

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
FISIOPATOLOGIA

CAMILA RODRIGUES

Estudo da associação entre HLA e aloimunização aos antígenos eritrocitários em
pacientes politransfundidos com anemia falciforme

Maringá
2013

CAMILA RODRIGUES

Estudo da associação entre HLA e aloimunização aos antígenos eritrocitários em
pacientes politransfundidos com anemia falciforme

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia.

Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof^a Dr^a Jeane Eliete Laguila Visentainer

Co-Orientador: Prof^a Dr^a Ana Maria Sell

Maringá
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

R696e Rodrigues, Camila
Estudo da associação entre HLA e aloimunização aos antígenos eritrocitários em pacientes politransfundidos com anemia falciforme / Camila Rodrigues. -- Maringá, 2013.
57 f. + Apêndices : il., figs., tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Jeane Eliete Laguila Visentainer.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Sell.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Bimédicas, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, 2013.

1. HLA. 2. Aloimunização. 3. Antígenos eritrocitários. 4. Anemia falciforme. 5. Transfusão sanguínea. I. Visentainer, Jeane Eliete Laguila, orient. II. Sell, Ana Maria, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Bimédicas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia. IV. Título.

CDD 21.ed. 616.0796

ECSL-001272

FICHA DE APROVAÇÃO

CAMILA RODRIGUES

Estudo da associação entre HLA e aloimunização aos antígenos eritrocitários em
pacientes politransfundidos com anemia falciforme

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Prof^a Dr^a Jeane Eliete Laguila Visenteiner
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dr^a Tatiana Takahashi Higa
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Daniela Maira Cardozo
Universidade Estadual de Campinas

Prof^a Dr^a Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 03 de dezembro de 2013.

Local de defesa: Sala 112-B, Bloco T-20, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, João e Terezinha e meu noivo, André Luiz que são minha inspiração para todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui, iluminando meus caminhos e pensamentos, sempre me dando forças para nunca desistir.

Aos meus pais, João e Terezinha, por todo o esforço e companheirismo concedido, por sempre terem acreditado em mim e por toda confiança depositada.

Ao meu noivo, André Luiz, que sempre esteve ao meu lado me auxiliando, me dando suporte em todos os obstáculos que enfrentei e esperanças nos momentos de fraqueza.

Às amigas que fiz durante esta etapa da minha vida, Emília, Luciana, Joana, Josiane, Ana Paula e Adriana, por terem sido parte essencial na conclusão deste trabalho e pelo companheirismo de todos os dias.

Aos técnicos do Laboratório de Imunogenética, Fabiano, Marco, Helen e Edna por todo auxílio e atenção que me forneceram sempre quando precisei.

Aos funcionários do Hospital do Câncer e Hemocentro Regional de Maringá, Mari Elen, Sandra Schiller, Loide Hirle e à Dr.^a Tatiana Higa pela disponibilidade e auxílio na coleta das amostras e fornecimento dos dados dos pacientes.

À Prof.^a Dr.^a Lilian Castilho e à doutoranda Gláucia Guelsin pela dedicação concedida e pela parceria com o projeto que funcionou muito bem e que pretendemos continuar mantendo.

À minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Ana Sell pelo companheirismo, auxílio e aprendizado durante este período de trabalho e por todo conhecimento transmitido.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Jeane Visentainer pelos dois anos de trabalho juntas, pela amizade, dedicação e todo conhecimento transmitido. Muito obrigada pelas oportunidades oferecidas e por toda confiança depositada. Acredito que fizemos e poderemos fazer ótimos trabalhos juntas!

EPÍGRAFE

“O verdadeiro valor de um ser humano é determinado principalmente pela medida com que atinge a libertação de si próprio.”

(Albert Einstein)

Estudo da associação entre HLA e aloimunização aos antígenos eritrocitários em pacientes politransfundidos com anemia falciforme

RESUMO

A aloimunização aos antígenos eritrocitários é uma resposta imunológica importante que pode ocorrer depois de repetidas transfusões. No entanto, existem diferenças entre as respostas imunológicas de pacientes que recebem o mesmo número de transfusões. O sistema HLA vem sendo associado em alguns estudos com a pré-disposição ao desenvolvimento de aloanticorpos anti-eritrocitários. Outros fatores também podem estar associados como idade, sexo e número de transfusões. O presente estudo teve como objetivo investigar a possibilidade da aloimunização aos antígenos eritrocitários estar associada ao HLA de cada indivíduo, e também a fatores como sexo e número de transfusões. Participaram do estudo 172 pacientes politransfundidos com anemia falciforme (128 não aloimunizados e 44 aloimunizados). Após a coleta de dados clínicos e laboratoriais de cada paciente, foi realizada a genotipagem eritrocitária pelo método de *Microarray* e das variantes alélicas HLA pela técnica de PCR-SSO (One Lambda-Luminex). As frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas foram obtidas pela contagem direta e analisadas por Qui-Quadrado e/ou Teste Exato de Fisher. Os resultados demonstraram que as variantes alélicas *HLA-C*06* e *HLA-DQB1*03* se apresentaram significativamente elevadas em pacientes aloimunizados contra o sistema Rh (48,8%) e Kell (17%). Quando analisados pacientes com anti-Fy^a e anti-K, foi possível observar que *HLA-DRB1*04* e *HLA-DRB1*11*, respectivamente, foram mais frequentemente encontrados em indivíduos que desenvolveram estes aloanticorpos. Também foi possível observar que o número de mulheres aloimunizadas foi maior do que de homens, e que o número de transfusões influenciou diretamente no processo de aloimunização.

Palavras-chave: Aloimunização eritrocitária. HLA. Anemia falciforme. Transfusões sanguíneas.

Association between HLA alloimmunization to erythrocyte antigens in massively transfused patients with sickle cell anemia

ABSTRACT

The red blood cell (RBC) alloimmunization is an important immune response that can occur after multiple transfusions. However, there are differences in the immune responses of patients who receive the same number of transfusions. The HLA system has been associated in some studies with predisposition to the development RBC alloantibodies. Other factors may also be associated with alloimmunization, like age, sex, and number of transfusions. The aim of this study was to investigate the possibility of RBC alloimmunization being associated with HLA being of each individual, including factors like as gender and number of transfusions. One hundred and seventy-two (172) polytransfused patients with sickle cell disease participated of the study (128 non-alloimmunized and 44 alloimmunized). After the collect of clinical and laboratory data of each patient was performed the erythrocyte genotyping was performed by *Microarray* method and HLA genotyping by PCR-SSO (One Lambda[®], Luminex). Allelic, genotypic and phenotypic frequencies were obtained by direct counting and analyzed by Chi square and/or Fisher's Exact Test. The results showed that the *HLA-C*06* and *HLA-DQB1*03* alleles were significantly high in alloimmunized patients against Rh (48.8%) and Kell systems (17%). When analyzed patients with anti-Fy^a and anti-K, we observed that *HLA-DRB1*04* and *HLA-DRB1*11*, respectively, were found high in individuals who developed these alloantibodies. We also observed that the number of women alloimmunized was higher than of men, and that the number of transfusions directly influenced the alloimmunization process.

Keywords: Erythrocyte antigen alloimmunization. HLA. Sickle cell disease. Blood transfusion.

LISTA DE TABELAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Composição de hemoglobina normal em adultos..... | 13 |
| Tabela 2. Padrão de hemoglobinas presentes em indivíduos com doenças falciformes..... | 14 |
| Tabela 3. Taxa de aloimunização em pacientes com hemoglobinopatias em diferentes populações | 25 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Padrão de herança da anemia falciforme | 15 |
| Figura 2. Representação esquemática das funções biológicas dos grupos sanguíneos eritrocitários | 20 |
| Figura 3. Representação esquemática de alguns antígenos eritrocitários de grupos sanguíneos dispostos na membrana eritrocitária | 21 |
| Figura 4. Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) humano..... | 27 |

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica: *Transfusion* (artigo).
Disponível em:
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1537-2995](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1537-2995)

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. CAPÍTULO I | 13 |
| 1.1 ANEMIA FALCIFORME | 13 |
| 1.2 TRANSFUSÕES SANGUÍNEAS | 17 |
| 1.3 ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS..... | 19 |
| 1.4 ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA | 22 |
| 1.5 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE..... | 26 |
| 1.6 JUSTIFICATIVAS | 28 |
| 1.7 OBJETIVOS | 29 |
| 1.7.1 Geral..... | 29 |
| 1.7.2 Específicos | 29 |
| 1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 29 |
| 2. CAPÍTULO II | 39 |
| HLA POLYMORPHISMS AND RISKS OF RED BLOOD CELL ALLOIMMUNIZATION IN POLYTRANSFUSED PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA | 40 |
| 3. CAPÍTULO III | 55 |
| 3.1 CONCLUSÕES | 55 |
| 3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 56 |
| 4. APÊNDICES | 57 |

1. CAPÍTULO I

1.1 ANEMIA FALCIFORME

A hemoglobina é uma proteína presente no interior dos eritrócitos cuja principal função é o transporte de oxigênio para todos os tecidos do organismo. Estruturalmente, é uma proteína globular esferoide, formada por quatro subunidades e os tipos de cadeias de globinas determinam os tipos de hemoglobina. Esta estrutura está quimicamente ligada a um núcleo prostético de ferro (heme), o qual se liga ao oxigênio nos tecidos. Após o nascimento, o indivíduo passa a produzir em maior quantidade cadeias β (substitui cadeia γ da hemoglobina fetal – HbF por cadeia β), dando origem à produção da hemoglobina A ($\text{HbA-}\alpha_2\beta_2$)⁽¹⁾. Na Tabela 1, está descrita a composição de hemoglobina em um indivíduo adulto normal.

Tabela 1. Composição de hemoglobina normal em adultos.

| Hemoglobina | Composição | Porcentagem (%) |
|-------------|--------------------|-----------------|
| HbA | $\alpha_2\beta_2$ | 96 – 98 |
| HbA2 | $\alpha_2\delta_2$ | 1,5 – 3,5 |
| HbF | $\alpha_2\gamma_2$ | < 1 |

Fonte: Adaptado de Roseff⁽²⁾

Doença falciforme (DF) é a denominação de um grupo de doenças de caráter hereditário, na qual o indivíduo apresenta um gene anormal de globina S (HbS), concomitantemente, associado a outras anomalias hereditárias da hemoglobina, como a hemoglobina C (HbC) e D (HbD), β -talassemia, causando diversas hemoglobinopatias, SC e SD e S/ β -talassemia, respectivamente. Esta alteração ocorre devido a uma mutação de ponto (GAG>GTG) da cadeia β da hemoglobina, levando a substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6, com consequente modificação da estrutura molecular da hemoglobina^(3,4). A simples troca de um único aminoácido na composição de cadeia beta globínica ocasiona o surgimento de uma estrutura hemoglobínica nova, denominada HbS, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Padrão de hemoglobinas presentes em indivíduos com doenças falciformes.

| Síndromes falciformes | Hemoglobinas presentes | HbA2 (%) |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------|
| HbSS | S, F, A2 | Normal |
| HbS β^0 talassemia | S, F, A2 | Aumentada |
| HbS β^+ talassemia | S, F, A2, A (10-30%) | Aumentada |
| HbS/ $\delta\beta$ | S, F, A2 | Normal ou diminuída |
| HbSS/ α talassemia | S, F, A2 | Normal |
| HbSC | S, F, C, A2 | Normal |
| HbSD | S, F, D, A2 | Normal |
| HbAS | A (maior que 60%), S, F, A2 | Normal |

Fonte: Adaptado de Anvisa⁽⁴⁾.

Estudos comprovam que o traço falciforme (HbAS) protege também contra a infecção assintomática por *P. falciparum* em crianças inicialmente infectadas, quando comparadas com uma população controle (HbAA) na ausência do tratamento antimalárico⁽⁵⁾.

A anemia falciforme (AF) é caracterizada pela homozigose da HbS (SS), caracterizada pela anemia hemolítica crônica, crises alérgicas e comprometimento de diversos órgãos. Indivíduos portadores do traço falciforme (heterozigotas AS) apresentam em um cromossomo o alelo β normal e no outro o alelo mutante β^s , produzindo uma mistura de HbA e HbS (HbAS), caracterizando a não manifestação da doença⁽³⁾. A Figura 1 demonstra o padrão da herança do traço falciforme e da anemia falciforme em uma família. Esta nova hemoglobina apresenta propriedades físico-químicas bastante diferentes da hemoglobina normal, levando à perda de duas cargas elétricas, pela substituição do ácido glutâmico por valina, devido o fato de o mesmo ser classificado como um aminoácido neutro. Mecanismo que leva à formação de um polímero por uma alteração da estabilidade e solubilidade da hemácia, acarretando o enrijecimento e a deformação na estrutura da célula, apresentando gravidade clínica variada com retardo no crescimento e no desenvolvimento, podendo apresentar lesões de órgãos, em decorrência da hemólise crônica e de fenômenos vaso-oclusivos^(2,4,6-8).

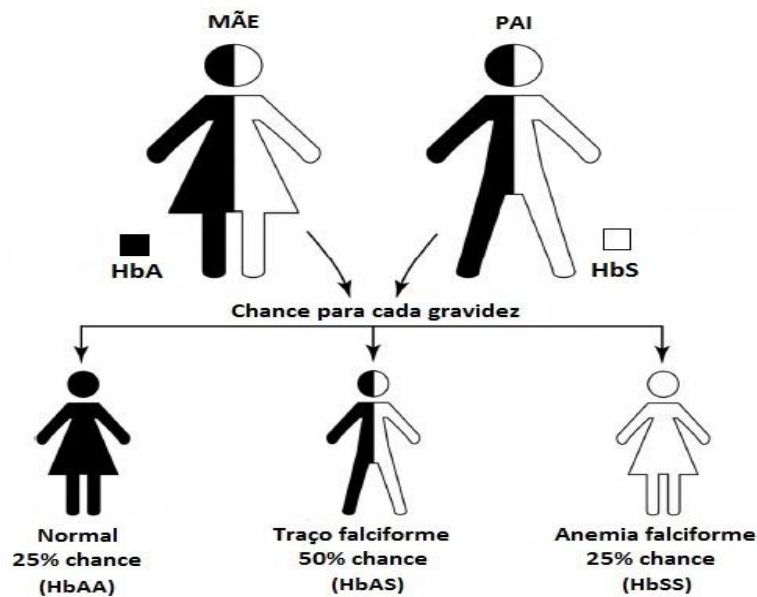


Figura 1. Padrão de herança da anemia falciforme.

A primeira descrição na literatura médica de um caso clínico de anemia falciforme, datada em 1910, ocorreu através da observação de hemácias alongadas e em forma de foice no esfregaço sanguíneo de um jovem negro, Walter Clement Noel, natural de Granada. Emmel (1917)⁽⁹⁾ observou a transformação da hemácia na sua forma original, bicôncava, para a forma falciforme, *in vitro*, e somente em 1922 o termo anemia falciforme foi utilizado pela primeira vez por Manson. Posteriormente, em 1927, descobriram que a falcização ocorria devido à exposição das hemácias a uma baixa tensão de oxigênio. Porém, somente em meados de 1949 surgiu o conceito de que a alteração nas hemácias ocorria devido a uma herança autossômica dominante, e que a doença era definida somente pela forma homozigota⁽⁹⁻¹¹⁾.

