**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

FLÁVIA LEITE SOUZA SANTOS

Aloimunização eritrocitária e HLA em doença falciforme

**Ribeirão Preto
2020**

FLÁVIA LEITE SOUZA SANTOS

Aloimunização eritrocitária e HLA em doença falciforme

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Programa: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.

Área de Concentração: Células-Tronco e Terapia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo de Publicação

Serviço de Documentação Médica

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Santos, Flávia Leite Souza

Aloimunização eritrocitária e HLA em doença falciforme / Flávia Leite Souza Santos; orientador Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas - Ribeirão Preto, 2020.

165 f.: il., 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

1. Aloimunização, 2. Doença Falciforme,
3. Aloimunização eritrocitária, 4. Aloimunização HLA,
5. Sistema Duffy de Grupo Sanguíneo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávia Leite Souza Santos

Aloimunização eritrocitária e HLA em doença falciforme

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor dedicado, pelo exemplo e por sempre terem priorizado
minha educação.

Ao meu esposo Rafael, pelo amor e cuidado. Por sempre estar ao meu lado e por
dividir comigo a melhor e mais desafiadora experiência da vida.

Às minhas filhas Maria Clara e Cecília, por todos os momentos em que estive
ausente e por todos os sorrisos que recebi à cada chegada.

Aos avós, Zenaide, Ivonilcio, Terezinha e Eduardo, pela atenção dedicada à minha
família e principalmente às suas netas.

AGRADECIMENTOS

Durante minha jornada na pós-graduação algumas pessoas colaboraram diretamente com este trabalho, enquanto outras, mesmo sem a direta participação, enriqueceram o meu caminho até aqui. Assim, registro meu reconhecimento por todos aqueles que me deram a oportunidade de conhecer seus trabalhos e que dividiram seus conhecimentos, me permitindo evoluir no campo científico e profissional. Agradeço:

Aos pacientes atendidos no ambulatório de hemoglobinopatias, pela disponibilidade e colaboração.

Ao Dr. Gil Cunha De Santis, pelo incentivo para que eu trilhasse esse caminho, desde minha chegada ao Hemocentro de Ribeirão Preto. Obrigada pelos conselhos oportunos e por compartilhar diariamente seu infinito conhecimento.

À Dra. Luciana Oliveira, por sempre me auxiliar com seu raciocínio lógico, preciso e ponderado. Obrigada pelo incentivo, amizade e convivência.

À Profa. Dra. Simone Kashima e à Dra. Evandra Strazza, por todo apoio no transcorrer do projeto e pela contínua colaboração.

À Dra. Ana Cristina Silva Pinto, por compartilhar seu conhecimento e experiência no tratamento dos pacientes com hemoglobinopatias.

Ao Prof. Dr. Thierry Peyrard, que me acolheu no laboratório do *Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins*, em Paris, onde tive a oportunidade de ter contato com os casos mais interessantes e raros, que até então conhecia apenas pelos livros.

À Dra. Eugênia M. A. Ubiali, por compartilhar durante esses anos sua vasta experiência na hemoterapia e por estar sempre disposta a ajudar nas resoluções de problemas, sejam eles de ordem técnica ou não.

À Talitha Baldin Cuter, pelo trabalho junto ao laboratório de genotipagem de grupos sanguíneos, por sempre aceitar os desafios imuno-hematológicos que proponho e por comemorar comigo cada caso intrigante e doador raro encontrados.

À toda equipe do laboratório de imuno-hematologia, pelo importante trabalho desempenhado no atendimento aos pacientes com doença falciforme.

Ao Gustavo Visconde Martins e à Neifi Hassan Saloum, pelo apoio neste projeto junto ao laboratório de HLA.

À Sandra Navarro, por seu trabalho sempre impecável na criação e edição de ilustrações.

À Dalvinha, pela amizade e pelas diversas vezes que me auxiliou com questões administrativas.

Aos colegas pós-graduandos do laboratório da Profa. Dra. Simone Kashima, que me deram a oportunidade de conhecer seus trabalhos e também de aprender com eles. Destaco aqui a colaboração da aluna Aline Fernanda de Souza.

Agradeço a todos os colegas médicos do Hemocentro pela convivência e pela colaboração, direta ou indireta nesse projeto, que me permitiu conciliar as atividades profissionais e acadêmicas.

Agradeço ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, meu orientador, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

RESUMO

Santos, F.L.S. **Aloimunização eritrocitária e HLA em doença falciforme [tese]**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2020. 165 f.

A aloimunização contra antígenos eritrocitários é complicação frequente da terapia transfusional na doença falciforme (DF), podendo afetar mais da metade dos pacientes. A aloimunização contra antígenos leucocitários humanos (HLA) é outra complicação da transfusão, ainda pouco investigada na DF. O estado inflamatório crônico da DF é exacerbado nas complicações agudas. A inflamação tem papel importante na ativação imune e na aloimunização. O grupo sanguíneo Duffy é receptor de citocinas inflamatórias e a presença do alelo *FY*02N.01*(c.-67T>C), em homozigose, determina a ausência de expressão da proteína nos eritrócitos. A presença ou ausência da proteína no eritrócito determinam perfis inflamatórios diferentes em estudos *in vivo* e *in vitro*, mas a correlação clínica desses achados é controversa. **Objetivos:** Avaliar características clínicas associadas à aloimunização eritrocitária, determinar a prevalência de aloimunização HLA e sua eventual correlação com a aloimunização eritrocitária, investigar a relação do polimorfismo *FY* c.-67T>C com a aloimunização eritrocitária e com características clínicas da DF. **Métodos:** Foi realizada análise retrospectiva de dados clínicos, transfusionais e imuno-hematológicos de 211 pacientes com DF já submetidos a transfusão hemácias. Para 185 pacientes, foi realizada a genotipagem de grupos sanguíneos, incluindo os polimorfismos *FY*01/*02* e *FY*02N.01* (c.-67T>C). A pesquisa de anticorpos anti-HLA I/II (LABScreen® Mixed Class I/II) foi realizada em 118 pacientes. **Resultados:** O sexo feminino representou 52,6% dos participantes, a mediana de idade foi 27 anos (mín-máx;2-74 anos) e a distribuição de genótipos foi 69,1% SS, 14,6% S β^0 , 9,4% SC, 3,3% S β^+ , 1,8% SD e 1,4% SS com persistência hereditária da hemoglobina fetal. A prevalência de aloimunização eritrocitária foi 33,1%. Foram encontrados 230 anticorpos. Os anticorpos Rh (C, E, c, e e) e Kell representaram 40,2% dos aloanticorpos (n=179). O anti-Di^a (8,9%) foi a especificidade mais comum depois dos anticorpos Rh/Kell. A idade e o número de transfusões foram fatores de risco independentes para a aloimunização eritrocitária ($p<0,01$). Cada ano de vida e cada concentrado de hemácias aumentou 3% e 0,4% a prevalência de aloimunização, respectivamente. A maioria dos pacientes (68,3%) desenvolveu anticorpos ainda nas primeiras 20 transfusões. O histórico de transfusão antes dos cinco anos de idade foi um fator protetor contra a aloimunização eritrocitária (25% vs 42,2%; $p=0,049$). Nos pacientes em regime transfusional episódico, a taxa de aloimunização foi 1,75/100 CHs, enquanto no

regime regular foi 0,41/100CHs, com risco relativo de aloimunização 4,2 vezes maior na transfusão episódica (IC95%:2,47-7,03). Não houve associação da aloimunização com sobrevida, complicações agudas ou crônicas. A prevalência de aloimunização HLA foi elevada (77,1%) e não mostrou relação com sexo, idade ou número de transfusões. Anticorpos anti-HLAI (76,2%) foram mais comuns que anti-HLAI (38,9%). Houve tendência à associação de aloimunização eritrocitária e HLA (41,7% vs 22,2%; $p=0,07$). Os genótipos *FY c.-67CC/TC* foram associados ao regime transfusional regular (62,6% vs 45,7%; $p=0,032$), ao uso mais frequente de quelante de ferro (40,8% vs 21,4%; $p=0,006$) e à aloimunização eritrocitária (40,8% vs 24,2%; $p=0,025$), porém, foram menos associados à síndrome torácica aguda (41,7% vs 62,8%; $p=0,006$) e ao sequestro esplênico (10,4% vs 22,8%; $p=0,033$) que o genótipo *c.-67TT*. **Conclusão:** A prevalência de aloimunização eritrocitária e HLA são elevadas em pacientes com DF submetidos a transfusão. A aloimunização eritrocitária ocorre principalmente nas primeiras transfusões. Idade mais elevada, maior número de transfusões e transfusão episódica são fatores de risco para a aloimunização. O polimorfismo *FY*02N.01 (c.-67T>C)* parece ter relação com o perfil clínico e com a aloimunização na DF, porém mais estudos são necessários para compreender esse fenômeno.

Palavras-chave: Aloimunização. Doença Falciforme. Aloimunização eritrocitária. Aloimunização HLA. Sistema Duffy de Grupo Sanguíneo.

ABSTRACT

Santos, F.L.S. **Red blood cell and HLA alloimmunization in sickle cell disease [thesis]**. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School, 2020. 165 f.

Red blood cell (RBC) alloimmunization is a common complication of transfusional therapy in sickle cell disease (SCD), which can affect more than a half of the patients. Alloimmunization against human leukocyte antigens (HLA) is another complication of RBC transfusion, poorly investigated in SCD. The chronic inflammatory state in SCD is further exacerbated during acute complications. Inflammation plays an important role in immune activation and in alloimmunization. The Duffy blood group is a receptor of inflammatory cytokines and the *FY*02N.01 (c.-67T> C)* allele, in homozygosis, prevents its expression in RBCs. The presence or absence of Duffy in the erythrocyte determines different inflammatory profiles in *in vivo* and *in vitro* studies. However, the clinical correlation of these findings is controversial. **Objectives:** To evaluate clinical characteristics associated with RBC alloimmunization, to investigate HLA alloimmunization and its relationship with RBC alloimmunization, to investigate the relationship between *FY c.-67T>C* polymorphism, RBC alloimmunization and clinical features in SCD. **Methods:** Retrospective analysis of clinical, transfusional and immunohematological data of 211 patients was performed. RBC genotyping was carried out in 185 patients, including *FY *01/*02* and *FY*02N.01 (c.-67T> C)* polymorphisms. The screening for anti-HLA I / II antibodies (LABScreen® Mixed Class I / II) was performed in 118 patients. **Results:** The female gender represented 52.6% of the participants, the median age was 27 years (min-max; 2-74 years) and the distribution of SCD genotypes was 69,1% SS, 14,6% S β^0 , 9,4% SC, 3,3% S β^+ , 1,8% SD and 1,4% SS with hereditary persistence of fetal hemoglobin. The prevalence of RBC alloimmunization was 33.1%. We found 230 antibodies (Abs) . Rh (C, E, c, and e) and Kell represented 40.2% of the alloAbs (n=179). Anti-Di^a (8,9%) was the most common specificity after Rh / Kell Abs. Age and the number of RBC concentrates were independent risk factors for RBC alloimmunization ($p < 0.01$). Each year and each RBC concentrate increased the prevalence of alloimmunization by 3% and 0.4%, respectively. Most patients (68.3%) developed Ab within the first 20 transfusions. Transfusion before the age of five protected against alloimmunization (25% vs 42.2%; $p = 0.049$). The alloimmunization rate was 1.75/100 CHs in patients in episodic transfusion, while in the regular regimen it was 0.41/100CHs, with a relative risk 4,2 times higher in episodic transfusion (95%CI: 2.47-7.03). There was no association of RBC alloimmunization with survival, acute or chronic complications. The prevalence of HLA

alloimmunization was high (77.1%). There was no association with sex, age or number RBC concentrates. Anti-HLAI Abs (76.2%) were more common than anti-HLAI (38.9%). There was a trend towards an association of RBC and HLA alloimmunization (41.7% vs 22.2%; $p = 0.07$). The *FY c.-67CC/TC* genotypes were associated with regular transfusion (62.6% vs 45.7%; $p = 0.032$), with a more frequent use of iron chelator (40.8% vs 21.4%; $p = 0.006$) and with RBC alloimmunization (40.8% vs 24.2%; $p = 0.025$), however, they were less associated with acute chest syndrome (41.7% vs 62.8%; $p = 0.006$) and splenic sequestration (10,4% vs 22.8%; $p = 0.033$) than the *c.-67TT* genotype. **Conclusion:** The prevalence of RBC and HLA alloimmunization is high in patients with SCD previously transfused. RBC alloimmunization occurs mainly within the first transfusions. Older age, increasing number of transfusions and episodic transfusions are risk factors for RBC alloimmunization. The polymorphism *FY c.-67T>C* seems to be related to the clinical profile of SCD and to RBC alloimmunization, however, more studies are needed to understand this phenomenon.

