor tipo "químico seco", porém o pó químico será especial para cada material;
- o extintor tipo "água pressurizada" ou "água-gás", com capacidade variável entre 10 e 18 litros, deve ser usado em fogos classe A.

Em qualquer um desses casos de incêndio, quando em um ambiente tomado pela fumaça, deve-se usar um lenço molhado para cobrir o nariz e a boca e sair rastejando, procurando respirar junto ao piso. Deve-se também molhar bem as roupas e manter-se vestido para se proteger. Uma pessoa com as roupas em chamas deve ser obrigada a se jogar no chão e ser envolvida em um cobertor, cortina etc.

2.3 Cuidados básicos pessoais e de higiene no âmbito do laboratório

Cabelos: devem ser mantidos permanentemente presos na sua totalidade; em áreas de trabalho com riscos químico e biológico, o uso do gorro é obrigatório.

Sapatos: devem ser exclusivamente fechados; não deve ser permitido o uso de sandálias dentro de áreas hospitalares e laboratoriais. Em alguns casos, é necessário também a utilização de propé (sapatilha descartável) ou sapato de uso exclusivo.

Joias e bijuterias: deve-se usar o mínimo possível; não usar anéis com reentrâncias ou incrustações, nem pulseiras e colares.

Maquiagem: deve ser proibida, pois a área laboratorial e hospitalar é grande fonte de partículas que, na sua maior parte, são aderentes, contendo glicerina, mica e titânio, entre outras substâncias. Entre os produtos cosméticos, destacamos o batom, o laquê e o rímel como fontes de contaminantes biológicos.

Perfumes: devem ser evitados, porque são poluentes ambientais, causam intolerância em pacientes que estão com a saúde debilitada ou que fazem uso de medicamentos, como aqueles em tratamento de quimioterapia, podem causar enjoo nas mulheres grávidas, agravar o estado de saúde de muitos pacientes alérgicos, impregnar ambientes fechados que contenham filtros e afetar sistemas de refrigeração.

Unhas: devem ser aparadas e bem cuidadas; preferencialmente, não devem estar pintadas com esmalte, pois ele libera partículas por microfraturas, principalmente em "áreas limpas" e laboratórios de cultura celular.

2.4 Boas práticas de laboratório

As boas práticas de laboratório, conhecidas pelas siglas BPL ou GLP (do inglês *good laboratory practices*), são definida pela Anvisa como "um sistema de qualidade relativo ao processo organizacional e às condições sob as quais estudos não clínicos referentes à saúde e ao meio ambiente são planejados, realizados, monitorados, registrados, arquivados e relatados" (Brasil, 2001b, p. 10). Os princípios das boas práticas de laboratório são aplicáveis a práticas que dizem respeito ao uso seguro de produtos relacionados à saúde humana, vegetal, animal e ao meio ambiente.

O conceito de boas práticas de laboratório tem como alicerce quatro pilares, conhecidos como os quatros "M", por causa das iniciais dos termos homem, materiais, maquinários e métodos em inglês: *man*, *materials*, *machinery* e *methods*. Esses pilares se referem a pontos estratégicos do laboratório, os quais, por isso, merecem atenção especial. No entanto, quem trabalha em laboratórios de saúde sabe que eles apresentam grande complexidade, fato que deve ser levado em conta na hora de abordar as boas práticas de laboratório. Listaremos a seguir os principais pontos (incluindo os quatro "M"):

a) Instalações prediais: materiais utilizados para piso, teto e parede devem ser fáceis de limpar, não podem ter frestas e devem ser resistentes ao uso de desinfetantes. Os cantos do teto e do chão devem ser arredondados, para evitar o acúmulo de sujeira e facilitar a limpeza e o uso de desinfetantes. A iluminação deve ser feita por um número suficiente de luminárias – de preferência luminárias seladas para evitar o acúmulo de sujeira –, a fim de que o ambiente fique bem claro. Em relação a esse ponto, é importante lembrar que o contrário também pode prejudicar o trabalho, isto é, o excesso de luz pode diminuir a qualidade da visão, pois pode causar ofuscamento, principalmente quando a luz se reflete em superfícies brilhantes, ocasionando fadiga visual. A troca das lâmpadas deve ser feita pelo forro e não pela sala, evitando-se assim aumento das fontes de contaminação. As portas devem ser de material que facilite a limpeza, sem frestas, com vedação e com abertura para fora. As janelas, fixas, não podem ser abertas e não devem ser utilizadas cortinas.

