

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**PACIENTES COM ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE: DESCRIÇÃO DAS
CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS E ANÁLISE
RELACIONADA À ALOIMUNIZAÇÃO E À SOBREVIDA**

GIANE DURIGON

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**PACIENTES COM ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE: DESCRIÇÃO DAS
CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS E ANÁLISE
RELACIONADA À ALOIMUNIZAÇÃO E À SOBREVIVÊNCIA**

GIANE DURIGON

Orientador: Prof. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Durigon, Giane

Pacientes com Anemia Hemolítica Autoimune: descrição das características clínico-laboratoriais e análise relacionada à aloimunização e à sobrevida / Giane Durigon. -- 2019.

59 f.

Orientadora: Lucia Mariano da Rocha Silla.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Anemia Hemolítica Autoimune. 2. Transfusão de Hemácias. 3. Aloimune. 4. Sobrevida. I. Silla, Lucia Mariano da Rocha, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, origem de todo bem; somos apenas instrumentos.

Agradeço aos meus pais, Pedro e Marli, a minha irmã Graciele *in memoriam* e aos meus sobrinhos-afilhados Antonella e Joaquim por darem todo o amor e suporte ao longo da minha vida e por compreenderem as minhas ausências, impostas pelo exercício da Medicina. Sou eternamente grata por todos os ensinamentos, o esforço e a dedicação empregados a mim; isso é família e o real sentido do amor.

Aos meus amigos pelo companheirismo, pelos conselhos e pelo apoio, fundamentalmente nesses dois anos de repentinas mudanças, em que a resiliência imperou.

Aos pacientes, aos professores, aos preceptores, aos colegas, enfim, a todos que contribuíram e contribuem para o meu aprendizado diário.

Ao Serviço de Diagnóstico Laboratorial pela compreensão.

À Dra. Laura Maria Fogliatto.

À grande hemoterapeuta que muito admiro Dra. Juliana Pires Marafon Franz.

Ao Dr. Leo Sekine, por tamanha sensibilidade, generosidade e paciência em compartilhar parte do seu gigantesco saber.

Por fim, a minha orientadora, Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla, por todo o apoio e confiança a mim depositados, além de ser uma exímia pesquisadora, fonte de inspiração para a busca do conhecimento, no intuito de promover a melhor assistência aos pacientes.

RESUMO

Introdução: Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI) é caracterizada pela hemólise causada por autoanticorpos e a corticoterapia é o tratamento inicial. No entanto, muitos portadores de tal enfermidade não respondem às terapias, sendo considerados refratários. O objetivo do estudo é descrever o perfil clínico-laboratorial, identificar os aspectos imuno-hematológicos e avaliar a sobrevida dos pacientes com AHAI aloimunizados e não aloimunizados. Almeja-se, ainda, verificar se os dados relacionados ao hemograma e ao teste de antiglobulina direto (DAT) no momento do diagnóstico de AHAI exercem impacto na sobrevida global dos pacientes com a referida enfermidade.

Materiais e métodos: trata-se de estudo retrospectivo observacional, de uma única Instituição, que incluiu os pacientes diagnosticados com AHAI, durante janeiro de 2000 a junho de 2019. Todos os participantes tiveram dados laboratoriais coletados por 6 meses, a partir da data do diagnóstico. O trabalho foi realizado através de obtenção de dados de prontuário desses pacientes, incluindo crianças, adolescentes, adultos e idosos, todos com TAD positivo e quadro clínico de anemia hemolítica, com formação de autoanticorpos. Foram analisados: raça, idade, sexo, peso, exames laboratoriais ao diagnóstico, a resposta aos tratamentos, perfil de aloanticorpos e de autoanticorpos, realização ou não de transfusão de concentrado de hemácias (CH) e evolução clínica. A análise de sobrevida para fatores categóricos foi realizada através das curvas de Kaplan-Meier, com teste de log rank e, para fatores contínuos, pela regressão de riscos proporcionais de Cox.

Resultados: Foram envolvidos na pesquisa 138 pacientes, sendo a maioria da raça branca e do sexo feminino. A mediana de idade, ao diagnóstico, foi de 48,5 anos (0,16-88), estando 72,5% dos integrantes (n=100) no subgrupo dos maiores de 20 anos. Na amostra total, 79 (57,2%) pacientes possuíam AHAI secundária, sendo 60 adultos e idosos. Com relação ao fenótipo eritrocitário, a maioria era do grupo A RhD positivo (30,4%) e 1,4% tinham o ABO indeterminado; por ordem de prevalência, seguem os antígenos: e (33,3%), C (28,3%), c (20,3%). Ademais, 33% (25/75) dos pacientes tinham aloanticorpos no momento do diagnóstico da AHAI e 40% (16/40) detectaram o surgimento de aloanticorpos após. Cerca de 30% (n=39) da população evoluiu ao óbito e os preditores independentes de mortalidade evidenciados foram a idade [Hazard Ratio (HR): 1,41 (1,18-1,69)], a monocitose [HR: 3,56 (1,38-9,19)], a intensidade do TAD em 3+ e 4+ [HR: 5,08 (1,15-22,47)] e autoanticorpo da classe IgM [HR: 6,59 (1,18-1,69)].

Conclusão: A probabilidade cumulativa de sobrevida global em 10 anos de acompanhamento foi de 51% (mediana de sobrevida não atingida para esta amostra, e a mediana de seguimento foi de 39 meses), hipoteticamente pelo fato de a maioria da população ter AHAI severa, além da influência de fatores como a monocitose, a intensidade do TAD e a presença de autoanticorpo IgM, já que a aloimunização tanto ao diagnóstico quanto após não foi estatisticamente significativa. Por fim, outros trabalhos são necessários a fim de elucidar com mais propriedade os aspectos envolvidos nos principais desfechos relacionados à AHAI.

Descritores: anemia hemolítica autoimune, transfusão de concentrado de hemácias, aloimune, sobrevida

ABSTRACT

Introduction: Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA) is characterized by hemolysis caused by autoantibodies and corticotherapy is the initial treatment. However, many patients with such disease do not respond to therapies and are considered refractory. The aim of this study is to describe the clinical and laboratory profile, identify the immunohematological aspects and evaluate the survival of alloimmunized and non-alloimmunized AIHA patients. We also verify data related to the peripheral blood count at the time of AIHA diagnosis and the of the Direct Antiglobulin Test (DAT) in the overall survival of patients with this disease.

Materials and methods: This is a retrospective, single-site observational study that included patients diagnosed with AIHA from January 2000 to June 2019. All participants had laboratory data collected for 6 months from the date of diagnosis. The study was performed through data collection of these patients, including children, adolescents, adults and elderly, all with positive DAT and clinical features of hemolytic anemia, with formation of autoantibodies. Epidemiologic data (race, age, sex and weight), laboratory tests at diagnosis, response to treatments, profile of alloantibodies and autoantibodies, red blood cell transfusion (RBC), and clinical evolution were analyzed. Survival analysis for categorical factors was performed using Kaplan-Meier curves, with log rank test and, for continuous factors, Cox proportional hazards regression.

Results: The study involved 138 patients, most of them white and female. The median age at diagnosis was 48.5 years (0.16-88), with 72.5% of the members (n = 100) in the subgroup of those older than 20 years. In the total sample, 79 (57.2%) patients had secondary AIHA, 60 adults and elderly. Regarding the erythrocyte phenotype, most were from group A RhD positive (30.4%) and 1.4% had undetermined ABO; in order of prevalence, the antigens follow: e (33.3%), C (28.3%), c (20.3%). Furthermore, 33% (25/75) of the patients had alloantibodies at the time of AIHA diagnosis and 40% (16/40) detected the appearance of alloantibodies after. Approximately 30% (n = 39) of the population died and the independent predictors of mortality evidenced were age [Hazard Ratio (HR): 1.41 (1.18-1.69), monocytosis [HR: 3,56 (1.38-9, 19)], DAT intensity at 3+ and 4+ [HR: 5.08 (1.15-22.47)] and IgM class autoantibody [HR: 6.59 (1.18-1.69)].

Conclusion: The cumulative 10-year follow-up overall survival probability was 51% (median survival not reached for this sample, and median follow-up was 39 months), hypothetically because most of the population had severe AIHA. Monocytosis, IgM class autoantibody and DAT intensity, had a significant impact in predicting mortality in this population. In the other hand, alloimmunization at diagnosis and after was not statistically significant. Finally, further work is needed to better elucidate the aspects involved in key outcomes related to AIHA.

Keywords: Autoimmune hemolytic anemia, red blood cell transfusion, alloimmune, survival

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	13
Figura 2 – Marco conceitual.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação AHAI.....	15
Tabela 2- Diagnóstico diferencial anemia hemolítica.....	16
Tabela 3- Autoanticorpos que podem mimetizar aloanticorpos.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHAI	Anemia Hemolítica Autoimune
LDH	Desidrogenase Láctica
TAD	Teste Antiglobulina Direto
TAI	Teste Antiglobulina Indireto
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HCV	Vírus da Hepatite C
HBsAg	Antígeno de Superfície Hepatite B (Antígeno Austrália)
FAN	Anticorpo Antinuclear
Hb	Hemoglobina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgA	Imunoglobulina A
C3d	Componente 3 do Complemento
CH	Concentrado de Hemácias
HPF	Hemoglobinúria Paroxística ao Frio
RHT	Reação Hemolítica Transfusional
PAI	Pesquisa de Anticorpos Irregulares
AGH	Antiglobulina Humana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2. 1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	12
2. 2 Um breve histórico	13
2. 3 Conceitos básicos	14
2. 4 Os Monócitos	17
2. 5 Autoanticorpos e Aloanticorpos	18
2.5.1 Os autoanticorpos também podem imitar aloanticorpos	19
2. 6 O Teste Antiglobulina Direto	20
2.6.1 Princípios do TAD	20
2.6.2 O TAD positivo	21
2.6.3 O complemento	23
2.6.4 Comparação do TAD com o TAI	23
2.6.5 AHAI associada a um TAD negativo	23
2. 7 Tratamento Farmacológico	24
2. 8 Transfusão de Concentrado de Hemácias	25
2.8.1 Aloimunização predispondo à formação de autoanticorpos	27
2.8.2 Métodos de avaliação imuno-hematológica para seleção de bolsas de CH para transfusão	27
2.8.3 Transfundindo o paciente com AHAI	27
2.8.4 AHAI grave após transfusão de CH	28
2.9 Prognóstico	28
3. MARCO CONCEITUAL	29
4. HIPÓTESE	29
5. JUSTIFICATIVA	29
6. OBJETIVOS	30
6. 1 Objetivo principal	30
6. 2 Objetivo secundário	30
7. MÉTODOS	30

7.1 Desenho do Estudo	30
7.2 Contexto	30
7.2.1 Cálculo de amostra, participantes do estudo e critérios de seleção	30
7.2.2 Definições	30
7.3 Local de Execução do Projeto	31
7.4 Variáveis de Estudo	32
7.4.1 Fontes de dados	32
7.5 Análise Estatística	32
7.6 Aspectos Éticos	32
8. REFERÊNCIAS	34
9. ARTIGO EM INGLÊS: PATIENTS WITH AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA: DESCRIPTION OF CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS AND ANALYSIS RELATED TO ALLOIMMUNIZATION AND SURVIVAL.....	37
10. ANEXO 1: STROB.....	57

1. INTRODUÇÃO

A anemia hemolítica autoimune (AHAI) é uma entidade pouco comum, caracterizada pela ligação de autoanticorpos na superfície eritrocitária e consequente destruição via sistema complemento ou sistema reticuloendotelial.¹ A classificação pode ser realizada de acordo com a temperatura na qual se desencadeia a reação dos anticorpos contra a membrana eritrocitária ou, ainda, em AHAI idiopática ou primária, em que não há a correlação com a doença de base e em AHAI secundária, onde se denota associação com outras patologias ou com o uso de alguns fármaco.² Além disso, em indivíduos com doença autoimune prévia, a AHAI pode desenvolver-se em razão da formação de autoanticorpos induzidos por aloanticorpos.³ Por tratar-se de uma condição infrequente e heterogênea, não há consenso na literatura acerca dos critérios diagnósticos e da mais eficaz estratégia terapêutica. Soma-se a isso o fato de, diuturnamente, ainda conhecer-se pouco sobre os mecanismos fisiopatológicos da AHAI e sobre os fatores que possam influenciar na resposta ao tratamento, já que existem os pacientes respondedores e aqueles refratários às terapias que, inevitavelmente, evoluirão ao óbito. Assim sendo, estudos que identifiquem peculiaridades acerca da patologia em questão, bem como possíveis fatores prognósticos, evidenciam-se de suma relevância para a prática clínica, no intuito da prestação de uma assistência mais personalizada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estratégia para localizar e selecionar as informações

A estratégia de busca foi realizada a partir de outubro de 2017 e atualizada até setembro de 2019, através das seguintes bases de dados: Library of Medicine (PubMed), Scientific Electronic Library Online (SciELO) e LILACS. Com isso, buscou-se encontrar artigos científicos publicados em jornais, periódicos e revistas nacionais e internacionais, através dos termos: “Anemia, Hemolytic, Autoimmune”, “Anemia, Hemolytic, Autoimmune Treatment”, “Anemia Hemolytic Autoimmune Blood Transfusion”, “Anemia, Hemolytic, Autoimmune, Alloimmunization”, “Anemia, Hemolytic, Autoimmune, Alloimmune”, “Anemia, Hemolytic, Autoimmune, Survival”, “Anemia Hemolytic Autoimmune, Alloimmune, Blood Transfusion” e “Anemia Hemolytic Autoimmune, Alloimmune, Blood Transfusion”.

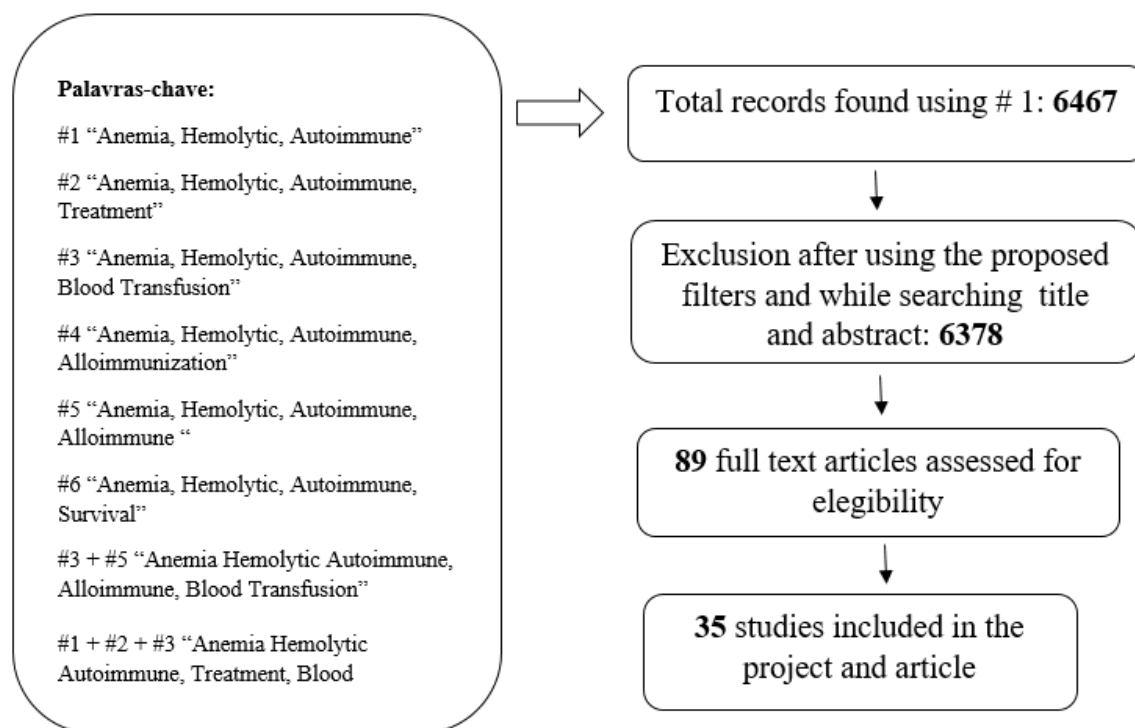


Figura 1: Estratégia para a busca de referências bibliográficas
 Fonte: elaborado pela autora