Keywords: Alloimmunization. Sick Cell Disease. Red blood cell Alloimmunization. HLA Alloimmunization. Duffy Blood-group System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatologia da doença falciforme	25
Figura 2 - Principais complicações clínicas da doença falciforme	31
Figura 3 - Fatores envolvidos na aloimunização.	41
Figura 4 - Região de abrangência do Hemocentro de Ribeirão Preto.	56
Figura 5 - Intensidade de aglutinação na técnica em gel.	60
Figura 6 - Triagem de anticorpos irregulares.....	61
Figura 7 - Pesquisa de anticorpos anti-HLA	62
Figura 8 - Genotipagem por PCR-RFLP.....	65
Figura 9 - Genotipagem por PCR em tempo Real.....	66
Figura 10 - Representação do processo de inclusão e exclusão.	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Recomendação para transfusão de hemácias na doença falciforme.	37
Quadro 2 - Reagentes para a reação de PCR KEL*01/KEL*02.	64
Quadro 3 - Programação do termociclador para a genotipagem KEL*01/KEL*02....	65
Quadro 4 - Fenótipos eritrocitários raros.	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Composição de genótipos da doença falciforme.	71
Gráfico 2 - Histograma de idade.....	71
Gráfico 3 - Prevalência de aloimunização por faixa etária.	75
Gráfico 4 - Número de anticorpos por paciente.....	77
Gráfico 5 - Anticorpos presentes na primeira pesquisa de anticorpos irregulares....	82
Gráfico 6 - Resultado da última PAI nos pacientes aloimunizados.	82
Gráfico 7 - Número de concentrados transfundidos antes da aloimunização.....	83
Gráfico 8 - Risco de aloimunização em função do tempo e do número de transfusões.....	84
Gráfico 9 - Regime transfusional e probabilidade de aloimunização.....	86
Gráfico 10 - Aloimunização vs idade e número de transfusões.....	87
Gráfico 11 - Aloimunização e transfusão antes ou após os cinco anos de idade.....	87
Gráfico 12 - Regime transfusional vs aloimunização e número de transfusões.	89
Gráfico 13 - Sobrevida do grupo aloimunizado e não aloimunizado.	92
Gráfico 14 - Probabilidade de aloimunização conforme o genótipo FY c.-67T>C....	96
Gráfico 15 - Genótipos Fy c.-67T>C e perfil transfusional.....	100
Gráfico 16 - Probabilidade de aloimunização: genótipos FY c.-67TC/CC vs FY c.-67TT.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes com doença falciforme.	73
Tabela 2 - Especificidades dos anticorpos antieritrocitários.	76
Tabela 3 - Prevalência dos fenótipos ABO nos pacientes com doença falciforme. ..	78
Tabela 4 - Prevalência de fenótipos Rh nos pacientes com doença falciforme.	78
Tabela 5 - Frequência antigênica em pacientes com doença falciforme e em doadores.	78
Tabela 6 - Frequências dos fenótipos do sistema Kidd em pacientes e doadores. ..	79
Tabela 7 - Frequências dos fenótipos do sistema MNS (S e s) em pacientes e doadores.	79
Tabela 8 - Frequências dos fenótipos do sistema Duffy em pacientes e doadores. .	79
Tabela 9 - Prevalência dos antígenos C ^w , Di ^a , Kp ^a e Lu ^a em doadores.	79
Tabela 10 - Probabilidade cumulativa de aloimunização por tempo e número de transfusões.	84
Tabela 11 - Características do regime transfusional regular e episódico.	85
Tabela 12 - Taxa de aloimunização: regime regular vs episódico.	85
Tabela 13 - Características transfusionais do grupo aloimunizado vs não aloimunizado.	88
Tabela 14 - Comparação das características clínicas do grupo aloimunizado e não aloimunizado.	90
Tabela 15 - Aloimunização vs variáveis de interesse: modelo bruto e ajustado.	91
Tabela 16 - Resultados da triagem de anticorpos anti-HLA I e II.	92
Tabela 17 - Aloimunização anti-HLA: características dos aloimunizados e não aloimunizados.	93
Tabela 18 - Características clínicas e transfusionais de acordo com o genótipo <i>FY c-67T>C</i>	94

Tabela 19 - Comparação dos genótipos FY c.-67T>C.....	95
Tabela 20 - Taxa de aloimunização e genótipos FY c.-67T>C.	96
Tabela 21 - Comparação dos genótipos FY.c-67CC/TC vs c.-67TT.....	97
Tabela 22 - Genótipo Fy c.-67T>C vs STA: modelo bruto e ajustado.....	98
Tabela 23 - Genótipo FY c.-67T>C vs sequestro esplênico: modelo bruto e ajustado.....	98
Tabela 24 - Características transfusionais: genótipos FY c.-67CC/TC vs FYc.-67TT.....	99
Tabela 25 - Aloimunização vs genótipo FY c.-67T>C: modelo bruto e ajustado.....	101
Tabela 26 - Proporção de fenótipos negativos de acordo com o genótipo FYc.-67T>C.	102
Tabela 27 - Proporção de aloanticorpos por fenótipo negativo de acordo com o genótipo FY c.-67T>C.	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>ACKR1</i>	<i>“Atypical Chemokine Receptor 1” (gene)</i>
AF	anemia falciforme
APC	<i>“Antigen presenting cell”</i>
AVCi	acidente vascular cerebral isquêmico
AVCh	acidente vascular cerebral hemorrágico
CVO	crise vaso-oclusiva
CH	concentrado de hemácias
<i>DARC</i>	<i>“Duffy antigen receptor of chemokines” (gene)</i>
DECH	doença do enxerto contra o hospedeiro
DF	doença falciforme
DHL	desidrogenase láctica
DI	sistema de grupo sanguíneo Diego
Di ^a	antígeno Diego a
DNA	<i>“deoxyribonucleic acid”</i>
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
DP	desvio padrão
DTC	doppler transcraniano
EDTA	<i>“ethylenediamine tetra acetic acid”</i>
<i>et al</i>	<i>“et alii” (do latim: “e outros”)</i>
FY	Sistema Duffy de grupo sanguíneo
Fy ^a /Fy ^b	Antígenos Duffy a e Duffy b
Hb	hemoglobina
HbSS	hemoglobinopatia SS

HbSC	hemoglobinopatia SC
HbS β	hemoglobinopatia S β
HbSD	hemoglobinopatia SD
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HLA	<i>“Human leucocyte antigen”</i>
HP	hipertensão pulmonar
HPLC	<i>“high-performance liquid chromatography”</i>
HU	hidroxiureia
IIQ	intervalo interquartil
ISBT	<i>“International Society of Blood Transfusion”</i>
ICAM-4	<i>“Intercellular Adhesion Molecule-4”</i>
JK	sistema Kidd de grupo sanguíneo
Jk ^a /Jk ^b	antígenos Kidd a e Kidd b
KEL	sistema Kell de grupo sanguíneo
K	antígeno Kell
k	antígeno “Celano”
LFA-3	<i>“lymphocyte function-associated antigen 3”</i>
Lu/BCAM	<i>“Lutheran/basal cell-adhesion molecule”</i>
LU	sistema Lutheran de grupo sanguíneo
Lu ^a	antígeno Lutheran a
máx	máximo
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mín	mínimo
ON	óxido nítrico

PAI	pesquisa de anticorpos irregulares
PAP	pressão de artéria pulmonar
PBS	Phosphate-buffered saline (tampão fosfato-salino)
PCR	<i>“polymerase chain reaction”</i>
PE	<i>“phycoerythrin”</i>
PHHF	persistência hereditária da hemoglobina fetal
RFLP	<i>“restriction fragment length polymorphism”</i>
RNA	“ribonucleic acid”
RNAm	RNA mensageiro
RTH	reação transfusional hemolítica
RT-PCR	<i>“real time polymerase chain reaction”</i>
STA	síndrome torácica aguda
TCR	<i>“T cell receptor”</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCPH	transplante de células progenitoras hematopoéticas
TRALI	<i>“transfusion related acute lung injury”</i>
TRJV	<i>“tricuspid regurgitant jet velocity”</i>
USP	Universidade de São Paulo
VCAM-1	<i>“Vascular Cell Adhesion Protein 1”</i>
vs	<i>“versus”</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Fisiopatologia da doença falciforme	23
1.2 Diagnóstico.....	27
1.3 Quadro clínico	27
1.4 Tratamento	33
1.4.1 Aspectos gerais.....	33
1.4.2 Transplante de células progenitoras hematopoéticas	34
1.4.3 Terapia gênica.....	34
1.4.4 Tratamento medicamentoso.....	35
1.4.5 Terapia transfusional	36
1.5 Complicações da terapia transfusional.....	38
1.5.1 Sobrecarga de ferro.....	38
1.5.2 Aloimunização	39
1.5.2.1 Aloimunização eritrocitária	39
1.5.2.1.1 Compatibilidade antigênica e aloimunização.....	41
1.5.2.1.2 Resposta imune, inflamação e aloimunização	42
1.5.2.1.3 Fatores genéticos relacionados a aloimunização.....	43
1.5.2.2 Aloimunização HLA	44
1.6 O sistema de grupo sanguíneo Duffy e a doença falciforme	46
2 OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivo geral	50
2.2 Objetivos específicos	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 Casuística.....	52
3.1.1 Critérios de inclusão	52
3.1.2 Critérios de exclusão	53
3.1.3 Aspectos éticos	53
3.2 Análise retrospectiva de dados	53
3.2.1 Revisão de dados clínicos.....	53
3.2.1.1 Definições.....	54
3.2.2 Revisão de dados transfusionais.....	56
3.2.3 Revisão de dados imuno-hematológicos.....	57