b) Eletricidade: o sistema deve prever toda carga elétrica demandada pelos equipamentos utilizados no laboratório. O uso de benjamins deve ser evitado. Além disso, alguns laboratórios precisam observar a necessidade de instalação de geradores de emergência, a fim de suprir a falta de energia elétrica para equipamentos e serviços que não possam ser interrompidos.

c) Banheiros, vestiários e *airlocks*: segundo a NR24 (Brasil, 2008b), que dispõe sobre as condições sanitárias e de conforto nos locais de trabalho, as instalações sanitárias devem ser separadas por

sexo e estar submetidas a processo permanente de higienização, de tal forma que sejam mantidas limpas e desprovidas de quaisquer odores, durante toda a jornada de trabalho. Todos os laboratórios de saúde devem ter vestiários, também separados por sexo, e que, por uma questão de funcionalidade, sirvam como entrada ao local de serviço, permitindo ao trabalhador a colocação de seu uniforme e, em alguns casos, a troca de sapatos ou a colocação de sapatilhas descartáveis. O nível de contenção para laboratórios NB-3 exige a intensificação dos programas de boas práticas laboratoriais e de segurança, além da existência obrigatória de dispositivos eletrônicos de segurança para o fechamento de portas, conhecidos como *airlocks*, e do uso, igualmente obrigatório, de cabines de segurança biológica. Os trabalhadores devem usar roupas de proteção específicas para a área e equipamentos de proteção individual (Fundação Oswaldo Cruz, s.d.).

d) Instalações para equipamentos: cada laboratório deve prever os equipamentos necessários às suas análises e às atividades de rotina. Dessa forma, parte elétrica, refrigeração, dreno, água purificada e sistema de gerador de vapor limpo devem ser analisados e projetados para cada caso, levando-se em conta o consumo, a vazão, a produtividade e a eficiência de cada equipamento. Alguns equipamentos são de uso comum para os laboratórios da área da saúde e, por isso, merecem atenção especial. São eles: sistema de purificação de água – bidestilador, desmineralizador, deionizador e purificador por osmose reversa, entre outros –, autoclave, forno, estufa, sistema de filtração de ar, incubadoras, banho-maria, *freezer*, câmara fria, microscópio e centrífuga. O monitoramento e a validação dos equipamentos reforçam um dos elementos das boas práticas de laboratório que é a preocupação com o maquinário, e devem ser feitos diariamente, com a confecção de uma tabela de registros com os principais parâmetros do equipamento.

e) Pessoal: o pessoal é um dos quatro pilares das boas práticas de laboratório. Todos os laboratórios devem ter um organograma com descrição dos cargos, funções e responsabilidades técnicas de seus

trabalhadores. Os profissionais devem possuir qualificação técnica para ocupar e responder pelos cargos, inclusive por cargos gerenciais, uma vez que a liderança vai funcionar como determinante estratégico na condução da equipe. Um dos pontos nevrálgicos nessa área é a moral da equipe. A maioria dos laboratórios tem necessidade de tarefas coletivas ou sequenciais e, dessa forma, o trabalho de um afeta o trabalho do outro, e a capacidade de se trabalhar em equipe, sem perder o foco individual, faz toda a diferença. A formação de pessoal com qualificação para o trabalho é peça fundamental para a qualidade da execução de rotinas e exames laboratoriais. A chefia do laboratório deve desenvolver procedimentos para identificar a necessidade de capacitação e atualização dos profissionais, além de propor, sempre que necessário, a implantação de programas de desenvolvimento profissional.

f) Alarmes: alguns equipamentos, como *freezers*, geladeiras, liofilizadores e incubadoras, não podem parar de funcionar por falta de energia elétrica ou por falhas no equipamento, pois há risco de perda de insumos, reagentes e produtos, ocasionando prejuízos financeiros, ou mesmo ao trabalho. Por isso, é importante que esses equipamentos "avisem" sobre a ocorrência de alguma pane, para que se possa solucionar o problema rapidamente ou, pelo menos, transferir os produtos para outro equipamento. Esses alarmes podem ser localizados, isto é, acoplados a cada equipamento, ou fazer parte de uma central de alarmes na qual o operador pode detectar o problema e encaminhar a solução.