Inicialmente, acreditava-se que a mutação do gene β^S tivesse origem única no continente africano, contudo alguns estudos posteriores comprovaram que esta origem seria multicêntrica, ou seja, em países do centro-oeste da África, Índia e leste da Ásia, há cerca de 50 a 100 mil anos, difundindo-se para o resto do mundo^(4,12-14). O caráter falciforme tem uma frequência de aproximadamente 8% na população negra norte-americana⁽⁴⁾, e no Brasil, a doença representa um grande problema de saúde pública e sua distribuição abrange quase todos os estados. A prevalência do traço falciforme está presente entre 2% a 8% na população geral, variando de acordo com a região, e de 6% a 10% entre afrodescendentes⁽¹⁵⁾. Estudos pontuais em diversas regiões do Brasil têm demonstrado essa distribuição heterogênea. Em populações do Recôncavo Baiano, no estado da Bahia, a prevalência de portadores do traço falciforme foi de 10,5% e de homozigotos 1,24%⁽¹⁶⁾, sendo que na cidade de Salvador a

prevalência da forma heterozigota foi de 9,8%, enquanto da anemia falciforme foi 0,2%⁽¹⁷⁾. As cidades de Natal, no Rio Grande do Norte, e Distrito Federal apresentaram resultados semelhantes, onde a prevalência do traço falciforme em recém-nascidos foi de 1,5% e 3,23% e da anemia falciforme 0,05% e 0,09%, respectivamente^(18,19). Por outro lado, em estudos realizados no sul do país, a prevalência do gene β^s em heterozigose foi de 1,2% em Porto Alegre, Rio Grande do Sul e de 1,52% no Paraná^(20,21).

Estima-se que a cada ano mais de 300.000 crianças com a forma grave da doença nascem em todo mundo, desses, 200.000 casos de anemia falciforme ocorrem na África. Aproximadamente, 5% da população mundial são portadores assintomáticos de um gene para a doença falciforme. No Brasil, a estimativa é de que mais de 2 milhões de indivíduos sejam portadores da globina HbS e dentre estes, que mais de 8 mil apresentem a forma homozigota (HbSS)^(4,22).

Geralmente, as manifestações clínicas surgem nos primeiros anos de vida, a partir do momento em que o indivíduo começa a produzir grande quantidade de cadeia β , substituindo a cadeia γ da HbF, e estende-se ao longo da vida, com uma grande variedade de sintomas⁽²³⁾. Devido ao processo de falcização das hemácias, surgem diversas complicações clínicas, como aumento da adesão das hemácias ao endotélio, desencadeando processos inflamatórios e vaso-oclusivos, lesões microvasculares e redução do fluxo sanguíneo para os órgãos vitais, o que leva a isquemias e alterações no sistema imunológico. Em virtude da forma alterada das hemácias, as mesmas são retiradas prematuramente da circulação, evento que resulta na anemia hemolítica crônica. Além das manifestações de anemia crônica, o quadro é caracterizado também por episódios de dores osteoarticulares, dores abdominais, infecções, enfartes pulmonares, retardo do crescimento e maturação sexual, além do comprometimento crônico de múltiplos órgãos^(4,24).

O diagnóstico preciso das diversas formas de doença falciforme requer uma detecção efetiva, baseado em técnicas eletroforéticas, hemograma e dosagem de HbF e HbA₂. Em 1949, Linus Pauling foi o primeiro pesquisador a demonstrar que havia uma diferença na migração eletroforética da hemoglobina de pacientes com anemia falciforme comparadamente à hemoglobina de indivíduos normais⁽²⁵⁾. Porém, há casos em que o padrão eletroforético da anemia falciforme é semelhante aos outros tipos de doenças falciformes, havendo a necessidade da associação com outras técnicas de diagnósticos, tais como, hemograma,

dosagem de hemoglobina fetal, quantificação de hemoglobina A₂, e em casos de difícil diagnóstico, a utilização de técnicas de genética molecular torna-se essencial⁽⁴⁾.

A anemia falciforme é uma doença que não apresenta tratamento específico, porém existem diversas medidas gerais e preventivas, a fim de amenizar as complicações decorrentes da hemólise crônica. Estas medidas incluem: boa nutrição e profilaxia, diagnóstico e terapia precoces das infecções, manutenção de boa hidratação e uma menor exposição a condições climáticas adversas. O processo transfusional é frequentemente utilizado como medida terapêutica, porém pode gerar efeitos adversos como hiperviscosidade, sobrecarga do volume, reações hemolíticas agudas e tardias, reações febris não hemolíticas, reações alérgicas, sobrecarga de ferro, infecções e o risco de aloimunização eritrocitária e, até mesmo aloimunização aos antígenos leucocitários humanos^(4,26).

1.2 TRANSFUSÕES SANGUÍNEAS

A terapia transfusional é uma prática comum no tratamento e prevenção de complicações na anemia falciforme e, aproximadamente, 50% dos pacientes com a doença recebem transfusões de concentrado de hemácias pelo menos uma vez, estimando-se que cerca de 20% a 30% sejam mantidos em regime crônico de transfusão. O principal objetivo da transfusão sanguínea é repor o volume sanguíneo perdido nas crises hemolíticas e melhorar a capacidade de transporte de oxigênio e diminuir fenômenos vaso oclusivos devido a diminuição na quantidade de HbS^(15,27).

A primeira transfusão sanguínea indireta entre humanos foi datada em 1818 por um obstetra americano chamado James Blundell, que descreveu o tratamento de seis pacientes com transfusões sanguíneas, porém o sucesso das transfusões não foi alcançado até a identificação do sistema sanguíneo ABO, 75 anos após o primeiro relato de transfusão. No decorrer dos anos, ele registrou em torno de dez transfusões sanguíneas em humanos, onde cinco pacientes morreram. Somente após vários ensaios, ele foi capaz de identificar alguns critérios básicos que deveria adotar para melhorar as práticas transfusionais. Em seus primeiros ensaios, Blundell usou uma seringa de bronze para transfundir o sangue de uma pessoa para a outra. Mais tarde, inventou um instrumento semelhante a um funil, onde o doador se conectava por meio de uma cânula ao paciente, instrumento que permaneceu em uso até a última parte do século XIX⁽²⁸⁻³⁰⁾. Foi somente por volta de 1900 que o sucesso da terapia transfusional começou a surgir, após o descobrimento do grupo sanguíneo ABO por

Karl Landsteiner, e melhorou com o descobrimento do sistema Rh, por Landsteiner e Wiener, em 1940⁽³¹⁾.

No Brasil, o primeiro relato acadêmico sobre hemoterapia foi descrito em 1879, com a apresentação de uma tese de doutorado à Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, pelo autor José Vieira Marcondes, o qual descreveu experimentações empíricas sobre práticas transfusionais realizadas até então. Após o descobrimento do sistema ABO, os pioneiros nesta prática no país foram Brandão Filho e Armando Aguinaga. Na década de 40, surgiram diversos serviços de transfusões, destacando o Serviço de Transfusão de Sangue, fundado no Rio de Janeiro, o qual deu origem a diversas filiais pelo país. Em 1942, foi inaugurado o primeiro Banco de Sangue no Instituto Fernandes Figueira, visando atender a demanda de doações de sangue na época da guerra, dando caminho para a criação de diversos bancos de sangue no território nacional⁽³²⁾. Em 2001, foi implantado no Brasil o sistema de hemovigilância com o objetivo de recolher e avaliar informações sobre os efeitos indesejáveis e inesperados da utilização de hemocomponentes, com o intuito de prevenir o aparecimento ou a ocorrência destes efeitos. O sistema de hemovigilância permite avaliar a qualidade do trabalho desempenhado sobre transfusões sanguíneas e o uso dos hemocomponentes e derivados, sendo estes de responsabilidade dos hemocentros distribuídos em todo país^(33,34).

Transfusões sanguíneas podem ser procedimentos que salvam vidas, porém existem diversos fatores que podem comprometer a sobrevida destas pessoas, como risco de infecções e outras complicações não infecciosas⁽³⁵⁾. Mesmo com as atuais medidas criteriosas existentes, cerca de 20% das transfusões sanguíneas apresentam algum tipo de efeito adverso, dentre os quais se destacam transmissões infecciosas virais como HIV, hepatite, e bacterianas; reações hemolíticas devido à incompatibilidade de grupos sanguíneos; reações de hipersensibilidade, dentre outras⁽³⁶⁾.

As complicações transfusionais podem ser descritas como aguda ou tardia e infecciosa ou não infecciosa. As reações agudas acontecem até as primeiras 24 horas após a transfusão sanguínea, com destruição das células sanguíneas do hospedeiro levando à hemólise extravascular, geralmente causada por incompatibilidade ABO. Já a tardia pode acontecer dias, meses ou até mesmo anos após o procedimento, podendo ocorrer devido à incompatibilidade dos antígenos eritrocitários ou de moléculas HLA entre hospedeiro-receptor e doador. Por outro lado, as reações infecciosas acontecem com menor frequência do

que as não infecciosas, devido ao cuidado na triagem de doadores e aos diversos procedimentos de detecção precoce dos patógenos⁽³⁷⁾.

Dentre as reações transfusionais tardias, a aloimunização eritrocitária vem se tornando destaque em diversos estudos, a qual ocorre devido uma resposta primária do organismo, resultante da exposição do receptor aos antígenos eritrocitários estranhos do doador, após uma ou diversas transfusões de concentrado de hemácias, levando à produção de anticorpos anti-eritrocitários, dificultando novas transfusões⁽³⁸⁾.

1.3 ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS

Os antígenos eritrocitários são estruturas localizadas na membrana dos eritrócitos, cuja natureza pode ser proteica, glicoproteica ou glicolipídica. São detectados por anticorpos, produzidos naturalmente através de estímulos ambientais ou por exposição a hemácias estranhas⁽³⁹⁾. A presença e ausência dos variados antígenos na membrana eritrocitária permite uma grande variabilidade entre os indivíduos da mesma espécie, que se deve ao grande polimorfismo genético⁽⁴⁰⁾. Estes antígenos podem apresentar diferentes funções biológicas potenciais dependendo da natureza de cada um. Alguns apresentam função estrutural de membrana, auxiliando na estabilidade mecânica e na forma celular, como exemplo os sistemas Gerbich e Diego. Outros exercem função de transporte de íons e ureia na membrana das hemácias (Kidd, Colton), e alguns apresentam ambas as funções (Diego, Rh, Kx). A glicoproteína Duffy é uma receptora de citoquinas como a IL-8 e também funciona como receptor de merozoítas de *Plasmodium vivax* e *P. knowlesi*, e os antígenos Kell apresentam função enzimática, semelhante à família das endopeptidases⁽⁴¹⁾. Alguns ainda funcionam como elementos do sistema complemento (Cromer, Knops) – Figura 2. Contudo, a maioria dos antígenos eritrocitários apresenta função indefinida, e sua ausência na membrana das hemácias não implica em algum tipo de doença⁽⁴⁰⁾.

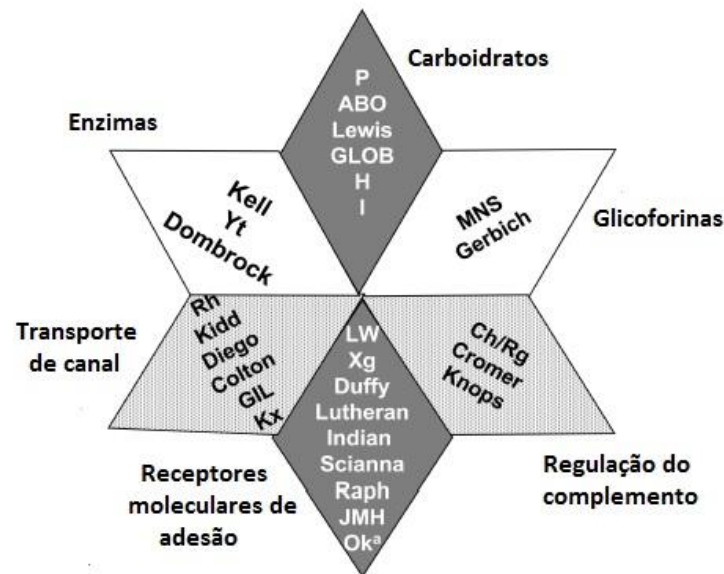


Figura 2. Representação esquemática das funções biológicas dos grupos sanguíneos eritrocitários. Fonte: adaptado de Storry⁽⁴²⁾.

Atualmente, existem 328 antígenos eritrocitários, dos quais 284 estão distribuídos em 33 sistemas de grupos sanguíneos, de acordo com a Sociedade Internacional de Transfusões Sanguíneas em 2013 (do inglês *International Society of Blood Transfusion* - ISBT)⁽⁴³⁾. Na Figura 3, estão representados alguns sistemas de grupos sanguíneos e sua disposição na membrana eritrocitária. O primeiro relato sobre a existência destes antígenos foi no ano de 1900, por Karl Landsteiner, ao reagir seu sangue com alguns de seus colegas (Decastello e Sturli). O resultado foi aglutinação em algumas misturas, sugerindo que poderiam existir duas classes de anticorpos (anti-A e anti-B), cuja pessoa que tivesse antígeno A e antígeno B apresentava, respectivamente, anti-B e anti-A. Indivíduos que apresentavam os dois anticorpos eram classificados como O (ausência de antígenos) e, em 1902, previu-se a existência de um novo grupo sanguíneo chamado AB, devido à ausência de anticorpos. Em 1940, Landsteiner e Wiener⁽⁴⁴⁾, ao injetarem sangue de macaco *Rhesus* em porcos e coelhos, observaram que estes produziram anticorpos contra as hemácias injetadas, os quais reagiram com quase todas as hemácias de doadores de sangue de Nova Iorque. Logo em seguida, descobriram que estes anticorpos estavam envolvidos nas incompatibilidades materno-fetais⁽⁴⁵⁾. Com o descobrimento de diversos grupos eritrocitários ao longo dos anos, em 1980, a ISBT estabeleceu critérios para definir a nomenclatura numérica dos antígenos eritrocitários de acordo com as bases genéticas⁽⁴⁰⁾.

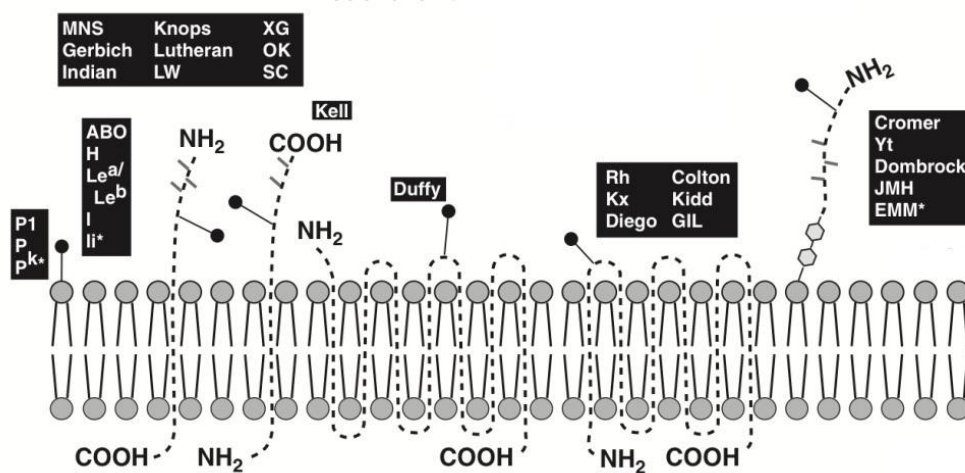


Figura 3. Representação esquemática de alguns antígenos eritrocitários de grupos sanguíneos dispostos na membrana eritrocitária. Fonte: Reid; Lomas-francis⁽⁴⁸⁾.