3.2.3.1 Histórico de anticorpos irregulares	57
3.2.3.2 Fenotipagem eritrocitária	58
3.2.3.3 Genotipagem eritrocitária	59
3.3 Coleta e processamento de amostras	59
3.4 Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares	60
3.5 Pesquisa de anticorpos anti-HLA	61
3.6 Genotipagem eritrocitária	63
3.6.1 Extração do DNA.....	63
3.6.2 Genotipagem por PCR-RFLP	64
3.6.3 Genotipagem por PCR em tempo real	66
3.7 Análise estatística	67
3.7.1 Análise descritiva	67
3.7.2 Testes estatísticos.....	67
4 RESULTADOS.....	70
4.1 Características da população estudada	70
4.2 Aloimunização eritrocitária	75
4.2.1 Especificidades dos anticorpos observados.....	75
4.2.2 Fenótipos eritrocitários de pacientes e doadores de sangue	77
4.2.3 Fenótipos eritrocitários raros	80
4.2.4 Evolução dos resultados de PAI dos pacientes aloimunizados.....	81
4.2.5 Aloimunização e características transfusionais	83
4.2.6 Comparação dos grupos aloimunizado e não aloimunizado	86
4.3 Aloimunização HLA	92
4.4 O polimorfismo <i>FY c.-67T>C</i> e o perfil clínico e transfusional.....	93
5 DISCUSSÃO	104
6 CONCLUSÃO	126
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	128
REFERÊNCIAS.....	130
APÊNDICES	151
ANEXOS	160

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A denominação doença falciforme (DF) designa uma síndrome clínica caracterizada pela herança de duas cadeias de β -globina mutadas, sendo pelo menos uma delas a hemoglobina S (HbS). A HbS resulta de uma mutação de ponto no 17º nucleotídeo do gene da β -globina (A>G), o qual determina a troca de um ácido glutâmico por valina (Glu6Val, rs334)(1,2). Além da homozigose para a HbS, que é o genótipo mais prevalente e conhecido como anemia falciforme (AF), a heterozigose composta com outra mutação da cadeia da β -globina dá origem a outras variantes da DF. Entre os exemplos de heterozigose composta está a associação com a hemoglobina C (HbC), resultante da substituição do aminoácido ácido glutâmico por lisina, e a herança concomitante de genes relacionados à β -talassemia, na qual diferentes mutações podem determinar um espectro de apresentações clínicas, de acordo com a quantidade residual de cadeia de β -globina produzida(3).

A DF foi formalmente descrita pela primeira vez em 1910 por James B. Herrick, em Chicago-EUA, ao atender um estudante negro procedente de Granada, Índias Ocidentais, e observar hemácias em forma de foice no esfregaço de sangue periférico(4). Outros três casos foram relatados durante os 12 anos seguintes, mas apenas em 1949 foi proposto o modelo de herança genética de uma hemoglobina anormal (HbS). Os portadores de apenas uma cadeia anormal eram assintomáticos e essa condição recebeu o nome “traço falciforme”(5). Em 1957, a substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina foi demonstrada por sequenciamento de proteínas (6), e em 1977, o RNAm da β -globina foi finalmente sequenciado, revelando a mutação que dava origem à HbS (7).

A distribuição da HbS pelo mundo reflete, em primeiro lugar, a sua seleção positiva em áreas endêmicas de malária por *Plasmodium falciparum*, em decorrência da maior resistência dos heterozigotos à infecção. Em segundo lugar, ela está diretamente relacionada aos fluxos históricos de migração e das rotas de comercialização de escravos africanos (8). A DF é a doença monogênica mais comum mundialmente (9) com aproximadamente 300 mil nascimentos afetados (HbSS) anualmente e mais de 5 milhões de heterozigotos (HbAS) (10). No Brasil,

em 2007, estimava-se que existiam 25 a 30 mil casos de DF e que 3.500 nascimentos por ano eram afetados (11).

1.1 Fisiopatologia da doença falciforme

A polimerização da HbS é o evento primário no mecanismo fisiopatológico da DF e suas consequências são inúmeras, incluindo a produção de moléculas inflamatórias e fenômenos que levam à vaso-oclusão, principal manifestação clínica da doença (12). A substituição Glu6Val gera um resíduo hidrofóbico no tetrâmero HbS, que sob baixa tensão de oxigênio provoca a ligação entre duas cadeias β , desencadeando um processo de cristalização. Assim, forma-se um núcleo inicial de polimerização que se expande e dá origem a longas fibras paralelas. As fibras assumem a textura de um gel que distorce a arquitetura e compromete a flexibilidade da hemácia. A reologia da hemácia é alterada e a célula se torna rígida antes mesmo de assumir o formato de foice (2,8).

O processo de polimerização se autoperpetua, pois a rigidez dos eritrócitos aumenta a viscosidade do sangue total, que por sua vez diminui a velocidade do fluxo sanguíneo e aumenta o tempo de trânsito dos eritrócitos através da microvasculatura pobre em oxigênio. Embora a polimerização da HbS seja reversível com o restabelecimento da oxigenação após a passagem pela circulação pulmonar, o polímero HbS residual pode permanecer nos eritrócitos e continuar o processo de polimerização quando as células retornarem ao ambiente pobre em oxigênio (2).

A polimerização da HbS também desencadeia o influxo de cálcio e aumenta a permeabilidade da membrana eritrocitária, o que agrava a desidratação da célula e aumenta a concentração de HbS (2). Os eritrócitos sofrem ainda estresse oxidativo, desencadeado por espécies reativas de oxigênio que são produzidas por ciclos recorrentes de oxigenação e hipóxia, e também por exposição à hemoglobina, ao heme e ao ferro livre. A polimerização recorrente da HbS, a desidratação e o dano oxidativo resultam em alterações irreversíveis no citoesqueleto e na membrana da hemácia, que assume definitivamente a forma de foice (12) (figura1).

Tantas agressões à membrana eritrocitária acabam induzindo maior expressão de moléculas de adesão, como $\alpha 4\beta 1$ integrina, Lu/BCAM, LFA-3 e ICAM-4, as quais aumentam a ligação dos eritrócitos ao endotélio e à matriz extracelular

(13). Os eritrócitos se unem a neutrófilos e plaquetas ativados, formando agregados celulares que se ligam às paredes dos vasos e culminam com a vaso-oclusão e isquemia tecidual. Esta é sucedida pela restauração do fluxo sanguíneo, que leva à lesão tecidual por reperfusão. Os ciclos de isquemia e reperfusão potencializam o processo inflamatório e o estresse oxidativo (8,14).

As alterações estruturais do eritrócito em foice fazem com que ele seja destruído precocemente. Enquanto a sobrevivência do eritrócito normal é de 120 dias, na DF ela é reduzida para 16 dias. Estima-se que aproximadamente 10% da massa eritrocitária seja destruída diariamente, sendo que 30% da destruição ocorre no compartimento intravascular (15). A liberação de hemoglobina e heme livres depleta o óxido nítrico (ON) no plasma, sendo um dos principais processos na fisiopatologia da DF. O ON é produzido pelo endotélio e favorece o tônus vasodilatador basal, além de inibir a ativação plaquetária e a expressão de moléculas de adesão no endotélio, como a VCAM-1 e as selectinas. O ON também inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de fator tecidual pelos leucócitos e pelas células endoteliais. Portanto, a depleção do ON promove a vasoconstrição e favorece a adesão celular, a ativação plaquetária e a inflamação (16). A biodisponibilidade do ON é ainda prejudicada pela liberação de arginase-1 dos eritrócitos, a qual metaboliza a arginina, substrato para a sua produção (16,17). Além disso, a exposição ao heme livre e às micropartículas derivadas dos próprios eritrócitos provoca estresse oxidativo e inflamação no endotélio, contribuindo diretamente para os fenômenos vaso-oclusivos (18).

Figura 1 - Fisiopatologia da doença falciforme

Fonte: Adaptado de REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sick cell disease. **Lancet**, London, v. 376, n. 9757, p. 2018–31, dec. 2010 (8). A polimerização da HbS é o evento essencial na fisiopatologia da DF. A desoxigenação causa a polimerização da HbS, levando à formação de eritrócitos em forma de foice. A vaso-oclusão resulta da interação dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas com o endotélio vascular, causando isquemia, hemólise e inflamação; a inflamação aumenta a expressão de moléculas de adesão e a agrava a vaso-oclusão. A reperfusão do tecido isquêmico gera radicais livres e danos oxidativos aos vasos. Os eritrócitos lesados liberam hemoglobina livre no plasma, que se liga fortemente ao ON, causando deficiência funcional desse último e contribuindo para o desenvolvimento de vasculopatia. HbS = hemoglobina falciforme. ON = óxido nítrico.

A polimerização da HbS, a vaso-oclusão e a hemólise induzem a ativação de células inflamatórias e de suas vias de sinalização, que por sua vez envolvem a produção e secreção de moléculas que propagam o estado inflamatório na DF. Citocinas do tipo I, que estimulam a resposta celular, encontram-se elevadas no paciente com DF em estado basal. Os níveis de $\text{TNF-}\alpha$, por exemplo, são elevados, possivelmente como consequência do processo de isquemia-reperfusão. O $\text{TNF-}\alpha$ estimula a expressão de $\beta 2$ -integrinas em neutrófilos, aumentando a sua adesão à parede do vaso sanguíneo. Além disso, ele altera a biodisponibilidade de ON derivado do endotélio e regula positivamente a expressão de moléculas de adesão em sua superfície. A concentração de interleucina (IL) 1, envolvida no recrutamento

de leucócitos, na ativação de células endoteliais e na produção de outros mediadores inflamatórios, também está aumentada. É descrito também o aumento de IL-18, que pode estimular a proliferação de células do músculo liso vascular e a produção de IFN- γ , IL-2 e IL-12, bem como o aumento de IL-6, que deve desempenhar papel na síntese de proteínas de fase aguda, e de IL-17, que estimula a produção de quimiocinas e citocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos para a parede dos vasos. Citocinas derivadas de plaquetas, como a CD40L e a TNSF14, também encontram-se elevadas e devem participar da ativação leucocitária e endotelial, tendo sido demonstrada associação de seus níveis elevados à síndrome torácica aguda e ao aumento da velocidade de regurgitação tricúspide (12).

A interleucina 8 (CXCL8), a MCP -1 (do inglês: "*monocyte chemoattractant protein 1*") (CCL2), a RANTES (CCL5), o PF4 (do inglês: "*platelet factor 4*") (CXCL4), a MIP-1 (do inglês: "*macrophage inflammatory protein*") e a eotaxina-1 (CCL11) são algumas das quimiocinas que estão elevadas no paciente com DF. Esses mediadores inflamatórios facilitam o recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e monócitos para as paredes dos vasos sanguíneos. Os fatores de crescimento, por sua vez, estimulam a proliferação e diferenciação de leucócitos e participam da regulação de processos angiogênicos. Entre esses fatores, estão elevados na DF o GM-CSF (do inglês: *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*), o M-CSF (do inglês: *macrophage-CSF*), o TGF- β e moléculas pró-angiogênicas. Outros mediadores inflamatórios que são regulados positivamente na DF são a substância P e as pentraxinas, incluindo a proteína C reativa (12).

Os pacientes com DF apresentam, portanto, um quadro inflamatório sistêmico perene e não simplesmente um quadro hemolítico crônico. Além disso, esses pacientes apresentam um estado de hipercoagulabilidade com maior geração de trombina, maior expressão de fator tecidual e ativação da cascata do complemento, que se traduz em maior risco de eventos tromboembólicos (12). Como resultado dos processos descritos, os pacientes podem apresentar complicações agudas e crônicas que podem afetar todos os órgãos e sistemas, porém, tanto o perfil quanto a gravidade das manifestações clínicas podem variar amplamente entre os indivíduos. Esse espectro de apresentação clínica é consequência da interação da herança HbS com outros modificadores, tanto genéticos quanto ambientais (9).