g) Manutenção: todo laboratório deve prever a manutenção dos equipamentos, na qual se incluem o seu controle e monitoramento. A manutenção pode ser classificada em três categorias: preditiva, preventiva e corretiva (Paula, 2006). A manutenção preditiva é o acompanhamento periódico dos equipamentos, baseado na análise de dados coletados por meio da monitoração ou de inspeções em campo. A manutenção preditiva tem sido reconhecida como uma técnica eficaz de gerenciamento de manutenção. A manutenção preventiva visa aproveitar ao máximo a vida útil de cada equipamento, e mantê-lo sempre em perfeito estado pro-

dutivo, reduzindo, dessa forma, o número de paradas não programadas. A manutenção preventiva demanda a confecção de um cronograma com foco na periodicidade de cada manutenção, como troca de óleo, ajuste de velocidade etc. As certificações ISO, hoje mais comuns no mercado, exigem uma rotina de manutenção bem definida, com o registro de controles de processos para futuras auditorias. Por último, a manutenção corretiva refere-se à manutenção não periódica que variavelmente poderá ser necessária, por falhas e erros, demandando a correção de danos atuais e não iminentes.

h) Extintores, lava-olhos e chuveiros: são equipamentos de uso coletivo cuja finalidade é proteger os profissionais que trabalham em laboratórios. É importante que o trabalhador conheça algumas regras básicas de biossegurança e identifique adequadamente os dispositivos de proteção, a fim de usá-los apenas para a finalidade a que se destinam; ele deve responsabilizar-se por sua guarda e conservação, comunicar à chefia imediata qualquer alteração que os torne impróprios para o uso, solicitando a sua substituição, e compreender a importância da obrigatoriedade de seu uso (Universidade Federal de Alfenas, s.d.).

i) Cronograma de proteção contra insetos e roedores: existência de proteção contra insetos e roedores, e um cronograma de dedetização e desratização periódico, observando-se os efeitos dessas medidas e as possíveis incompatibilidades com os produtos químicos utilizados (Brasil, 2007b).

j) Controle de qualidade e garantia da qualidade: são dois setores distintos. O controle de qualidade de um laboratório de imunohematologia deve garantir que os resultados produzidos reflitam, de forma consistente e fidedigna, os ensaios realizados dentro das normas técnicas prescritas, assegurando que não representem o resultado de alguma interferência no processo. Já o setor da garantia da qualidade determina os procedimentos e metas para assegurar o controle sobre todas as etapas do processo, incluindo o controle de insumos e reagentes, o

plano de amostragem, o controle de temperaturas do ambiente e do maquinário, a verificação de registros, a padronização de todas as atividades e o uso correto dos equipamentos. No laboratório de imuno-hematologia, a garantia da qualidade deve ter um esquema de processos a serem controlados que vai desde o atendimento ao paciente até a liberação do laudo. Segundo Chaves (2010), todas essas atividades devem ser documentadas por meio de procedimentos operacionais-padrão (POP) ou instruções de trabalho (IT) que sempre devem estar acessíveis aos funcionários envolvidos nas atividades. Segundo a mesma autora, com a incessante procura por qualidade nos processos, foram criados os programas de acreditação brasileiros, visando atender às necessidades de ampla e melhor avaliação dos laboratórios clínicos laboratoriais. Fazem parte desses sistemas o Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (Palc) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), e o Departamento de Inspeção e Credenciamento da Qualidade (Dicq) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (Sbac). Vale a pena ressaltar que o setor da garantia da qualidade deve ter autonomia e ser responsável também pela validação de metodologias analíticas e controle de padrões.

Referências bibliográficas

Bahia. Secretaria da Saúde. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde. Diretoria de Vigilância e Controle Sanitário. *Manual de biossegurança*. Salvador: Secretária da Saúde, 2001. Parte 2: Unidades de saúde: biossegurança em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública, p. 61-180.

Baldwin, C. L.; Runkle, R. S. Biohazards Symbol: Development of a Biological Hazards Warning Signal. *Science*, v. 158, p. 264-265, 1967.

Borba, C. M.; Pereira, M. E. C. Organismos geneticamente modificados: como trabalhar legalmente? Rio de Janeiro: Publit, 2009. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/022010_TRN_Miolo%20bioseg%20vol%202%20reed%205a%20correcao.pdf. Acesso em: 9 nov. 2012.

_____ et al. Biossegurança e boas práticas de laboratório. In: Molinaro, E.; Caputo, L.; Amendoeira, R. *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*: volume 1. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2009. p. 21-66.