2.2 Um breve histórico

O desenvolvimento do método científico levou às descobertas da circulação sanguínea por Harvey, no início do século XVI, e aos experimentos com transfusão de sangue por Lower, na Inglaterra, e Denis, em Paris, em meados do século XVII. Apesar desse interesse pelo sangue, a descoberta das hemácias teve que aguardar o surgimento do microscópio, por volta de 1650. A primeira observação de um eritrócito foi, provavelmente, feita por Malpighi em 1661, quando descreveu a circulação de hemácias nos capilares, seguido em 1663 pela descrição de Swammerdan de pequenos glóbulos no sangue de um sapo. Mais tarde, os glóbulos vermelhos humanos foram descritos em detalhes por van Leeuwenhoek, delimitando as dimensões de um eritrócito em cerca de 1/3000 de polegada, comparando com um grão de areia de tamanho conhecido. John Huxham, em 1770, descreveu as mudanças no formato de hemácias em degeneração e reconheceu que essas células originavam a hemoglobina.⁴

O conceito de que a destruição eritrocitária prematura pode levar a um estado de doença e de icterícia foi sugerido, pela primeira vez, em 1871, por Vanlair e Masius. Em uma série de estudos iniciados em 1899, Paul Ehrlich e Julius Morgenroth procuraram identificar os constituintes e definir os mecanismos envolvidos no fenômeno da hemólise imune.⁴

O primeiro tipo de AHAI na qual as características clínico-laboratoriais foram claramente descritas foi a Hemoglobinúria Paroxística ao Frio (HPF). Isso parece, a princípio, surpreendente, porque a HPF é o tipo menos comum de AHAI, porém o reconhecimento precoce deveu-se ao fato de a hemoglobinúria ser um sintoma

marcante, além da considerável prevalência na época, já que a maioria dos casos registrados na literatura médica estava associada à sífilis tardia ou à sífilis congênita. No início dos anos 1900, mais de 90% dos pacientes com HPF crônica tinham um teste positivo para sífilis e, aproximadamente 30%, mostraram evidências clínicas da doença. Com o tratamento eficaz da sífilis, HPF passou a ser um distúrbio extremamente raro, assim como a HPF crônica. Foi nos pacientes com a forma crônica, que se identificou a exposição ao frio como fator para a hemoglobinúria paroxística.⁴

O maior passo à frente na compreensão da patogênese da HPF foi fornecido pelo trabalho de Donath e Landsteiner, cujo famoso relatório foi publicado em 1904. Esses pesquisadores demonstraram que a hemólise era devida a uma autolisina que reagia com as hemácias do paciente em baixas concentrações e temperaturas e que fatores séricos lábeis (complemento) causariam lise das células sensibilizadas, caso a temperatura fosse subsequentemente elevada. Esse procedimento bitérmico para o diagnóstico de HPF foi o primeiro teste imuno-hematológico já descrito. Além disso, esse achado foi amplamente aclamado como a primeira descrição de um autoanticorpo e de doença autoimune humana. O teste é referido como o teste de Donath-Landsteiner (DL), assim como a denominação desse anticorpo, quando detectado. Mesmo depois de um século desde o relato de Donath e Landsteiner, a precisão de suas observações e a utilidade do teste de DL persistem.⁴

2.3 Conceitos básicos

A Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI) se caracteriza pela destruição de hemácias relacionada à ação de autoanticorpos. Os pacientes acometidos por esta enfermidade podem apresentar sintomas anêmicos (fraqueza, tontura, dispneia), hemólise ou outros sintomas associados. Menos frequentemente, nos casos de hemólise grave, o paciente pode apresentar hemoglobinúria, hepatoesplenomegalia e insuficiência cardíaca.⁵

A classificação pode ser realizada quanto ao tipo de autoanticorpo em: AHAI por Anticorpos Quentes (65%), Anticorpos Frios, Hemoglobinúria Paroxística ao Frio, ainda, Mista. Quanto à etiologia, pode ser Primária, também chamada de Idiopática ou Secundária. A tabela abaixo mostra com mais detalhes a classificação:

Tabela 1 Classificação da AHAI

AHAI por anticorpos quentes	Primária	Secundária
		Neoplasia (Leucemia Linfocítica Crônica [LLC], linfoma, tumor sólido)
		Infecção (Hepatite C, HIV, Citomegalovírus [CMV], Varicela Zoster [VZV], infecção pneumocócica, leishmaniose, tuberculose)
		Desregulação imune (desordens do tecido conjuntivo, colite ulcerativa, sarcoidose, pós-transplante, síndromes de imunodeficiência)
AHAI por anticorpos frios		
Doença por Hemaglutinina Fria	Primária	Secundária
		Malignidade (LLC, Linfoma Não Hodgkin, tumor sólido)
		Infecção (micoplasma, mononucleose)
		Doença autoimune
		Pós TCTH Alogênico
Hemoglobinúria Paroxística Fria		Infecção (Adenovírus, Influenza A, Sífilis, CMV, mononucleose, VZV, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>E.coli</i>)
AHAI mista	Primária	Secundária
		Linfoma, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), infecção
AHAI induzida por Aloanticorpos		

Fonte: adaptado de Hill *et al*, 2017.

Em recente revisão sistemática, corroborou-se que ainda não há critérios diagnósticos “standard” para a AHAI e seus subtipos, identificando-se apenas descrições de características clínicas e laboratoriais “típicas”. Como resultado, os estudos utilizam definições diversificadas para diagnóstico, classificação e avaliação de resposta ao tratamento, inviabilizando a adequada comparação entre os trabalhos e, com isso, a determinação das melhores práticas.⁶

Todavia, para a determinação da AHAI, os primeiros passos são confirmar a presença de hemólise, a relação com autoimunidade e o tipo de anticorpo envolvido. Os achados laboratoriais típicos de hemólise são: reticulocitose, bilirrubina indireta aumentada, desidrogenase láctica (LDH) em nível normal ou elevado, haptoglobina reduzida, hemoglobínúria, hemossiderinúria, além da presença de esferócitos, aglutinação ou policromasia em esfregaço de sangue periférico. Ademais, alguns parâmetros podem estar normais, denotando um quadro de hemólise compensada. É necessário diferenciar a AHAI dos demais quadros de anemia hemolítica.⁷

Tabela 2 Diagnósticos diferenciais de anemia hemolítica

Hereditária	Desordens de membrana (esferocitose, eliptocitose)
	Desordens de enzimas (deficiência de G6PD, deficiência de piruvatoquinase)
	Hemoglobinopatias (anemia falciforme, instabilidade adquirida da hemoglobina)
Imune	Autoimunidade (AHAI por anticorpos quentes, frios ou mista)
	Aloimunidade (Doença Hemolítica do Recém-Nascido, reação hemolítica transfusional, pós TCTH Alogênico)
	Induzida por drogas
Não imune	Infecção (Malária, <i>Clostridium perfringens</i>)
	Mecânica (prótese valvar cardíaca)
	Hemoglobinúria Paroxística Noturna
	Microangiopatia trombótica (Púrpura Trombocitopênica Trombótica, Síndrome Hemolítico Urêmica)
	Hiperesplenismo
	Substâncias oxidantes (dapsona, gás arsênico, nitrito)
	Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD)
	Grandes queimados
	Circulação extracorpórea
	Insuficiência renal

Fonte: adaptado de Hill *et al*, 2017.

Ademais, se múltiplos aloanticorpos ou um aloanticorpo contra um antígeno de alta incidência forem formados, poderá ser mais difícil de diferenciar da AHAI, pois tal enfermidade também pode ser desencadeada como consequência da transfusão de CH.

Em suma, um diagnóstico presuntivo de AHAI por anticorpos quentes, por exemplo, pode ser realizado em um paciente que não foi transfundido nos últimos três meses, tem anemia hemolítica adquirida com TAD positivo, não possui aglutinina fria de alta amplitude térmica, não utiliza drogas conhecidas por causar hemólise imunomediada e possui um anticorpo quente com ampla reatividade no soro ou no eluato de glóbulos vermelhos. Tal diagnóstico presuntivo tende a ser correto porque, se as hemácias doadoras não mais permanecerem na circulação do paciente, os aloanticorpos não podem estar causando a anemia hemolítica imune adquirida. Deve-se perceber, no entanto, que um TAD positivo pode persistir por, pelo menos, três a quatro meses após uma Reação Hemolítica Tardia (RHT). Mesmo que o paciente não tenha sido transfundido nos últimos três meses, se recomenda testes adicionais para caracterizar o (s) anticorpo (s) de hemácias do paciente, a fim de evitar erros de diagnóstico e de obter dados imuno-hematológicos relevantes, caso o paciente necessite de transfusão de CH no futuro. Se um paciente foi transfundido nas últimas semanas, tal teste adicional é obrigatório para distinguir entre uma RHT e uma AHAI.

2.4 Os Monócitos

Os monócitos são células da linhagem mielóide e possuem atribuições que vão desde o desenvolvimento e à homeostase dos tecidos, passando pela defesa, pela iniciação e resolução de inflamação e pelo reparo tecidual. A produção, realizada ao longo da vida, é aprimorada durante a “monopoiese de emergência”, a qual ocorre em diversas circunstâncias, tais como na resposta a estímulos infecciosos e inflamatórios, na presença de tumores e no estresse psicossocial crônico.⁸

Os monócitos periféricos humanos atuam como células apresentadoras de antígenos para a ativação das células T e, também, secretam citocinas que modulam a diferenciação desses linfócitos durante condições inflamatórias.⁹

A heterogeneidade dos monócitos é reconhecida há muito tempo e, conseqüentemente, foi categorizada, conforme os níveis de expressão do CD14 (lipopolissacarídeo, receptor LPS) e do CD16 (receptor III de Fcγ), em 3 subgrupos: Clássicos (CD14⁺⁺ CD16⁻), Intermediário (CD14⁺⁺ CD16⁺) e Não Clássico (CD14⁺ CD16⁺⁺).¹⁰ Análises recentes acerca do perfil genético dessas células sugerem que monócitos intermediários desempenham um papel importante na apresentação do antígeno, porém ainda há controvérsias sobre seu perfil de citocinas, com relatos contraditórios ora de expressão pró-inflamatória, ora de anti-inflamatória.¹¹

Ademais, reservas de monócitos clássicos são mantidas na medula óssea e no baço, onde estão disponíveis para o recrutamento imediato em tecidos infectados ou lesados, podendo originar macrófagos ou células dendríticas, a fim de limitar o dano inflamatório e iniciar o reparo tecidual. Já os monócitos não clássicos são caracterizados pela capacidade de remover detritos celulares e de reparar o endotélio durante a homeostase; são menos proliferativos que os monócitos clássicos, porém permanecem na circulação por mais tempo.¹²

Atualmente, estudos vêm mostrando associação de leucocitose e monocitose com doenças inflamatórias agudas, impactando no prognóstico dos pacientes. Segundo Afiune e colaboradores, a monocitose é um marcador de risco independente para Doença Arterial Coronariana.¹³

Em pacientes com Sarcoidose Cardíaca, por exemplo, foi encontrada uma associação significativa entre a proporção de monócitos intermediários (CD14⁺⁺ 16⁺)

e a atividade inflamatória. Além disso, uma diminuição periférica desse subtipo de monócitos foi observada após a corticoterapia, sendo relacionada com uma melhora do padrão dos escores do PET 18F-FDG, um dos métodos utilizados para a avaliação da resposta nesses pacientes.¹⁴

Dentro desse contexto, seria possível que os monócitos exercessem impacto na resposta ao tratamento e na sobrevida de pacientes com AHAI, porém até o momento, não há estudos que busquem essa associação.

2.5 Autoanticorpos e Aloanticorpos

A superfície das hemácias é revestida por antígenos (carboidratos e proteínas) que são ligados às proteínas ou aos lipídeos de membrana. Atualmente, conhece-se trinta e seis sistemas de grupo sanguíneo, sendo que cada um é composto por um ou mais antígenos, os quais são controlados por um único gene ou por genes homólogos. Por sua vez, existem trezentos e sessenta antígenos reconhecidos pela *International Society of Blood Transfusion*.¹⁵

Quando se refere ao fenótipo das hemácias, trata-se da identificação de antígenos, através de testes sorológicos, os quais utilizam anticorpos reagentes, diferentemente do genótipo - metodologia de detecção de antígenos por meio da avaliação do DNA pelos testes de biologia molecular.

Ademais, dos antígenos mais comuns do sistema Rh (D, C, c, E, e), o anticorpo anti-e evidencia-se o mais comumente relacionado à AHAI e, na maioria dos casos é IgM. Com relação ao sistema MNS (M, N, S, s, Mur), o anticorpo anti-S, normalmente IgG tem maior prevalência na AHAI. Já no sistema Kell (K, k, Kp^a, Hp^b, Js^a, Js^b), pode haver uma diminuição transitória da expressão do antígeno Kp^b na superfície eritrocitária no momento de infecção aguda em pacientes com AHAI, fazendo com que o autoanticorpo anti-Kp^b se comporte como um aloanticorpo.⁴

Diante disso, torna-se imperativo elucidar o fenótipo das hemácias de indivíduos com AHAI ou que necessitarão de transfusões de CH. De modo simplista, se o paciente possui anticorpos contra os antígenos próprios, trata-se de um autoanticorpo; caso apresente anticorpos contra antígenos de sistemas de grupos sanguíneos que não compoñham o fenótipo das hemácias, trata-se de um aloanticorpo.⁴

Existem autores que usam o termo “hemólise intravascular” para descrever a destruição de hemácias mediada por complemento, em contraponto ao que ocorre no sistema reticuloendotelial. Poucos anticorpos destroem as hemácias, via intravascular, mediados por complemento: anti-A e anti-B são os únicos exemplos de aloanticorpos que destroem as hemácias dessa maneira; outros, como anti-Jk^a, Jk^b, Vel, P1, Pk e anti-Le^a são capazes de causar lise intravascular de hemácias de doadores em raras ocasiões, mas poucos ativam o complemento de maneira a formar o complexo de ataque à membrana.

A hemólise intravascular também é incomum na AHAI e, quando ocorre, geralmente está associada à Hemoglobinúria Paroxística ao Frio (HPF) e à AHAI por anticorpos quentes, mais comumente em crianças.

Quando as hemácias se encontram sensibilizadas com IgM e o complemento é ativado, frequentemente, ocorre hemólise intravascular. Alguns outros aloanticorpos, como o anti-Le^a, também podem produzir um padrão semelhante de destruição. Embora não haja receptor IgM nos macrófagos, existem receptores para C3b e iC3b; assim, se os glóbulos vermelhos não percorrerem a cascata do complemento, a qual termina na lise, eles podem ser removidos extravascularmente se tiverem atingido o estágio C3. No entanto, esse é um processo ineficiente na ausência de IgG.

Autoanticorpos eritrocitários e aloanticorpos são, geralmente, IgM ou IgG; ocasionalmente podem ser IgA. *In vitro*, os anticorpos IgM aglutinam diretamente glóbulos vermelhos em suspensão com solução salina, lisando as hemácias se as condições forem adequadas. Por exemplo, pode ser necessário o uso de hemácias tratadas com enzima e/ou adicionar complemento fresco para demonstrar a lise. Os autoanticorpos IgG não costumam causar aglutinação direta de hemácias normais em suspensão com solução salina, mas quase sempre aglutinam hemácias tratadas com enzimas ou aglutinam hemácias não tratadas quando estão presentes potencializadores (por exemplo, polietileno glicol). Os autoanticorpos IgG raramente causam lise de hemácias *in vitro* (a hemolisina anti-P bifásica IgG, associada à HPF, é uma exceção), mas geralmente sensibilizam eritrócitos e podem ser detectados pelo TAD.⁴

Uma forma adicional para diferenciar autoanticorpos de aloanticorpos é a própria especificidade, por exemplo, com relação ao sistema Rh, o anti-e, como autoanticorpo, frequentemente causa AHAI e, quando identificado como um aloanticorpo, raramente causa RHT. Já, o anti-E, quando aloanticorpo, relaciona-se fortemente com a RHT; todavia, apresenta-se menos prevalente enquanto autoanticorpo.

2.5.1 Os autoanticorpos também podem imitar aloanticorpos

Já foram descritos, na literatura, muitos pacientes que apresentaram antígenos de membrana mascarados por autoanticorpos no soro; algumas vezes o TAD é negativo (mas o anticorpo pode frequentemente ser eluído de seus glóbulos vermelhos). Assim, o autoanticorpo pode aparecer como um aloanticorpo. Os pesquisadores provaram que, realmente, tratava-se de autoanticorpos, mostrando que, quando a AHAI estava em remissão, o anticorpo não era mais detectável no soro e o antígeno era reconhecido nas hemácias do paciente.