Sabe-se que quanto maior é a concentração da HbS, mais intenso é o fenômeno de polimerização e mais grave é o perfil clínico da doença. Assim, entre os modificadores clínicos da DF estão a concentração mais elevada de hemoglobina fetal (HbF) e a herança concomitante da α -talassemia, ambas capazes de reduzir a concentração de HbS no eritrócito e, por isso, a taxa de polimerização. Quando herdada com a β -talassemia, com produção residual de hemoglobina A (HbS β^+), as manifestações clínicas também são mais brandas. Por outro lado, na variante HbS β^0 , em que não há produção residual de HbA, o curso clínico é muito semelhante ao do paciente HbSS (9). Além disso, os homozigotos HbSS em geral cursam com quadros mais graves que os duplo heterozigotos HbSC, HbSD e HbSO^{arab} (3).

1.2 Diagnóstico

Atualmente, com a adoção do programa de triagem neonatal universal, o diagnóstico da DF é feito logo ao nascimento em muitos países (19). Em contrapartida, nos locais onde a triagem neonatal ainda não é realizada, o diagnóstico se faz em média aos 21 meses de vida, após início das manifestações clínicas. Os métodos mais utilizados na detecção da HbS são a eletroforese de hemoglobina e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC; do inglês: “*high-performance liquid chromatography*”). O exame é realizado logo na primeira semana de vida, mas resultados positivos devem ser confirmados após o sexto mês, quando a concentração da HbS é maior (8,20). Os mesmos testes podem ser indicados no aconselhamento genético de casais que desejam ter filhos, enquanto métodos não invasivos, como a pesquisa de DNA fetal na circulação materna, estão em desenvolvimento para o diagnóstico ainda no período pré-natal (19).

1.3 Quadro clínico

As manifestações da doença falciforme podem se iniciar ainda no terceiro mês de vida, à medida que ocorre substituição da cadeia γ , que compõe a hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$), pela cadeia β^S , que compõe a HbS ($\alpha_2\beta^S_2$) (2).

No primeiro ano de vida, a manifestação mais comum é a **dactilite**, quadro caracterizado por edema, dor e vermelhidão em pés e mãos, decorrentes de infarto

medular nos pequenos ossos das extremidades (21). As manifestações da anemia hemolítica costumam não ser motivo de queixa por parte do paciente, até por se tratar de quadro crônico, a que os pacientes estão em geral adaptados. Os sinais e sintomas relacionados à anemia em geral ocorrem nos períodos de descompensação da DF, em que há piora da hemólise, queda da concentração de hemoglobina e piora da icterícia. A piora da anemia também pode ser secundária à **crise aplástica transitória**, causada por **parvovírus B19**, complicação mais comum na idade escolar (22).

O baço é um dos primeiros órgãos a ser afetado na DF. Sucessivos episódios de vaso-oclusão levam à fibrose e à atrofia do órgão, num processo em geral silencioso e progressivo. As crianças podem apresentar **hipoesplenismo** mesmo antes de completar um ano de vida e, em geral, entre 3 e 5 anos a autoesplenectomia está completa em pacientes HbSS e HbS β^0 (2). A persistência do baço, com ou sem hiperesplenismo, também pode estar associada ao hipoesplenismo funcional (23). A vaso-oclusão esplênica também pode se dar de forma aguda e maciça, complicação conhecida como **sequestro esplênico**, em que grande quantidade de hemácias são represadas no órgão, causando dor abdominal, piora da anemia e até mesmo choque circulatório. Aproximadamente 75% dos episódios de sequestro esplênico ocorrem antes dos 2 anos de idade e são raros depois dos 6 anos. Nos pacientes em que o baço persiste, como é o caso das variantes HbSC e HbS β^+ , pode haver recorrência de sequestro, mesmo após a infância (2,23).

A asplenia funcional tem papel chave na elevada **susceptibilidade à infecção** e ao maior risco de **septicemia** na DF. Destacam-se as infecções por bactérias encapsuladas como o *Streptococcus pneumoniae*, a *Nesseiria meningitidis* e o *Haemophilus influenza tipo B* e a infecção por *Salmonella sp* (21). A infecção ainda é uma das principais causas de mortalidade na DF, especialmente em países subdesenvolvidos onde a profilaxia com vacinas e o tratamento da doença costuma não ser adequado (8).

Após o primeiro ano de vida, as crises álgicas tornam-se a intercorrência mais frequente e acometem diversas partes do corpo como os membros, tórax, dorso e abdome. As **crises vaso-oclusivas (CVO)** são acompanhadas de lesão de isquemia e reperfusão que podem ou não ter um fator desencadeante evidente (1). A CVO, quando não é rapidamente tratada e revertida, pode culminar com o infarto ósseo e embolização gordurosa. Esta, por sua vez, pode desencadear a **síndrome**

torácica aguda (STA), segunda complicação aguda mais frequente da DF e uma das principais causas de internação e óbito nessa população (24).

A **STA** caracteriza-se por novo infiltrado pulmonar acompanhado de pelo menos um sinal ou sintoma clínico como febre, taquipneia, dispneia, dor torácica, alteração da ausculta pulmonar ou hipoxemia (21). Enquanto crianças em geral apresentam febre e infiltrado em lobo superior ou médio, adultos em geral são afebris e podem ter comprometimento multilobar. Adultos apresentam-se mais comumente com história recente de CVO resolvida ou com CVO ativa. A etiologia mais comum da STA é a infecção, especialmente em crianças, mas o embolismo gorduroso, a formação de trombos na própria vasculatura pulmonar, o tromboembolismo venoso, atelectasias e até mesmo edema pulmonar podem desencadear o quadro (21,24).

Entre as complicações agudas mais graves está o **acidente vascular cerebral (AVC)**. O **AVC isquêmico** representa 54% dos AVCs na DF e sua incidência é maior na primeira década de vida e após os 30 anos. Em contrapartida, na terceira década de vida o **AVC hemorrágico** é mais comum (25). A vasculopatia inicia-se na infância com incidência de 1,02 eventos por 100 pacientes-ano, entre 2 a 5 anos. Aos 20 anos, 11% dos pacientes tiveram pelo menos um episódio de AVC isquêmico e aos 45 anos esse índice chega a 24% (25). Após um primeiro episódio, o risco de recorrência do AVC chega a 67% se não for iniciado tratamento específico (26). Apesar da fisiopatologia do AVC na DF diferir da fisiopatologia do AVC em não falciformes, a manifestação clínica é a mesma e vai variar de acordo com a área cerebral afetada. A vasculopatia pode, porém, ser detectada precocemente por meio da triagem regular com doppler transcraniano (DTC), o que permite inserir o paciente em um programa de profilaxia primária com transfusão regular, reduzindo o risco de AVC em 90%(27).

Outra complicação aguda da DF é o **priapismo**, definido como uma ereção dolorosa, prolongada e não desejada que pode cursar com disfunção erétil e impotência. Estudos retrospectivos mostram que 30 a 45% dos pacientes com AF já tiveram pelo menos um episódio de priapismo (28). O mecanismo envolvido consiste na obstrução da drenagem venosa peniana, em que o sangue represado permanece por período prolongado em baixa tensão de oxigênio, resultando em acidose local e agravando a falcização dos eritrócitos no local. Ocorre elevação da pressão intra-cavernosa e se ela exceder a pressão arterial média, pode resultar em isquemia peniana (28).

À medida que o acesso ao tratamento melhora, que novas terapias, drogas e protocolos surgem, a sobrevida aumenta, tornando também mais frequentes as complicações crônicas da DF. Dentre elas, destaca-se a **hipertensão pulmonar** (HP), que está fortemente associada a maior mortalidade (29,30). Aproximadamente metade dos casos são consequência da vasculopatia causada pela falcização, tromboembolismo e vasoconstrição secundária à depleção crônica de ON. Nos demais casos, a hipertensão pulmonar é pós-capilar, provocada por disfunção ventricular esquerda em resposta ao elevado débito cardíaco provocado pela anemia crônica (8). Definida como pressão de artéria pulmonar (PAP) ≥ 25 mmHg ao cateterismo cardíaco (31), o seu diagnóstico precoce e preciso ainda é um desafio, uma vez que a triagem é realizada por meio da ecocardiografia, na qual a pressão na artéria pulmonar é estimada a partir da velocidade do jato de regurgitação tricúspide (TRJV; do inglês “*tricuspid regurgitant jet velocity*”) (30). A TRJV $\geq 2,5$ m/seg é em geral utilizada para triar a HP, mas sabe-se que seu valor preditivo positivo é baixo (30).

As complicações crônicas do sistema musculoesquelético são dolorosas e invalidantes. A **osteonecrose** asséptica afeta mais comumente o fêmur, uni ou bilateralmente, mas pode também comprometer o úmero ou outros ossos. Quinze a 40% dos adultos com DF são afetados e 85% daqueles que se apresentam com lesão sintomática no quadril terão indicação de prótese dentro de 5 anos (32). As **úlceras** localizam-se em geral na região perimaleolar, podem ser recidivantes e ainda se complicar com a sobreposição de osteomielite. A frequência de úlceras aumenta com a idade. A dor intensa faz com que o paciente precise de analgesia potente com opióides e a sua cicatrização é lenta, podendo arrastar-se por meses (33).

A **nefropatia falciforme** instala-se desde a infância e pode evoluir para insuficiência renal em até 30% dos adultos. A microalbuminúria é comum na infância e até 20% dos adultos desenvolvem proteinúria nefrótica. Baixa tensão de oxigênio, baixo pH e alta osmolaridade da medula renal favorecem a polimerização da HbS e a falcização, que acarretam infarto renal, seguido de necrose de papila, fibrose medular e glomeruloesclerose. Além disso, o órgão é sobrecarregado com hiperfiltração e disfunção tubular (8).

A **hepatopatia falciforme** é um termo abrangente, utilizado para designar a lesão hepática da DF, que é na verdade resultado de múltiplos mecanismos primários e cuja apresentação clínica é bastante diversa. É por vezes difícil apontar

um único fator relacionado à lesão hepática. Ao mesmo tempo que existe lesão isquêmica, decorrente de falcização intra-hepática, pode haver sobreposição de hemocromatose e hepatite viral, ambas complicações tardias da terapia transfusional. A colelitíase provocada pela hemólise crônica também pode cursar com complicações graves como colecistite, colangite e pancreatite. Entre as complicações agudas, estão a crise de falcização hepática, o sequestro hepático e a colestase intra-hepática falcêmica. Como resultado de múltiplos insultos ao órgão, 16 a 29% dos pacientes evoluem com algum grau de cirrose (34).

Das complicações oculares, a mais comum é a **retinopatia proliferativa**, que pode evoluir com perda visual progressiva. Seu pico de incidência ocorre entre 15 e 24 anos em homens, e entre 20 e 39 anos em mulheres (21). Na terceira década de vida, a retinopatia pode afetar 43% dos pacientes HbSC e 14% dos pacientes HbSS (35). A figura 2 representa as principais complicações da DF.

Figura 2 - Principais complicações clínicas da doença falciforme

Fonte: adaptado de KATO, G. J. *et al.* Sick cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, London, v. 4, n. 1, p. 18010, jun. 2018 (19).

Existe grande variabilidade fenotípica entre pacientes com DF. São observados subfenótipos caracterizados pela combinação de determinadas complicações clínicas e alterações características de alguns biomarcadores que estão diretamente relacionados a um mecanismo fisiopatológico predominante. O nível de Hb mais baixo, a elevada contagem de reticulócitos e a elevada concentração de desidrogenase láctica (DHL) caracterizam um fenótipo hemolítico mais grave e mais propenso à vasculopatia. Os pacientes desse subgrupo apresentam maior incidência de AVCi, HP, úlceras, colelitíase, priapismo e, possivelmente, nefropatia. Outro subfenótipo é aquele caracterizado por um nível mais alto de hemoglobina e hemólise mais branda, com consequente aumento da viscosidade sanguínea, e apresentam maior frequência de crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e osteonecrose. Essas características podem se sobrepor, originando um espectro de apresentação clínica, diretamente influenciados por modificadores genéticos (19).