Brasil. Decreto nº 3.029, de 6 de abril de 1999: Aprova o regulamento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, seção 1, p. 1, 19 abr. 1999a. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/decreto_3029_99.pdf. Acesso em: 1º out. 2012.

_____. Ministério da Ciência e Tecnologia. *Lei nº 11.105*: Biossegurança. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2005. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/lei/L11105.htm. Acesso em: 25 jul. 2011.

_____. _____. Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). *Norma CNEN-NE-6.05*: Gerência de rejeitos radioativos em instalações radiativas. Brasília: Comissão Nacional de Energia Nuclear, 1985.

_____. _____. _____. *Norma CNEN-NE-3.05*: Requisitos de radioproteção e segurança para serviços de medicina nuclear. Brasília: Comissão Nacional de Energia Nuclear, 1996.

_____. Ministério da Previdência Social. *Manual de instruções para preenchimento da comunicação de acidente de trabalho (CAT)*. Brasília: Ministério da Previdência Social, 1999b. Item V: Conceito, definições e outros.

_____. Ministério da Saúde. *Classificação de riscos dos agentes biológicos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2007a. (Série Normas e Manuais Técnicos).

_____. _____. *Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos*. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

_____. _____. *Manual de procedimentos para o diagnóstico e manejo das doenças relacionadas ao trabalho nos serviços de saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, 1999c.

_____. _____. *Doenças relacionadas ao trabalho*: manual de procedimentos para os serviços de saúde. Brasília: Ministério da Saúde–Opas, 2001a.

_____. _____. *Portaria nº 1.286*: Direitos do paciente. Brasília: Ministério da Saúde, 1993.

_____. _____. *Portaria nº 3.204, de 20 de outubro de 2010*: Norma técnica de biossegurança para laboratórios de saúde pública. Brasília: Ministério

da Saúde, 2010b. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3204_20_10_2010.html. Acesso em: 31 out. 2012.

_____. _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). *Critérios para a habilitação de laboratórios segundo os princípios das boas práticas de laboratório*. Brasília: Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública, 2001b. (Procedimentos operacionais da Reblas).

_____. _____. _____. *Protocolo das ações de vigilância sanitária*. Brasília: Anvisa, 2007b.

_____. _____. _____. *RDC nº 57*, de 16 de dezembro de 2010: Determina o regulamento sanitário para serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. *Diário Oficial da União*, Brasília, 17 dez. 2010c.

_____. _____. _____. *RDC nº 306*: Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Brasília: Anvisa, 2004.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama). *Resolução Conama, nº 275*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2001c.

_____. Ministério do Trabalho e Emprego. *NR15*: Atividades e operações insalubres. Brasília: Ministério do Trabalho e Emprego, 2008a. Disponível em: http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr. Acesso em: 11 out. 2010.

_____. _____. *NR9*: Programa de prevenção de riscos ambientais. Brasília: Ministério do Trabalho e Emprego, 1994.

_____. _____. *NR24*: Condições sanitárias e de conforto nos locais de trabalho. Brasília: Ministério do Trabalho e Emprego, 2008b.

_____. _____. *Portaria nº 397*: Classificação Brasileira de Ocupações – CBO. Brasília: Ministério do Trabalho e Emprego, 2002.

_____. _____. Secretaria de Inspeção do Trabalho (SIT). *NR6*: Portaria SIT nº 25, de 15 de outubro de 2001. Brasília: Ministério do Trabalho e Emprego, 2001d.

3M do Brasil. *Respiradores e máscaras cirúrgicas*: uma comparação. São Paulo: 3M do Brasil, 2009. Disponível em: http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=SSSSSu7zK1fslxtUn8mZnY_9ev7qe17zHvTSevTSeSSSSSS--&fn=RespiradoresxMascaras.pdf. Acesso em: 20 out. 2010.

Carvalho, P. R. *Boas práticas químicas em biossegurança*. Rio de Janeiro: Interciência, 1999.

Chaves, C. D. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, n. 5, p. 352, 2010.

Coelho, H. *Manual de gerenciamento de resíduos sólidos de serviços de saúde*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2001.

Di Vitta, P. B. *Classificação e rotulagem de produtos químicos (o sistema GHS)*. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2005.

Dias, J. C. P. Epidemiologia. In: Brener, Z.; Andrade, Z. A.; Barral Neto, M. (org.). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 48-74.