Tabela 3 Autoanticorpos que imitam aloanticorpos

Sistema	Antigenos
Rh	D*, C*, E, c, e*, Ce, G, hb ^{B*}
MN	S, En ^{a*}
Lutheran	Lu ^b , "alta incidência" ^{**}
Kell	K, Kp ^{b*} , "alta incidência" ^{**}
Duffy	Fy ^a , Fy ^{b*}
Kidd	Jk ^{a*} , Jk ^b , JK3
Scianna	Sc1*, Sc3*
Colton	Co ^a
LW	LW ^{a*}
Gerbich	Ge2, "G" ^{**}
Miscelania	AnWi*, Lan

*Autoanticorpo imitando aloanticorpo

Fonte: adaptado de Lawrence e Petz, 2004.

Em 1996, Issitt e colaboradores estudaram aparentes aloanticorpos presentes nos soros de pacientes com autoanticorpos. É interessante notar as diferenças entre adsorções com hemácias autólogas e alogênicas: a adsorção com hemácias alogênicas parece melhor revelar a especificidade de aloanticorpo, do que a adsorção com hemácias autólogas. Além disso, aparentes aloanticorpos detectados após a adsorção com hemácias autólogas eram muito mais propensos a serem autoanticorpos imitando aloanticorpos do que quando os soros eram adsorvidos com hemácias alogênicas. Contudo, outros autores descreveram padrões distintos. Por exemplo, Beck e colaboradores avaliaram um paciente cujo autoanticorpo, ao longo de um período de cinco anos, mudou de “não específico” para específico e a especificidade variou de anti-e para anti-c e anti-f. A conclusão foi a de que tal modificação sofreu a influência do tratamento que o paciente estava recebendo (Prednisona e Metotrexato), sugerindo que determinados clones de imunócitos podem ter sido seletivamente destruídos ou suprimidos. Há pacientes que, primeiramente, produzem um único aloanticorpo após a transfusão e, posteriormente, formam outros aloanticorpos, gerando, eventualmente, autoanticorpos.⁴

2.6 O Teste Antiglobulina Direto

Em 1945, Coombs demonstrou a presença de aloanticorpos Rh não aglutinantes (anticorpos “incompletos” ou “sensibilizadores”) nos soros, pela reação antiglobulina. O TAD, também conhecido como teste de Coombs Direto, é utilizado para detectar o envolvimento de autoanticorpos no processo de hemólise. O TAD irá indicar a presença de imunoglobulina IgG, IgM, IgA ou de complemento (usualmente C3d) na membrana da hemácia. Geralmente, reagentes anti-IgG monoespecífico e anti-C3d são utilizados como rastreio inicial para determinar o tipo de AHAI.⁷

Raramente, pacientes com AHAI apresentam TAD negativo. Isso pode ocorrer devido à baixa afinidade ou à pequena concentração de anticorpos na superfície das hemácias ou, ainda, em razão de imunoglobulina não testada. O método de aglutinação em coluna de gel é o meio de avaliação mais sensível e menos suscetível a erros, em comparação com a avaliação em tubo convencional.¹⁶

De modo geral, parece haver uma relação direta entre a quantidade de IgG nas hemácias e a hemólise *in vivo*. Ademais, sabe-se que eritrócitos sensibilizados com as mesmas quantidades de autoanticorpo IgG podem ter tempos de sobrevivência celular marcadamente diferentes. Da mesma forma, uma pequena parcela de doadores de CH tem um TAD fortemente positivo, com sobrevida normal das hemácias. Ainda não se sabe a razão disso. Pensou-se que a descoberta de que os macrófagos possuíam receptores IgG1 e IgG3, mas não os receptores IgG2 e IgG4, explicaria tais discrepâncias. Hughes-Jones mostrou que as hemácias fortemente sensibilizadas (TAD 4+) com um anticorpo IgG contra o sistema Rh, teoricamente, poderiam ter de 30% a 100% de saturação do antígeno. Embora o macrófago possa explicar tais diferenças, tem sido difícil comparar, com precisão, a sensibilização de eritrócitos por IgG dentro desse intervalo.⁴

2.6.1 Princípios do TAD

Os autoanticorpos e aloanticorpos eritrocitários são gamaglobulinas, geralmente IgM ou IgG. Se IgM, frequentemente ocasionam a aglutinação direta das hemácias suspensas em solução salina; se IgG, não aglutinam os glóbulos vermelhos, mas reagem

com os antígenos de membrana eritrocitários, produzindo uma hemácia "sensibilizada". Por exemplo, o anti-IgG reage principalmente com a porção Fc (isto é, cadeia pesada) das moléculas de IgG humanas; se utilizado anticorpos anticadeias leves poderá haver resultados falso-positivos, já que as cadeias leves são compartilhadas pelas diversas imunoglobulinas e apenas as cadeias pesadas são específicas para cada classe.

Em 1947, Coombs mostrou que o componente que reagia com hemácias sensibilizadas podia ser inibido pela adição de pequenas quantidades de gamaglobulina humana; alfa e betaglobulinas não inibiram a reação. Mais tarde, outros estudos mostraram que a globulina não gama que sensibilizaria as hemácias não era anticorpo, mas complemento.⁴

Tipos de reagentes antiglobulinas humanas:

- a) Antiglobulina Humana (AGH) Poliespecífica: contém anticorpo IgG e C3d do complemento humano e outros anticorpos anticomplemento (C3b, C4b, C4d) também podem estar presentes. A AGH poliespecífica comercialmente preparada contém pouca ou nenhuma atividade contra as cadeias pesadas de IgA e IgM, porém a mistura de soros poliespecíficos pode conter atividade de anticorpos contra cadeias leves kappa e lambda comuns a todas as classes de imunoglobulinas.
- b) Antiglobulina Humana Monoespecífica: contém apenas uma especificidade de anticorpos.

Tipos de técnicas do TAD:

a) Método em tubo: preparar para o teste uma suspensão de 5% de hemácias em solução salina, transferir para um tubo uma gota da suspensão de hemácias e lavar três vezes com solução salina. Pingar uma gota do soro antiglobulina humana (preferencialmente poliespecífico) nas hemácias lavadas, ou de acordo com a rotina estabelecida pelo serviço, homogeneizar, centrifugar e ler, observando a presença (resultado positivo; varia de 1+ a 4+) ou a ausência de aglutinação (resultado negativo).

b) Método em gel: Preparar uma suspensão de hemácias a 1%, centrifugar o tubo com a amostra para sedimentar as hemácias, adicionar a solução de diluição (conforme recomendações do fabricante do kit), acrescentar 10 µL das hemácias centrifugadas, pipetar 50 µL da suspensão no microtubo do cartão específico para Coombs (conforme fabricante do kit), centrifugar e realizar a leitura, observando a presença (resultado positivo; varia de 1+ a 4+) ou a ausência de aglutinação (resultado negativo).

2.6.2 O TAD positivo

O TAD deve refletir o que está acontecendo *in vivo*, porém, um resultado positivo, mesmo devido à sensibilização *in vivo*, não indica necessariamente AHAI ou a presença de autoanticorpo. Dessa forma, existem fatores que podem determinar a positividade do TAD:

- a) Autoanticorpos contra antígenos eritrocitários intrínsecos, levando à sensibilização dessas hemácias, através de imunoglobulinas e / ou componentes do complemento. A anemia hemolítica pode ou não estar presente.
- b) Anticorpos contra medicamentos ligados à membrana de hemácias (por exemplo, penicilina).

- c) Complexos imunes ligados à membrana eritrocitária ou complemento vinculado à membrana de hemácias por ativação remota (por exemplo, complexo antidrogas).
- d) Captação inespecífica de proteína: vários relatos indicam que 65% a 80% das hemácias com TADs positivos produzem eluatos não reativos, sugerindo que nenhum anticorpo eritrocitário está presente. Às vezes, os medicamentos podem modificar a membrana das hemácias, levando à adsorção de muitas proteínas, incluindo a IgG. Um exemplo disso é o TAD positivo, em alguns momentos associado à administração de cefalosporina. Também é possível que essa seja a causa do TAD positivo associado a algumas infecções bacterianas ou virais.
- e) Reações hemolíticas transfusionais: as RTH tardias podem ser muito difíceis de diferenciar, sorologicamente, do AHAI. Os aloanticorpos presentes no receptor podem sensibilizar as hemácias transfundidas, levando a um TAD positivo. Se o (s) aloanticorpo (s) presente (s) no plasma do doador reagem com a maioria das hemácias (por exemplo, anticorpo para um antígeno de alta frequência ou uma mistura de anticorpos específicos), eles podem parecer autoanticorpos.
- f) Transferência passiva de aloanticorpo em produtos transfundidos: aloanticorpos podem estar presentes em produtos derivados do plasma (por exemplo, plaquetas), ou mesmo em CH. Tais anticorpos (incluindo anticorpos ABO) podem sensibilizar os glóbulos vermelhos do receptor e causar uma RHT.
- g) Doença hemolítica do recém-nascido: anticorpos maternos podem atravessar a placenta e sensibilizar hemácias fetais.

Por sua vez, há casos em que o resultado do TAD é falso-negativo e algumas condições, listadas a seguir, podem estar envolvidas:

- a) Má execução da técnica: lavagem insuficiente de hemácias, permitindo a inibição do teste pela imunoglobulina residual; ressuspensão dos eritrócitos centrifugados, utilizando-se de muita força, causando a dispersão de uma aglutinação fraca.
- b) O teste não contém o anticorpo apropriado.
- c) Anticorpo, utilizado no teste, com baixa afinidade e que sensibiliza as hemácias do paciente.

Diante disso, torna-se complexo determinar o significado clínico de um TAD positivo. Se a avaliação for baseada apenas no que concerne à sobrevivência das hemácias, um TAD positivo associado à IgG provavelmente é mais significativo que um teste associado à sensibilização do complemento; entretanto, em muitos pacientes isso pode não ter significado. Bohnen e colaboradores descobriram que 60% de seus pacientes com TAD positivo apresentavam sinais de anemia, porém obtiveram dificuldades em explicar a etiologia dessa anemia; dos pacientes com TAD positivo, 39% haviam recebido transfusões de CH nos últimos 2 meses e aloanticorpos foram detectados em 25% desses pacientes. Os eluatos não foram testados, mas é provável que muitos desses resultados fossem devido a aloanticorpos.¹⁷

Ademais, em uma população hospitalar, a maioria (cerca de 65% a 80%) dos TADs positivos decorrentes da sensibilização por IgG é devida à adsorção não imunológica da IgG plasmática, não apresentando, com isso, significado clínico. Assim, aproximadamente 1 em cada 125 pacientes hospitalizados possuem TAD IgG-positivos com qualquer potencial de significado clínico.¹⁸

2.6.3 O complemento

Existem muitas razões pelas quais os eritrócitos podem ter pequenas quantidades de complemento em sua superfície, exceto como resultado da ativação do complemento por autoanticorpos e aloanticorpos. Uma razão pode estar relacionada à presença do receptor do complemento (CR1) nas hemácias. Este receptor pode se ligar a C3b, iC3b e C4b. Embora todas essas moléculas de complemento sejam produtos de ativação e não se espere que estejam presentes em indivíduos saudáveis, há evidências crescentes de que a baixos níveis de ativação podem estar ocorrendo continuamente, e pequenas quantidades de C3b e de seus produtos de decomposição (iC3b e C3d) estejam presentes no plasma. Por exemplo, Salama e colaboradores mostraram que a ativação do complemento por bactérias pode levar à sensibilização de hemácias previamente não sensibilizadas.¹⁹

Já Siegel e colaboradores sugeriram que os glóbulos vermelhos eram, talvez, mais importantes que os macrófagos na remoção de complexos imunes da circulação e, que a principal função do receptor CR1 poderia ser a de atrair complexos imunes contendo complemento, levando à interação de macrófagos e subsequente depuração. Assim, torna-se aceitável o entendimento de que as hemácias poderiam ser revestidas com pequenas quantidades de complemento, independentemente da ativação exercida pelo anticorpo direcionado contra antígenos eritrocitários.²⁰

2.6.4 Comparação do TAD com o TAI

O TAD é quase sempre mais forte que o TAI (Teste da Antiglobulina Indireto) na AHAI por anticorpos quentes. Parece que o autoanticorpo é amplamente adsorvido nas hemácias do paciente, e somente quando as hemácias são fortemente revestidas é que encontramos uma grande quantidade de anticorpo no soro. Por outro lado, aloanticorpos fortemente reativos podem estar presentes no soro de um paciente, mas esse achado pode não resultar em um TAD fortemente positivo, a menos que esteja presente um grande número de hemácias transfundidas com o antígeno em questão. Assim, a presença de um TAD fracamente positivo em associação com um TAI fortemente positivo é uma evidência presuntiva da existência de um aloanticorpo. Esses achados são, portanto, altamente sugestivos de uma Reação Hemolítica Transfusional. Além disso, mesmo que o TAD seja fortemente positivo no momento da avaliação inicial, em breve poderá se tornar mais fraco em testes subsequentes, como resultado da destruição das hemácias transfundidas ou como resultado da AHAI em tratamento com corticoesteroides, drogas imunossupressoras ou pós esplenectomia.⁴

2.6.5 AHAI associada a um TAD negativo

Aproximadamente, 3% das AHAI apresentam TAD negativo. As causas mais comuns para isso são: IgG ligada às hemácias em concentração inferior ao limite de detecção do teste; IgA e IgM ligadas à membrana eritrocitária que não são detectáveis pela maioria dos reagentes de rotina usados para o TAD e autoanticorpos IgG de baixa afinidade, eliminados durante a fase de lavagem das hemácias.²¹

2.7 Tratamento Farmacológico

O tratamento inicial recomendado inclui o uso de corticoide na dose de 1mg/Kg/dia para pacientes com AHAI por anticorpo quente. Se $Hb < 6g/dL$, imunoglobulina humana endovenosa na dose de 0.4-0.5g/Kg/dia por 5 dias é indicada e aproximadamente 40% desses indivíduos respondem à terapia, sustentando nível de Hb desejado por três semanas ou mais.²² Se o paciente apresentar anemia hemolítica severa ($Hb < 8,5g/dL$) com disfunção orgânica, há a indicação de transfusão de concentrado de hemácias. Nesse caso, são necessários testes para avaliação fenotípica das hemácias do receptor para a liberação de bolsas com o fenótipo mais semelhante com o do paciente. É feita a pesquisa de aloanticorpos (mais comumente Rh ou K), além da averiguação sobre história de gestação (em caso de pacientes do sexo feminino) e de submissão a transfusões prévias.²⁴ Com relação ao manejo não emergencial, recomenda-se profilaxia de tromboembolismo venoso em pacientes com quadro hemolítico agudo e $Hb < 8,5g/dL$, utilizando heparina de baixo peso molecular. Os estudos demonstram que cerca de 21%²⁴ dos pacientes com AHAI, em quadro descompensado de hemólise, apresentaram tromboembolismo venoso. A suplementação de ácido fólico está indicada para evitar anemia megaloblástica e a proteção gástrica com inibidores da bomba de prótons também se faz necessária. Recomenda-se, ainda, suplementar cálcio oral e vitamina D em pacientes usuários de corticoide; já em mulheres pós menopausa com idade maior ou igual a 50 anos indica-se uso de bisfosfonados, caso estas recebam dose superior a 7,5mg/dia de Prednisona por um período igual ou superior a 3 meses.⁷

Ainda, de acordo com a mesma publicação, considera-se critério de resposta à terapia um nível de $Hb > 10g/dL$. Aproximadamente 80% dos pacientes respondem ao corticoide numa dose equivalente a 60-100mg/dia de Prednisona, atingindo remissão completa em 2-3 semanas. Se não houver resposta em 21 dias, considera-se falha aos corticosteroides. Cerca de 20% dos pacientes permanecem em remissão após a descontinuação dos corticosteroides e 40% dos indivíduos podem manter um nível de Hb aceitável com uma dose de Prednisona $< 15-20mg/dia$, porém uma segunda linha de terapia deverá ser considerada, em razão dos efeitos colaterais acarretados pelo uso crônico de corticoide. Como terapias de segunda linha, as mais estudadas e com melhores resultados são o uso de Rituximab e a esplenectomia; as terapias de terceira linha que podem ser empregadas são: Azatioprina, Ciclosporina, Danazol, Mícofenolato Mofetil. Além disso, existem outras opções, tais como Alemtuzumabe e Ciclofosfamida para aqueles pacientes refratários à terceira linha de tratamento. Caso ainda não haja resposta, poder-se-á avaliar a possibilidade de transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico. Com relação ao manejo da AHAI mista, utiliza-se Prednisona 1mg/Kg/dia. Se for secundária, deve-se otimizar o tratamento da doença de base e se for primária, considera-se a imunossupressão como tratamento de segunda linha, semelhante ao tratamento da AHAI primária por anticorpos quentes.