Os pacientes com HbSC exibem um curso clínico bastante diferente dos pacientes HbSS. Apesar de representarem 30% dos pacientes com DF nos EUA, ainda existem muitos pontos a serem esclarecidos sobre a fisiopatologia da HbSC e sobre seu tratamento, já que grande parte das evidências que guiam as condutas clínicas são produtos de estudos envolvendo pacientes com anemia falciforme (36). A hemoglobinopatia SC evolui normalmente com um quadro clínico mais brando e maior sobrevida que a HbSS e HbS β^0 (3,36). Os pacientes costumam apresentar níveis de hemoglobina mais elevados, hemólise menos intensa, fenômenos vaso-oclusivos menos frequentes, porém desenvolvem com maior frequência a retinopatia proliferativa (35).

A mortalidade na DF é diretamente afetada pelas condições socioeconômicas e pelos investimentos em saúde pública de cada país. Em países desenvolvidos, é marcante a queda da mortalidade em relação ao observados na década de 70. A redução da mortalidade infantil está diretamente relacionada aos programas de triagem neonatal, ao início precoce de profilaxia com antimicrobianos, ao acesso a vacinas e à orientação familiar sobre a doença (37). Nos EUA houve 67% de redução da mortalidade entre 1999 e 2009, quando comparada com as duas décadas anteriores(37). Além disso, a melhora no manejo das complicações crônicas, dos protocolos transfusionais e a introdução da hidroxiureia também

melhoraram consideravelmente a sobrevida na DF, no entanto, ela é ainda 20 a 30 anos inferior à sobrevida da população geral (19).

1.4 Tratamento

1.4.1 Aspectos gerais

Os pacientes com DF devem ser incluídos em programa de acompanhamento desde os primeiros meses de vida ou tão logo o diagnóstico seja feito. A profilaxia com penicilina deve ser iniciada precocemente e mantida até os cinco anos. Esta conduta reduziu a mortalidade de 25% para menos de 3% nessa faixa etária (19). A vacina para o pneumococo também está indicada, pois reduz em 68% a taxa de infecção invasiva em crianças até os 10 anos de idade (38). A família do paciente também precisa ser orientada sobre as complicações agudas da doença e sobre os sinais que indicam a necessidade de avaliação médica. Além disso, nos quadros febris suspeitos de infecção bacteriana, recomenda-se o início precoce de antibióticos com cobertura para bactérias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenza* (39). O atendimento dos episódios agudos por profissionais treinados é fundamental para obter controle precoce da dor com analgésicos e hidratação, evitando a evolução para quadros mais graves, como a STA e o AVCi (40).

O acompanhamento clínico regular deve garantir a triagem e prevenção de lesões de órgão alvo, bem como o controle de comorbidades que possam agravar o curso da DF. Entre as medidas de prevenção destaca-se a realização do DTC, exame capaz de identificar crianças com risco elevado de AVCi (21). O estudo STOPI demonstrou que crianças sem nenhum sinal ou sintoma neurológico, mas com fluxo vascular superior a 200cm/seg apresentavam alto risco de AVCi e se beneficiavam de transfusões regulares de hemácias. Tal estratégia reduziu a ocorrência de AVCi de 11% para 1%. Portanto, o DTC deve ser realizado anualmente a partir dos 2 anos de idade (27). O exame oftalmológico para avaliar retinopatia proliferativa é recomendado a partir dos 10 anos, quando também é recomendado o início da triagem de lesão renal por meio da dosagem de microalbuminúria (41). Em contrapartida, o teste de função pulmonar e a triagem de hipertensão pulmonar com ecocardiograma estão indicados apenas em pacientes

com queixas clínicas, não havendo evidências suficientes para indicar a realização desses exames de forma universal e periódica (21,41).

1.4.2 Transplante de células progenitoras hematopoéticas

Atualmente, a única opção terapêutica curativa para a DF é o transplante de células progenitoras hematopoéticas (TCPH) alogênico. Inicialmente, o transplante alogênico era reservado para os casos mais graves da doença, mas à medida que resultados positivos eram observados, os critérios para indicar o tratamento foram aos poucos ampliados. Paralelamente, a aplicação de protocolos de condicionamento com menor toxicidade também reduziu a morbidade e a mortalidade associadas ao procedimento. Hoje, casos menos graves são elegíveis ao TCPH e, conseqüentemente, maior número de candidatos espera pela terapia(42). Apesar dos bons resultados obtidos no TCPH HLA-compatível aparentado, em que a sobrevida em 3 anos chega a ser superior a 90%, apenas 25% dos pacientes dispõem de doador HLA-compatível na família. A ausência de doadores HLA idênticos na família exige a busca por alternativas. O transplante não aparentado, o uso de células de cordão umbilical e o transplante haploidêntico são promissores, mas os resultados clínicos ainda apontam a necessidade de melhora nos índices de falha de enxertia, de ocorrência de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) crônica e da taxa de mortalidade relacionada ao transplante (43).

1.4.3 Terapia gênica

Por se tratar de uma doença monogênica autossômica, a DF é uma forte candidata à terapia gênica. Esse tratamento oferece a vantagem sobre o TCPH alogênico de não trazer complicações como a DECH crônica e de superar a barreira imposta pela ausência de doadores compatíveis. Os primeiros relatos de terapia gênica no tratamento da DF foram publicados em 2017 e utilizaram as células autólogas modificadas por um lentivírus contendo um gene variante de β -globina, desenhada para conferir propriedades antifalcatização (44,45). Após esses primeiros casos, várias estratégias desenvolvidas entraram em fase de estudo clínico, incluindo técnicas desenhadas para aumentar a expressão da cadeia de γ -globina e,

consequentemente, a concentração de HbF, reduzindo assim as manifestações clínicas da DF(46). A terapia gênica é, sem dúvida, promissora para o tratamento da DF, mas ainda é necessário aperfeiçoar a tecnologia e depois torná-la acessível à população (46).

1.4.4 Tratamento medicamentoso

A hidroxiureia (HU), também denominada hidroxycarbamida, é atualmente o único tratamento medicamentoso reconhecido como modificador do curso da DF. Na década de 80, os primeiros estudos com HU em pacientes com AF mostravam que a droga promovia aumento da síntese de HbF, o que inicialmente justificava a sua aplicação clínica, uma vez que ela reduziria a concentração de HbS e, consequentemente, a sua polimerização(47). Os eritrócitos com elevada concentração de HbF são maiores, menos densos e mais deformáveis, apresentando, portanto, uma melhor reologia. Hoje, sabe-se que o seu mecanismo de ação vai além do efeito sobre o eritrócito. Ela está associada à redução da contagem de leucócitos, plaquetas e reticulócitos, bem como à diminuição da expressão de moléculas de adesão, reduzindo assim os fenômenos vaso-oclusivos (21). Além disso, a HU está associada ao aumento dos níveis de ON e à melhora do tônus vascular (48).

A HU reduz a recorrência de complicações agudas, o número de internações, e também a mortalidade (49). As situações em que as evidências são mais fortes a favor do tratamento com HU são as CVOs recorrentes, com pelo menos três episódios de intensidade moderada a grave ao ano e as STAs severas ou recorrentes. Para pacientes com dor ou com sintomas de anemia interferindo nas atividades diárias e reduzindo a qualidade de vida, a HU também está indicada. Anteriormente, a HU era reservada para os casos mais graves da DF, mas hoje a tendência é oferecer o tratamento de forma mais precoce, com o objetivo de prevenir complicações, podendo a droga ser iniciada a partir dos 9 meses de vida (21). Apesar da recomendação para o uso de HU em pacientes com HbSC e HbS β^+ ser mais fraca, aqueles com manifestações moderadas a graves também podem obter benefício com a medicação (21).

Dentre as novas drogas utilizadas no tratamento da DF, destacam-se o crizanlizumabe e o voxelotor (antes denominado de GBT440). A primeira é um

anticorpo monoclonal inibidor da P-selectina, que reduziu significativamente a recorrência de crises vaso-oclusivas, mesmo em pacientes já em uso de HU e com perfil mais grave da doença (50). O voxelotor, por sua vez, liga-se à cadeia de α -globina, melhora a afinidade da HbS pelo oxigênio e, por isso, reduz a sua polimerização. Os pacientes tratados apresentaram melhora do nível de hemoglobina e da hemólise em fase III de estudo clínico randomizado (51).

1.4.5 Terapia transfusional

A transfusão de hemácias de doadores saudáveis (que contém essencialmente HbA e não contém HbS) dilui a concentração de HbS, reduz o fenômeno de polimerização, melhora o nível de hemoglobina e, conseqüentemente, o aporte de oxigênio aos tecidos. A transfusão é um dos pilares principais do tratamento da DF e pode ser indicada com intuito terapêutico ou profilático. A transfusão ainda pode ser episódica, normalmente indicada durante complicações agudas, ou regular, quando caracteriza um regime transfusional crônico com intervalos, em geral, mensais.

A transfusão profilática é indicada na prevenção primária do AVCi em crianças com alteração da velocidade do fluxo arterial cerebral ao doppler transcraniano. A intervenção mostrou ser capaz de reduzir em 90% a ocorrência de AVCi em crianças (27). A transfusão tem como alvo manter a HbS em geral abaixo de 30% com transfusões regulares, entretanto, a sua duração ainda é incerta. Estudo que avaliou a suspensão da transfusão após normalização do DTC teve de ser interrompido por recorrência dos eventos (52). Em contrapartida, o estudo TWITCH mostrou que é possível a transição para HU em pacientes com DTC normal e sem vasculopatia grave, de acordo com a ressonância magnética (53). Após um primeiro episódio de AVCi, o regime transfusional crônico é atualmente a única alternativa terapêutica eficaz, tendo-se mostrado superior à HU como profilaxia secundária (54).

A transfusão profilática também é indicada antes de cirurgias de médio ou grande porte, com objetivo de reduzir complicações agudas no pós-operatório, tendo como alvo atingir Hb de 10g/dl antes da cirurgia (55). Já na profilaxia de eventos agudos, como a STA, a CVO e o priapismo, a transfusão fica reservada para os casos recorrentes, mesmo em vigência do uso da HU, ou quando a droga estiver contraindicada (56). Não há recomendação formal de transfusão profilática após um

primeiro episódio de sequestro esplênico, mas ela pode ser indicada em crianças que tiverem apresentado episódios recorrentes, até elas atingirem a idade para a esplenectomia. Apesar de a DF estar associada a maior morbidade e mortalidade materno-fetal, não há consenso sobre a indicação da transfusão profilática no período gestacional. Ela é geralmente indicada para gestantes com complicações agudas ou para as pacientes que interromperam o uso de HU devido à gestação (56,57).

A transfusão de hemácias é indicada no tratamento de intercorrências agudas graves, como o AVCi, a STA grave e a anemia aguda grave, decorrente de crise aplástica ou de sequestro esplênico. No quadro agudo de AVC, a transfusão tem como alvo atingir níveis de HbS inferiores a 30% (21). Ela também está indicada no tratamento da colestase intra-hepática falcêmica e na falência de múltiplos órgãos (58). Nos casos de CVO, a transfusão é restrita aos episódios mais graves e refratários ao tratamento medicamentoso inicial (56).