Os genes que codificam os antígenos de grupos sanguíneos são altamente polimórficos, devido, principalmente, ao polimorfismo de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* - SNP)⁽⁴⁶⁾, definidos através de protocolos de PCR-RFLP, PCR alelo específico e PCR multiplex, além de técnicas avançadas, como a PCR em tempo real⁽⁴⁷⁾. Esta variabilidade gênica, geralmente, encontra-se distribuída de forma variável em diferentes populações e etnias; como exemplo, o sistema Duffy, onde o antígeno Fy^b é mais frequente em populações caucasóides, praticamente ausente em populações negróides e extremamente raro em outras populações como chinesas e japonesas⁽⁴⁸⁾.

Antes de 1900, pensava-se que todos apresentavam o mesmo tipo sanguíneo, o que levou a transfusões sanguíneas frequentemente fatais tanto de animais em pessoas quanto entre indivíduos da mesma espécie. Contudo, após as descobertas ao longo dos anos de que as hemácias eram recobertas por estruturas imunogênicas, o sucesso na medicina transfusional começou a surgir. A membrana eritrocitária contém milhões de antígenos que são ignorados pelo sistema imune, contudo quando o paciente recebe transfusão sanguínea, o seu sistema de defesa irá atacar as células vermelhas do doador, as quais contêm antígenos diferentes do receptor. Portanto, para garantir o sucesso nos processos transfusionais, é necessário que haja maior compatibilidade entre os sangues do doador e receptor⁽⁴⁰⁾.

1.4 ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA

A aloimunização eritrocitária é uma resposta imunológica contra antígenos eritrocitários estranhos, que geralmente ocorre devido à sensibilização em transfusões sanguíneas, gestações e transplantes de órgãos, tecidos ou enxertos, quando o indivíduo sofre exposição a eritrócitos alogênicos (fenotipicamente diferentes), com produção de aloanticorpos específicos⁽³⁹⁾. Este evento depende de vários fatores genéticos e adquiridos do paciente, tais como dose e via de administração e da imunogenicidade dos antígenos eritrocitários. Estima-se que cerca de 1% dos pacientes são sensibilizados a cada unidade de hemácias transfundidas. A taxa de aloimunização após exposição aos aloantígenos em pacientes politransfundidos está entre 7% e 10%, sendo maior em pacientes com doença falciformes (6% a 47%) e talassêmicos (3% a 10%)⁽⁴⁹⁻⁵²⁾.

A aloimunização ocorre quando o indivíduo se expõe pela primeira vez ao antígeno estranho, ocorrendo a produção de baixos títulos de anticorpos, geralmente da classe IgM, que podem ser detectados semanas ou meses após a transfusão. Na segunda exposição, ocorre uma resposta imune secundária, com alta produção de anticorpos IgG, por meio das células de memória imunológica, produzidas desde o primeiro contato. Nesta segunda resposta, os anticorpos apresentam maior avidéz pelo antígeno, requerendo doses antigênicas bem menores para que ocorra a produção dos anticorpos, podendo gerar complicações graves, como as reações transfusionais hemolíticas tardias⁽⁵³⁾. Os antígenos dos grupos sanguíneos eritrocitários Rh, Kell, Duffy e Kidd, respectivamente, são os mais imunogênicos da nossa espécie, depois do ABO, podendo induzir resposta imune com pequenas quantidades do antígeno⁽⁵²⁾.

Os aloanticorpos podem ser classificados como naturais ou irregulares. Os anticorpos naturais são aqueles formados naturalmente pelo indivíduo sem a necessidade de contato prévio com o antígeno, ocorrem devido ao contato com bactérias e alimentos que irão estimular a produção destes anticorpos ao longo da vida e são específicos para o sistema ABO. Por outro lado, os anticorpos irregulares são de ocorrência inesperada, ou seja, são formados após contato prévio com o antígeno desconhecido, referentes aos demais antígenos de sistemas sanguíneos⁽⁵²⁾.

O primeiro relato de aloimunização data do século XVII em natimortos hidrópicos (doença que hoje é conhecida como doença hemolítica do feto e recém-nascido - DHFRN),

causada por anticorpos IgG materno contra hemácias do feto (que contém antígeno de origem paterna) que atravessam a barreira hematoplacentária. Estes anticorpos são transferidos para a circulação fetal, se ligam ao antígeno na superfície da hemácia e são reconhecidos pelo baço, causando hemólise extravascular. Em 1939, Levine e Stetson⁽⁵⁴⁾ publicaram um relato de caso de DHFRN, onde o soro materno aglutinou hemácias de seu marido e 80% das células de doadores tipo sanguíneo O. Observaram também que estas aglutininas reagiam fortemente a 37°C e que após alguns meses desapareciam do soro, fenômeno este, semelhante aos processos de aloimunização após transfusões sanguíneas. O anticorpo envolvido neste processo foi o anti-Rh, identificado pela primeira vez por Landsteiner e Wiener⁽⁴⁴⁾. Um ano após a primeira observação, Wiener e Peters reportaram o primeiro caso de reação hemolítica transfusional com o mesmo anticorpo⁽⁵⁵⁾. Tal descoberta contribuiu para melhorar significativamente a segurança transfusional, que até então era um procedimento de alto risco, devido às várias incompatibilidades existentes entre os sangues dos doadores e receptores.

Estudos demonstram que o processo de aloimunização pode ser influenciado por diversas complicações, tais como *Diabetes mellitus*, malignidades de órgãos sólidos, doença falciforme, talassemia, síndrome mielodisplásica, leucemia mieloide crônica, transplante de células progenitoras hematopoiéticas do sangue periférico, além de fatores como idade, sexo, número de transfusões e polimorfismos dos antígenos HLA⁽⁵⁶⁻⁶¹⁾. Estes fatores podem estar relacionados a um estado de inflamação crônica, como por exemplo, na síndrome metabólica caracterizada por obesidade, diabetes, inflamação e doença cardíaca, no qual ocorre aumento da ativação imunológica⁽⁶²⁾. Além disto, estudos realizados por Schonewille *et al.*⁽⁶³⁾ em pacientes com doença não hematológica, demonstraram que a presença de um aloanticorpo aumenta o risco do desenvolvimento de outros aloanticorpos após transfusões subsequentes, aumentando o risco de aloimunização nestes pacientes.

Contudo, há controversas sobre alguns fatores que possam estar associados à aloimunização, tais como sexo e número de transfusões. Em um estudo realizado com pacientes politransfundidos de Uganda, o número de transfusões e os episódios transfusionais influenciaram diretamente no processo de aloimunização ($p = 0,01$)⁽⁶⁴⁾. Resultado similar foi encontrado por Schonewille *et al.*⁽⁶⁵⁾ em pacientes com doença hematológica e oncológica da Holanda quando comparados com uma população controle ($p < 0,0001$). Por outro lado, de acordo com Blumberg *et al.*⁽⁶⁶⁾, embora a formação de aloanticorpos seja influenciada pelo número de transfusões, a maioria dos casos de aloimunização ocorre logo no início da terapia

transfusional. Bauer *et al.*⁽⁵⁷⁾ também não encontraram associação com o número de transfusões em pacientes politransfundidos atendidos em dois hospitais na Holanda.

Alguns estudos afirmam que mulheres apresentam maior predisposição à aloimunização eritrocitária, como em estudos realizados por Hoeltge *et al.*⁽⁶⁷⁾, onde em pacientes com múltiplas transfusões sanguíneas, a porcentagem de mulheres aloimunizadas foi maior do que no grupo controle ($p < 0,001$). Bauer *et al.*⁽⁵⁷⁾ também associaram este risco ao sexo feminino. A justificativa plausível para este evento seria que mulheres são frequentemente expostas aos aloantígenos eritrocitários durante a gravidez ou no momento do parto⁽⁵⁷⁾. Um dado que reflete esta realidade pôde ser observado em estudos realizados nos Estados Unidos por Aygun *et al.*⁽⁵⁶⁾ em pacientes com doenças falciformes, onde em pacientes pediátricos não houve diferença na taxa de aloimunização em ambos os sexos, já entre pacientes adultos, esta taxa foi maior em mulheres (54,5%) do que em homens (38%). Por sua vez, Schonewille *et al.*⁽⁶³⁾ não encontraram diferença na formação de anticorpos de acordo com o sexo, exceto para o anti-D que foi encontrado com maior frequência em mulheres do que em homens ($p < 0,001$). Hoppe *et al.*⁽⁵⁸⁾ não encontraram diferença entre os grupos estudados com relação à idade e sexo (média entre homens e mulheres de 50%). Resultado semelhante foi encontrado por Rosse *et al.*⁽⁴⁹⁾ e Natukunda *et al.*⁽⁶⁴⁾, onde o sexo feminino não foi associado com o processo de aloimunização.

A incidência da taxa de aloimunização em pacientes com hemoglobinopatia politransfundidos pode ser observada na Tabela 3, distribuída de forma heterogênea em diferentes populações.

Tabela 3. Taxa de aloimunização em pacientes com hemoglobinopatias em diferentes populações

| Autores/ano/região | Taxa de aloimunização em pacientes com hemoglobinopatias (%) |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Luban ⁽⁶⁸⁾ (1989)/Estados Unidos | Doença falciforme – 42,9 |
| Spanos <i>et al.</i> ⁽⁶⁹⁾ (1990)/Grécia | HbS/ β -talassemia – 36,9 |
| Vichinsky <i>et al.</i> ⁽⁵⁰⁾ (1990)/Estados Unidos | Anemia falciforme – 34 |
| Hmida <i>et al.</i> ⁽⁷⁰⁾ (1994)/Tunísia | Doença falciforme – 7,76 |
| Tahhan <i>et al.</i> ⁽⁷¹⁾ (1994)/Estados Unidos | Doença falciforme – 34,8 |
| Olujohungbe <i>et al.</i> ⁽⁷²⁾ (2001)/Reino Unido | Anemia falciforme – 76 |
| Olujohungbe <i>et al.</i> ⁽⁷²⁾ (2001)/Jamaica | Anemia falciforme – 2,6 |
| Aygun <i>et al.</i> ⁽⁵⁶⁾ (2002)/Estados Unidos | Doença falciforme - 47 |
| Ameen <i>et al.</i> ⁽⁷³⁾ (2003)/Kuwait | β -talassemia maior – 30 |
| Wang <i>et al.</i> ⁽⁷⁴⁾ (2006)/Taiwan | β -talassemia maior – 37 |
| Aly <i>et al.</i> ⁽⁷⁵⁾ (2012)/Egito | Anemia falciforme – 21,4 |

A frequência de anticorpos irregulares em indivíduos politransfundidos depende muito da imunogenicidade dos antígenos eritrocitários. Os aloanticorpos mais frequentes são aqueles contra os antígenos do sistema Rh, Kell, Duffy, Kidd e MSN, respectivamente⁽⁵²⁾. Resultado semelhante pôde ser observado em um estudo realizado em Minas Gerais em pacientes politransfundidos do Hemocentro Regional de Uberaba, onde os aloanticorpos mais frequentemente observados foram contra os antígenos do sistema Rh (anti-D – 24,28%; anti-E – 18,5%), Kell (anti-K – 13,87%) e MSN (anti-M – 10,41%), sendo a proporção de anti-D significativamente maior em mulheres do que em homens ($p = 0,01$)⁽⁷⁶⁾. Baby *et al.*⁽⁷⁷⁾ também identificaram maior frequência de aloanticorpos contra o sistema Rh em pacientes politransfundidos de Mali, porém o anticorpo mais frequente foi anti-E (7,7% em uma taxa global de 10,3%). Em estudos realizados no Brasil com pacientes falciformes, 70%⁽⁷⁸⁾ e 33,3%⁽⁷⁹⁾ dos aloanticorpos eritrocitários encontrados foram relacionados aos antígenos do sistema Rh; e 26,6% contra o sistema Kell⁽⁷⁹⁾. Por outro lado, Sarnaik *et al.*⁽⁸⁰⁾ observaram que os aloanticorpos mais encontrados foram anti-K (38%), anti-Le^a e -Le^b (24%) e anti-Rh (14%) em falciformes da Índia.

A pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) é um teste realizado com soro ou plasma de receptores incubando amostra do mesmo com hemácias do tipo O padronizadas, com a finalidade de identificar anticorpos irregulares⁽⁸¹⁾. Em 2004, tornou-se um dos testes pré-

transfusionais obrigatórios, de acordo com a Resolução nº 153 do Ministério da Saúde, de 24 de junho de 2004^(52,82). A imunofenotipagem eritrocitária é uma prova de aglutinação direta que visa identificar os antígenos presentes na membrana eritrocitária, e em pacientes politransfundidos com anemia falciforme é uma prática extremamente importante a fim de prevenir contra eventos de aloimunização, tendo em vista que a presença de aloanticorpos dificulta a obtenção de unidades de sangue compatíveis, o que pode gerar reações transfusionais hemolíticas agudas ou tardias, sendo necessário transfundir unidades de sangue com ausência de antígenos envolvidos na reação^(27,52).

A utilização das ferramentas de biologia molecular tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da imunohematologia, aumentando a segurança e eficácia transfusional de pacientes politransfundidos, como os talassêmicos, portadores de anemia falciforme, de síndrome mielodisplásica e anemia hemolítica auto-imune. Isto pode ser facilmente visualizado durante os procedimentos de genotipagem de grupos sanguíneos, onde as técnicas moleculares suprem as deficiências das técnicas de hemaglutinação, principalmente na fenotipagem de pacientes com transfusão recente, quando há hemácias do doador na circulação do receptor e, em pacientes com auto-anticorpos⁽⁸³⁻⁸⁷⁾. Os protocolos da técnica de PCR mais comumente utilizados na determinação de antígenos de grupos sanguíneos são: PCR alelo-esspecífico (AS-PCR) e PCR seguido por análises dos fragmentos com enzimas de restrição (PCR-RFLP)^(88,89). Recentemente, a técnica de PCR em tempo real (Real Time) e a técnica de microarranjos (*Microarray*) também têm sido utilizadas para a análise de genes de grupos sanguíneos^(86,87,90,91).