O tratamento para todos os pacientes com AHAI primária por anticorpos frios inclui evitar a exposição ao frio para diminuir o risco de exacerbações e a intervenção terapêutica deverá ser considerada em pacientes com anemia sintomática, disfunção circulatória e com dependência transfusional.²⁵ A esplenectomia deve ser evitada em pacientes com anticorpos IgM como causador da AHAI, uma vez que estes não são removidos pelo baço. Como primeira linha de tratamento sugere-se o uso de Rituximab 375mg/m² a cada 7 dias por 4 semanas, porém cerca de 57-89% dos pacientes recaem em 6.5-11 meses. Num estudo prospectivo, a combinação de Rituximab e Fludarabina atingiu uma taxa de resposta de 76%, com uma média de duração de resposta maior que 66 meses, porém com 44% de toxicidade hematológica grau 3-4.²⁶

Como nova perspectiva de terapia, existe um estudo em fase III, com um inibidor da tirosinquinase esplênico, chamado Fostamatinib, para tratamento da AHAI por anticorpos quentes, apresentando resultados promissores, quanto ao incremento da Hb e o tempo de duração da resposta ao tratamento.²⁷

2.8 Transfusão de Concentrado de Hemácias

Com relação à transfusão de concentrado de hemácias, as indicações para transfusão em pacientes com AHAI não são diferentes daquelas para pacientes anêmicos sem AHAI. A decisão de transfundir não depende apenas dos resultados dos testes de compatibilidade e, sim, de uma avaliação da real necessidade de transfundir o paciente.

No entanto, em muitos pacientes com AHAI, o autoanticorpo reagirá com todas as unidades de CH, tornando assim impossível fornecer sangue compatível, pois o autoanticorpo pode ocultar a presença de aloanticorpos em testes de compatibilidade. O maior desafio técnico enfrentado pelos serviços de hemoterapia em relação aos pacientes com AHAI relaciona-se com a detecção de aloanticorpos eritrocitários em pacientes com autoanticorpo amplamente reativo. Estes aloanticorpos são desenvolvidos como resultado de transfusões prévias ou gestação e são capazes de causar reações hemolíticas transfusionais. Eles podem ser direcionados contra antígenos de uma série de sistemas de grupos sanguíneos, como Rh, Kell, Kidd e Duffy. Segundo Branch & Petz foram detectados aloanticorpos em 209 de 647 soros (32%) de pacientes com AHAI, indicando claramente a necessidade de um método para detecção desses anticorpos, a fim de prevenir reações transfusionais.²⁸ De fato, os aloanticorpos não detectados podem ser a causa do aumento da hemólise após a transfusão, o que pode falsamente atribuído à gravidade da AHAI. Ademais, a identificação de aloanticorpos é feita testando o soro do paciente contra um painel de hemácias de fenótipos conhecidos.

Várias abordagens são úteis para selecionar as unidades de CH mais seguras e compatíveis para transfusão em pacientes com autoanticorpos quentes. Quando o autoanticorpo é menos reativo do que o aloanticorpo, as diferenças da reação contra várias células do painel permitem a identificação. Assim sendo, testes adicionais são pertinentes para avaliar se um aloanticorpo reage mais do que o autoanticorpo (diluição do soro do paciente antes de realizar o teste de compatibilidade, e / ou técnicas de adsorção que removerão o autoanticorpo, mas não os aloanticorpos). Tais testes são, também, muito benéficos para pacientes receberão transfusão de CH pela primeira vez, com o intuito de facilitar a seleção futura de unidades de concentrado de hemácias.²⁹

Transfundir CH em pacientes com AHAI acarreta certos questionamentos, em razão do tempo de meia-vida relativamente curto dos glóbulos vermelhos transfundidos, do mascaramento de aloanticorpos eritrocitários por autoanticorpos e da necessidade de testes imuno-hematológicos complexos pré-transfusionais. Park et al relataram incrementos semelhantes no nível de hemoglobina em pacientes que apresentavam apenas autoanticorpos eritrocitários (1,40-1,70 g / dL), apenas aloanticorpos (1,20-1,60 g / dL) ou sem anticorpos (1,40-1,55 g / dL) 7 dias após a transfusão de 10 ml de CH por kg, sem qualquer aumento do risco de hemólise.³⁰ Das et al encontraram um valor médio de hemoglobina (0,88 g / dL) após transfusão de cada unidade de concentrado de hemácias em pacientes com AHAI.³¹ A maioria dos estudos que relatam a alta frequência de aloanticorpos e autoanticorpos coexistentes descrevem principalmente nos pacientes com AHAI por anticorpos quentes.

Pacientes com AHAI cuja anemia desenvolveu-se lentamente são relativamente assintomáticos e geralmente não requerem transfusões de CH. Por outro lado, a transfusão deve ser indicada quando os pacientes com AHAI apresentam sinais de hipoxemia, como angina, sintomas cardíacos ou neurológicos refletidos por letargia, fraqueza, sonolência e / ou confusão mental. Estes sintomas geralmente ocorrem em pacientes com anemia muito profunda com níveis de hemoglobina abaixo de 5 g / dL. Nas anemias moderadas ($Hb > 8$ g / dL), a transfusão de CH raramente é necessária, pois os sintomas geralmente são controlados com terapia apropriada. Para os pacientes com níveis de hemoglobina entre 5 e 8 g / dL, a decisão clínica para a transfusão é mais difícil. Estes pacientes devem ser acompanhados com observação clínica e laboratorial até que os sintomas críticos da anemia sejam controlados e a hemólise não esteja progredindo; assim sendo, a transfusão não deve ser adiada, porque óbitos foram relatados quando não foi administrado CH.³²

A cinética da destruição de hemácias em pacientes com AHAI por anticorpos quentes é representada por uma curva exponencial decrescente, indicando que o número de células removidas em uma unidade de tempo é uma porcentagem das células presentes no início desse intervalo de tempo; conseqüentemente, se um volume maior de glóbulos vermelhos for transfundido em uma unidade de tempo, a hemólise pode aumentar. Sugere-se que, nessas situações, o volume sanguíneo transfundido deveria ser a menor quantidade necessária para manter o fornecimento adequado de oxigênio e não necessariamente para alcançar um nível arbitrário de hemoglobina. O volume total transfundido não deve exceder 1 mL / kg / hora. Alguns estudos demonstraram que a transfusão de CH não resultou em um aumento significativo da hemólise e não há relatos que demonstraram de forma contundente a exacerbação da hemólise em pacientes com AHAI. Ademais, a indicação para aquecer unidades de sangue antes da transfusão de pacientes com AHAI por anticorpos frios é controversa, e há poucos dados que indicam sua eficácia. Além disso, não foram realizados estudos para avaliar o rendimento da transfusão de hemácias em diferentes temperaturas. Quando apropriadamente indicado, o aquecimento do sangue deve ser monitorado e controlado e a extremidade do paciente escolhida para infusão deve ser mantida aquecida.³⁰

2.8.1 Aloimunização predispondo à formação de autoanticorpos

Os relatos na literatura, acerca do desenvolvimento de AHAI em pacientes aloimunizados surgiram no final da década de 70 e em meados de 1980, com as publicações de Worlledge (afirmando que a aloimunização persistente pode levar à autoimunização) e de Chaplin e Zarkowsky. Estes descreveram quatro pacientes com Doença Falciforme (DF) que desenvolveram AHAI e um quinto paciente desenvolveu TAD positivo sem AHAI. Nos pacientes com AHAI, a anemia era grave, com altas contagens de reticulócitos e os cinco pacientes eram aloimunizados antes de apresentarem autoanticorpos. Todos os pacientes responderam à terapia com corticoesteroides e, após a alta hospitalar, os TADs se tornaram negativos.^{33, 34}

Castellino e colaboradores revisaram os registros médicos de 184 pacientes pediátricos com DF que haviam recebido múltiplas transfusões de CH. Eles descobriram que 14 crianças (7,6%) desenvolveram autoanticorpos eritrocitários quentes (IgG). A exposição mediana à transfusão, no momento da formação dos autoanticorpos, foi de 24 (3-341) unidades de CH. O desenvolvimento de autoanticorpos foi associado à presença de aloanticorpos. Os autores concluíram que a formação de autoanticorpos quentes em associação com transfusões não é evento raro em pacientes pediátricos com DF.³⁵

Young et al demonstraram uma prevalência de 34% de pacientes que desenvolveram autoanticorpos contra anígenos de membrana eritrocitários, numa associação temporal com aloimunização após transfusão sanguínea recente.³⁶

2.8.2 Métodos de avaliação imunohematológica para seleção de bolsas de CH para transfusão

a) Técnica da Diluição

É possível selecionar uma alíquota do soro do paciente que reaja, aproximadamente, 1+ no TAI e, em seguida, testar essa diluição contra um painel de hemácias. Por exemplo, um caso em que o aloanticorpo anti-c tinha um título de 64 e o autoanticorpo um título de apenas 16: quando o soro não diluído foi testado, todas as células reagiram 3+, porém, numa diluição 1:64 do soro do paciente, a reação foi de apenas 1+. Embora essa técnica frequentemente forneça informações úteis, ela é eficaz apenas quando o aloanticorpo possui um título mais alto que o autoanticorpo.

b) Técnica da Adsorção

A adsorção com hemácias autólogas ("autoadsorção a quente") é o método ideal para a detecção de todos os aloanticorpos potencialmente significativos, pois usa os eritrócitos do paciente para adsorver o autoanticorpo do soro, deixando apenas os aloanticorpos. Isso torna-se relevante quando estão presentes aloanticorpos clinicamente significativos para antígenos de alta frequência. Uma outra vantagem da adsorção com hemácias autólogas, em comparação com as adsorções alogênicas, é a necessidade de apenas uma amostra para a técnica, resultando num volume de soro remanescente superior após a adsorção.

Para uma autoadsorção eficaz, parte do anticorpo que reveste as hemácias do paciente deve ser removida antes do procedimento. Para conseguir isso, uma técnica de eluição por calor foi usada originalmente; as hemácias eluídas foram, então, tratadas com enzimas, a fim de aumentar a adsorção de autoanticorpos. Atualmente, utiliza-se de substâncias como enzimas (bromelina, ficina e papaína, tripsina, quimiotripsina) e outras soluções com ditiotreitol (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), 2-aminoetilisotioúria (AET), as quais podem ativar ou inativar antígenos. Há, ainda, uma solução, conhecida como ZZAP que já contém DTT e enzima proteolítica papaína ativada com cisteína, a fim de agilizar a execução da técnica.

Embora pareça uma abordagem conservadora, aguardar três meses após a transfusão antes de se executar a técnica de autoadsorção, ainda é o mais adequado. No entanto, a técnica de adsorção alogênica passa a ser o método de escolha para detectar aloanticorpos em pacientes com AHAI e que necessitam de transfusões repetidas.

2.8.3 Transfundindo o paciente com AHAI

Alguns serviços de hemoterapia ainda utilizam o termo "unidade menos incompatível" na escolha de CH para pacientes com AHAI. Selecionam-se para a transfusão, unidades nas quais aloanticorpos foram identificados e adequadamente contabilizados ou unidades baseadas no painel fenotípico. No entanto, como qualquer unidade escolhida reage com o autoanticorpo do paciente, opta-se por dispensar aquela bolsa que apresentou menos reação, oferecendo, dessa forma, uma maior segurança para

a realização da transfusão. Assim sendo, o termo “unidade menos incompatível” não deveria ser utilizado na prática, pois não transmite informações sobre a extensão dos testes de compatibilidade realizados.

Em contrapartida, em alguns pacientes, o autoanticorpo não interfere no teste de compatibilidade. Isso ocorre porque o autoanticorpo pode ser indetectável no soro do paciente, em razão da adsorção total, ou apenas pode ser detectável por técnicas mais sensíveis daquelas executadas nos testes de rotina, dando, com isso, a impressão de que será realizada uma transfusão com hemácias doadoras compatíveis.

2.8.4 AHAI grave após transfusão de CH

Poucos estudos avaliam, com consistência, a ocorrência de AHAI grave após a transfusão. Sosler e colaboradores descreveram dois pacientes com Doença Falciforme, histórico de múltiplas transfusões e que desenvolveram AHAI grave após uma das transfusões de CH, cujos eritrócitos doadores não possuíam os antígenos contra os quais os pacientes apresentavam aloanticorpo. Em ambos os pacientes, a força da reatividade dos autoanticorpos aumentou após a transfusão e a hemoglobina para níveis de 1,5 g / dL e 4,0 g / dL, respectivamente; os dois pacientes recuperaram-se após terapia com Prednisona.³⁷

2.9 Prognóstico

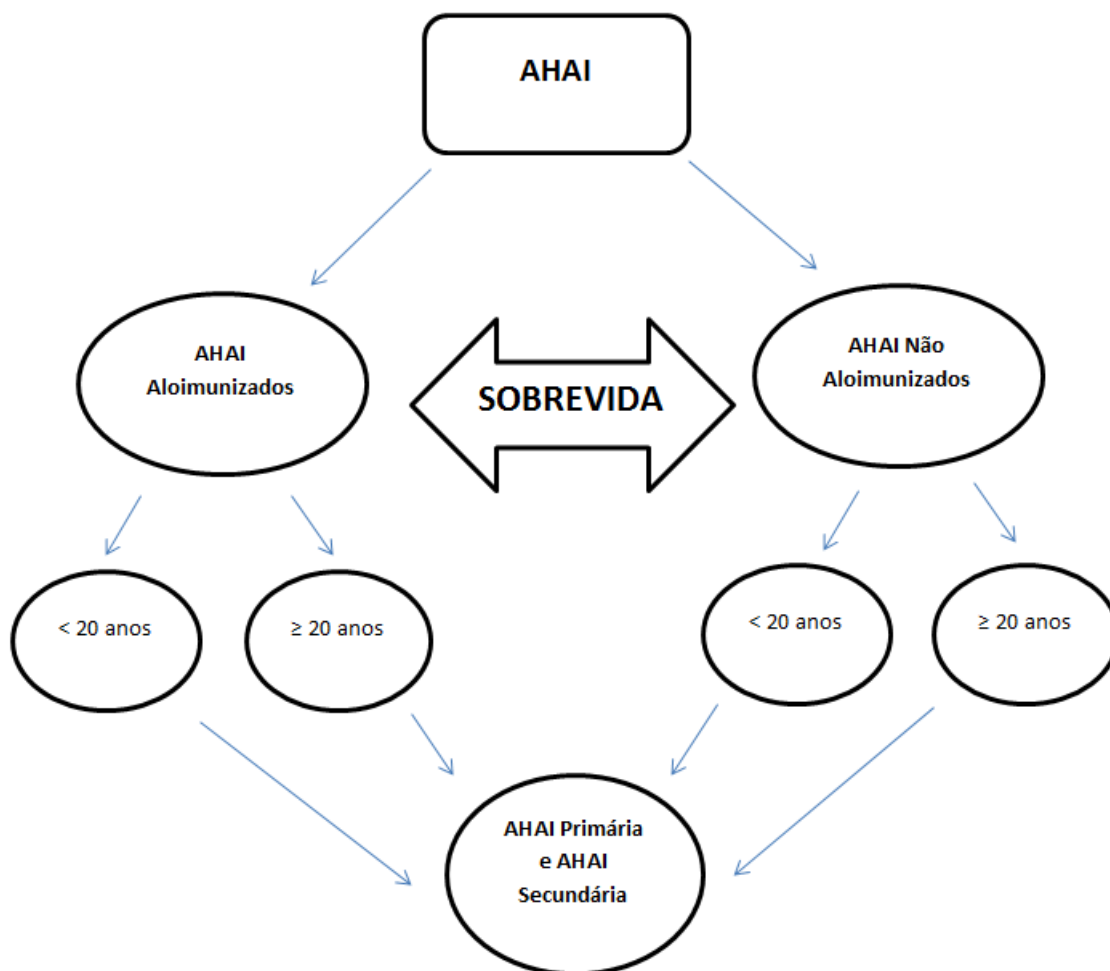
Poucos estudos analisam, com propriedade, o tempo de sobrevida e a taxa de mortalidade dos pacientes com AHAI. Numa série de casos relatados por Habibi et al, em 1974, 80% dos pacientes apresentaram doença aguda e transitória sem ocorrência de óbitos, porém foi verificado uma taxa de mortalidade de 11,2% entre os casos crônicos. Tais pacientes, geralmente, apresentavam distúrbios associados, tais como: trombocitopenia septicemia, infecção por citomegalovírus, aplasia da medula e síndrome da imunodeficiência. A revisão da literatura de Poschmann e Fischer, em 1985 averigou que a mortalidade por AHAI em crianças variava entre 10% a 28%, enquanto que, nos adultos, oscilou entre 28% e 70%.⁴

No entanto, uma coorte que avaliou 154 casos de AHAI descreveu uma taxa de sobrevida, 1 ano após o diagnóstico, em pacientes com AHAI- TAD negativa e com AHAI-TAD positiva de 83% e de 88%, respectivamente.³⁸

Ademais, para Rattarittamrong e colaboradores, numa mediana de 53 meses de acompanhamento, a sobrevida global dos pacientes com AHAI por anticorpos quentes foi de 84%. Como fatores de risco independentes, destacaram-se a idade superior a 50 anos e malignidade; a sepse foi a causa mais comum de morte.³⁹

Numa coorte que avaliou pacientes com Síndrome de Evans (AHAI associada à plaquetopenia), a sobrevida média foi de 7,2 anos, sendo que na síndrome de Evans primária foi de 10,9 anos e, na secundária, evidenciou-se sobrevida de 1,7 anos. Em relação à taxa de mortalidade, a Síndrome de Evans secundária superou qualquer outra coorte, com uma sobrevida em 5 anos de 38%; dentre as causas de óbito, destaca-se: sangramento, infecções e câncer hematológico.⁴⁰

3. MARCO CONCEITUAL



Fonte: elaborado pela autora

4. HIPÓTESE

Pacientes com AHAI e que possuem aloanticorpos apresentam menor sobrevivida, em relação aos pacientes com AHAI não aloimunizados.