Embora não haja comprovação sólida a favor do uso da transfusão no tratamento de úlceras maleolares, os pacientes com lesões de difícil cicatrização podem receber transfusões regulares até a melhora da lesão, especialmente aqueles com níveis de hemoglobina mais baixos (32). Os pacientes com hipertensão pulmonar, cardiopatia, insuficiência renal e hepatopatia também podem ter indicação de transfusão regular, apesar de haver menos evidência do seu benefício para essas complicações (32,56). O quadro 1 resume as recomendações para transfusão na DF.

Quadro 1 - Recomendação para transfusão de hemácias na doença falciforme.

	Recomendado	Controverso	Em geral não recomendada
Tratamento	AVCi agudo STA moderada/grave Anemia aguda sintomática (sequestro/ crise aplástica) Colestase intra-hepática falcêmica Complicações agudas na gestação	Hipertensão pulmonar	CVO não complicada Priapismo Úlceras maleolares Osteonecrose
Profilaxia	AVCi (primária de secundária) Sequestro esplênico recorrente Colestase intra-hepática falcêmica Pré-operatório	STA recorrente CVO recorrente	Gestação não complicada

Fonte: Adaptado de YAWN, B. P. *et al.* Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. **JAMA**, Chicago, v. 312, n. 10, p. 1033–48, sep. 2014 (21).

1.5 Complicações da terapia transfusional

Nas últimas décadas, observou-se um aumento significativo do uso da transfusão na DF, tanto para o tratamento de complicações agudas, como crônicas. Apesar de a HU reduzir a ocorrência de eventos agudos, a transfusão continua sendo a única alternativa terapêutica nos quadros agudos graves e na profilaxia primária e secundária do AVCi (59). Apesar da contínua melhora da segurança transfusional, pacientes submetidos à transfusão estão expostos ao risco de reações adversas agudas e tardias, como reações alérgicas, sobrecarga volêmica, reações febris não hemolíticas, transmissão de agentes infecciosos, entre outros. Nos pacientes com DF, frequentemente expostos a múltiplas transfusões ao longo da vida, destacam-se duas reações: a sobrecarga de ferro e a aloimunização.

1.5.1 Sobrecarga de ferro

Grande número de pacientes com DF começa a receber transfusões ainda na infância e muitos são candidatos a transfusão crônica, ou ainda, são submetidos a múltiplas transfusões por quadros agudos recorrentes. A sobrecarga de ferro é, portanto, uma complicação comum que precisa ser monitorada e tratada.

As diferenças na fisiopatologia e no regime transfusional na DF determinam um padrão em geral menos grave de sobrecarga de ferro, quando comparada a outras doenças com eritropoese ineficaz ou aplasias medulares. Na DF, a eritropoese está preservada, na verdade, intensificada para compensar a destruição prematura das hemácias (60). Ademais, a DF é caracterizada por um estado inflamatório perene que favorece o aprisionamento de ferro nos macrófagos, característica da anemia da doença inflamatória. Diferentemente do que ocorre em outras doenças, na DF a estratégia transfusional em geral visa a redução da concentração de HbS, inclusive por supressão da eritropoese, ao invés de simplesmente elevar a concentração hemoglobina, sendo a transfusão de troca uma prática comum, que acarreta um balanço de ferro menos positivo, de modo a reduzir a magnitude da sobrecarga de ferro (60).

Casos graves de lesão de órgão por sobrecarga de ferro foram associados a maior morbidade e mortalidade na DF (61,62). Autópsias de pacientes com DF mostraram alta prevalência de hemossiderose entre pacientes com cirrose hepática

(63). Além disso, estima-se que 3% dos pacientes em regime transfusional regular apresentem sobrecarga de ferro cardíaco (64). O depósito de ferro na medula óssea parece também comprometer a eritropoese e aumentar a necessidade transfusional, agravando a hemossiderose. Esse fenômeno é observado principalmente em pacientes com baixa contagem de reticulócitos, elevada necessidade transfusional e intenso depósito de ferro no coração (60).

Como a transfusão é indicada para o tratamento de lesão de órgão alvo secundária à doença de base, é difícil estabelecer o quanto o depósito de ferro contribui para o agravamento dessa lesão. Por esse mesmo motivo, a sobrecarga de ferro pode ser subestimada e, portanto, subtratada (60). Assim, recomenda-se a triagem e a monitorização do acúmulo de ferro para pacientes em transfusão crônica, ou com múltiplas transfusões esporádicas, e o tratamento com quelante quando indicado (21). A dosagem de ferritina sérica é um ensaio relativamente bem padronizado, barato e amplamente utilizado para avaliação da sobrecarga, mas deve ser interpretada com cautela na monitorização do grau de hemossiderose, principalmente porque é também proteína de fase aguda, de modo que tem seus níveis séricos aumentados nas doenças inflamatórias, de que é exemplo a DF (65).

1.5.2 Aloimunização

A aloimunização ocorre como consequência da exposição de um indivíduo a antígenos não próprios por meio de transfusão, gestação ou transplante de órgãos. Em um único episódio transfusional o indivíduo é exposto a centenas de antígenos estranhos presentes em hemácias, leucócitos e plaquetas, e pode desenvolver anticorpos contra vários desses antígenos. É importante compreender os mecanismos envolvidos na aloimunização para que estratégias de prevenção sejam desenvolvidas, bem como entender melhor suas consequências sobre a evolução clínica do paciente.

1.5.2.1 Aloimunização eritrocitária

A aloimunização eritrocitária está associada a atrasos na transfusão, devido ao maior tempo exigido para a identificação do anticorpo ou à dificuldade em encontrar sangue compatível para indivíduos com múltiplos anticorpos. Ela também

aumenta o risco de reações transfusionais hemolíticas (RTHs), cuja apresentação clínica pode variar de um simples incremento transfusional abaixo do esperado a um quadro de franca à hemólise, que nos casos mais graves pode ocasionar o óbito (66). Além disso, os anticorpos contra antígenos de grupos sanguíneos também estão envolvidos na doença hemolítica perinatal e podem complicar as gestações de mulheres previamente aloimunizadas (67).

A prevalência de aloimunização varia consideravelmente de acordo com a população estudada. Trabalhos mostram taxa de aloimunização de 0,8% em doadores de sangue e de 1 a 2% em pacientes hospitalizados. Em pacientes com algum histórico de transfusão, a prevalência aumenta para 2 a 9%, e taxas maiores são observadas em pacientes que foram submetidos a múltiplas transfusões (68). Nos pacientes com síndrome mielodisplásica, são frequentes as associações complexas de anticorpos, e a taxa de aloimunização varia entre 10 e 20% (69,70). Essa complicação também pode afetar 10 a 20% dos pacientes com talassemia (71), porém, nenhum outro grupo mostra taxas de aloimunização tão elevadas quanto os pacientes com DF(72).

A aloimunização eritrocitária em pacientes com DF chega a afetar mais de 50% dos pacientes, a depender do estudo (73). Na DF, as reações transfusionais são em geral mais graves, podem desencadear CVOs e cursar com quadro de hiper-hemólise (74). Além disso, a reação hemolítica tardia pode não ser diagnosticada, uma vez que os sinais e sintomas comumente podem ser confundidos com os da doença de base (75). A aloimunização pode também representar um marcador de gravidade da doença, tendo sido associada à dor crônica, à dependência de opioide, à lesão de órgão e à menor sobrevida(76). Não obstante, a aloimunização eritrocitária pode prejudicar o suporte transfusional durante o TCPH, bem como seu desfecho (77,78).

Para que ocorra a aloimunização é necessário que o receptor seja exposto a um antígeno não próprio e que ele possua uma molécula de antígeno leucocitário humano classe II (HLA II, do inglês: "*human leucocyte antigen II*"), capaz de reconhecer e apresentar parte do antígeno estranho ao linfócito T CD4⁺ auxiliar (T_H, do inglês: "*T helper*"), que, em sequência, ativa o linfócito B para a produção de anticorpos (79). Porém, esse passo não é suficiente para que a aloimunização eritrocitária aconteça. A interação complexa de fatores relacionados ao receptor, ao doador, ao hemocomponente, às características do antígeno e às circunstâncias da

transusão são determinantes nesse processo. A figura 3 ilustra alguns dos principais fatores relacionados à aloimunização eritrocitária.

Figura 3 - Fatores envolvidos na aloimunização.

Fonte: próprio autor.

Estudos em pacientes com DF mostram que a taxa de aloimunização aumenta com a idade e com o número de transfusões prévias. A idade precoce do primeiro episódio transfusional parece proteger contra a aloimunização, fato que já foi mais bem demonstrado em pacientes com talassemia (71,80). As taxas de aloimunização variam muito entre os estudos publicados, o que está diretamente relacionado às características de cada população estudada e com o protocolo de compatibilidade antigênica entre doador e receptor utilizado em cada estudo (72,76,81–84).

1.5.2.1.1 Compatibilidade antigênica e aloimunização

Uma das explicações para a elevada taxa de aloimunização na DF está na diferença fenotípica entre a população de doadores, de origem predominantemente caucasiana, e de pacientes com DF, essencialmente constituída de afrodescendentes. Nos afrodescendentes, a frequência dos antígenos de grupo

sanguíneo C (RH2), E (RH3), Jk^b (JK2), Fy^a (FY1) e S (MNS3) é significativamente menor que em brancos, tornando-os mais vulneráveis à sensibilização por esses antígenos por meio da transfusão de hemácias(85).

Devido à elevada imunogenicidade dos antígenos do sistema Rh e Kell e à diferença fenotípica entre doadores e pacientes, os anticorpos desses sistemas representam até 65% das especificidades encontradas em pacientes com DF(86). Por esse motivo, é altamente recomendada a seleção de hemácias com mesmo perfil fenotípico Rh (C,c,E,e) e Kell (KEL1) dos pacientes, já que essa estratégia profilática reduz significativamente a aloimunização quando comparada àquela observada com a compatibilidade apenas para os antígenos ABO e RhD (57).

Ainda assim, mesmo adotando-se a conduta profilática, estudos mostram que anticorpos do sistema Rh, como o anti-D, anti-C e anti-e, continuam surgindo em pacientes fenotipicamente positivos para esses antígenos. Essa peculiaridade é decorrente da alta prevalência de variantes alélicas dos genes *RHD* e *RHCE*. Essas variantes dão origem a antígenos parciais, podem perder a expressão de antígenos de alta prevalência ou dar origem a antígenos de baixa frequência (84,85). As variantes alélicas do sistema Rh, bem como os antígenos de baixa frequência de outros sistemas como o Js^a (KEL6), também são comuns em doadores afrodescendentes, o que pode colaborar para a aloimunização, mesmo quando doadores da mesma etnia, e com mesmo fenótipo, são selecionados (87).

1.5.2.1.2 Resposta imune, inflamação e aloimunização

O estado inflamatório crônico dos pacientes com DF pode contribuir para a aloimunização, uma vez que está relacionado à ativação e à desregulação do sistema imune. São observados padrões diferenciados na resposta imune entre pacientes com DF, aloimunizados e não aloimunizados. Em indivíduos aloimunizados, foram observadas respostas alteradas de linfócitos T_H, anormalidades na população de células T reguladoras (Treg), bem como na de células T_H tipo 1 (T_H1), T_H17 e T_H foliculares (88). Diferença na função de linfócitos B regulatórios também foi observada, com menor produção de interleucina 10 (IL10) e menor capacidade de suprimir a ativação de monócitos em aloimunizados (89). Além disso, pesquisas apontam que os monócitos e as células dendríticas de pacientes aloimunizados respondem de forma diferente à exposição à molécula de heme livre,

com supressão de suas capacidades anti-inflamatórias, ao contrário do observado em voluntários saudáveis e em pacientes não aloimunizados. Também foi demonstrado que monócitos de pacientes aloimunizados não são eficazes em conter a resposta inflamatória de células T (90,91).