1.5 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) são conhecidos também como do sistema HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*) na espécie humana, são altamente polimórficos, encontram-se localizados no braço curto do cromossomo 6, e estendem-se por aproximadamente 3.500kb. Didaticamente são agrupados em três regiões: classe I, classe II e classe III, os quais codificam diversas moléculas, muitas delas envolvidas diretamente com a resposta imune. Os genes de classe I codificam as moléculas clássicas HLA-A, -B e -C e os de classe II codificam as moléculas clássicas HLA-DR, -DQ e -DP. Os genes de classe III, embora estejam na mesma região, não são genes de histocompatibilidade, e codificam proteínas do sistema complemento, proteínas do choque térmico e fatores de

necrose tumoral (TNF- α e TNF- β). Na Figura 4, estão representados os genes do CPH localizados no cromossomo 6. Os antígenos HLA de classe I são expressos em todas as células nucleadas, enquanto que os de classe II somente em linfócitos B, macrófagos, monócitos, células de Langerhans, células dendríticas e linfócitos T ativados. São responsáveis pela apresentação do antígeno estranho às células do sistema imune, onde as moléculas de classe I apresentam o peptídeo antigênico para os linfócitos T citotóxicos (CD8+) e as moléculas de classe II para células T auxiliares (CD4+)^(92,93). Este mecanismo de defesa mediado por células T é um dos principais determinantes da histocompatibilidade em transplante e reações transfusionais, causadas pela presença destas moléculas nas superfícies de leucócitos e plaquetas⁽⁹⁴⁾.

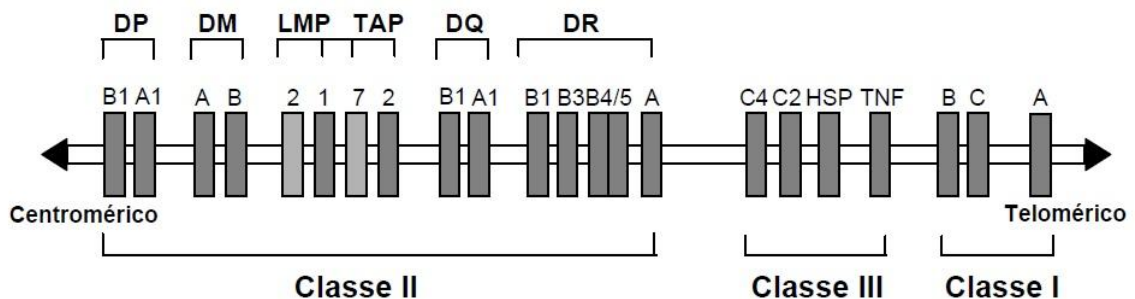


Figura 4. Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) humano. Fonte: Donadi⁽⁹⁵⁾.

Os antígenos HLA foram descobertos por volta de 1958 por Jean Dausset e cols, que descreveram anticorpos do soro humano de pacientes politransfundidos e múltiparas que reagiam com a maioria dos leucócitos de indivíduos que foram testados e, por esta descoberta, ganhou o prêmio Nobel em 1980. Ao longo dos anos, outros pesquisadores realizaram diversas descobertas sobre os antígenos leucocitários, como Both van Rood, Payne, Bernard Amos e Richard Batchelor⁽⁹⁶⁾.

Estudos demonstram que o sistema HLA está associado com a predisposição a algumas doenças, tais como espondilite anquilosante, hanseníase, doença de chagas, diabetes tipo I, e algumas doenças hematológicas malignas, como linfoma não-Hodgkin e leucemia linfoide aguda⁽⁹⁷⁻¹⁰²⁾. Por outro lado, os antígenos leucocitários humanos também foram associados com a suscetibilidade ao desenvolvimento de anticorpos anti-eritrocitários. Segundo Alarif *et al.*⁽¹⁰³⁾, a molécula HLA-B35 estava significativamente associada com a aloimunização aos antígenos eritrocitários em pacientes falciformes ($p = 0,02$). Noizat-

Pirenne *et al.*⁽¹⁰⁴⁾ e Picard *et al.*⁽¹⁰⁵⁾ associaram o polimorfismo HLA à aloimunização ao antígeno Fy^a, onde em ambos os estudos a frequência da variante alélica *HLA-DRB1*04* mostrou-se significativamente elevada em pacientes politransfundidos europeus ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$), enquanto *HLA-DRB1*15* foi significativo somente no segundo estudo ($p < 0,001$). Outros estudos demonstram esta mesma associação com antígenos K, onde, segundo Chiaroni *et al.*⁽¹⁰⁶⁾ e Noizat-Pirenne *et al.*⁽¹⁰⁴⁾, o grupo alélico *HLA-DRB1*13* esteve mais frequente no grupo de aloimunizados nos dois estudos ($p < 0,001$ e $p = 0,013$), contudo o grupo alélico *HLA-DRB1*11* foi significante somente no primeiro ($p < 0,001$).

Em um estudo realizado no sul da França com pacientes aloimunizados com anti-Jk^a, os autores observaram uma frequência elevada da variante alélica *DRB1*01* nos pacientes quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$)⁽¹⁰⁷⁾. Em 2006, Chu *et al.*⁽¹⁰⁸⁾ encontraram uma forte correlação com o alelo *HLA-DRB1*09:01* em indivíduos com anti-Mi^a. Recentemente, no Brasil, a variante alélica *DRB1*07* demonstrou estar fortemente associada à aloimunização contra Di^a⁽¹⁰⁹⁾. Investigações realizadas com pacientes falciformes também apresentaram uma correlação ao risco de aloimunização com o alelo *HLA-DRB1*15:03* ($p = 0,03$), contudo o alelo *HLA-DRB1*09:01* apareceu com maior frequência no grupo que não apresentava aloanticorpos, sugerindo uma possível proteção contra a aloimunização ($p = 0,008$)⁽⁵⁸⁾. Tais descobertas estão intimamente ligadas à apresentação do peptídeo estranho para as células T pelas moléculas HLA de classe II, especialmente pelas moléculas HLA-DR⁽¹⁰⁶⁾.

1.6 JUSTIFICATIVAS

Pacientes que apresentam anemia falciforme necessitam de transfusões sanguíneas recorrentes, o que pode levar a um risco maior da produção de aloanticorpos anti-eritrocitários, acarretando em uma diminuição na disponibilidade de bolsas compatíveis. O grande problema destes pacientes são as limitações das técnicas de fenotipagem em casos de múltiplas transfusões e a aloimunização, o que acaba dificultado na seleção de bolsas sanguíneas. Atualmente, os bancos de sangue contam somente com as técnicas de fenotipagem como ferramenta de detecção dos antígenos eritrocitários nos processos transfusionais; contudo, nestes casos existe a necessidade de técnicas complementares que auxiliem na elucidação do problema, tendo em vista que a maior preocupação é evitar a formação dos aloanticorpos.

O desenvolvimento de ferramentas laboratoriais que permita avaliar o risco de alossensibilização aos antígenos eritrocitários pode ser útil para pacientes com anemia falciformes. Além disso, a genotipagem eritrocitária e HLA poderão ser utilizadas na escolha do melhor par doador-receptor de sangue, sabendo que alguns fatores genéticos podem influenciar neste processo de aloimunização.

Os métodos de investigação de sistemas sanguíneos eritrocitários por Biologia Molecular, empregados nesse estudo, ainda são pouco utilizados no Brasil, devido à necessidade de padronização dos métodos pelos laboratórios e de pessoal técnico-científico com conhecimento para realizar as interpretações das análises. Além disso, a tecnologia de *Microarray* é o que há de mais avançado no momento em termos de sistemas de detecção desses antígenos eritrocitários, podendo auxiliar em um diagnóstico mais preciso e com maior rapidez.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Geral

Estudar o perfil de indivíduos com anemia falciforme com relação aos genótipos de sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários e do sistema HLA, para identificar uma possível susceptibilidade à aloimunização seletiva aos antígenos eritrocitários e a relação entre a produção de anticorpos anti-eritrocitários.

1.7.2 Específicos

- Genotipar os grupos sanguíneos pertencentes aos sistemas Rh, Duffy, Dombrock, Colton, Diego, Scianna, MNS, Lutheran, Kell, Kidd e Landsteiner-Wiener de pacientes com anemia falciforme.
- Genotipar as variantes alélicas de HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1 nestes pacientes.
- Levantar dados clínicos e laboratoriais desses pacientes em relação ao número de transfusões, aloimunização aos antígenos eritrocitários, idade e sexo.

1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neto, G.C.G.; Pitombeira, M.S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2003, p. 51-56.

2. Roseff, S.D. Sick cell disease: a review. **Immunohematology**, 2009, p.67-74.
3. Koch, A.A.; Yang, Q.; Olney, R.S. Sick hemoglobin (HbS) allele and sick cell disease: a HUGE review. **American Journal of Epidemiology**, 2000, p. 839-45.
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**, Brasília, DF, 2002.
5. Billo, M.A.; Johnson, E.S.; Dombia, S.O. *et al.* Sick Cell Trait Protects Against Plasmodium falciparum Infection. **American Journal of Epidemiology**, 2012, p. 175–185.
6. Gonçalves, M.S.; Nechtman, J.F.; Figueiredo, M.S. *et al.* Sick cell disease in a Brazilian population from São Paulo: a study of the β S haplotypes. **Human Heredity**, 1994 v. 44, p. 322-327.
7. Stedman. **Dicionário médico** (Ed) 25a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996.
8. Weatherall, D.J.; Clegg, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.
9. Emmel, V.E. Observations Regarding the Erythrocytic Origin of Blood Platelets. **The Journal of Medical Research**, 1917, p. 67-74.
10. Herrick, J.B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Archives of Internal Medicine**, 1910, p. 517-21.
11. Neel, J.V. The Inheritance of Sick Cell Anemia. **Science**, 1949, p. 64-6.
12. WHO, Working Group – Hereditary anemias: genetics basis, clinical features, diagnosis and treatment. Bull. **WHO**, 1982. p.643-60.
13. Pagnier, J.; Mears, J.G.; Dunda-Belkhodja, O. *et al.* Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1984, p.1771-3.
14. Naoum, P.C. Hemoglobinopatias e talassemias. **Sarvier**, 1997.lk
15. Cançado, R.D.; Jesus, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2007, vol.29, n.3, p. 204-206.
16. Silva, W.S.; Lastra, A.; Oliveira, S.F. *et al.* Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 2006, p. 2561-2566.
17. Adorno, E.V.; Couto, F.D.; Neto, J.P.M. *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, 2005, p. 292-298.

18. Araújo, M.C.; Serafim, E.S.; Castro Júnior, W.A. *et al.* Prevalence of abnormal hemoglobins in newborns in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, 2004, p. 123-8.
19. Diniz, D; Guedes, C; Barbosa, L. *et al.* Prevalence of sickle cell trait and sickle cell anemia among newborns in the Federal District, Brazil, 2004 to 2006. **Caderno de Saúde Pública**, 2009; p. 188-94.
20. Daudt, L.E.; Zechmaister, D.; Portal, L. *et al.* Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 2002, p. 833-841.
21. Watanabe, A.M.; Pianovski, M.A.; Zanis Neto, J. *et al.* Prevalence of hemoglobin S in the state of Paraná, Brazil, based on neonatal screening. **Caderno de Saúde Pública**, 2008; p. 993-1000.
22. WHO (World Health Organization). Sickle cell disease and other haemoglobin disorders. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs308/en/>>. Acesso em 25 de junho de 2013.
23. Cobo, V.A.; Chapadeiro, C.A.; Ribeiro, J.B. *et al.* Sexuality and sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2013, p. 89-93.
24. Zago, M. A.; Pinto, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2007, p. 207-214.
25. Pauling, L; Itano, H.A. Sickle cell anemia a molecular disease. **Science**, 1949, p. 543-548.
26. Mcpherson, M.E.; Anderson, A.R.; Castillejo, M.I. *et al.* HLA Alloimmunization Is Associated With RBC Antibodies in Multiply Transfused Patients With Sickle Cell Disease. **Pediatric Blood & Cancer**, 2010, p.552-558.
27. Pinto, P.C.A.; Braga, J.A.P.; Santos, A.M.N. Risk factors for alloimmunization in patients with sickle cell anemia. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**, 2011, p. 668-673.
28. Young, J.H. James Blundell (1790-1878): experimental physiologist and obstetrician. **Medical History**, 1964, p. 159–169.
29. Greenwalt, T.J. A short history of transfusion medicine. **Transfusion**, 1997, p. 550-563.
30. Dzik, W. H. The James Blundell Award Lecture 2006: transfusion and the treatment of haemorrhage: past, present and future. **Transfusion Medicine**, 2007, p. 367–374

31. Giangrande, P.L. The history of blood transfusion **British Journal of Haematology**, 2000, p. 758-67.
32. Junqueira, P.C.; Rosenblit, J.; Hamerschlag, N. História da Hemoterapia no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2005, p. 201-207
33. BRASIL, 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Lei 10.205, de 21 de março de 2001.
34. BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Manual Técnico de Hemovigilância**, 2004.
35. Hébert, P.C.; Wells, G.; Blajchman, M.A. *et al.* A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. **The New England Journal of Medicine**, 1999, p.409-417.
36. Vicent, JL; Baron, JF; Reinhart, K. *et al.*. Investigators. Anemia and blood transfusion in critically ill patients. **JAMA**, 2002, p. 1499-507.
37. Sharma, S.; Sharma, P.; Tyler, L.N. Transfusion of Blood and Blood Products: Indications and Complications. **American Family Physician**, 2011, p.719-724.
38. Harmening, D. M. In: **Modern Blood Banking and Transfusion Practices**. 5º Ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2005. p. 594.
39. Novaretti, M.C. Investigação laboratorial em pacientes com anticorpos eritrocitários. In: BORDIN, JO; LANGHI JÚNIOR, DM; COVAS, DT. **Hemoterapia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu; 2007. p186-89.
40. Dean, L. **Blood Groups and Red Cell Antigens** [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005.
41. Bonifacio, S.L.; Novaretti, M.C.Z. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2009, p. 104-111.
42. Storry, J.R. Review: the function of blood group-specific RBC membrane components. **Immunohematology**, 2004, p. 206-216.
43. ISBT (International Society of Blood Transfusion). Blood Group Terminology. Disponível em: <<http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/blood-group-terminology/>>. Acesso em 19 de agosto de 2013.
44. Landsteiner, K.; Weiner, A.S. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for Rhesus blood. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1940, p. 43:223.

45. Owen, R. Karl Landsteiner and the first human marker locus. **Genetics**, 2000, p. 995-998.
46. Storry, J.R.; Olsson, M.L. Genetic basis of blood group diversity. **British Journal of Haematology**, 2004, p. 759-771.
47. Castilho, L.; Pellegrino, J.J.R. Blood group genotyping. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2004, p. 135-140.
48. Reid, M.E.; Lomas-Francis, C. **The Blood Group Antigen FactsBook**. 2nd ed. 2004, New York: Elsevier Academic Press
49. Rosse, W.F.; Gallagher, D.; Kinney, T.R. *et al.*. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**, 1990, p. 1431–1437.
50. Vichinsky, E.P.; Earles, A.P.N.P.; Johnson, R.A. *et al.* Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. **The New England Journal of Medicine**, 1990, p. 1617–1621.
51. Bordin, J.O. Aloimunização após transfusão de concentrado de hemácias em pacientes atendidos em um serviço de emergência. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2007, p. 339-343
52. Girello, A.L; Kuhn, T.I.B.B. **Fundamentos da Imuno-hematologia eritrocitária**. 2ª Ed. São Paulo: Editora Senac, São Paulo, 2007.
53. Langhi Júnior, D. M.; Pereira, J. P. M.; Pereira, C. M. Reações transfusionais hemolíticas. In: Bordin J. O.; Langhi Júnior, D. M.; Covas, D. T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 438-44.
54. Levine, P.; Stetson, R.E. An unusual case of intragroup agglutination. **JAMA**, 1939, p. 126-127.
55. Wiener, A.S.; Peters, H.R. Hemolytic reactions following transfusions of blood of the homologous group, with three cases in which the same agglutinin was responsible. **Annals of Internal Medicine**, 1940, p. 2306-2322.
56. Aygun, B.; Padmanabhan, S.; Paley, C. *et al.* Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. **Transfusion**, 2002, p. 37-43.
57. Bauer, M.P.; Wiersum-osselton, J.; Schipperus, M. *et al.* Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion. **Transfusion**, 2007, p. 2066-2071.
58. Hoppe, C.; Klitz, W.; Vichinsky, E. *et al.* HLA type and risk of alloimmunization in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, 2009, p. 462-464.