5. JUSTIFICATIVA

A AHAI é uma doença infrequente, com poucos estudos clínicos randomizados para auxílio na definição das respostas e das melhores abordagens de tratamento. Quanto aos aspectos relacionados à transfusão de concentrado de hemácias nesses pacientes (mortalidade, interferência de aloanticorpos), uma análise mais minuciosa, englobando o painel imuno-hematológico desses pacientes mostra-se imperativa, uma vez que ajudará a tomada de decisão na prática clínica, implicando na melhoria da assistência.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo principal:

Objetiva-se descrever o perfil clinico-laboratorial, identificar os aspectos imunohematológicos e avaliar sobrevida dos pacientes com AHAI aloimunizados e não aloimunizados.

6.2 Objetivo secundário:

Verificar se os dados relacionados ao hemograma e ao DAT no momento do diagnóstico de AHAI exercem impacto na sobrevida global dos pacientes com a referida enfermidade.

7- MÉTODOS

7.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de coorte, retrospectivo, realizado através de coleta de dados de prontuários médicos, por meio de planilhas padronizadas, a partir de janeiro de 2000 até junho de 2019. Cada paciente recrutado teve o prontuário revisado por um período de 6 meses a partir da data do diagnóstico.

7.2 Contexto

7.2.1 Cálculo de amostra, participantes do estudo e critérios de seleção

Quando calculado o poder da amostra de 80% com um nível de significância de 5%, levando em consideração as prevalências de AHAI em pacientes com TAD positivo, nos estudos de Pirofsky. (1975) e Lawrence e Petz (2004) e no intuito de avaliar a mortalidade, o número da amostra a ser analisada é de 106.

Assim sendo, foram incluídos os pacientes com TAD positivo e critérios de hemólise, corroborados por exames laboratoriais ao diagnóstico, e excluídos os que não tinham critérios de hemólise, ou ainda, que apresentem hemólise, porém sem relação direta com autoimunidade, como, por exemplo, as RHT. Ainda, não participaram do estudo os indivíduos com TAD negativo.

Como limitações do estudo, destacam-se a amostra de conveniência e o fato de tratar-se de uma análise retrospectiva.

7.2.2 Definições

Como já mencionado anteriormente, na AHAI não há critérios padronizados para o diagnóstico e para a avaliação da resposta, ocorrendo discrepâncias entre os autores. Esse trabalho utiliza os critérios que constam nas recomendações, publicadas em 2017, no *British Journal of Haematology*.⁷ Todavia, mesmo em tal publicação, não há posicionamentos determinantes para muitos dos aspectos que envolvem o

diagnóstico e a resposta aos tratamentos. Abaixo, serão listados alguns dos critérios. Com relação aos testes bioquímicos, o intervalo de referência utilizado pelo laboratório do hospital, conforme recomendação do fabricante do equipamento da fase analítica, foi considerado como parâmetro para o estabelecimento dos resultados. Para o diagnóstico de AHAI, necessita-se comprovar a existência de anemia, de hemólise (bilirrubinas, LDH, reticulócitos) e de autoanticorpos. Os seguintes parâmetros foram considerados:

- a) Hb < 12g/dL e VCM >100 fl (ambos sem diferenciação com relação à idade e ao sexo).
- b) Bilirrubina indireta (BI) aumentada (referência: 0,1 - 0,7 mg/dL).
- c) Reticulócitos aumentados (referência 0,5-1,7%). Para a análise foi utilizado o valor em %, após correção pela fórmula: Hematócrito x Reticulócitos/(40 ou 45). A determinação do denominador varia conforme o sexo.
- d) LDH normal ou aumentado (referência: até 247 U/L).
- e) Leucócitos totais (referência: 3.600-11.000 μ /L).
- f) Monócitos (referência: 100-1000 μ /L).
- g) AHAI é considerada severa, quando o nível de Hb está abaixo de 8,5 g/dL.
- h) Considera-se resposta ao tratamento, um nível de Hb maior que 10 g/dL, atingido em 2-3 semanas. Também é admissível como resposta o incremento da Hb (Hb>10 g/L) após, no máximo 21 dias, reduzindo 20-30 mg da dose do corticosteroide por mais 4-6 semanas e, depois, reduzindo 5mg por mês até concluir o tratamento.
- i) AHAI por anticorpos quentes: causada por autoanticorpos IgG ou IgG+C3d, em temperatura de 37° C.
- j) AHAI por anticorpos frios: causada por autoanticorpos IgM ou IgA, ou C3d ou IgG+C3d, em temperatura, geralmente, < 25° C.
- k) AHAI mista: causada pela associação de autoanticorpos quentes e frios: IgG + anti-I ou anti-P ou IgM ou IgA, em temperatura \geq 30° C;

A estratificação da população foi realizada, considerando a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS)⁴⁰, a qual aponta o início da idade adulta a partir dos 20 anos. Para fins de análise, quando oportuna, optou-se por dividir, conforme a idade, em apenas dois subgrupos:

- a) Menores de 20 anos: contempla crianças e adolescentes.
- b) A partir de 20 anos: contempla adultos e idosos.

Com relação à avaliação imuno-hematológica, utilizou-se resultados dos testes de TAD e de PAI (pesquisa e identificação de anticorpos irregulares) - técnicas em tubo e em gel – verificados ao diagnóstico e no período posterior, a fim de averiguar a especificidade do aloanticorpo e do autoanticorpo.

7.3 Local de Execução do Projeto

O estudo se desenvolveu no Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

7.4 Variáveis de Estudo

7.4.1 Fontes de dados

As variáveis analisadas correspondem a raça, idade, sexo, peso, data do diagnóstico (considerada a data de realização do TAD no Banco de Sangue) exames ao diagnóstico (Hb, contagem de reticulócitos e de monócitos, LDH, bilirrubinas, anti-HIV, anti-HCV, HBsAg, sorologia para Citomegalovírus e para Epstein-barr, TAD direto), data da última consulta ou registro de atendimento hospitalar, data do óbito, tratamento(s) indicado(s) e a resposta observada, a realização ou não de transfusão de concentrado de hemácias (CH), painel imuno-hematológico (autoanticorpos e aloanticorpos).

7.5 Análise Estatística

Variáveis contínuas foram avaliadas quanto à sua distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk. Para aquelas com distribuição normal, a medida sumário foi expressa como média e desvio-padrão. Para aquelas com distribuição assimétrica, a descrição foi realizada por mediana e intervalo interquartil (IIQ). Variáveis categóricas foram expressas como frequência absoluta relativa.

As comparações entre grupos envolvendo variáveis categóricas foi realizada pelo teste exato de Fisher. E as variáveis contínuas foram avaliadas com teste T de Student ou U de Mann-Whitney, conforme distribuição.

A análise de sobrevida para fatores categóricos foi realizada através das curvas de Kaplan-Meier, com teste de log rank e, para fatores contínuos, pela regressão de riscos proporcionais de Cox na forma univariada. Após a avaliação inicial das variáveis, foi construído um modelo multivariável pela regressão de Cox em uma estratégia backwise. O modelo final foi avaliado quanto ao seu goodness-of-fit pela análise dos resíduos de Martingale, Deviance, Cox-Snell e Schoenfeld e as variáveis contínuas foram testadas quanto à sua linearidade pelo teste de verossimilhança através da estatística $-2 \log L$.

Os testes estatísticos foram realizados usando o Programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 22.0 (SPSS® Inc, Chicago, IL).

7.6 Aspectos Éticos

No que tange aos aspectos éticos, o protocolo do presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa (CAAE: 88718418418300005327) e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os dados foram extraídos dos prontuários e o Termo de Compromisso para Uso de Dados, foi assinado por todos os pesquisadores e colaboradores envolvidos na pesquisa; neste documento, os pesquisadores declararam cumprir os termos das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 466/12 do CNS).

No presente estudo, há o potencial risco, aos pacientes, de quebra de confidencialidade dos dados de prontuário. Ademais, como não haveria a realização de novos exames e/ou procedimentos invasivos adicionais àqueles determinados pelos médicos assistentes, no intuito de obter dados para a análise de resultados, os pacientes foram poupados da exposição a outros potenciais fatores de risco, desencadeados pela realização do projeto proposto.

REFERÊNCIAS

1. Engelfriet CP, Overbeeke MA von dem BA. Autoimmune hemolytic anemia. *Semin Hematol.* 1992;29((1)):3-12.
2. Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A. The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 2017;176(3):395-411. doi:10.1111/bjh.14478
3. Young PP, Uzieblo A, Trulock E, Lublin DM, Goodnough LT. Autoantibody formation after alloimmunization: Are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia? *Transfusion.* 2004;44(1):67-72. doi:10.1046/j.0041-1132.2003.00589.x
4. Lawrence D. Petz GG. *Immune Hemolytic Anemias.* 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania; 2004.
5. Packman CH. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Rev.* 2008;22(1):17-31. doi:10.1016/j.blre.2007.08.001
6. Hill QA, Hill A, Berentsen S. Defining autoimmune hemolytic anemia: A systematic review of the terminology used for diagnosis and treatment. *Blood Adv.* 2019;3(12):1897-1906. doi:10.1182/bloodadvances.2019000036
7. Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A. The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 2017;176(3):395-411. doi:10.1111/bjh.14478
8. Wolf AA, Yáñez A, Barman PK, Goodridge HS. The Ontogeny of Monocyte Subsets. *Front Immunol.* 2019;10(July). doi:10.3389/fimmu.2019.01642
9. Acosta-Rodriguez E V., Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007;8(6):639-646. doi:10.1038/ni1467
10. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16). doi:10.1182/blood-2010-02-258558
11. Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol.* 2008;67(2):152-159. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x
12. Yona S, Kim KW, Wolf Y, et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity.* 2013;38(1):79-91. doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001
13. Afiune N A, Mansur A P, Avakian S D, Gomes Everly P. S. G., Ramires JA F. Monocitose é um marcador de risco independente para a doença arterial coronariana. *Arq. Bras. Cardiol.* [Internet]. 2006 Mar; 86(3): 240-244. doi:1590/S0066-782X2006000300013.
14. Orii M, Imanishi T, Teraguchi I, et al. Circulating CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte subsets as a surrogate marker of the therapeutic effect of corticosteroid therapy in patients with cardiac sarcoidosis. *Circ J.* 2015;79(7):1585-1592.

15. Storry JR, Clausen FB, Castilho L, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. *Vox Sang*. 2019;114(1):95-102. doi:10.1111/vox.12717
16. Fayek MH, Saad AA, Eissa DG, Tawfik LM, Kamal G. Role of gel test and flow
17. Bohnen RF, Ultmann JE, Gorman JG, Farhangi M SJ. The direct Coomb's test: Its clinical significance. *Ann Intern Med*. 1968;68:19-32.
18. Garratty, G. *The Clinical Significance (and Insignificance) of Red-Cell-Bound IgG and Complement.*; 1988.
19. Salama A M-EC. Binding of fluid phase C3b to nonsensitized bystander human RBCs. *Transfusion*. 1985;25; 528-534.
20. Siegel I, Liu TL GN. The red-cell immune system. *Lancet*. 1981;2; 556-559.
21. Worlledge SM BM. The autoimmune haemolytic anaemias. *Br J Haematol*. 1972;23:61-69.
22. Flores G., Cunningham-Rundles C. NAC& BJB. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune hemolytic anemia: results in 73 patients. *Am J Hematol*. 1993;44:237-242.
23. Petz LD. Review: evaluation of patients with immune hemolysis. *Immunohematology*. 2004;20:167-176.
24. Hendrick AM. Autoimmune haemolytic anaemia – a high risk disorder for thromboembolism? *Hematology*. 2003;8:53-56.
25. Berentsen S. TG. Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia. *Blood Rev*. 2012;26:107-115.
26. Berentsen S, Randen U, Vagan A.M, Hjorth-Hansen H, Vik A, Dalgaard J, Jacobsen E.M, Thoresen A.S BK. High response rate and durable remissions following fludarabine and rituximab combination therapy for chronic cold agglutinin disease. *Blood*. 2010;116:3180-3184.
27. Rigel Enrolls First Patient in Phase 3 Clinical Trial of Fostamatinib Disodium Hexahydrate in Warm Autoimmune Hemolytic Anemia | BioSpace. <https://www.biospace.com/article/releases/rigel-enrolls-first-patient-in-phase-3-clinical-trial-of-fostamatinib-disodium-hexahydrate-in-warm-autoimmune-hemolytic-anemia/>. Accessed October 26, 2019.
28. Branch D.R. PL. Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. *Transfusion*, 39. 1999:6-10.
29. Petz LD. A physician's guide to transfusion in autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol*. 2004;124(6):712-716.
30. Park SH, Choe WH KS. Red blood cell transfusion in patients with autoantibodies: is it effective and safe without increasing hemolysis risk? *Ann*

Lab Med. 2015;35(4):436-444.