O episódio transfusional dentro de um contexto de inflamação aguda também parece favorecer a aloimunização. Tal relação foi demonstrada inicialmente em modelo animal (92,93) e vai ao encontro dos resultados de estudos com pacientes com DF, em que a transfusão na CVO e na STA foi associada a maior risco de aloimunização (94).

1.5.2.1.3 Fatores genéticos relacionados a aloimunização

O modelo matemático proposto por Higgins e Sloan aponta a existência de um subgrupo de pacientes com risco muito elevado de aloimunização que independe da doença de base, da idade do paciente e da presença de anticorpos previamente formados, e depende apenas fracamente do número de transfusões, o que sugere tratar-se de característica determinada geneticamente. Esse achado vai ao encontro do observado na DF, em que um grupo de pacientes nunca desenvolverá anticorpos mesmo após múltiplas transfusões, sendo conhecidos como “não respondedores” imunes, enquanto outro grupo de pacientes desenvolvem anticorpos após poucos episódios transfusionais e que, por isso, são conhecidos como “respondedores”. Os fatores genéticos ou adquiridos envolvidos na determinação do fenótipo respondedor e não respondedor ainda não são claros. Diversas linhas de pesquisa buscam esclarecer os mecanismos envolvidos na aloimunização, de modo a identificar biomarcadores que permitam prever o risco de ocorrência dessa complicação e desenhar estratégias de prevenção dirigidas para o grupo de maior risco (95).

Um dos fatores envolvidos na aloimunização é o genótipo HLA II. O principal locus do complexo HLAII responsável por desencadear respostas a alo peptídeos é o HLA-DR. Sabe-se que existe uma especificidade no reconhecimento de determinados antígenos eritrocitários por certos isotipos HLA-DR como o antígeno Di^a (DI1), E(RH3) e Fy^a (FY1)(96–98). Além disso, enquanto alguns isotipos HLA-DR foram relacionados à formação de múltiplos anticorpos e a ao fenótipo “respondedor”

imune na DF (99), outros alelos HLA-DQB1 foram associados à proteção contra a aloimunização (100).

Os genes *FCGR* codificam receptores $Fc\gamma$ de células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês: “*antigen presenting cells*”), moléculas responsáveis por ligarem-se à porção Fc de imunoglobulinas da classe G (IgG) e mediar a internalização e apresentação dos antígenos às células T. Polimorfismos nesses genes podem portanto afetar o equilíbrio entre as vias de ativação e inibição imunes reguladas por esses receptores. Recentemente, o haplótipo *FcγR2B 2B.4* foi associado ao maior risco de aloimunização em estudo conduzido em pacientes com DF no Brasil (101). Estudo francês também descreveu a forte associação de um polimorfismo no gene *FCGR2C* ao fenótipo não respondedor, conferindo, portanto, um efeito protetor em relação à aloimunização (102).

Polimorfismo relacionado à molécula CD81, que está envolvida na modulação de sinal para linfócitos B, também já foi associado ao maior risco de aloimunização (103), bem como alterações do gene *TRIM*, envolvido na produção de interleucina 2 (IL2) (80). A investigação desses genes partiu do pressuposto que um ou mais genes relacionados à modulação imune e inflamação localizados próximo ao gene da β -globina teriam sofrido seleção positiva junto com a herança da HbS, que em heterozigose reduz em duas vezes o risco de malária e em dez vezes o risco da forma grave da malária por *plasmodium falciparum* (104). Assim, da mesma forma que polimorfismos nos genes *HLA-B*, *HLA-DR*, *IL-4*, *CD40L*, *FcGR2A* e *TNF* foram relacionados à resistência à malária, outros polimorfismos genéticos relacionados à resposta imune poderiam ter relação com a maior predisposição à aloimunização na DF (103).

1.5.2.2 Aloimunização HLA

O sistema HLA consiste em um grupo de genes intimamente ligados que codificam moléculas de superfície celular altamente polimórficas, cujo papel principal é apresentar peptídeos antigênicos ao sistema imune. Com base em características moleculares e funcionais, dois complexos de genes e moléculas HLA são descritos: HLA classe I (HLAI) e HLA classe II (HLAII).

As moléculas HLA I A, B e C são expressas na maioria dos tecidos e células sanguíneas nucleadas, incluindo linfócitos T e B, granulócitos e plaquetas e, em

menor extensão, no tecido endócrino, músculo esquelético e no sistema nervoso central. Estas moléculas apresentam principalmente peptídeos antigênicos endógenos para as células T CD8⁺. As moléculas HLA de classe II, por outro lado, são expressas em linfócitos B, monócitos, células dendríticas e também podem ser detectadas em linfócitos T e granulócitos ativados. A expressão de HLA classe II também pode ser induzida em fibroblastos e células endoteliais pela ativação por citocinas inflamatórias como IFN γ , TNF α e IL-10. As moléculas de classe II HLA-DR, -DQ e -DP estão envolvidas na apresentação de peptídeos exógenos às células T CD4⁺, que após ativadas promovem a maturação e a diferenciação dos efetores celulares e humorais(105).

Os antígenos HLA são eficientes em induzir a resposta imune uma vez que podem ser apresentados tanto diretamente quanto indiretamente ao sistema imune do receptor. A via direta envolve a estimulação dos receptores das células T (TCR, do inglês: "*T cell receptor*") do paciente por moléculas de HLA expressas nas superfícies das APCs. A via indireta consiste no processamento de moléculas HLA do doador por APCs do receptor seguida da apresentação dos peptídeos às células T efectoras (106).

A aloimunização HLA é o principal mecanismo envolvido em alguns tipos de reações transfusionais como a reação febril não-hemolítica, lesão aguda pulmonar relacionada à transfusão (TRALI, do inglês: "*transfusion related acute lung injury*") e refratariedade à transfusão de plaquetas (105). Não obstante, a aloimunização HLA aumenta o risco de complicações em transplantes alogênicos. No transplante de órgão sólido ela aumenta o risco de rejeição aguda, enquanto no TCPH ela aumenta a chance de falha de enxertia e rejeição do enxerto, especialmente quando não há compatibilidade completa entre doador e receptor (107,108).

Embora o transplante aparentado HLA compatível tenha sido muito bem sucedido na DF, apenas uma pequena parte dos pacientes possui doador. Posto que o transplante haploidêntico seja uma alternativa e aumente significativamente o número de doadores disponíveis, existe um risco aumentado de rejeição do enxerto e de mortalidade relacionada ao tratamento. Tais complicações explicam-se em parte pela presença de anticorpos anti-HLA no receptor voltados contra antígenos do doador, decorrentes das múltiplas transfusões prévias (109). A aloimunização anti-HLA também foi fator de risco para a DECH crônica e foi associada à maior

necessidade transfusional de plaquetas durante o TCPH em crianças com DF submetidas ao TCPH HLA compatível (110).

Em estudo conduzido nos EUA a aloimunização HLAI foi detectada em 33% dos pacientes pediátricos com DF transfundidos e foi associada à aloimunização eritrocitária. Além disso, a reatividade elevada contra antígenos HLAI foi associada ao histórico de anticorpos antieritrocitários e não ao número de transfusões prévias (111). Outro estudo em pacientes com DF entre 3 a 21 anos também encontrou anticorpos HLA em 34% dos pacientes e forte associação com aloimunização eritrocitária (112). Esses resultados são consistentes com a existência de fenótipos respondedores e não respondedores imunológicos e apontam que esse conceito se aplica não só à aloimunização eritrocitária, mas também ao sistema HLA.

São poucos os estudos envolvendo aloimunização HLA na população brasileira que é única por sua enorme diversidade étnica e intensa miscigenação. Não há até o presente momento nenhum estudo analisando a aloimunização HLA em pacientes com DF brasileiros e os resultados obtidos em estudos internacionais provavelmente não se aplicam a nossa população. Em pacientes brasileiros com DF o componente de ascendência africana varia de 6,7 a 93,4%, comprovando a complexidade da miscigenação em relação à população de falciformes em outros países (113). Apesar de elevada prevalência de anticorpos HLA (77,9%) ter sido descrita em 122 pacientes transfundidos em três diferentes regiões do país, as doenças de base não foram avaliadas no estudo (114). Dessa forma, pesquisas para determinar a real prevalência de aloimunização HLA em pacientes com DF brasileiros são necessárias. Além disso, comprovando-se a correlação com a aloimunização eritrocitária, o histórico positivo de anticorpos antieritrocitários pode indicar o paciente de maior risco para complicações durante o TCPH.

1.6 O sistema de grupo sanguíneo Duffy e a doença falciforme

O sistema de grupo sanguíneo Duffy é codificado pelo gene *FY*¹, ou gene *ACKR1* (“*Atypical Chemokine Receptor 1*”), anteriormente conhecido como *DARC* (“*Duffy antigen chemokine receptor*”). Os antígenos *Fy^a* (FY1) e *Fy^b* (FY2) são

¹ A nomenclatura “FY” é formalmente utilizada pela ISBT (do inglês: “*International Society of Blood Transfusion*”) para o gene que codifica a glicoproteína Duffy, enquanto a nomenclatura “ACKR1” é utilizada pela HUGO (do inglês: “*Human Genome Organisation*”).

codificados por dois alelos co-dominantes, *FY*01* e *FY*02*, que diferem pela presença de um polimorfismo de um único nucleotídeo c.125G>A (rs12075). A combinação desses alelos determina os três fenótipos comuns Duffy positivos: Fy(a + b-), Fy (a - b +) e Fy (a + b +). O fenótipo Fy (a-b-), ou Duffy negativo, é consequência da herança em homozigose de um alelo *FY*02 null*, que apresenta uma mutação de ponto c.-67T> C (rs2814778) na região de ligação do fator de transcrição eritróide (GATA-1), impedindo a expressão da proteína nos eritrócitos, enquanto sua expressão nos demais tecidos está preservada (115). O fenótipo Fy (a-b-) é raro em caucasianos, mas é encontrado em quase 100% da população da África Ocidental e em grande parte dos afrodescendentes, sendo portanto bastante comum entre pacientes com DF (116). Indivíduos com o genótipo *FY c.-67TT* expressam 100% dos sítios da proteína Duffy, enquanto os heterozigotos *FY c.-67TC* expressam 50% dos sítios (117).

A glicoproteína Duffy é expressa nos eritrócitos, nas células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares em todo o corpo e nas células epiteliais de órgãos não eritróides. Além de ser o receptor para a entrada de merozoítos do *Plasmodium Vivax* nos eritrócitos, a glicoproteína Duffy é receptora de quimiocinas inflamatórias das subfamílias CC e CXC, como a RANTES e a IL-8, respectivamente. O mecanismo pelo qual ela influencia o processo inflamatório ainda é controverso (118).