59. Thompson, A.A.; Cunningham, M.J.; Singer, S.T. *et al.* Red cell alloimmunization in a diverse population of transfused patients with thalassaemia. **British Journal of Haematology**, 2011, p. 121-128.
60. Zalpuri, S.; Zwaginga, J.J.; LE Cessie, S. *et al.* Red-blood-cell alloimmunization and number of red-blood-cell transfusions. **Vox Sanguinis**, 2012, p. 144-149.
61. Sanz, C.; Nomdedeu, M.; Belkaid, M. *et al.* Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. **Transfusion**, 2013, p. 710-715.
62. Hendrickson, J.E.; Desmares, M.; Deshpande, S.S. *et al.* Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. **Transfusion**. 2006, p. 1526-1536.
63. Schonewille, H.; Van de Watering, L.M.G.; brand, A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: is it time to take precautionary measures?. **Transfusion**, 2006, p. 630-635.
64. Natukunda, B.; Schonewille, H.; Van de Watering, L. *et al.* Prevalence and specificities of red blood cell alloantibodies in transfused Ugandans with different diseases. **Vox Sanguinis**, 2010, p. 167-171.
65. Schonewille, H.; Haak, H.L.; Van Zijl, A.M. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. **Transfusion**, 1999, p. 763-771.
66. Blumberg, N.; Peth, K.; Ross, K. *et al.* Immune response to chronic red blood cell transfusion. **Vox Sanguinis**, 1983, p. 212-217.
67. Hoeltge, G.A.; Domen, R.E.; Rybicki, L.A. *et al.* Multiple red cell transfusions and alloimmunization. Experience with 6996 antibodies detected in a total of 159, 262 patients from 1985 to 1993. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, 1995, p. 42-45.
68. Luban, N.L. Variability in rates of alloimmunization in different groups of children with sickle cell disease: effect of ethnic background. **The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, 1989, p. 314-319.
69. Spanos, T.; Karageorga, M.; Ladis, V. *et al.* Red cell alloantibody in patients with thalassaemia. **Vox Sanguinis**, 1990, p. 50-55.
70. Hmida, S.; Mojaat, N.; Maamar, M. *et al.* Red cell alloantibodies in patients with hemoglobinopathies. **Nouvelle Revue Française d'Hématologie**, 1994, p. 363-366.

71. Tahhan, H.R.; Holbrook, C.T.; Braddy, L.R. *et al.* Antigenmatched donor blood in the transfusion management of patients with sickle cell disease. **Transfusion**, 1994, p. 562–569.
72. Olujohungbe, A.; Hambleton, I.; Stephens, L. *et al.* Red cell antibodies in patients with homozygous sickle cell disease: a comparison of patients in Jamaica and the United Kingdom. **British Journal of Haematology**, 2001, p. 661–665.
73. Ameen, R.; Al-Shemmari, S.; Al-Humood, S. *et al.* RBC alloimmunization and autoimmunization among transfusion-dependent Arab thalassemia patients. **Transfusion**, 2003, p. 1604–1610.
74. Wang, L.Y.; Liang, D.C.; Liu, H.C. *et al.* Alloimmunization among patients with transfusion-dependent thalassemia in Taiwan. **Transfusion Medicine Review**, 2006, p. 200–203.
75. Aly R.; El-Sharnoby, M.R.; Hagag, A.A. Frequency of red cell alloimmunization in patients with sickle cell anemia in an Egyptian referral hospital. **Transfusion and Apheresis Science**, 2012, p. 253–257.
76. Martins, P.R.J.; Alves, V.M.; Pereira, G.A. *et al.* Frequência de anticorpos irregulares em politransfundidos no Hemocentro Regional de Uberaba-MG, de 1997 a 2005. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2008, p. 272-276.
77. Baby, M.; Fongoro, S.; Cissé, M. *et al.* Fréquence de l'allo-immunisation érythrocytaire chez les malades polytransfusés au centre hospitalo-universitaire du Point G, Bamako, Mali. **Transfusion Clinique et Biologique**, 2010, p. 218-22.
78. Fabron, A. Estudo da significância clínica de aloanticorpos eritrocitários em pacientes com anemia falciforme (resumo de tese). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2001, p. 121-122.
79. Helman, R.; Cançado, R.D.; Olivatto, C. Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes com doença falciforme: experiência de um centro em São Paulo. **Einstein**. 2011, p.160-164.
80. Sarnaik, S.; Schornack, J.; Lusher, J.M. The incidence of development of irregular red cell antibodies in patients with sickle cell anemia. **Transfusion** 1986, p. 249–252.
81. Proetti, A.B.F.C. *et al.* Hemoterapia: Conduas para a prática clínica. **Manual do Hemominas**. Belo Horizonte: Rede Editora Gráfica Ltda, s.d
82. BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 153, de 14 de junho de 2004. Determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o

- armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 jun. 2004b.
83. Rozman, P.; Dovc, T.; Gassner, C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. **Transfusion**, 2000, p. 936-942.
 84. Castilho, L.; Rios, M.; Bianco, C. *et al.*. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. **Transfusion**, 2002a, p. 232-238.
 85. Castilho, L.; Rios, M.; Pellegrino, J.J.R. *et al.* Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 2002b, p. 216-220.
 86. Ribeiro, K.R.; Guarnieri, M.H.; Costa, D.C. *et al.* DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen matched blood in sickle cell disease patients. **Vox Sanguinis**, 2009, p. 147-152.
 87. Guelsin, G.A.; Sell, A.M.; Castilho, L. *et al.* Benefits of blood group genotyping in multitransfused patients from the South of Brazil. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 2010, p. 311–316.
 88. Reid, M.E.; Yazdanbakhsh, K. Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusions. **Current Opinion in Hematology**, 1998, p. 93-102.
 89. Reid, M.E.; Rios, M. Applications of molecular genotyping to immunohaematology. **British Journal of Biomedical Science**, 1999, p. 145-152.
 90. Hashmi, G.; Shariff, T.; Seul, M. *et al.*. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. **Transfusion**, 2005, p. 680-688.
 91. Hashmi, G.; Shariff, T.; Zhang, Y.I. *et al.* Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. **Transfusion**, 2007, p. 736-747.
 92. Nepom, G.T.; Erlich, H. MHC class II molecules and autoimmunity. **Annual Review of Immunology**; 1991, p. 493-525.
 93. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
 94. Oliveira, E.A.; Sell, A.M. Os antígenos HLA e a hemoterapia. **Acta Scientiarum**, 2002, p.731-736.

95. Donadi, E.A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina**, Ribeirão Preto, 2000, p. 7-18.
96. Thorsby, E. A short history of HLA. **Tissue Antigens**, 2009, p. 101-116.
97. Layrisse, Z.; Fernandez, M.T.; Montagnani, S. *et al.* HLA-C(*)3 is a risk factor for cardiomyopathy in Chagas disease. **Human Immunology**, 2000, p. 925-929.
98. Choi, H.B.; Roh, S.Y.; Choi, E.J. *et al.* Association of HLA alleles with non-Hodgkin's lymphoma in Korean population. **International Journal of Hematology**, 2008, p. 203-209.
99. Zhou, M.; Qiu, H.; Chen, T. *et al.* Human leukocyte antigen (HLA)-DRB1*14 is associated with a high incidence of acute lymphocytic leukemia. **Onkologie**, 2012, p. 268-271.
100. Yang, T.; Duan, Z.; Wu, S. *et al.* Association of HLA-B27 genetic polymorphisms with ankylosing spondylitis susceptibility worldwide: a meta-analysis. **Modern Rheumatology**, 2013, p.1-12.
101. Jarduli, L.R.; Sell, A.M.; Reis, P.G. *et al.* Role of HLA, KIR, MICA, and cytokines genes in leprosy. **Biomed Research International**, 2013, p. 1-17.
102. Mikk, M.L.; Kiviniemi, M.; Laine, A.P. *et al.* The HLA-B*39 allele increases type 1 diabetes risk conferred by HLA-DRB1*04:04-DQB1*03:02 and HLA-DRB1*08-DQB1*04 class II haplotypes. **Human Immunology**, 2013, p. 1-6.
103. Alarif, L.; Castro, O.; Ofosu, M. *et al.* HLA-B35 is associated with red blood cell alloimmunization in sickle cell disease. **Clinical Immunology and immunopathology**, 1986, p. 178-183.
104. Noizat-Pirenne, F.; Tournamille, C.; Bierling, P. *et al.* Relative immunogenicity of Fy^a and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. **Transfusion**, 2006, p. 1328-1333.
105. Picard, C.; Frassati, C.; Basire, A. *et al.* Positive association of DRB1 04 e DRB1 15 alleles with Fy^a immunization in a Southern European population. **Transfusion**, 2009, p. 2412- 2417.
106. Chiaroni, J.; Dettori, I.; Ferrera, V. *et al.* HLA-DRB1 polymorphism is associated with Kell immunization. **British Journal of Haematology**, 2005, p.374-378.

107. Reviron, D.; Detorri, I.; Ferrera, V. *et al.* HLA-DRB1 alleles and Jk^a Immunization. **Transfusion**, 2005, p. 956-959.
108. Chu, C.C.; Ho, H.T.; Lee, H.L. *et al.* Anti-“Mi^a” immunization is associated with HLA-DRB1*0901. **Transfusion**, 2009, p. 472-478.
109. Baleotti Júnior., W.; Suzuki, R.B.; Ruiz, M.O. *et al.* Association of HLA DRB1*07 Allele with Dia Alloimmunization in a Brazilian Population. **Transfusion**, 2010, p.17A. (Abstract Supplement).

2. CAPÍTULO II

Artigo: “HLA POLYMORPHISMS AND RISKS OF RED BLOOD CELL ALLOIMMUNIZATION IN POLYTRANSFUSED PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA”

HLA POLYMORPHISMS AND RISKS OF RED BLOOD CELL ALLOIMMUNIZATION IN POLYTRANSFUSED PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA

Camila Rodrigues¹, Ana Maria Sell¹, Gláucia Andréia Soares Guelsin², Daiane Cobianchi da Costa², Tatiana Takahashi Higa³, Sarah Pagliarini e Silva⁴, Luciana Conci Macedo¹, Josiane Bazzo de Alencar¹, Ângela Zanette⁵, Lilian Castilho², Jeane Eliete Laguila Visentainer^{1*}

¹Immunogenetics Laboratory. Sciences Basic Health Department. State University of Maringa, Av. Colombo, 5790, Maringa, PR, Brazil – CEP 87020-900.

²Research Laboratory of Molecular Blood Group. Hematology and Hemotherapy Center. State University of Campinas, Rua Carlos Chagas, 480, Campinas, SP, Brazil – CEP 13081-970.

³Maringa Regional Blood Center – Av. Mandacaru, 1.600, Maringa, PR, Brazil – CEP 87080-000.

⁴Maringa Hospital Cancer – Av. Dr. Luiz Teixeira Mendes, 1736, Maringa, PR, Brazil – CEP: 87015-000

⁵Bahia Hematology and Hemotherapy Center - Av. Vasco da Gama, s/n^o, Rio Vermelho, Salvador, BA, Brazil – CEP: 40240-090.

*Correspondent author:

Jeane E. L. Visentainer

Universidade Estadual de Maringa - Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Avenida Colombo, 5790, CEP 87020-900 - Maringa, PR, Brazil

Telefone: (+55 44) 3011-5392 - e-mail: jelvisentainer@gmail.com

This study was supported by FAPESP, Immunogenetics Laboratory - UEM, CAPES and Fundação Araucária of Paraná State.

No conflicts of interest in this study.

Abstract: The red blood cell alloimmunization is an event that occurs due to factors such as subsequent blood transfusions, age, sex, number of transfusions, and genetic factors. The HLA system has been associated in some studies with a predisposition to the development of red blood alloantibodies. The aim of this present study was to investigate the possibility of alloimmunization to red blood group antigens associated with HLA from each individual, relating the alloimmunization to factors such as gender and number of transfusions. Were used 172 polytransfused patients with sickle cell anemia (128 alloimmunized and 44 non-alloimmunized) and collected clinical and laboratory data of each patient. Red blood group genotyping was performed by *Microarray* method (BioArray Solutions®) and HLA genotyping by PCR-SSO (One Lambda Luminex) for each patient. Allelic, genotypic and phenotypic frequencies were obtained by direct counting and analyzed by Chi Square and/or Fisher's Exact Test. The results showed that the *HLA-C*06* and *HLA-DQB1*03* were significantly high in alloimmunized patients. When analyzed patients with anti-Fy^a and anti-K, were observed that *HLA-DRB1*04* and *HLA-DRB1*11*, respectively, were more often found in individuals who developed these alloantibodies. The number of women alloimmunized was higher than men, and the number of transfusions directly influenced the process of alloimmunization. The most common alloantibodies were against Rh (48.8%) and Kel (17%) systems.

Keywords: Erythrocyte antigen alloimmunization, human leukocyte antigen, sickle cell anemia, blood transfusion

INTRODUCTION

The knowledge of red blood group antigens is essential in transfusion practice, given the development of antibodies against these antigens¹ can become a major problem in the clinic, especially in cases when patients are carriers of hemoglobinopathies^{2,3} or other diseases that requiring periodic red blood cell (RBC) transfusions.^{4,5} According to Poole and Daniels,⁶ alloimmunization can cause a set of disorders, as the increased delayed hemolytic transfusion reaction risk and the reduction of the blood bags compatible number for future transfusions.

Although the blood group alloimmunization usually occurs in patients who receive incompatible blood components, it does not occur in all cases of incompatibility for these groups. According to Higgins e Sloan,⁷ some groups of patients are more responsive to allogeneic transfusions than others. It can be estimated that approximately 1% of patients are sensitized to each unit of transfused red blood cells and the rate of alloimmunization after exposure to alloantigen in polytransfused patients is around 7% to 10% and is higher in sickle cell patients (6% to 47%).⁸⁻¹⁰ A couple of studies reported the risk of alloimmunization be associated with the number of transfusions and related to the female gender, although some authors did not confirm these associations.¹¹⁻¹⁴

Genetic factors such as HLA (Human Leukocyte Antigen) have been studied by some authors regarding their ability to influence this alloimmunization. The HLA system is encoded by a genes subset of the Major Histocompatibility Complex (MHC) that is located on the short arm of human chromosome 6. The HLA class I and II participate in antigen presentation to T lymphocytes CD8+ and CD4+, respectively. The HLA-DRB1 alleles have been investigated most frequently in alloimmunization to red blood antigens, due to the mechanism of antigen recognition.^{15,16} Previous studies have identified a possible relationship between HLA phenotypes and the immune response to a variety of antigens, including blood groups antigens Jk^a,¹⁷ Kell,^{16,18} Fy^a,^{18,19} Mi^a²⁰ and Rh(D).²¹

Given the importance of the investigation of the factors that lead to alloimmunization, the aim of the present study was to investigate the possibility of red blood alloimmunization to be associated with HLA of each individual, including factors such as gender and number of transfusions.