31. Das SS, Zaman RU SM. Incompatible blood transfusion: challenging yet lifesaving in the management of acute severe autoimmune hemolytic anemia. *Asian J Transfus Sci.* 2014;8(2):105-108.
32. Yürek S, Mayer B, Lmahallawi MA, Pruss A, Salama A. Precautions surrounding blood transfusion in autoimmune haemolytic anaemias are overestimated. *Blood Transfus.* 2015;13(4):616-621. doi:10.2450/2015.0326-14
33. Worledge SM. The interpretation of a positive direct antiglobulin test. *Br J Haematol.* 1978;39:157-162.
34. Chaplin H Jr ZH. Combined sickle cell disease and autoimmune hemolytic anemia. *Arch Intern Med.* 1981;141:1091-1093.
35. Castellino SM, Combs MR, Zimmerman SA, Issitt PD WR. Erythrocyte autoantibodies in paediatric patients with sickle cell disease receiving transfusion therapy: Frequency, characteristics and significance. *Br J Haematol.* 1999;104:189-194.
36. Young PP, Uzieblo A, Trulock E, Lublin DM, Goodnough LT. Autoantibody formation after alloimmunization: Are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia? *Transfusion.* 2004;44(1):67-72. doi:10.1046/j.0041-1132.2003.00589.x
37. Sosler SD, Jilly BJ, Saporito C, Koshy M. A simple, practical model for reducing alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol.* 1993;43(2):103-106. doi:10.1002/ajh.2830430206
38. Kamesaki T, Toyotsuji T, Kajii E. Characterization of direct antiglobulin test-negative autoimmune hemolytic anemia: A study of 154 cases. *Am J Hematol.* 2013;88(2):93-96. doi:10.1002/ajh.23356
39. Rattarittamrong E, Eiamprapai P, Tantiworawit A, et al. Clinical characteristics and long-term outcomes of warm-type autoimmune hemolytic anemia. *Hematology.* 2016;21(6):368-374. doi:10.1080/10245332.2016.1138621
40. Hansen DL, Möller S, Andersen K, Gaist D, Frederiksen H. Evans syndrome in adults - incidence, prevalence, and survival in a nationwide cohort. *Am J Hematol.* 2019;94(10):1081-1090. doi:10.1002/ajh.25574

9- ARTICLE: Patients with Autoimmune Hemolytic Anemia: description of clinical and laboratory characteristics and analysis related to alloimmunization and survival

Patients with Autoimmune Hemolytic Anemia: description of clinical and laboratory characteristics and analysis related to alloimmunization and survival

Giane Durigon,^{1,2} Leo Sekine,³ Juliana Pires Marafon Franz,³ Laura Maria Fogliatto,⁴ Lucia Mariano da Rocha Silla^{2,4,5}

1. Laboratory Diagnostic Service, Porto Alegre Clinical Hospital, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
2. Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
3. Hemotherapy Service, Porto Alegre Clinical Hospital, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
4. Hematology Service, Porto Alegre Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
5. Hematology Service, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Giane Durigon, Laboratory Diagnostic Service, Porto Alegre Clinical Hospital, Ramiro Barcelos Street, 2350 - Santa Cecilia, Porto Alegre - RS, 90035-903, Brazil. [gidurigon.med@hotmail.com]

ABSTRACT

Introduction: Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA) is characterized by hemolysis caused by autoantibodies and corticotherapy is the initial treatment. However, many patients with such disease do not respond to therapies and are considered refractory. The aim of this study is to describe the clinical and laboratory profile, identify the immunohematological aspects and evaluate the survival of alloimmunized and non-alloimmunized AIHA patients. We also verify data related to the peripheral blood count at the time of AIHA diagnosis and the of the Direct Antiglobulin Test (DAT) in the overall survival of patients with this disease.

Materials and methods: This is a retrospective, single-site observational study that included patients diagnosed with AIHA from January 2000 to June 2019. All participants had laboratory data collected for 6 months from the date of diagnosis. The study was performed through data collection of these patients, including children, adolescents, adults and elderly, all with positive DAT and clinical features of hemolytic anemia, with formation of autoantibodies. Epidemiologic data (race, age, sex and weight), laboratory tests at diagnosis, response to treatments, profile of alloantibodies and autoantibodies, red blood cell transfusion (RBC), and clinical evolution were analyzed. Survival analysis for categorical factors was performed using Kaplan-Meier curves, with log rank test and, for continuous factors, Cox proportional hazards regression.

Results: The study involved 138 patients, most of them white and female. The median age at diagnosis was 48.5 years (0.16-88), with 72.5% of the members (n = 100) in the subgroup of those older than 20 years. In the total sample, 79 (57.2%) patients had secondary AIHA, 60 adults and elderly. Regarding the erythrocyte phenotype, most were from group A RhD positive (30.4%) and 1.4% had undetermined ABO; in order of prevalence, the antigens follow: e (33.3%), C (28.3%), c (20.3%). Furthermore, 33% (25/75) of the patients had alloantibodies at the time of AIHA diagnosis and 40% (16/40) detected the appearance of alloantibodies after. Approximately 28% (n = 39) of the population died and the independent predictors of mortality evidenced were age [Hazard Ratio (HR): 1.41 (1.18-1.69), monocytosis [HR: 3,56 (1.38-9, 19)], DAT intensity at 3+ and 4+ [HR: 5.08 (1.15-22.47)] and IgM class autoantibody [HR: 6.59 (1.18-1.69)].

Conclusion: The cumulative 10-year follow-up overall survival probability was 51% (median survival not reached for this sample, and median follow-up was 39 months), hypothetically because most of the population had severe AIHA. Monocytosis, IgM class autoantibody and DAT intensity, had a significant impact in predicting mortality in this population. In the other hand, alloimmunization at diagnosis and after was not statistically significant. Finally, further work is needed to better elucidate the aspects involved in key outcomes related to AIHA.

Keywords: Autoimmune hemolytic anemia, red blood cell transfusion, alloimmune, survival

INTRODUCTION

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is an uncommon entity characterized by the binding of autoantibodies on the erythrocyte surface and consequent destruction via complement system or reticuloendothelial system.¹ The annual incidence is 1-3 cases/100,000 people and approximately 0.2 cases/1,000,000 in individuals under 20 years old.² The classification can be performed according to the temperature at which the antibody reaction against the red blood cell membrane is triggered in idiopathic or primary AIHA, where there is no correlation with the underlying disease and, in secondary AIHA, when it is associated with other pathologies or with the use of medications.³ Because it is an infrequent and heterogeneous condition, there is no consensus in the literature about the diagnostic criteria and the most effective therapeutic strategy. Added to this, is the fact that little is known about the pathophysiological mechanisms that permeate AIHA, and also about the factors that may influence treatment response. This lack of knowledge concerning AIHA makes difficult to identify patients at risk for refractory disease that will inevitably have their overall survival reduced. In addition, further clarification is needed regarding the involvement of the alloantibody in AIHA and its impact on treatment, response and mortality. For those reasons, studies that identify peculiarities about the pathology in question, as well as possible prognostic factors, are extremely relevant for clinical practice, in order to provide more personalized care. Thus, the purpose of the research was to investigate the clinical and laboratory profile, identify immunohematological aspects and assess survival of patients with AIHA alloimmunized and not alloimmunized. Also, to verify whether the intensity of the DAT or data related to the peripheral blood count at the time of AIHA diagnosis predicts mortality in patients with AIHA.

METHODS

This is a retrospective observational study, performed at the tertiary care hospital of Porto Alegre (HCPA), with 833 hospitalization beds, located in southern Brazil. The patients with AIHA from January 2000 to June 2019 were included, in which each individual had laboratory data collected for 6 months, based on the diagnosis of the disease - determined by the date of positivity of the DAT. Within this six-month period, data related to Hb, leukocyte, monocyte, transfusion, and pharmacological therapy levels were also acquired at 14 days, 21 days, 60 days, 90 days and 180 days after diagnosis. The study was performed by collecting information from electronic medical record system, without age restriction, but with positive DAT and clinical features of autoantibody forming hemolytic anemia. Epidemiologic data (race, age and gender), laboratory tests at diagnosis, response to treatments, alloantibody and autoantibody profile, RBC transfusion, and survival were analyzed.

Patients

Patients of any age and gender with positive DAT (tube or gel technique) and with hemolysis criteria (increased indirect bilirubin, reticulocytosis and normal or increased Lactic Dehydrogenase [LDH]), corroborated by laboratory tests at diagnosis, were selected. Patients with: positive DAT without hemolysis or those with hemolysis but not directly related to autoimmunity, such as Transfusion Hemolytic Reactions (THR), were excluded. Neither were patients with negative DAT

included. The study was approved by the HCPA Research Ethics Committee (REC) (CAAE: 88718418418300005327). The mode of inclusion of the study participants is illustrated in **Figure 1**.

Definitions and Ratings

As previously mentioned, there are no standardized criteria for diagnosis and assessment of response in AIHA, with discrepancies among the authors. This paper uses the criteria established by Hill et al, 2017.⁴ However, even in such a publication, there are no determining positions for many of the aspects that involve diagnosis and response to treatments. The **Table 1** shows the reference ranges for the analytes used in this article.

Regarding biochemical tests, the reference range used by the hospital laboratory, as recommended by the analytical phase equipment manufacturer, was considered as a parameter for the establishment of the results. For the diagnosis of AIHA, it is necessary to prove the existence of anemia, hemolysis (bilirubins, LDH, reticulocytes) and autoantibodies.

The AIHA is considered severe when the hemoglobin (Hb) level is below 8.5g/dL. The response to treatment is to achieve greater than 10 g/dL Hb in 2-3 weeks and maintain the response after the corticosteroid discontinuation; also, commonly, response is acceptable as the increase of Hb ($> 10 \text{ g / L}$) after a minimum of 21 days, with a reduction in the corticosteroid dose by 20-30 mg for 4-6 weeks and then reduced to 5 mg per month until the end of treatment. The warm antibodies AIHA is caused by IgG or IgG+C3d autoantibodies at 37°C ; the cold antibodies AIHA is caused by IgM or IgA autoantibodies, or C3d or IgG + C3d, at temperature generally $< 25^{\circ}\text{C}$ and, the mixed AIHA is caused by the combination of warm and cold autoantibodies: IgG + anti-I or anti-P or IgM or IgA, at temperature $\geq 30^{\circ}\text{C}$.

The population stratification was performed, considering the classification of the World Health Organization (WHO),⁵ which indicates the onset of adulthood from 20 years. For purposes of analysis, when timely, it was decided to divide, according to age, into only two subgroups: under 20 years (children and adolescents) and from 20 years (adults and elderly).

Regarding the immunohematological evaluation, results from DAT and RIA tests (research and identification of irregular antibodies) were used, verified at diagnosis and in the subsequent, in order to ascertain the specificity the alloantibody and autoantibody. The DAT techniques used were in the tube method [preparing to test a 5% suspension of erythrocytes in saline, transferred to a tube drop of a suspension of erythrocytes and wash three times with brine. Drip one drop of human anti-globulin serum (preferably polyspecific) into the washed red blood cells, homogenize, centrifuge and read, observing the presence (positive result; ranges from 1+ to 4+) or absence of agglutination (negative result)] and by the gel method [prepare a 1% red cell suspension, centrifuge the tube with the sample to settle the red cells, add dilution solution (as recommended by the kit manufacturer), add 10 μL of centrifuged red blood cells, pipette 50 μL of suspension into microtube of Coombs- specific card (according to kit manufacturer), centrifuge and read, observing presence (positive: ranges from 1+ to 4+) or absence of agglutination (negative result)].

Statistical Analysis

When calculating the 80% sample power with a significance value of $p < 0.05$, taking into account the prevalence of AIHA in patients with positive DAT, in Pirofsky's studies ⁶ and Lawrence and Petz ⁷ and in order to evaluate mortality, the sample size to be analyzed is 106.

Continuous variables were evaluated for their distribution by the Shapiro-Wilk test. For those with normal distribution, the summary measure was expressed as mean and standard deviation. For those with asymmetric distribution, the description was performed by median and interquartile range (IQR) from P25 to P75. Categorical variables were expressed as relative absolute frequency.

Comparisons between groups involving categorical variables were performed by Fisher's exact test. Continuous variables were assessed using T-test Student or Mann-Whitney as distribution.

Survival analysis for categorical factors was performed using Kaplan-Meier curves, with log rank test and, for continuous factors, by univariate Cox proportional hazards regression. After the initial evaluation of the variables, a multivariable Cox regression model was built in a backwise strategy. The final model was evaluated for goodness-of-fit by analysis of the Martingale, Deviance, Cox-Snell and Schoenfeld residues and continuous variables were tested for their linearity by the likelihood test using the $-2 \log L$ statistic.

Statistical tests were performed using the *Statistical Package for Social Sciences* Program, version 22.0 (SPSS® Inc, Chicago, IL).

RESULTS

Study Sample

The study included a population of 138 patients, consisting of approximately 90% Caucasians and 57% female. The median age at diagnosis was 48.5 years (0.16-88), with 72.5% of the members ($n = 100$) in the subgroup of those older than 20 years. In the total sample, 79 (57.2%) of the patients had secondary AHAI, being 60 adults and elderly, with the following underlying diseases: 19 had some rheumatologic disorder or other autoimmune disease (87.5% with Systemic Lupus Erythematosus [LES]); 16 had hematological disorders (10 with Chronic Lymphocytic Leukemia [CLL], 5 with Non-Hodgkin Lymphoma [NHL] and 1 post Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation [HSCT]); 9 patients had Acquired Immunodeficiency Syndrome [HIV/AIDS]; 8 had active C-virus hepatitis [HCV]; 2 patients had infection by hepatitis B virus [HBV], other 2 cytomegalovirus [CMV] and 1 patient with Epstein - Barr virus [EBV] infection. Finally, 2 patients had solid organ neoplasms and one had a kidney transplant.

Regarding the group of patients under 20 years ($n = 38$), 19 had secondary AIHA, related to the following pathologies, in order of prevalence: SLE, post Allogeneic HSCT, HIV/AIDS, EBV infection, Vitiligo, CMV infection and Autoimmune Sclerosing Cholangitis. The **Table 2** shows more characteristics of the study population.

In the total research population, 9.4% ($n = 13$) of AIHA with associated thrombocytopenia were found, characterizing Evans Syndrome.

Laboratory Profile

At diagnosis, the following parameters were found (expressed as 75th percentile): Hb 7.8 g/dL, MCV: 107 fl, total leukocytes: 11.660 μ /L, monocytes: 850 μ /L, total bilirubin (TB): 4 mg/dL, indirect bilirubin (IB): 2.4 mg/dL (0.1-1.2), LDH: 1.510 U/L and a reticulocyte index of 10.4%. The **Table 3** illustrates the median Hb, WBC and monocytes within 6 months.

Immuno-hematological and Transfusion Profile

Of the 102 patients in whom information was available, 13.8% (n=19) had received RBC transfusion prior to AIHA diagnosis. At the onset of the disease, 59.4% (n=82) of the patients received allogeneic transfusions and 43.5% (n=60) of the individuals in the total study population had the autologous red blood cell phenotype identified. Regarding the phenotype, most were from group A positive RhD (30.4%) and 1.4% had an undetermined ABO; in order of prevalence, follow the antigens found: e (33.3%), C (28.3%), c (20.3%), Jk^a(14.5%), E (13%), Fy^a(10.9%), Fy^b(10.9%), S (9.4%), D (8.7%), s (8%), Jk^b(7.2%), Kell (6.5%), Sm (4.3%), N (3.6%); M (2.9%), Le^b(2.2%), finally Le^a(0.7%). Approximately 35% of women had previous pregnancies.

Considering the DAT, 79% (n = 109) presented intensity of 3+ and 4+ and the autoantibodies profile are expressed in **Figure 2**. Anti-D, anti-e and anti-C autoantibodies have been detected, known in the literature as possible imitators of alloantibodies. In addition, 33% (25/75) had alloantibody at the time of AIHA diagnosis and 40% (16/40) had a posteriori appearance, whose frequencies are shown in **Figure 3**.

The cumulative total RBC transfusion in the sample over the 6-month follow-up period, recorded in hospital records since AIHA diagnosis was on average 2.02 units (SD: 2.81).

Responses to Treatment

About 60% (n = 88) of the study population responded to treatment and 25.5% (23/90) had negative DAT, indicating impact on survival (p=0.003 and p=0.036, respectively). Splenectomy required 14.5% of the patients, and in three of them, the pathological examination revealed the presence of Splenic Non-Hodgkin's Lymphoma. The types of pharmacological treatment, as well as the frequency of patients related to the follow-up period, are shown in **Table 4**.

Survival

The cumulative 10-year follow-up overall survival probability was 51% (median survival not reached for this sample, and median follow-up was 39 months).

The factors associated with survival in the analysis univariate were hematologic response, class antibodies IgM (compared to other classes of antibodies), DAT negativity during treatment, age at diagnosis, MCV and monocyte count (p<0.05). Factors for which no association was found in the univariate analysis were gender, ethnicity, transfusion at diagnosis, type of treatment, IgG and IgA class antibodies, presence of alloantibody at diagnosis, appearance of new alloantibody after diagnosis, hematological, autoimmune or rheumatologic disease, HIV/AIDS, HCV, Hb level, LDH, TB, IB, weight and total RBC transfusion at 6 months. Details on some variables analyzed by Cox regression are shown in **Table 5**.

In the final multivariable model, the following factors were maintained: categorized DAT intensity, response to treatment, IgM class antibodies, age at diagnosis and presence of monocytosis. The magnitudes of the association measures are also described in **Table 5** and the total mortality curves are shown in **Figure 4**.