_____. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 4, p. 370-375, jul.-ago. 2006.

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Comissão Técnica de Biossegurança (CTBio). *Procedimentos para a manipulação de microrganismos patogênicos e/ou recombinantes na Fiocruz*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998.

_____. Núcleo de Biossegurança (NuBio). *Manual de biossegurança*. Rio de Janeiro: Fiocruz, [s.d.]. Disponível em: http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab_virtual/riscos_quimicos.html. Acesso em: 31 out. 2012.

_____. _____. *EPI para proteção dos olhos e face*. Rio de Janeiro: NuBio, 2003a. Disponível em: http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab_virtual/epiprotecaoolhoseface.html. Acesso em: 20 out. 2010.

_____. _____. *EPI para proteção auditiva*. Rio de Janeiro: NuBio, 2003b. Disponível em: http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab_virtual/epiprotecaoauditiva.html. Acesso em: 20 out. 2010.

Garcia, L. P.; Facchini, L. A. Vacinação contra a hepatite B entre trabalhadores da atenção básica à saúde. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 24, n. 5, p. 1.130-1.140, maio 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/csp/v24n5/20.pdf. Acesso em: 13 out. 2010.

Girardi, S. N.; Fernandes Jr., H.; Carvalho, C. L. A regulamentação das profissões de saúde no Brasil. *Espaço para a Saúde*, v. 2, n. 1, dez. 2000. Disponível em: http://www.ccs.uel.br/espacoparasaude/v2n1/RPSB.htm. Acesso em: 31 out. 2012.

Hermosilla, L. Abordagem ergonômica de sistemas. *Revista Científica Eletrônica de Sistema de Informações*, Faculdade de Ciências Humanas de Garça, Garça, v. 3, n. 5, ago. 2006. Disponível em: http://www.revista.inf.br/sistemas05/artigos/edic5anoIIIagosto2006-artigo02.pdf. Acesso em: 31 out. 2012.

Hirsch, E. B.; Tam, V. H. Detection and Treatment Options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An Emerging Cause of Multidrug-Resistant Infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* v. 65, n. 6, p. 1.119-1.125, 2010.

Jones, K. E. et al. As tendências globais em doenças infecciosas emergentes. *Nature,* n. 451, p. 990-993, Feb. 2008.

Klenk, H. D.; Feldmann, H. *Ebola and Marburg Viruses*. Molecular and Cellular Biology. Norfolk: Horizon Bioscience, 2004.

König, B. Hazard Symbols. In: _____. *NOP Online*. Regensburg (Alemanha): Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg, 2009. Disponível em: http://www.oc-praktikum.de/en/articles/pdf/HazardSymbols_en.pdf. Acesso em: 25 jul. 2011.

Maia, A. D. M. *Riscos ocupacionais em trabalhadores de banco de sangue*. 2002. Monografia (Especialização em Medicina do Trabalho) – Sociedade Universitária Estácio de Sá, Associação Médica de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2002.

Mamizuka, E. M. et al. Segurança nas universidades – classificação dos microrganismos infecciosos por grupo de risco. *Revista CIPA*, v. 22, n. 253, p. 50-93, 2000.

Oliveira, M. B. S. C.; Nogueira, J. M. R. Conceitos e técnicas básicas aplicados ao laboratório. In: Molinaro, E.; Caputo, L.; Amendoeira, R. *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*: volume 1. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2009. p. 67-123.

Organisation for economic co-operation and development (OECD). *Biological Resource Centres*. Paris: OECD, 2001. Disponível em: http://www.oecd.org/dataoecd/26/19/31685725.pdf. Acesso em: 29 out. 2010.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Manual de segurança biológica em laboratório*. 3. ed. Genebra: OMS, 2004.

Paula, A. S. *Proposta para implantação de manutenção preventiva em bancada de teste hidráulico*. 2006. Monografia (Graduação em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2006.

Shimizu H. E.; Ribeiro, E. J. G. Ocorrência de acidente de trabalho por materiais perfurocortantes e fluidos biológicos em estudantes e trabalhadores da saúde de um hospital-escola de Brasília. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 367-365, 2002.

Stephens, P. R. S. et al. Virologia. In: Molinaro, E.; Caputo, L.; Amendoeira, R. *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*: volume 4. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2009. p. 125-220.