MATERIALS AND METHODS

Study participants

After informed consent, blood samples were collected with EDTA from 172 polytransfused patients with sickle cell anemia (SCA) in blood transfusion scheme phenotype (among these, 128 non-alloimmunized and 44 alloimmunized), attended at Hematology and Blood Center at UNICAMP and Maringa Regional Blood Center. The project was executed according to the rules of the Ethics Committee on Human Research of the University of Campinas (UNICAMP) and University State of Maringa (UEM), in accordance with Resolution 196/96 of the National Health Council/National Committee for Research Ethics: Opinions nº 355/2009 and nº 1216/2009, respectively.

Patients who have received three or more lifelong blood transfusions were eligible for the study. We also collected data such as age, number of transfusions and the presence of alloantibodies. The ethnic group was made up of a majority of African descent, due to the fact that the disease presents high frequency in the African continent, but due to the large miscegenation that exists in Brazil, they were classified as being of mixed ethnic group according to Parra et al.²²

Blood samples processing and DNA extraction

The blood samples collected were frozen in a freezer at -20°C. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes using the Biopur Kit (Diagnostic Biometrix®, Brazil), according to protocols recommended by manufacturer, or by Salting-out

Technique.^{23,24} The concentration and quality of all DNA were analyzed with the Nanodrop 2000 (Applied Biosystems[®], USA), with recommended concentration of 20 to 100ng/μL.

HLA and red blood group genotyping

The HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 genotyping from the patients was analyzed by PCR-SSO (polymerase chain reaction - specific sequence of oligonucleotides), based on the LUMINEX technology (One Lambda[®], CA, USA). The fluorescence intensity corresponding to hybridization was observed by a flow cytometer. The data were analyzed using the computer program HLA Fusion 2.0 (One Lambda[®], CA, USA).

Red blood group genotyping of all patients was performed by Microarray Kit BeadChip Human Erythrocyte Antigen (HEA) containing probes directed to polymorphic sites RHCE, FY (FY-including GATA), DO, CO, DI, SC, GYPA, GYPB, LU, KEL, JK, LW and a mutation associated with hemoglobin (HbS) (BioArray Solutions[®], Warren, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. The assays were performed as described by Hashmi et al²⁵ for BeadChip, using equipment supplied by the company BioArray Solutions Ltd[®].

Statistical analysis

Allelic, genotypic and phenotypic frequencies were obtained by direct counting of alleles and the association analysis of HLA genes variants with alloimmunization to red blood antigen was performed by Fisher's Exact Test, using the GraphPad (<http://www.graphpad.com/quick/calcs/contingency1.cfm>). Analysis of data such as age, sex and number of transfusions were analyzed by Chi-Square (X^2) and/or Fisher's Exact Test, as appropriate.

P Values less than or equal to 0.05 and corrected by the Bonferroni method for HLA (P_c) were considered statistically significant. The odds ratio (OR) was calculated with a confidence interval (CI) of 95%, using the computer program online SISA (<http://home.clara.net/sisa/>).

To assess whether the population is in Hardy-Weinberg equilibrium, we used the computer program Arlequin 3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>), after the organization of the data in the Convert program.²⁶

RESULTS

Demographic data of patients

The population of this study is in Hardy-Weinberg equilibrium. All patients are homozygous for hemoglobin S (HbSS) with a median age of 29.5 years (range 2-83 years), and for each group, 32 years (range 10-63) for alloimmunized patients and 38 years (range 2-83) for non-alloimmunized. When compared the proportion of men and women between the two groups of patients, no significant difference between the sex ($p > 0.05$) but in alloimmunized patients the frequency was higher in women ($n = 27$, 61.36%) when compared to men ($n = 17$, 38.63%) (p Value = 0.05). When separated the alloimmunized patients in age, individuals less than 18 years, the frequencies were very similar between both (women = 4.54%, men = 2.27%), although, patients over than 18 years, 54.54% were women and 36.36% men.

HLA and red blood group genotyping

Red blood group genotyping showed only significant difference in *GYPA*MM* genotype, which was more frequent in alloimmunized patients (21.6%), when compared with non-alloimmunized group (12.5%) ($p = 0.05$). For other blood systems no statistical difference between the two groups of patients was found (Supplementary Material).

After the Bonferroni correction, there was significant difference for the *HLA-C*06* ($P_c = 0.008$, OR = 3.43, 95% CI = 1.72-6.85) and *HLA-DQB1*03* ($P_c = 0.05$, OR = 1.99, 95% CI = 1.17-3.37) in alloimmunized patients when compared with non-alloimmunized (Table 1) (Supplementary material).

Table 1. Significant allelic and phenotypic frequency of HLA class I and II in alloimmunized and non-alloimmunized polytransfused patients with sickle cell anemia.

| HLA alleles | Alloimmunized (44) | | | Non-alloimmunized (128) | | | OR | 95% CI | p Value | Pc values |
|-------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|------|------------|---------|-----------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | | |
| A*31 | 5 | 5.68 | 11.36 | 2 | 0.78 | 1.56 | 7.65 | 1.47-40.17 | 0.01 | NS* |
| C*06 | 19 | 21.59 | 38.64 | 19 | 7.42 | 14.84 | 3.43 | 1.72-6.85 | <0.001 | 0.008 |
| DQA1*05 | 25 | 28.41 | 50 | 47 | 18.36 | 34.38 | 1.76 | 1.01-3.09 | 0.04 | NS |
| DQB1*03 | 31 | 35.23 | 61.36 | 55 | 21.48 | 39.84 | 1.99 | 1.17-3.37 | 0.01 | 0.05 |

*NS: not significant

Three patients who developed anti-Fy^a had the *HLA-DRB1*04* allelic variant (100%), whereas only 11.36% (n = 21) in non-alloimmunized patients had this variant. The *HLA-DRB1*04:01* allele is more frequent in patients with anti-Fy^a (n = 2, 66.66%) than in non-alloimmunized against that antigen (n = 2, 9.52%) (Table 2) (Supplementary Material). When analyzed Duffy genotypes of the 21 patients who have non alloimmunized and presented the *HLA-DRB1*04*, 15 (71.42%) had the *FY*B/FY*B* genotype, in the other words, the remaining six patients not present risk of Fy^a alloimmunization, increasing the OR to 18.47 with 95% CI = 4-115.76.

Table 2. Allelic and phenotypic frequency comparison of *HLA-DRB1*04* in anti-Fy^a alloimmunized and anti-Fy^a non-alloimmunized polytransfused patients with sickle cell disease.

| HLA-DRB1 | Anti-Fy ^a alloimmunized (3) | | | Anti-Fy ^a non-alloimmunized (169) | | | OR | 95%CI | p Value |
|-------------------|----------------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------|------------|---------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | |
| <i>DRB1*04</i> | 3 | 50 | 100 | 21 | 6.21 | 11 | 15.09 | 2.87-79.40 | 0.005 |
| <i>DRB1*04:01</i> | 2 | 33.33 | 66.66 | 2 | 4.76 | 9.52 | 4.86 | 0.45-40.01 | NS |

When analyzed patients with anti-K, *HLA-DRB1*11* have been found in 46.67% of the anti-K, while individuals who do not develop this antibody frequency was 19.11%. In this case, *HLA-DRB1*11:04* was more presented in alloimmunized patients (42.86%) than in non alloimmunized patients (6.66%) (Table 3) (Supplementary Material). *KEL*01/KEL*02* genotype was found only in two patients who had not alloimmunized to *HLA-DRB1*11*, the rest were homozygous for *KEL*02* allele, in the other words, only these patients may develop alloantibodies anti-K.

Table 3. Allelic and phenotypic frequency comparison of *HLA-DRB1*11* in anti-K alloimmunized and anti-K non-alloimmunized polytransfused patients with sickle cell disease.

| HLA-DRB1 | Anti-K alloimmunized (15) | | | Anti-K non-alloimmunized (157) | | | OR | 95% CI | p Value |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------|-----------|---------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | |
| <i>DRB1*11</i> | 8 | 26.67 | 46.67 | 37 | 11.78 | 19.11 | 2.72 | 1.13-6.56 | 0.04 |
| <i>DRB1*11:04</i> | 3 | 21.43 | 42.86 | 2 | 3.33 | 6.66 | 21.75 | 2.78-1.70 | 0.04 |

Number of transfusions and alloantibody specificity

In this study, the number of transfusions directly influenced the process of alloimmunization (Table 4). Among the patients who received less than 25 blood transfusions, 90.63% did not alloimmunized, while 27.27% alloimmunized. Moreover, individuals who received between 25 and 50 blood transfusions, only 4.69% non-alloimmunized and 54.55% produced alloantibodies. Patients who received more than 50 blood transfusions also alloimmunized more than non-alloimmunized patients, however with smaller OR due to the low number of patients in this group.

Table 4. Number of blood transfusions in alloimmunized and non-alloimmunized polytransfused patients with sickle cell disease.

| Number of transfusions | Alloimmunized (44) | Percent of RBC (%) | Non-alloimmunized (128) | Percent of RBC (%) | OR | 95% CI | p Value |
|------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|------|--------------|---------|
| ≤ 25 | 12 | 27.27 | 116 | 90.63 | 0.03 | 0.013-0.08 | < 0.001 |
| 25-49 | 24 | 54.55 | 6 | 4.69 | 37.2 | 11.67-118.55 | < 0.001 |
| > 50 | 8 | 18.18 | 6 | 4.69 | 4.51 | 1.47-13.87 | 0.009 |

In the group of alloimmunized patients, 23 patients (53.5%) developed a single alloantibody, while 14 patients (32.6%) developed two or three alloantibodies and six patients (14%) developed 4 to 6. The most common antibodies were developed against the Rh system antigens (anti-E: 19%, anti-C: 11.5%, anti-D: 6.9%; anti-C^w: 4.6%, anti-c and anti-e: 3.4%) and Kell system (anti-K: 17%). Antibodies against S (8%); Jk^b and Le^a (5.7%); Fy^a (3.4%); Le^b and anti-I (2.3%); Fy^b, Di^a, s, M and Lu^a (1.1%) antigens were less frequent.

DISCUSSION

The transfusion therapy is a common practice in the treatment and prevention of complications of sickle cell disease (SCD), and approximately over half of children and 90% of adults with SCD receive transfusions of RBC at least one time, it is estimated that about 20 to 30% are maintained by chronic transfusion.^{9,10,27} Chronically transfused patients represent a special class of alloimmunized whose development multiple antibodies can lead to death.

The results of this study confirm that some HLA molecules could facilitate the presentation of red blood cell antigenic peptides to T lymphocytes. Hoppe *et al.*²⁸ have been studied 159 American polytransfused patients with sickle cell anemia and observed that *HLA-DRB1*15:03* was associated with the risk of develop alloantibodies (p = 0.03, OR = 2.02), whereas the *HLA-DRB1*09:01* conferred protection to patients who not alloimmunized

($p = 0.008$, $OR = 0.13$). Alarif *et al.*²⁹ showed that HLA-B35 was associated with the red blood alloimmunization in patients with sickle cell disease, from United State, which was present in 67% of alloimmunized patients and 25% of non-alloimmunized ($p = 0.02$). This same study suggested a high frequency of HLA-Cw4 in responding patients (57%) and lowest in non-responders (25%), although this difference was not significant. However, when that two molecules (B35 and HLA-Cw4) were analyzed together, both had to alloimmunized individuals often high (81%) versus 25% in non-alloimmunized ($p = 0.001$). To date, no other previous study associated the red blood alloimmunization to *HLA-C*06* and *HLA-DQB1*03* allelic variants, as observed in this study, which showed high risk of alloimmunization.

Analyzing the process of alloimmunization individually blood group antigens, some studies have associated HLA-DRB1 alleles with the production of specific alloantibodies. In this study, the *HLA-DRB1*04* variant showed high frequency in patients with anti-Fy^a, with an alloimmunization risk of 15.38. Similar data were found by Noizat-Pirenne *et al.*¹⁸ and Picard *et al.*¹⁹ who associated the HLA polymorphism with Fy^a alloimmunization. In both studies *HLA-DRB1*04* was significantly elevated in French polytransfused patients ($p < 0.0001$, $OR = 12.9$; $p < 0.001$, $OR = 4.2$), on the other hand, *HLA-DRB1*15* was only significant in the second study ($p < 0.001$, $OR = 4.3$). In our studied population, there was no significant difference between the two groups of patients for the *HLA-DRB1*15* variant.

Furthermore, in this study, *HLA-DRB1*11* was associated with K alloimmunization (risk of 2.72 to developing alloantibodies). This same result was found by Chiaroni *et al.*,¹⁶ who have shown that the *HLA-DRB1*11* variant was more frequent in alloimmunized group with anti-K when compared to the control group ($p < 0.001$, $OR = 3.5$) in a French population. In the same study and in another performed by Noizat-Pirenne *et al.*,¹⁸ the frequency of *HLA-DRB1*13* was significant higher in patients with anti-K when compared to the controls ($p < 0.02$, $OR = 3$ and $p < 0.001$, $OR = 2.52$, respectively), which could not be confirmed in this study.

Studies have been confirmed that women present more predisposition to red blood alloimmunization than men do. Reisner *et al.*³⁰ found that females were more sensitive to the development alloantibodies when compared to males ($p = 0.008$). Bauer *et al.*¹³ also associated this risk to females, with a risk of 1.89 to alloimmunization. This study found that among patients alloimmunized, the frequency was higher in women when compared to men, mainly in individuals over 18 years. A plausible explanation for this event would be that women are often exposed to erythrocyte alloantigen during pregnancy or at childbirth.¹³ A fact that reflects this reality could be observed in studies by Aygun *et al.*⁴ in patients with sickle cell disease, which in pediatric patients there was no difference in the rate of alloimmunization for both sexes, while among adult patients, this rate was higher in women (54.5%) than in men (38%).