DISCUSSION

Currently, most of the published works refer to reports, case series and cohorts; these basically emphasize the clinical characteristics and pharmacological treatment employed in the AIHA population. Adds to that the fact that few papers have set out to analyze the aspects immunohaematological involved in the disease in question, however, no study to date has sought correlations between AIHA characteristics and survival. Faced with this, our study aimed to know the clinical, laboratory and immunohematological aspects of the population with AIHA assisted and analyze factors that could have an impact on mortality and survival of these patients.

Regarding the hemolytic profile, the medians of Hb and reticulocytes were similar to the parameters of such analytes in the Mexican cohort of 89 patients (the first that evaluated the characteristics of patients with AIHA in the Latin American population). However, the present study was higher than LDH and lower than TB and IB. ⁸Most patients with both primary and secondary AIHA had Hb <8.5g/dL at diagnosis, being considered severe AIHA and warm autoantibodies predominated. The intensity of DAT 3+ and 4+ and the presence of IgM autoantibody significantly contributed to mortality.

It was found that 33% (25/75) of the patients had alloantibodies at the time of AIHA diagnosis and in 40% (16/40) the appearance of alloantibodies after diagnosis. These prevalences are similar to those in the literature, in which alloantibody rates ranging from 12-40% in AIHA by warm antibodies were found in Caucasians. ⁹It is known that the specificity of these antibodies (commonly class IgM) is against the Rh antigen system, and the D_{Ce} and phenotype most frequent in caucasians and D_{ce} in the black race. In addition, genetic factors may influence the risk of alloimmunization, with the expression or suppression of some types of alleles related to erythrocyte antigens. ¹⁰ Currently, thirty-six blood group systems are known, each consisting of one or more antigens, which are controlled by a single gene or homologous genes, totaling three hundred and sixty antigens recognized by the *International Society of Blood Transfusion*. ¹¹In the study population, the presence of anti-D, anti-e and anti-C autoantibodies, known in the literature as possible imitators of alloantibodies, by masking membrane antigens may be considered as alloantibodies. If the patient is in remission of AIHA and a new DAT is performed, such antibody will disappear, denoting the nature of autoantibody.

According to the literature and corroborated by the publication by Takahashi et al., AIHA can increase MCV above 130 fl, since it correlates with the percentage of reticulocytes and the occurrence of abrupt severe hemolysis. ¹² In the present study, MCV assessed at the time of AIHA diagnosis contributed to mortality [HR: 1.044 (1.004-1.087)].

Concerning monocytes, the suspicion that they participate in the scenario of inflammatory reactions by regulating Treg lymphocyte expression and IL-10 release has been addressed. ¹³ However, in hematology, studies related to Sickle Cell Disease (SCD)

suggest the possibility that circulating monocyte subtypes present differences in FcγR1 expression, playing a role in alloimmunization.¹⁴ Regarding AHAI, a case was reported in an HIV/AIDS patient with Hb: 1g/dL, MCV: 110 fl and RBC transfusion refractory, where almost all red blood cells were visualized, through *Monocyte Monolayer Assay*, inside macrophages.¹⁵ In our study, monocytosis contributed to the population not reaching overall survival.

Regarding response to treatment, a rate of 63,7% (n = 88) was found, which is below most studies reflecting data of 80-84.3%.⁸ One of the hypotheses would be the presence of the alloantibody, allowing the emergence of the mixed or cold behavior autoantibody, since there were patients alloimmunized at diagnosis and also those who acquired alloantibody, denoting an alloantibody-induced AIHA. In literature, it tends to respond to corticosteroids if the causative autoantibody is warm; however, if it is cold, the response tends to be launched with the use of Rituximab,¹⁶ but the pathogenesis of autoantibody formation after RBC transfusion is not well understood.⁹ In our study, anti-E was the most prevalent alloantibody at diagnosis, and afterwards, anti-D and anti-C had increased. These types of antibodies are described in the literature as predominantly IgM class, a fact that may be related to the increase of mortality in the population in question.¹⁷ Furthermore, erythrocytopenia - reflected by the reticulopenia - may occur more frequently in AIHA autoantibody IgA or IgM, requiring the addition of erythropoietin to corticosteroids in order to inhibit such a phenomenon and, therefore, get treatment response.¹⁸

Paradoxically to the publication by Rattarittamrong et al,¹⁹ where at a median of 53 months of follow-up the overall survival of patients with AIHA by warm antibodies was 84%, our sample did not reach the median of survival at a 39-month follow-up. This was hypothetically due to the fact that the majority of the population has severe AIHA, in addition to the impact exerted by factors such as age, monocytosis, DAT intensity and the presence of IgM autoantibody, whereas alloimmunization at diagnosis and after was not statistically significant.

The prevalence of splenectomized patients was 14%, similar the GIMEMA group with 10%.²⁰

Approximately 3% of AIHA have negative DAT. The most common causes for this are: red blood cell-bound IgG below the detection limit of the test; erythrocyte membrane-bound IgA and IgM that are not detectable by most routine reagents used for DAT and low affinity IgG autoantibodies, eliminated during red blood cell washing.²¹ Therefore, one of the limitations of the study, besides the fact that it was performed through the review of medical records, was that it did not cover patients with AIHA and negative DAT.

CONCLUSION

Despite been a retrospective study not including AIHA with negative TAD, our study is the first to link clinical, laboratory and immunohematological nuances with mortality, seeking predictors for this outcome in patients with AIHA. Initial analysis of the blood count - simple and easily accessible test - with particular attention to MCV and monocyte level, may assist in determining the patient profile regarding prognosis. In addition, patient follow-up through DAT, reaching negativity, may contribute to

survival gains, probably due to a more intense monitoring of the autoantibody profile, allowing early changes in the therapeutic strategy.

REFERÊNCIAS

1. Engelfriet CP, Overbeeke MA von dem BA. Autoimmune hemolytic anemia. *Semin Hematol.* 1992;29((1)):3-12.
2. Ladogana S, Maruzzi M, Samperi P, et al. Second-line therapy in paediatric warm autoimmune haemolytic anaemia. Guidelines from the Associazione Italiana Onco-Ematologia Pediatrica (AIEOP). *Blood Transfus.* 2018;16(4):352-358. doi:10.2450/2018.0024-18
3. MA. Gertz. Management of cold haemolytic syndrome. *Br J Haematol.* 2007;138((4)):422-429.
4. Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A. The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 2017;176(3):395-411. doi:10.1111/bjh.14478
5. Young people's health - a challenge for society : report of a WHO Study Group on Young People and "Health for All by the Year 2000." World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41720>. Published 1984.
6. Pirofsky B. Immune haemolytic disease: the autoimmune haemolytic anaemias. *Clin Haematol.* 1975;4(1):167-180. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1102181>. Accessed November 30, 2019.
7. Lawrence D. Petz GG. *Immune Hemolytic Anemias*. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania; 2004.
8. Alonso HC, Manuel AAV, Carlos CGA, et al. Warm autoimmune hemolytic anemia: Experience from a single referral center in Mexico City. *Blood Res.* 2017;52(1):44-49. doi:10.5045/br.2017.52.1.44
9. Romphruk A V., Simtong P, Butryojantho C, et al. The prevalence, alloimmunization risk factors, antigenic exposure, and evaluation of antigen-matched red blood cells for thalassemia transfusions: a 10-year experience at a tertiary care hospital. *Transfusion.* 2019;59(1):177-184. doi:10.1111/trf.15002
10. Raos M, Zunec R. Susceptible and protective HLA-DR and HLA-DQ alleles for Fya alloimmunization in the Croatian population. *Transfusion.* 2019;59:1118-1124.
11. Storry JR, Clausen FB, Castilho L, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. *Vox Sang.* 2019;114(1):95-102. doi:10.1111/vox.12717
12. Takahashi N, Kameoka J, Takahashi N, et al. Causes of macrocytic anemia among 628 patients: mean corpuscular volumes of 114 and 130 fL as critical markers for categorization. *Int J Hematol.* 2016;104(3):344-357. doi:10.1007/s12185-016-2043-x
13. Liu B, Dhanda A, Hirani S, et al. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes are enriched by glucocorticoid treatment and are functionally attenuated in driving effector T cell responses. 2016;194(11):5150-5160. doi:10.4049/jimmunol.1402409.CD14
14. Balbuena-Merle R, Curtis SA, Devine L, et al. Red blood cell alloimmunization

is associated with lower expression of FcγR1 on monocyte subsets in patients with sickle cell disease. *Transfusion*. July 2019. doi:10.1111/trf.15463

15. Conrado MA, Leão Bonifácio S, Nogueira FM, et al. Massive autoimmune hemolysis documented by monocyte monolayer assay in a multiply transfused patient using reticulocytes isolated by simple centrifugation in microhematocrit tubes. *Transfusion*. 2018;58(7):1578-1579. doi:10.1111/trf.14511
16. Sigler E, Shvidel L, Yahalom V, Berrebi A, Shtalrid M. Clinical significance of serologic markers related to red blood cell autoantibodies production after red blood cell transfusion - Severe autoimmune hemolytic anemia occurring after transfusion and alloimmunization: Successful treatment with rituximab. *Transfusion*. 2009;49(7):1370-1374. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02163.x
17. López-Díaz PE, Ruiz-Olivera M del R, Hernández-Osorio LA, et al. Irregular antibodies in no hemolytic autoimmune diseases are able to induce erythrophagocytosis. *Immunol Res*. 2017;65(1):410-418. doi:10.1007/s12026-016-8853-3
18. Bartolmäs T, Mayer B, Balola AH, Salama A. Eryptosis in autoimmune haemolytic anaemia. *Eur J Haematol*. 2018;100(1):36-44. doi:10.1111/ejh.12976
19. Rattarittamrong E, Eiamprapai P, Tantiworawit A, et al. Clinical characteristics and long-term outcomes of warm-type autoimmune hemolytic anemia. *Hematology*. 2016;21(6):368-374. doi:10.1080/10245332.2016.1138621
20. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A, et al. Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: a GIMEMA study of 308 patients. *Blood*. 2014. doi:10.1182/blood-2014-06
21. Worlledge SM BM. The autoimmune haemolytic anaemias. *Br J Haematol*. 1972;23:61-69.

Figure 1 - Selection of patients

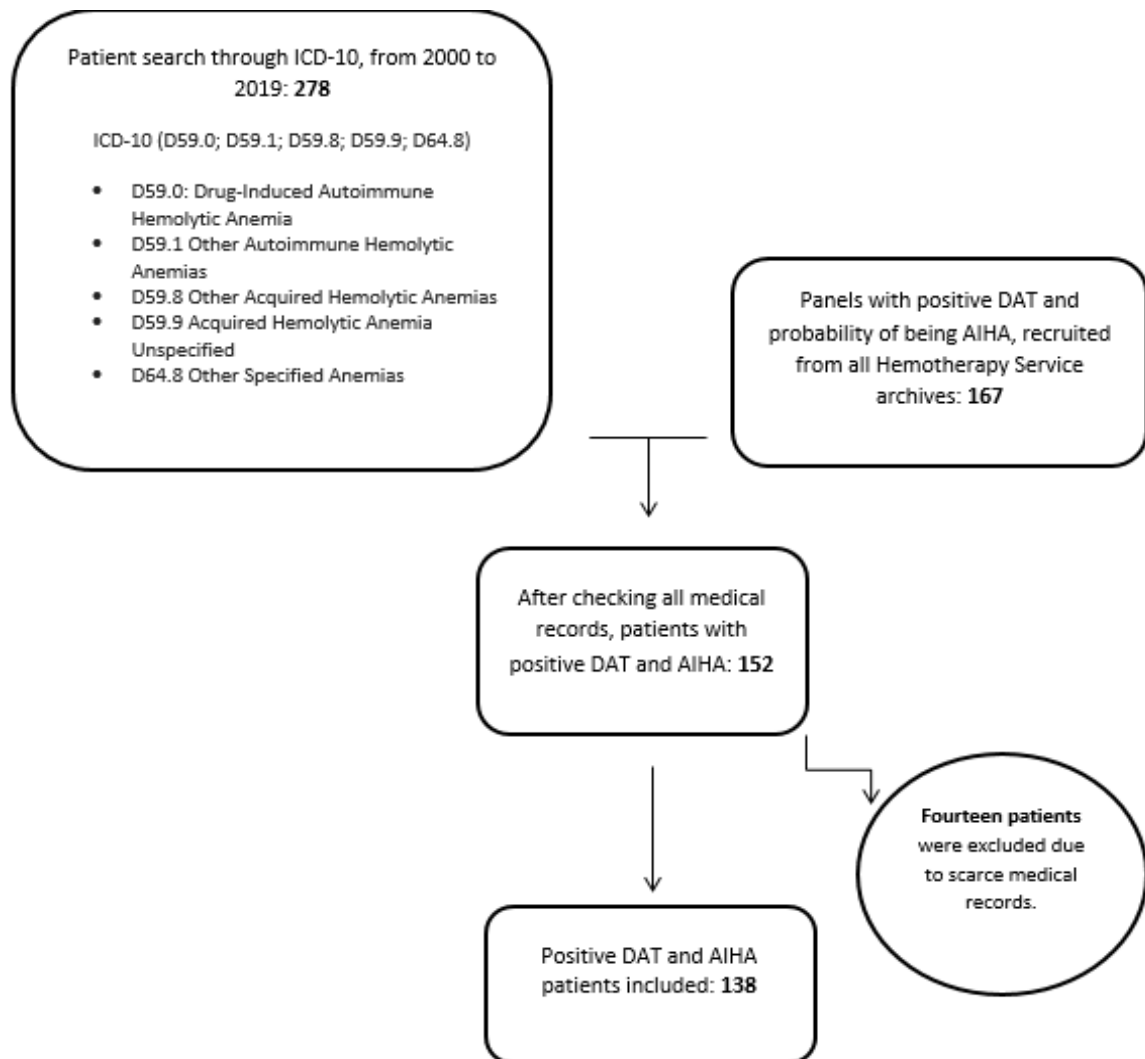


Table 1 – Reference ranges for the analytes used in this article

Parameters	Reference values
Hemoglobin (Hb) < 12g/dL*	no age or gender differentiation
MCV > 100 fl	no age or gender differentiation
Increased indirect bilirubin (IB)	0.1-0.7 mg/dL
Reticulocytes increased	0.5 to 1.7%**
Normal or increased Lactic Dehydrogenase (LDH)	up to 247 U/L
Total leukocytes	3,600-11,000 μ /L
Monocytes	100-1000 μ /L

* AIHA is considered severe when the Hb level is below 8.5g/dL **we used the % value after correction by the formula: Hematocrit x Reticulocytes/40 or 45 (denominator determination varies by gender)

Table 2- Characteristics of the study population

	< 20 years	≥20 years
Primary AIHA N=59 (42,7%)	N=19 (13,8%)	N=40 (29%)
Hb<8,5 g/dL	18/19 (94,7%)	31/40 (77,5%)
Monocytes > 1000u/L	5/19 (26,3%)	5/40 (12,5%)
Warm autoantibody	16/19 (84,2%)	30/37 (81%)
Cold autoantibody	0	6/37 (16,2%)
Mixed	3/19 (15,8%)	1/37 (2,7%)
Presence of alloantibodies at diagnosis	7/12 (58,3%)	8/35 (22,8%)
RBC transfusion before diagnosis	3/19 (15,8%)	5/35 (14,3%)
Previous pregnancy	1/19 (5,3%)	18/40 (45%)
RBC transfusion*	31	40
DAT negativity	5/11 (45,4%)	5/17 (29,4%)
Splenectomy	2/19 (10,5%)	9/40 (22,5%)
Response	9/19 (47,4%)	21/40 (52,5%)
Death	3/19 (15,8%)	11/40 (27,5%)
Secondary AIHA N=79 (57,2%)	N= 19 (13,8%)	N= 60 (43,5%)
Hb<8,5 g/dL	12/19 (63,1%)	47/60 (78,3%)
Monocytes > 1000u/L	7/19 (36,8%)	9/60 (15%)
Warm autoantibody	16/19 (84,2%)	45/53 (84,9%)
Cold autoantibody	0	5/53 (9,4%)
Mixed	3/19 (15,8%)	3/53 (5,7%)
Presence of alloantibodies at diagnosis	3/16 (18,7%)	14/44 (31,8%)
RBC transfusion before diagnosis	3/18 (16,7%)	8/43 (18,6%)
Previous pregnancy	1/19 (5,3%)	26/60 (43,3%)
RBC transfusion*	53	146
DAT negativity	4/12 (33,3%)	8/25 (32%)
Hematologic disease	3/19 (15,8%)	16/60 (26,6%)
Rheumatologic disease	7/19 (36,8%)	16/60 (26,6%)
HCV in activity	0	8/60 (13,3%)
AIDS	3/19 (15,8%)	9/60 (15%)
CMV Infeccion	1/19 (5,3%)	2/60 (3,3%)
EBV Infeccion	2/19 (10,5%)	1/60 (1,7%)
Splenectomy	1/19 (5,3%)	6/60 (10%)
Response	13/19 (68,4%)	35/60 (58,3%)
Death	1/19 (5,3%)	21/60 (35%)

*Total Red Blood Cel (RBC) units per group within 6 months of follow-up. AIHA: Autoimmune Hemolytic Anemia Hb: hemoglobin. DAT: Direct Antiglobulin Test. HCV: hepatitis C virus. CMV: Cytomegalovirus. EBV: Epstein-barr virus.