Toscano, C.; Kosim, L. *Cartilha de vacinas*: para quem quer mesmo saber das coisas. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2003. Disponível em: http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/cart_vac.pdf. Acesso em: 8 nov. 2010.

Universidade Federal de Alfenas. *Classe de produtos químicos perigosos*. Alfenas: Comissão de Riscos Químicos, Universidade Federal de Alfenas, [s.d.]. Disponível em: http://www.unifal-mg.edu.br/riscosquimicos. Acesso em: 4 mar. 2011.

World Health Organization (WHO); International Programme on Chemical Safety (IPCS); International Labour Organization (ILO). *Safety in the Use of Chemicals at Work*. Genebra: ILO, 1991. Disponível em: http://actrav.itcilo.org/actrav-english/telearn/osh/kemi/ctm2.htm. Acesso em: 2 set. 2010.

Os autores

Alexandre Gomes Vizzoni: biólogo; mestre em Ciências, área de concentração Doenças Infecciosas, pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz, com especialização em Imuno-Hematologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e com proficiência técnica em Imuno-Hematologia pela Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; chefe do Laboratório de Imuno-Hematologia e da Agência Transfusional do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz; coordenador da Especialidade em Hemoterapia do Curso de Especialização em Biologia Parasitária e Biotecnologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz e coordenador do Curso de Especialização em Imuno-Hematologia da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz e do Curso de Especialização *Lato Sensu* em Imuno-Hematologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Elmo Eduardo de Almeida Amaral: farmacêutico; doutor em Ciências pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e mestre em Química Biológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

Flávia Coelho Ribeiro: médica veterinária; doutora em Ciências (Diagnóstico de Doenças Infecciosas) pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz e mestre em Patologia Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, com especialização em Docência do Ensino Superior pela Universidade Cândido Mendes; professora-pesquisadora da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz.

Joseli Maria da Rocha Nogueira: bióloga; doutora em Ciências pela Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fiocruz, mestre em Microbiologia Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e especialista em Microbiologia e Análises Clínicas pela

Sociedade Barramansense de Ensino Superior; tecnologista sênior da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fiocruz, professora colaboradora da Universidade Federal do Rio de Janeiro, professora adjunta da Universidade do Grande Rio e professora convidada da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz.

Marcos Antonio Pereira Marques: biólogo; mestre em Microbiologia Veterinária pelo Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com especialização em Virologia pelo Instituto de Microbiologia e em Hematologia pela Faculdade de Farmácia, ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro; professor-pesquisador e coordenador de cursos técnicos da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz.

Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira: doutora em Ciências na área de Ensino em Biociências e Saúde pelo Instituto Oswaldo Cruz, mestre em Educação pela Universidade Estácio de Sá e especialista em Microbiologia e Liofilização pela Edwards, Inglaterra; tecnologista sênior em Saúde Pública lotada na Gerência de Risco do Núcleo de Vigilância Hospitalar do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira/Fiocruz.

Paulo Marcelo T. Cotias: farmacêutico e bioquímico; graduado em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal de Pernambuco, com especialização em Patologia Clínica pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas; imuno-hematologista do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz, exercendo até 2011 as seguintes atribuições: chefia do Laboratório de Imuno-Hematologia e da Agência Transfusional do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz, coordenador da Especialidade em Hemoterapia do Curso de Especialização em Biologia Parasitária e Biotecnologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz e coordenador e preceptor do Curso de Especialização em Imuno-Hematologia da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz.

Paulo Roberto Soares Stephens: biólogo; mestre em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; tecnologista sênior em Saúde Pública do Laboratório de Imunologia Clínica do Ins-

tituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, atuando na área de HIV, coordenador da área de Virologia dos Cursos de Especialização e Técnico em Biologia Parasitária e Biotecnologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz e professor dos cursos técnicos do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz e da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz.

Valmir Laurentino Silva: biólogo; doutor em Ciências pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; professor das disciplinas de Imunologia Básica e Imunologia Médica da Faculdade de Medicina de Campos (Fundação Benedito Pereira Nunes), professor convidado da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz e tecnologista em Saúde Pública do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fiocruz.

Valter Viana de Andrade Neto: farmacêutico bioquímico; doutorando do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, mestre em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, com habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Este livro foi impresso pela Suprema Grafica Editora, para a Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz, em agosto de 2013. Utilizaram-se as fontes Minion Pro e Myriad Pro na composição, papel pólen bold 70g/m^2 no miolo e cartão supremo 250g/m^2 na capa.