The results of this study showed that the number of blood transfusion can directly influence the process of alloimmunization ($p < 0.001$). The same could be seen in a study of patients with multiple transfusions of Uganda, which the number of transfusions and transfusion episodes directly influenced the process of alloimmunization ($p = 0.01$).¹¹ A similar result was found in two studies conducted in the Netherlands with multiple transfused patients and hematologic disease and cancer.^{12,31}

As in other studies,³¹⁻³⁴ antibodies against the Rh system (especially anti-D, anti-E) and Kell system were more often found after multiple transfusions in this population. This study also found that the most of alloimmunized patients (53.5%) produced only a specificity of alloantibodies. However, this data differs from other studies that identified a higher frequency of patients with the presence of more than one type of alloantibody.^{12,31,35}

The presence of these alloantibodies in polytransfused patients has diffculted to obtain compatible units of blood, which can cause hemolytic transfusion reactions,³⁶ becoming restricted the selection of phenotyped bags for these patients. The importance of investigate the association between alloimmunization and HLA, allows the best selection of these

phenotyped bags for patients who receive multiple blood transfusions, in view of certain HLA molecules predispose to the development of alloantibodies in these individuals. Therefore, the possibility of having complementary techniques to hemagglutination assays should be considered in polytransfused patients.^{27,37} The molecular biology techniques has been an instrumental in the introduction of new methodologies in the immunohematology routine laboratory, increasing the safety and efficacy of transfusion in multiple transfused patients, such as thalassemia, sickle cell anemia, myelodysplasia syndrome and autoimmune hemolytic anemia. Thus, the HLA and red blood group genotyping become an important methodology to prevent the alloimmunization in polytransfused patients. Another factor that can prevent the formation of additional alloantibodies in responder patients is reducing the frequency of blood transfusions. In a study conducted in Brazil with 144 sickle cell patients, in 11 of 15 alloimmunized patients, previously typed by hemagglutination testing, have benefited from receiving red blood antigens based on genotype. Therefore, blood groups genotyping contributed to the management of transfusions in SCD patients by facilitating the transfusion support with antigen-matched blood and reducing the episodes of red blood cell transfusions³⁸.

In conclusion, this study suggest that *HLA-C*06* and *HLA-DQB1*03* variants are associated with susceptibility alloimmunization in patients with recurrent scheme for blood transfusions In polytransfused patients with sickle cell anemia, and that the *HLA-DRB1*04* and *HLA-DRB1*11* are associated with the production of anti-Fy^a and anti-K, respectively, highlighting data previously found. The introduction of a program involving the HLA and red blood group genotype could have a large impact on pre-transfusion situations, reducing the undesirable alloantibodies production. In the future, these tests may be a part of routine transfusion of every major centers of Hematology, especially for multiple transfused patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thanks all those who helped in the execution of this study allocated at the Immunogenetics Laboratory (LIG - UEM); Maringa Regional Blood Center and Maringa Transfusion Services Cancer Hospital. We also thanks the financial support provided by FAPESP, LIG - UEM, CAPES and Fundação Araucária of Parana State.

REFERENCES

1. Seltsam A, Wagner FF, Salama A, Flegel WA. Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study. *Transfusion* 2003;**43**: 1563-6.
2. Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev* 2000;**14**: 44-61.
3. Moise KJ. Fetal anemia due to non-Rhesus-D red-cell alloimmunization. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;**13**: 207-14.
4. Aygun B, Padmanabhan S, Paley C, Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. *Transfusion* 2002;**42**: 37-43.
5. Talano JA, Hillery CA, Gottschall JL, Baylerian DM, Scott JP. Delayed hemolytic transfusion reaction/hyperhemolysis syndrome in children with sickle cell disease. *Pediatrics* 2003;**111**: e661-5.
6. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev* 2007;**21**: 58-71.
7. Higgins JM, Sloan SR. Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders. *Blood* 2008;**112**: 2546-53.
8. Bordin JO. Aloimunização após transfusão de concentrado de hemácias em pacientes atendidos em um serviço de emergência. *Rev. bras. hematol. hemoter* 2007;**29**: 339-43.
9. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, Castro O, Dosik H, Moehr J, Wang W, Levy PS. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1990;**76**: 1431-7.
10. Vichinsky EP, Earles A, Johnson RA, Hoag MS, Williams A, Lubin B. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. *N Engl J Med* 1990;**322**: 1617-21.
11. Natukunda B, Schonewille H, Ndugwa C, Brand A. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease patients in Uganda. *Transfusion* 2010;**50**: 20-5.
12. Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion* 1999;**39**: 763-71.
13. Bauer MP, Wiersum-Osselton J, Schipperus M, Vandenbroucke JP, Briet E. Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion. *Transfusion* 2007;**47**: 2066-71.
14. Schonewille H, van de Watering LM, Brand A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: is it time to take precautionary measures? *Transfusion*. United States, 2006:630-5.
15. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994;**368**: 215-21.
16. Chiaroni J, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, de Micco P, Reviron D. HLA-DRB1 polymorphism is associated with Kell immunisation *Br J Haematol*. England, 2006:374-8.
17. Reviron D, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, de Micco P, Chiaroni J. HLA-DRB1 alleles and Jk(a) immunization. *Transfusion* 2005;**45**: 956-9.
18. Noizat-Pirenne F, Tournamille C, Bierling P, Roudot-Thoraval F, Le Pennec PY, Rouger P, Ansart-Pirenne H. Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion* 2006;**46**: 1328-33.
19. Picard C, Frassati C, Basire A, Buhler S, Galicher V, Ferrera V, Reviron D, Zappitelli JP, Bailly P, Chiaroni J. Positive association of DRB1 04 and DRB1 15 alleles with

- Fya immunization in a Southern European population Transfusion. United States, 2009;2412-7.
20. Chu CC, Ho HT, Lee HL, Chan YS, Chang FJ, Wang CL, Lin M. Anti-"Mi(a)" immunization is associated with HLA-DRB1*0901 Transfusion. United States, 2009;472-8.
 21. Kumar US, Ghosh K, Gupte SS, Gupte SC, Mohanty D. Role of HLA antigens in Rh (D) alloimmunized pregnant women from Mumbai, Maharashtra, India. J Biosci 2002;**27**: 135-41.
 22. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;**100**: 177-82.
 23. John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. Nucleic Acids Res 1991;**19**: 408.
 24. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res 1991;**19**: 5444.
 25. Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajhala P, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, Lomas-Francis C, Chaudhuri A, Reid ME. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. Transfusion 2005;**45**: 680-8.
 26. Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, de ODMM, Visentainer JE, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. Hum Biol 2000;**72**: 597-617.
 27. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil:[editorial]; Sickle cell disease in Brazil:[editorial]. Rev. Bras. Hematol. Hemoter 2007;**29**: 204-6.
 28. Hoppe C, Klitz W, Vichinsky E, Styles L. HLA type and risk of alloimmunization in sickle cell disease. Am J Hematol 2009;**84**: 462-4.
 29. Alarif L, Castro O, Ofosu M, Dunston G, Scott RB. HLA-B35 is associated with red cell alloimmunization in sickle cell disease. Clin Immunol Immunopathol 1986;**38**: 178-83.
 30. Reisner EG, Kostyu DD, Phillips G, Walker C, Dawson DV. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. Tissue Antigens 1987;**30**: 161-6.
 31. Fluit CR, Kunst VA, Drenthe-Schonk AM. Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. Transfusion 1990;**30**: 532-5.
 32. Martins PRJ, Alves VM, Pereira GA, Moraes-Souza H. Frequência de anticorpos irregulares em politransfundidos no Hemocentro Regional de Uberaba-MG, de 1997 a 2005. Rev bras hematol hemoter 2008;**30**: 272-6.
 33. Baby M, Fongoro S, Cisse M, Gakou Y, Bathily M, Dembele AK, Maiga MK, Tounkara A, Diallo DA. [Frequency of red blood cell alloimmunization in polytransfused patients at the university teaching hospital of Point G, Bamako, Mali]. Transfus Clin Biol 2010;**17**: 218-22.
 34. Helman R, Cançado RD, Olivatto C. Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes com doença falciforme: experiência de um centro em São Paulo; Incidence of alloimmunization in sickle cell disease: experience of a center in São Paulo. Einstein (São Paulo) 2011;**9**.
 35. Blumberg N, Peck K, Ross K, Avila E. Immune response to chronic red blood cell transfusion. Vox Sang 1983;**44**: 212-7.
 36. Pinto PC, Braga JA, Santos AM. Risk factors for alloimmunization in patients with sickle cell anemia. Rev Assoc Med Bras 2011;**57**: 668-73.
 37. Guelsin GA, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, Higa TT, Hirle LS, Visentainer JE. Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. J Clin Lab Anal 2010;**24**: 311-6.
 38. Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, Costa FF, Pellegrino J, Jr., Castilho L. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. Vox Sang 2009;**97**: 147-52.

3. CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSÕES

O estudo de associação HLA com aloimunização eritrocitária realizado com pacientes politransfundidos com anemia falciforme permitiu algumas conclusões e observações:

- 1) As variantes *HLA-C*06* e *HLA-DRB1*03* foram associadas com a susceptibilidade ao processo de aloimunização em pacientes com anemia falciforme em esquema de múltiplas transfusões;
- 2) As variantes *HLA-DRB1*04* e *HLA-DRB1*11* foram associadas à aloimunização aos antígenos Fy^a e K, respectivamente, sugerindo que estas variantes sejam fatores de risco ao desenvolvimento de aloanticorpos contra estes determinados antígenos;
- 3) O número de transfusões sanguíneas influenciou diretamente no processo de aloimunização em pacientes politransfundidos com anemia falciforme.

A investigação do polimorfismo HLA em pacientes que são submetidos a esquemas de transfusões recorrentes mostrou-se de grande necessidade para estes pacientes, com intuito de evitar que ocorra a aloimunização anti-eritrocitária, tendo em vista que algumas destas moléculas HLA levam à predisposição ao desenvolvimento de determinados aloanticorpos, como visto neste estudo.

As ferramentas de biologia molecular, principalmente na genotipagem eritrocitária, são de suma importância na elucidação na tipagem sanguínea em casos onde o paciente recebe múltiplas transfusões e não é possível definir o fenótipo destes indivíduos.

A tecnologia de *Microarray* provou ser uma técnica importante e eficiente para identificação dos antígenos eritrocitários em pacientes politransfundidos, sendo esta uma metodologia de larga escala, diminuindo o tempo e até mesmo custo de trabalho, dependendo da demanda laboratorial.

É necessário alertar os profissionais de saúde para uma constante vigilância em relação ao processo de aloimunização e suas consequências, destacando a importância da genotipagem

eritrocitária e HLA em pacientes politransfundidos, servindo de auxílio nas técnicas convencionais de imunohematologia.

3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados promissores obtidos, há a necessidade de uma investigação minuciosa do polimorfismo HLA na aloimunização eritrocitária nestes pacientes politransfundidos, investigando se a doença falciforme está intimamente relacionada com este processo.

Análises adicionais, como a pesquisa de aloanticorpos anti-HLA também poderiam ser feitas para aprimorar os resultados, relacionando também a aloimunização HLA que acaba se tornando outro problema em pacientes cronicamente transfundidos.

A introdução de uma política envolvendo a genotipagem HLA e eritrocitária poderia ter um grande impacto nas situações pré-transfusionais, diminuindo a produção indesejável dos aloanticorpos evitando assim riscos adicionais a estes pacientes. No futuro, estes exames poderão fazer parte da rotina transfusional de todos os centros de Hematologia e Hemoterapia, em especial para pacientes politransfundidos.

4. APÊNDICES

Supplemental File

Table S1. Genotypic frequencies of red blood group in alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease.

| Red Blood Group genotype | Alloimmunized (44) | | Non-alloimmunized (128) | | P Value |
|--------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------|
| | n alleles | Genotypic frequency (%) | n alleles | Genotype frequency (%) | |
| <i>RHCE*CC</i> | 5 | 5.7 | 8 | 3.1 | NS |
| <i>RHCE*Cc</i> | 14 | 15.9 | 51 | 19.9 | NS |
| <i>RHCE*cc</i> | 25 | 28.4 | 65 | 25.4 | NS |
| <i>RHCE*EE</i> | 1 | 1.1 | 2 | 0.8 | NS |
| <i>RHCE*Ee</i> | 9 | 10.2 | 26 | 10.2 | NS |
| <i>RHCE*ee</i> | 34 | 38.6 | 98 | 38.3 | NS |
| <i>KEL*1/KEL*2</i> | 4 | 4.5 | 9 | 3.5 | NS |
| <i>KEL*2/KEL*2</i> | 40 | 45.4 | 118 | 46.1 | NS |
| <i>JK*A/JK*A</i> | 17 | 19.3 | 61 | 23.8 | NS |
| <i>JK*B/JK*B</i> | 7 | 7.9 | 17 | 6.6 | NS |
| <i>JK*A/JK*B</i> | 19 | 21.6 | 50 | 19.5 | NS |
| <i>FY*A/FY*A</i> | 9 | 10.2 | 28 | 10.9 | NS |
| <i>FY*A/FY*B</i> | 8 | 9.1 | 15 | 5.9 | NS |
| <i>FY*B/FY*B</i> | 26 | 29.5 | 82 | 32 | NS |
| <i>GATA-1(A/A)</i> | 12 | 13.6 | 28 | 10.9 | NS |
| <i>GATA-1(A/B)</i> | 15 | 17 | 54 | 21.1 | NS |
| <i>GATA-1(B/B)</i> | 12 | 13.6 | 41 | 16 | NS |
| <i>DI*A/DI*B</i> | 0 | 0 | 3 | 1.2 | NS |
| <i>DI*B/DI*B</i> | 44 | 50 | 123 | 48 | NS |
| <i>GYPA*MM</i> | 19 | 21.6 | 32 | 12.5 | 0.05 |
| <i>GYPA*MN</i> | 20 | 22.7 | 76 | 29.7 | NS |
| <i>GYPA*NN</i> | 5 | 5.7 | 13 | 5.1 | NS |
| <i>GYPB*SS</i> | 4 | 4.5 | 9 | 3.5 | NS |
| <i>GYPB*Ss</i> | 14 | 15.9 | 45 | 17.6 | NS |
| <i>GYPB*ss</i> | 26 | 29.5 | 73 | 28.5 | NS |
| <i>DO*A/DO*A</i> | 6 | 6.8 | 8 | 3.1 | NS |
| <i>DO*A/DO*B</i> | 23 | 26.1 | 56 | 21.9 | NS |
| <i>DO*B/DO*B</i> | 15 | 17 | 62 | 24.2 | NS |

Table S2. Allelic and phenotypic frequencies of HLA-A in alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease.

| HLA-A locus | Alloimmunized (44) | | | Non-alloimmunized (128) | | | OR | 95% CI | p Value | Pc values |
|-------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|------|------------|---------|-----------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | | |
| A*01 | 10 | 11.36 | 22.73 | 16 | 6.25 | 11.72 | - | - | NS | NS |
| A*02 | 23 | 26.14 | 47.73 | 44 | 17.19 | 30.47 | - | - | NS | NS |
| A*03 | 9 | 10.23 | 18.18 | 25 | 9.77 | 19.53 | - | - | NS | NS |
| A*11 | 3 | 3.41 | 6.82 | 8 | 3.13 | 6.25 | - | - | NS | NS |
| A*23 | 5 | 5.68 | 11.36 | 28 | 10.94 | 21.88 | - | - | NS | NS |
| A*24 | 6 | 6.82 | 13.64 | 19 | 7.42 | 13.28 | - | - | NS | NS |
| A*25 | 1 | 1.14 | 2.27 | 1 | 0.39 | 0.78 | - | - | NS | NS |
| A*26 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1.56 | 3.13 | - | - | NS | NS |
| A*29 | 2 | 2.27 | 4.55 | 18 | 7.03 | 14.06 | - | - | NS | NS |
| A*30 | 7 | 7.95 | 15.91 | 28 | 10.94 | 20.31 | - | - | NS | NS |
| A*31 | 5 | 5.68 | 11.36 | 2 | 0.78 | 1.56 | 7.65 | 1.47-40.17 | 0.01 | NS |
| A*32 | 0 | 0 | 0 | 6 | 2.34 | 4.69 | - | - | NS | NS |
| A*33 | 3 | 3.41 | 6.82 | 14 | 5.47 | 10.94 | - | - | NS | NS |
| A*34 | 2 | 2.27 | 4.55 | 4 | 1.56 | 3.13 | - | - | NS | NS |
| A*36 | 0 | 0 | 0 | 7 | 2.73 | 5.47 | - | - | NS | NS |
| A*66 | 2 | 2.27 | 4.55 | 3 | 1.17 | 2.34 | - | - | NS | NS |
| A*68 | 5 | 5.68 | 11.36 | 19 | 7.42 | 14.84 | - | - | NS | NS |
| A*74 | 5 | 5.68 | 11.36 | 7 | 2.73 | 5.47 | - | - | NS | NS |
| A*80 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.39 | 0.78 | - | - | NS | NS |