Table 3- Median hemoglobin, leukocytes and monocytes during follow-up

	D0	D+14	D+21	D+60	D+90	D+180
Hemoglobin (g/dL)	7.8	9.8	11.2	12.5	12.9	12.6
Leukocytes (μ /L)	11.660	11.247	11.315	10.820	11.565	9.687
Monocytes (μ /L)	850	869	780	732	772	741

Data expressed in percentile75. D0 (at diagnosis), D + 14 (14th day after diagnosis), D + 21 (21st day after diagnosis), D + 60 (60th day after diagnosis), D + 90 (90th day after diagnosis), D + 180 (180th day after diagnosis)

Figure 2- Prevalence of autoantibodies at diagnosis

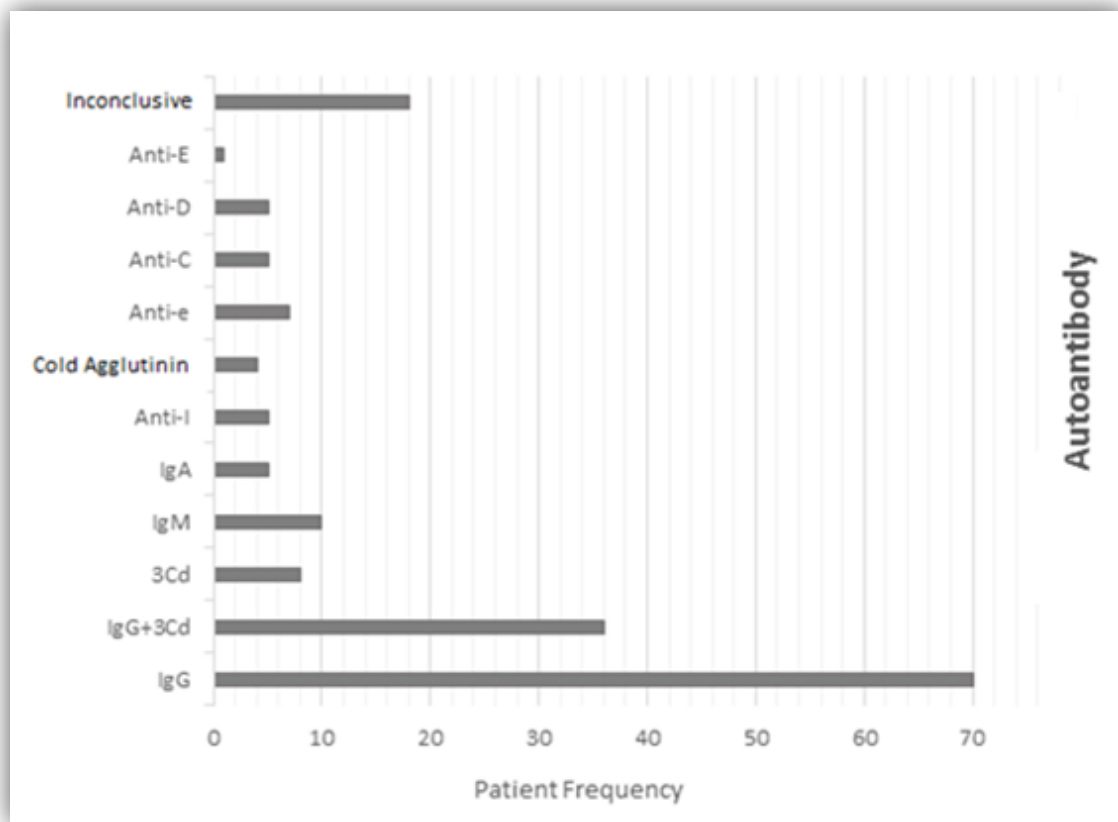


Figure 3- Prevalence of alloantibodies at diagnosis and after diagnosis

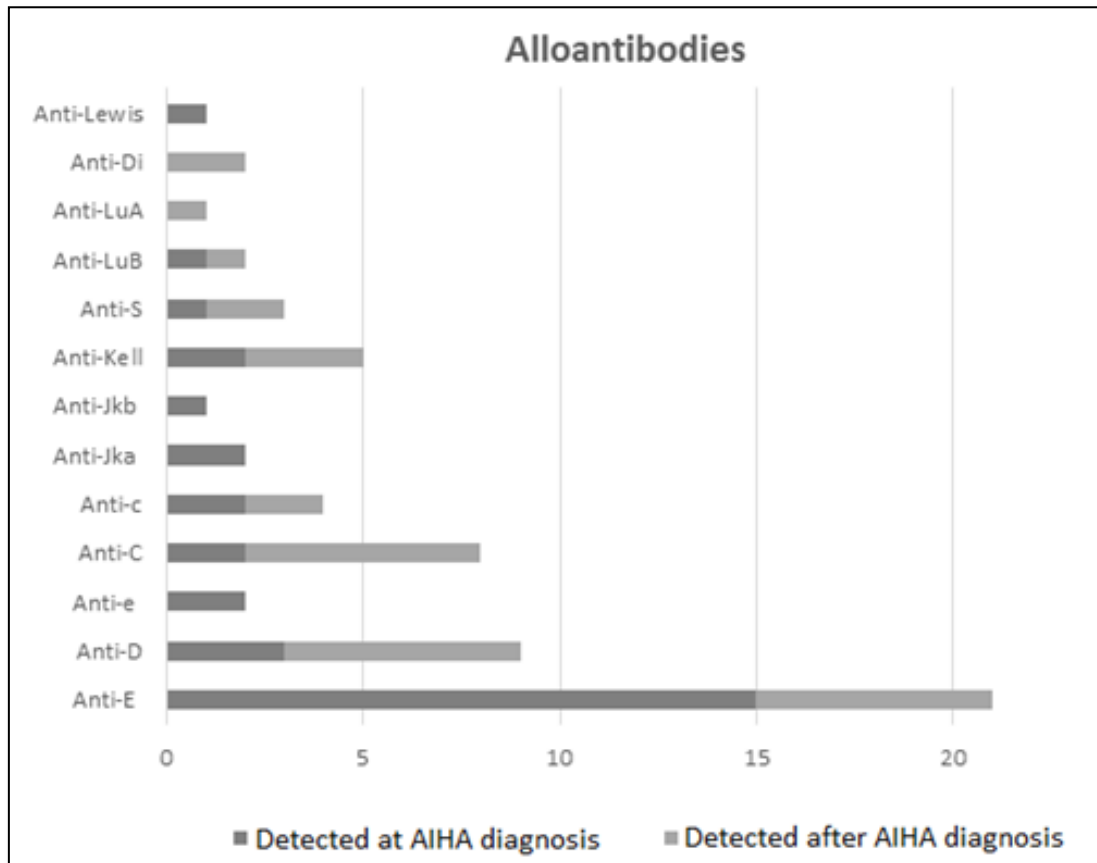


Table 4- Types of treatments verified within 180 days of diagnosis

	D0	D+14	D+21	D+60	D+90	D+180
Corticosteroid	113 (81,9%)	99 (71,7%)	91 (65,9%)	63 (45,7%)	57 (41,3%)	39 (28,3%)
Rituximab	2 (1,4%)	4 (2,9%)	6 (4,3%)	5 (3,6%)	3 (2,2%)	6 (4,3%)
Corticosteroid + IVIG*	10 (7,2%)	5 (3,6%)	3 (2,2%)	4 (2,9%)	1 (0,7%)	3 (2,2%)
Others**	13 (9,4%)	13 (9,4%)	18 (13%)	19 (13,8%)	17 (12,3%)	19 (13,8%)
No treatment	0	1 (0,7%)	1 (0,7%)	18 (13%)	31 (22,5%)	41 (29,7%)

D0 (at diagnosis), D + 14 (14th day after diagnosis), D + 21 (21st day after diagnosis), D + 60 (60th day after diagnosis), D + 90 (90th day after diagnosis), D + 180 days (180th day after diagnosis) * IVIG: human immunoglobulin ** Treatments specific to secondary disease and other immunosuppressants

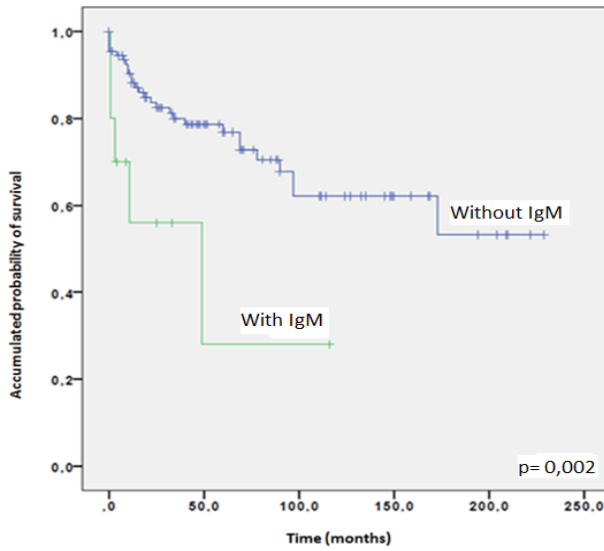
Table 5 - Univariate analysis and Cox multivariate model for mortality outcome

	HR	IC95%	p	HR	IC95%	p
MCV (fl)*	1,044	1,00-1,09	p= 0,033			
Leukocytes/1000 µ/L	1,005	1,00-1,01	p= 0,033			
Monocytes/1000 µ/L	1,13	1,02-1,26	p= 0,020	3,564	1,38-9,19	p= 0,009
Age/10 years	1,339	1,15-1,56	p< 0,001	1,417	1,18-1,70	p< 0,001
IgM Antibody	3,292	1,25-8,63	p= 0,015	6,596	1,98-21,93	p= 0,002
DAT** (1+ e 2+)	1	-	-			
DAT** (3+ e 4+)	1,11	0,49-2,53	p=0,803	5,086	1,15-22,47	p=0,032
Response to treatment	0,317	0,14-0,73	p= 0,007	0,271	0,11-0,64	p= 0,003
Hemoglobin (g/dL)	0,961	0,83-1,11	p= 0,584			
Reticulocytes (%)	0,957	0,90-1,02	p= 0,160			
Total Bilirrubin (mg/dL)	1,005	0,90-1,12	p= 0,928			
Indirect Bilirrubin (mg/dL)	0,988	0,86-1,14	p= 0,867			
Latic Dehydrogenase (U/L)	1	1,00-1,00	p= 0,211			
RBC transfusion (unit)***	1,122	0,95-1,29	p= 0,170			

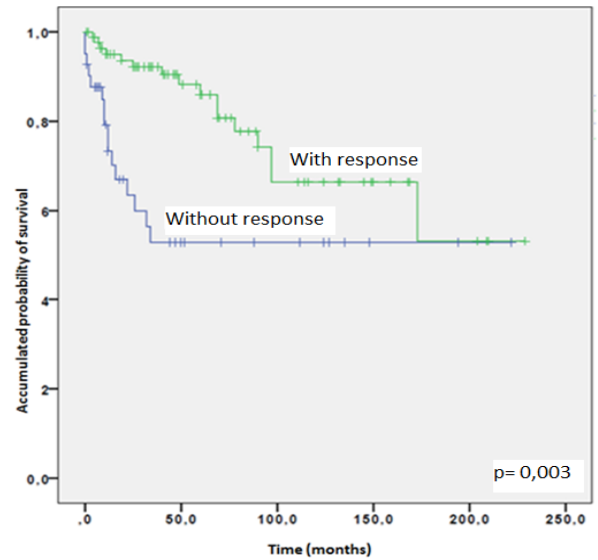
*Mean Corpuscular Volume **Direct Antiglobulin Test *** Total transfusion of red blood cell units within 6 months of follow-up. The Monocytes variable was stratified (Monocytes < or equal to 1000 x Monocytes > 1000) in the multivariable model because it did not meet the assumption of linearity of the association.



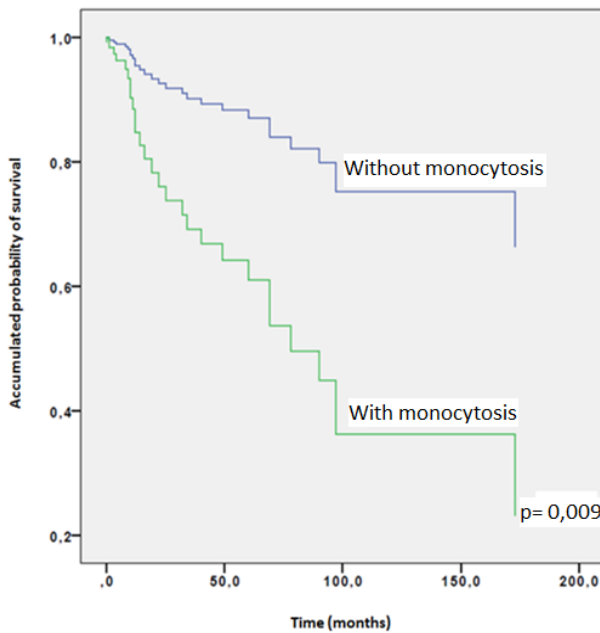
Figure 4 - Total mortality curves stratified by the presence of IgM autoantibody, treatment response, monocytosis and DAT intensity after Cox multivariate analysis. a) IgM class autoantibody, b) Response to treatment, c) Monocytes at diagnosis, d) DAT intensity at diagnosis



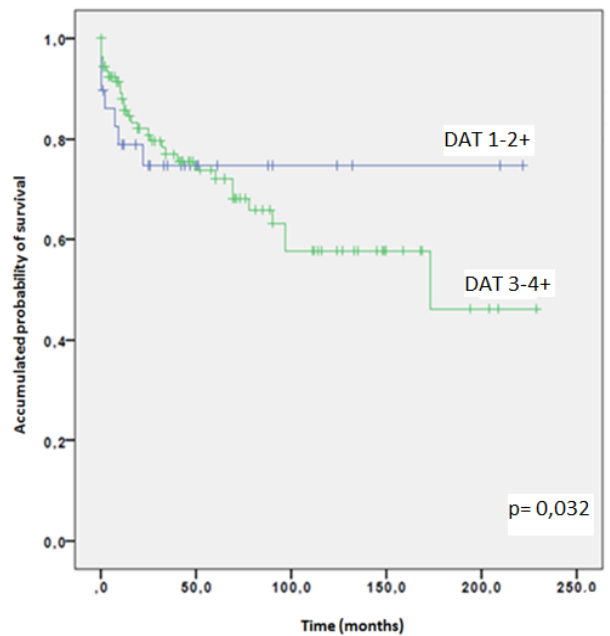
a) IgM class autoantibody



b) Response to treatment



c) Monocytes at diagnosis



d) DAT intensity at diagnosis

10. ANEXO 1: STROBE

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cohort studies*

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract <hr/> (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
<hr/> Introduction <hr/>		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
<hr/> Methods <hr/>		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <hr/> (b) For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those

		used to control for confounding
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions
		(c) Explain how missing data were addressed
		(d) If applicable, explain how loss to follow-up was addressed
		(e) Describe any sensitivity analyses
Results		
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed
		(b) Give reasons for non-participation at each stage
		(c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
		(c) Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures over time
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
Discussion		
Key results	18	Summarise key results with reference to study

objectives

Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results
<hr/> Other information		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at <http://www.strobe-statement.org>.