Table S3. Allelic and phenotypic frequencies of HLA-B in alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease.

| HLA-B locus | Alloimmunized (44) | | | Non-alloimmunized (128) | | | OR | 95% CI | p Value | Pc values |
|-------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|----|--------|---------|-----------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | | |
| <i>B*07</i> | 7 | 7.95 | 15.91 | 25 | 9.92 | 17.97 | - | - | NS | NS |
| <i>B*08</i> | 5 | 5.68 | 11.36 | 5 | 1.98 | 3.91 | - | - | NS | NS |
| <i>B*13</i> | 0 | 0 | 0 | 4 | 1.59 | 3.13 | - | - | NS | NS |
| <i>B*14</i> | 6 | 6.82 | 13.64 | 13 | 5.16 | 8.59 | - | - | NS | NS |
| <i>B*15</i> | 10 | 11.36 | 20.45 | 22 | 8.73 | 15.63 | - | - | NS | NS |
| <i>B*18</i> | 3 | 3.41 | 4.55 | 7 | 2.78 | 5.47 | - | - | NS | NS |
| <i>B*27</i> | 1 | 1.14 | 2.27 | 6 | 2.38 | 4.69 | - | - | NS | NS |
| <i>B*35</i> | 7 | 7.95 | 15.91 | 24 | 9.52 | 16.41 | - | - | NS | NS |
| <i>B*37</i> | 2 | 2.27 | 4.55 | 3 | 1.19 | 2.34 | - | - | NS | NS |
| <i>B*38</i> | 0 | 0 | 0 | 3 | 1.19 | 2.34 | - | - | NS | NS |
| <i>B*39</i> | 5 | 5.68 | 11.36 | 7 | 2.78 | 5.47 | - | - | NS | NS |
| <i>B*40</i> | 2 | 2.27 | 4.55 | 7 | 2.78 | 5.47 | - | - | NS | NS |
| <i>B*41</i> | 0 | 0 | 0 | 5 | 1.98 | 3.91 | - | - | NS | NS |
| <i>B*42</i> | 2 | 2.27 | 4.55 | 15 | 5.95 | 11.72 | - | - | NS | NS |
| <i>B*44</i> | 11 | 12.50 | 22.73 | 22 | 8.73 | 17.19 | - | - | NS | NS |
| <i>B*45</i> | 3 | 3.41 | 6.82 | 3 | 1.19 | 2.34 | - | - | NS | NS |
| <i>B*48</i> | 1 | 1.14 | 2.27 | 0 | 0 | 0 | - | - | NS | NS |
| <i>B*49</i> | 2 | 2.27 | 4.55 | 10 | 3.97 | 7.03 | - | - | NS | NS |
| <i>B*50</i> | 3 | 3.41 | 6.82 | 8 | 3.17 | 5.47 | - | - | NS | NS |
| <i>B*51</i> | 4 | 4.55 | 6.82 | 11 | 4.37 | 8.59 | - | - | NS | NS |
| <i>B*52</i> | 1 | 1.14 | 2.27 | 6 | 2.38 | 4.69 | - | - | NS | NS |
| <i>B*53</i> | 3 | 3.41 | 6.82 | 11 | 4.37 | 8.59 | - | - | NS | NS |
| <i>B*56</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.40 | 0.78 | - | - | NS | NS |
| <i>B*57</i> | 3 | 3.41 | 6.82 | 10 | 3.97 | 7.81 | - | - | NS | NS |
| <i>B*58</i> | 6 | 6.82 | 13.64 | 13 | 5.16 | 10.16 | - | - | NS | NS |
| <i>B*81</i> | 1 | 1.14 | 2.27 | 9 | 3.57 | 7.03 | - | - | NS | NS |

Table S4. Allelic and phenotypic frequencies of HLA-C in alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease.

| HLA-C locus | Alloimmunized (44) | | | Non-alloimmunized (128) | | | OR | 95% CI | p Value | Pc values |
|-------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|------|-----------|---------|-----------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | | |
| <i>C*01</i> | 1 | 1.14 | 2.27 | 4 | 1.59 | 3.13 | - | - | NS | NS |
| <i>C*02</i> | 8 | 9.09 | 18.18 | 18 | 7.14 | 14.06 | - | - | NS | NS |
| <i>C*03</i> | 5 | 5.68 | 11.36 | 24 | 9.52 | 18.75 | - | - | NS | NS |
| <i>C*04</i> | 16 | 18.18 | 31.82 | 40 | 15.87 | 26.56 | - | - | NS | NS |
| <i>C*05</i> | 4 | 4.55 | 9.09 | 9 | 3.57 | 7.03 | - | - | NS | NS |
| <i>C*06</i> | 19 | 21.59 | 38.64 | 19 | 7.42 | 14.84 | 3.43 | 1.72-6.85 | <0.001 | 0.008 |
| <i>C*07</i> | 21 | 23.86 | 38.64 | 59 | 23.41 | 41.41 | - | - | NS | NS |
| <i>C*08</i> | 0 | 0 | 0 | 11 | 4.37 | 7.81 | - | - | NS | NS |
| <i>C*12</i> | 2 | 2.27 | 4.55 | 9 | 3.57 | 7.03 | - | - | NS | NS |
| <i>C*14</i> | 1 | 1.14 | 2.27 | 6 | 2.38 | 4.69 | - | - | NS | NS |
| <i>C*15</i> | 2 | 2.27 | 4.55 | 9 | 3.57 | 6.25 | - | - | NS | NS |
| <i>C*16</i> | 6 | 6.82 | 11.36 | 16 | 6.35 | 12.50 | - | - | NS | NS |
| <i>C*17</i> | 2 | 2.27 | 4.55 | 20 | 7.94 | 15.63 | - | - | NS | NS |
| <i>C*18</i> | 1 | 1.14 | 2.27 | 8 | 3.17 | 6.25 | - | - | NS | NS |

Table S5. Allelic and phenotypic frequencies of HLA-DRB1 in alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease.

| HLA-DRB1 locus | Alloimmunized (44) | | | Non-alloimmunized (128) | | | OR | 95% CI | p Value | Pc values |
|----------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|----|--------|---------|-----------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | | |
| <i>DRB1*01</i> | 8 | 9.09 | 18.18 | 23 | 8.98 | 16.41 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*03</i> | 7 | 7.95 | 15.91 | 25 | 9.77 | 17.97 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*04</i> | 6 | 6.82 | 13.64 | 17 | 6.64 | 11.72 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*07</i> | 12 | 13.64 | 27.27 | 37 | 14.45 | 25.78 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*08</i> | 5 | 5.68 | 11.36 | 14 | 5.47 | 10.16 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*09</i> | 2 | 2.27 | 4.55 | 4 | 1.56 | 3.13 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*10</i> | 3 | 3.41 | 6.82 | 6 | 2.34 | 4.69 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*11</i> | 17 | 19.32 | 34.09 | 28 | 10.94 | 20.31 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*12</i> | 1 | 1.14 | 2.27 | 11 | 4.30 | 8.59 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*13</i> | 11 | 12.50 | 22.73 | 36 | 14.06 | 27.34 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*14</i> | 4 | 4.55 | 9.09 | 11 | 4.30 | 8.59 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*15</i> | 11 | 12.50 | 22.73 | 35 | 13.67 | 25 | - | - | NS | NS |
| <i>DRB1*16</i> | 1 | 1.14 | 2.27 | 9 | 3.52 | 7.03 | - | - | NS | NS |

Table S6 Allelic and phenotypic frequencies of HLA-DQA1 in alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease.

| HLA-DQA1 locus | Alloimmunized (44) | | | Non-alloimmunized (128) | | | OR | 95% CI | p Value | Pc values |
|----------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|------|-----------|---------|-----------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | | |
| <i>DQA1*01</i> | 37 | 42.05 | 81.58 | 122 | 47.97 | 67.97 | - | - | NS | NS |
| <i>DQA1*02</i> | 12 | 13.64 | 27.27 | 38 | 14.84 | 26.56 | - | - | NS | NS |
| <i>DQA1*03</i> | 9 | 10.23 | 20.45 | 24 | 9.38 | 16.41 | - | - | NS | NS |
| <i>DQA1*04</i> | 5 | 5.68 | 11.36 | 25 | 9.77 | 19.53 | - | - | NS | NS |
| <i>DQA1*05</i> | 25 | 28.41 | 50 | 47 | 18.36 | 34.38 | 1.76 | 1.01-3.09 | 0.04 | NS |

Table S7. Allelic and phenotypic frequencies of HLA-DQB1 in alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease.

| HLA-DQB1 locus | Alloimmunized (44) | | | Non-alloimmunized (128) | | | OR | 95% CI | p Value | Pc values |
|-------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------|-----------|---------|--------------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | | |
| <i>DQB1*02</i> | 15 | 17.44 | 34.09 | 58 | 22.83 | 38.28 | - | - | NS | NS |
| <i>DQB1*03</i> | 31 | 35.23 | 61.36 | 55 | 21.48 | 39.84 | 1.99 | 1.17-3.37 | 0.01 | 0.05 |
| <i>DQB1*04</i> | 5 | 5.81 | 11.36 | 20 | 7.87 | 15.63 | - | - | NS | NS |
| <i>DQB1*05</i> | 16 | 18.60 | 34.09 | 59 | 23.23 | 39.84 | - | - | NS | NS |
| <i>DQB1*06</i> | 19 | 22.09 | 38.64 | 62 | 24.41 | 41.41 | - | - | NS | NS |

Table S8. Allelic and phenotypic frequencies of HLA-DRB1 in anti-Fy^a alloimmunized and anti Fy^a non-alloimmunized patients with sickle cell disease.

| HLA-DRB1 | Anti-Fy ^a alloimmunized (3) | | | Anti-Fy ^a non-alloimmunized (169) | | | OR | 95%CI | p Value |
|--------------------|----------------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------|------------|---------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | |
| <i>DRB1*01</i> | 2 | 33.33 | 66.67 | 29 | 8.58 | 15.98 | - | - | NS |
| <i>DRB1*03</i> | 0 | 0 | 0 | 32 | 9.47 | 17.75 | - | - | NS |
| <i>DRB1*04</i> | 3 | 50 | 100 | 21 | 6.21 | 11 | 15.09 | 2.87-79.40 | 0.005 |
| <i>DRB1*07</i> | 1 | 16.67 | 33.33 | 47 | 13.91 | 25.44 | - | - | NS |
| <i>DRB1*08</i> | 0 | 0 | 0 | 19 | 5.62 | 10.65 | - | - | NS |
| <i>DRB1*09</i> | 0 | 0 | 0 | 6 | 1.78 | 3.55 | - | - | NS |
| <i>DRB1*10</i> | 0 | 0 | 0 | 9 | 2.66 | 5.33 | - | - | NS |
| <i>DRB1*11</i> | 0 | 0 | 0 | 45 | 13.31 | 24.26 | - | - | NS |
| <i>DRB1*12</i> | 0 | 0 | 0 | 12 | 3.55 | 7.10 | - | - | NS |
| <i>DRB1*13</i> | 0 | 0 | 0 | 47 | 13.91 | 26.63 | - | - | NS |
| <i>DRB1*14</i> | 0 | 0 | 0 | 15 | 4.44 | 8.88 | - | - | NS |
| <i>DRB1*15</i> | 0 | 0 | 0 | 46 | 13.61 | 24.85 | - | - | NS |
| <i>DRB1*16</i> | 0 | 0 | 0 | 10 | 2.96 | 5.92 | - | - | NS |
| <i>HLA-DRB1*04</i> | | | | | | | | | |
| <i>DRB1*04:01</i> | 2 | 33.33 | 66.66 | 2 | 4.76 | 9.52 | 4.86 | 0.45-40.01 | NS |
| <i>DRB1*04:04</i> | 1 | 16.66 | 33.33 | 7 | 16.66 | 23.81 | - | - | NS |

Table S9. Allelic and phenotypic frequencies of HLA-DRB1 in anti-K alloimmunized and anti-K non-alloimmunized patients with sickle cell disease.

| HLA-DRB1 | Anti-K alloimmunized (15) | | | Anti-K non-alloimmunized (157) | | | OR | 95%CI | p Value |
|--------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------|-----------|---------|
| | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | n alleles | Allelic frequency (%) | Phenotypic frequency (%) | | | |
| <i>DRB1*01</i> | 4 | 13.33 | 26.67 | 25 | 8.01 | 14.65 | - | - | NS |
| <i>DRB1*03</i> | 1 | 3.33 | 6.67 | 31 | 9.94 | 18.47 | - | - | NS |
| <i>DRB1*04</i> | 2 | 6.67 | 13.33 | 21 | 6.73 | 12.10 | - | - | NS |
| <i>DRB1*07</i> | 3 | 10 | 20 | 46 | 14.74 | 26.75 | - | - | NS |
| <i>DRB1*08</i> | 2 | 6.67 | 13.33 | 17 | 5.45 | 10.19 | - | - | NS |
| <i>DRB1*09</i> | 0 | 0 | 0 | 6 | 1.92 | 3.82 | - | - | NS |
| <i>DRB1*10</i> | 0 | 0 | 0 | 9 | 2.88 | 5.73 | - | - | NS |
| <i>DRB1*11</i> | 8 | 26.67 | 46.67 | 37 | 11.86 | 21.66 | 2.72 | 1.13-6.56 | 0.04 |
| <i>DRB1*12</i> | 0 | 0 | 0 | 12 | 3.85 | 7.64 | - | - | NS |
| <i>DRB1*13</i> | 4 | 13.33 | 26.67 | 43 | 13.78 | 26.11 | - | - | NS |
| <i>DRB1*14</i> | 0 | 0 | 0 | 15 | 4.81 | 9.55 | - | - | NS |
| <i>DRB1*15</i> | 6 | 20 | 33.33 | 40 | 12.82 | 23.57 | - | - | NS |
| <i>DRB1*16</i> | 0 | 0 | 0 | 10 | 3.21 | 6.37 | - | - | NS |
| <i>HLA-DRB1*11</i> | | | | | | | | | |
| <i>DRB1*11:01</i> | 1 | 7.14 | 14.28 | 20 | 33.33 | 63.33 | - | - | NS |
| <i>DRB1*11:02</i> | 4 | 28.57 | 57.14 | 10 | 16.67 | 33.33 | - | - | NS |
| <i>DRB1*04:04</i> | 3 | 21.43 | 42.85 | 2 | 3.33 | 6.66 | 21.75 | 2.78-1.70 | 0.04 |