A proteína Duffy pode atuar como um “reservatório” de quimiocinas capaz de manter estáveis os níveis séricos dessas substâncias (119). Porém, já foi proposto que ela funcionaria como um regulador local e sistêmico da inflamação, em que os eritrócitos que expressam os antígenos Duffy removeriam as quimiocinas dos leitos vasculares de tecidos inflamados, onde sua concentração é elevada, e liberaria sistemicamente, equilibrando assim a biodisponibilidade desses mediadores (120) (121). Paralelamente, estudos indicam que a proteína Duffy expressa no endotélio poderia desempenhar um papel pró-inflamatório por facilitar a transferência de quimiocinas da circulação para os tecidos através das células endoteliais, promovendo o recrutamento de leucócitos para os sítios de inflamação. A favor dessa hipótese, foi demonstrado aumento da expressão da proteína Duffy no endotélio pulmonar em processos inflamatórios e infecciosos (122).

Na DF o fenótipo Duffy positivo foi associado a níveis mais elevados de glóbulos brancos, de IL-8 e RANTES que o fenótipo Duffy negativo (123). Além

disso, a expressão da $\alpha 4\beta 1$ integrina nos reticulócitos falciformes e sua interação com o endotélio é sensível à IL-8, sendo a resposta ao estímulo pela IL-8 diferente dependendo da expressão Duffy (117).

Apesar do papel evidente do sistema Duffy nos mecanismos inflamatórios, ainda são poucos os estudos que relacionaram os fenótipos eritrocitários Duffy com as complicações clínicas da DF e alguns achados são controversos (124–128). Nesses estudos, os indivíduos heterozigotos *FY c.-67TC*, em que a expressão da proteína Duffy é reduzida, são analisados juntamente com os homozigotos *FY c.-67TT*, que apresentam 100% dos sítios Duffy. Dois trabalhos mostraram associação do fenótipo Duffy com lesão renal, sendo que um deles associou com o fenótipo Duffy positivo e o outro, com Duffy negativo (125,126). Um único estudo associou o fenótipo Duffy positivo à ocorrência de úlcera maleolar (126), e outro não achou relação do fenótipo Duffy com a aloimunização eritrocitária (125,129).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Descrever as características demográficas, clínicas e imuno-hematológicas dos pacientes com doença falciforme que receberam transfusões de hemácias.

2.2 Objetivos específicos

- a) Descrever as especificidades dos anticorpos antieritrocitários.
- b) Avaliar fatores clínicos e transfusionais associados à aloimunização eritrocitária.
- c) Avaliar o impacto da aloimunização eritrocitária na sobrevida.
- d) Avaliar a prevalência da aloimunização HLA e a correlação com a aloimunização eritrocitária.
- e) Avaliar a relação do polimorfismo *FY c.-67T>C* com características clínicas.
- f) Avaliar a relação do polimorfismo *FY c.-67T>C* com a aloimunização.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Como o objeto de estudo do presente trabalho era a aloimunização contra antígenos eritrocitários e HLA decorrente de transfusão, foi necessário conhecer o número de pacientes ativos no ambulatório de hemoglobinopatias do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP) da Universidade de São Paulo (USP), quantos deles já haviam sido submetidos a pelo menos uma transfusão e qual período de estudo permitiria acesso a registros clínicos e transfusionais consistentes. Foi, portanto, conduzida uma análise preliminar de todos os pacientes cadastrados no ambulatório de hemoglobinopatias. O primeiro levantamento de dados foi realizado através do programa Hemosam, que compila os dados de todos os pacientes com hemoglobinopatias já atendidos no serviço. Foram pesquisados os termos “HbSS”, “HbS β^0 ”, “HbSC”, “HbS β^+ ” e “HbSD”, o que resultou em uma lista de 669 pacientes.

A seguir, o prontuário de cada paciente foi acessado através do sistema informatizado do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para determinar quais pacientes foram ativos no ambulatório entre janeiro de 2014 e dezembro de 2018, período que permitiria acesso a registros mais recentes pelo prontuário eletrônico. A terceira e última análise, conduzida no sistema informatizado do HCFMRP e no sistema informatizado de banco de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, identificou quais pacientes tinham registro de transfusão e pesquisa de anticorpos irregulares prévios.

3.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes homozigotos para a HbS (SS) ou duplo heterozigotos (S β^0 , SC, S β^+ e SD) com seguimento regular no ambulatório, com pelo menos um registro de transfusão no período compreendido entre janeiro de 2014 e dezembro de 2018 e pelo menos uma transfusão antes da última pesquisa de anticorpos irregulares. Não foram incluídos no estudo pacientes inativos, pacientes cuja irregularidade dos retornos prejudicaria a análise de dados clínicos, pacientes com início de acompanhamento apenas em 2019 e aqueles transferidos

recentemente de outros serviços, onde tenham realizado a maior parte de seu acompanhamento clínico e transfusional.

3.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes que apresentaram apenas anticorpos com especificidades dirigidas contra antígenos próprios.

3.1.3 Aspectos éticos

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e aprovado em 22 de janeiro de 2019 com parecer número 3.118.117 (ANEXO A). O participante foi convidado a participar da pesquisa durante seu retorno para transfusão eletiva ou antes de sua consulta no ambulatório de hemoglobinopatias. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aplicado pessoalmente pelo pesquisador (APÊNDICE A).

Qualquer achado sorológico novo que pudesse mudar a conduta transfusional ou que sua omissão pudesse colocar em risco a segurança das futuras transfusões, foi incorporado aos registros imuno-hematológicos.

3.2 Análise retrospectiva de dados

3.2.1 Revisão de dados clínicos

Todos os dados clínicos foram obtidos através da revisão dos prontuários eletrônicos de todos os pacientes entre janeiro de 2019 e janeiro de 2020 e do sistema Hemosam, programa que compila dados de pacientes acompanhados no ambulatório de hemoglobinopatias. Os seguintes dados foram obtidos:

- a) **Identificação:** data de nascimento e sexo.
- b) **Genótipos da cadeia de β -globina:** HbSS, HbS β^0 , HbSC, HbSD, HbS β^+ , HbSS com persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF) determinadas por HPLC.
- c) **Complicações clínicas:** crise vaso-oclusiva, síndrome torácica aguda, vasculopatia cerebral, acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico,

eventos trombóticos, lesão renal (presença de proteinúria e insuficiência renal crônica) , úlceras de membros inferiores, osteonecrose, priapismo, sequestro esplênico, hipertensão pulmonar, hepatopatia e óbito.

- d) **Regime transfusional:** classificado em regime transfusional regular ou episódico.
- e) **Tratamento farmacológico:** uso de hidroxiureia e de quelante de ferro.
- f) **Outros:** número de gestações, esplenectomia cirúrgica e concentração de ferritina.

3.2.1.1 Definições

- a) **Crise vaso-oclusiva:** paciente com crises álgicas recorrentes, pelo menos três episódios no ano, ou um episódio com necessidade de hospitalização.
- b) **Síndrome torácica aguda:** Pelo menos um episódio pelo menos moderado com necessidade de internação, caracterizado por novo infiltrado pulmonar e pelo menos um sintoma respiratório (tosse, dispneia, dor torácica, febre, expectoração e alteração na ausculta pulmonar).
- c) **Vasculopatia cerebral:** alteração ao DTC com indicação de transfusão crônica profilática, sem evento isquêmico ou hemorrágico prévio.
- d) **Acidente vascular isquêmico:** déficit neurológico agudo, permanente ou reversível, e imagem (tomografia ou ressonância) compatível com evento isquêmico recente.
- e) **Acidente vascular hemorrágico:** déficit neurológico agudo, permanente ou reversível, e imagem (tomografia ou ressonância) compatível com evento hemorrágico.
- f) **Eventos neurológicos:** presença de qualquer umas das complicações descritas em c, d ou e.
- g) **Eventos trombóticos:** tromboembolismo venoso confirmado por imagem (angiotomografia com contraste ou ultrassom). Inclui tromboembolismo pulmonar, trombose venosa cerebral e trombose venosa em membros.
- h) **Proteinúria:** baseada na dosagem de proteínas no volume urinário de 24 horas. Para análise foram avaliados os cortes de 150mg/24h (proteinúria moderada) e 500mg/24h (proteinúria severa). Não foram consideradas as

dosagens alteradas detectadas exclusivamente durante gestação, infecção de trato urinário ou uso do quelante de ferro Deferasirox.

- i) **Insuficiência renal crônica:** definido como clearance de creatinina < 60 ml/min por mais de 3 meses consecutivos.
- j) **Úlceras:** lesão em membro inferior sem outra causa evidente, como insuficiência venosa ou arterial.
- k) **Osteonecrose:** lesão óssea na cabeça do fêmur, úmero ou outro local menos comum, compatível com necrose asséptica, confirmada por radiografia ou ressonância e sem outra etiologia envolvida.
- l) **Priapismo:** pelo menos um episódio de ereção involuntária e dolorosa com duração de pelo menos 30 minutos.
- m) **Sequestro esplênico:** episódio agudo caracterizado por queda súbita de pelo menos 2g/dl no nível de hemoglobina e aumento concomitante do volume esplênico.
- n) **Hipertensão pulmonar:** foi definida pelo ecocardiograma por pressão de artéria pulmonar ≥ 35 mmHg, ou por TRJV $\geq 3,0$ m/seg, e pelo cateterismo cardíaco, por pressão de artéria pulmonar ≥ 25 mmHg.
- o) **Hepatopatia:** Cirrose hepática instalada ou sinais de hepatopatia crônica, precedida ou não por quadros agudos de falcização, ou quadros agudos recorrentes com elevação de bilirrubinas, alteração de enzimas hepáticas com ou sem alteração da função hepática. Presença de alteração do parênquima hepático ao ultrassom.
- p) **Regime transfusional regular:** foram classificados como em regime transfusional regular os pacientes que receberam pelo menos um concentrado de hemácias por pelo menos seis meses consecutivos entre janeiro de 2014 e dezembro de 2018, cuja indicação não tenha ocorrido por intercorrências agudas sucessivas.
- q) **Regime transfusional episódico:** foram classificados como em regime transfusional episódico os pacientes que receberam transfusões em períodos de descompensação da doença de base ou que receberam transfusões programadas com menos de 6 meses de duração entre janeiro de 2014 e dezembro de 2018.
- r) **Fenótipo eritrocitário raro:** fenótipo cuja frequência na população é inferior 1:1000 indivíduos. Pode ser decorrente da perda de expressão de um

antígeno de alta frequência ou pela ausência de múltiplos antígenos de frequência intermediária.

3.2.2 Revisão de dados transfusionais

O Hemocentro de Ribeirão Preto juntamente com seus cinco hemonúcleos e suas três unidades de hemoterapia abrangem uma região com mais de cinco milhões de habitantes. São abastecidos 132 hospitais localizados em 97 cidades diferentes. O destino de todo hemocomponente utilizado nos serviços que realizam transfusões deve ser informado ao Hemocentro de Ribeirão Preto. Dessa forma, mesmo que o paciente tenha recebido transfusões externas, fora do complexo do HCFMRP-USP, é possível detectar o episódio transfusional, desde que ele tenha ocorrido na região de abrangência do Hemocentro de Ribeirão Preto (figura 4). Além disso, diversas agências transfusionais externas atendidas pelo Hemocentro de Ribeirão Preto não realizam a identificação de anticorpos irregulares, sendo que, uma vez que o paciente desenvolve anticorpos irregulares, a amostra é enviada ao Hemocentro ou a um de seus Hemonúcleos para a identificação.

Figura 4 - Região de abrangência do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Fonte: Hemocentro de Ribeirão Preto.
Estão destacadas em azul as áreas atendidas pelo Hemocentro de Ribeirão Preto.

O sistema informatizado de banco de sangue armazena registros transfusionais desde 1996. A busca pelo número de concentrados hemácias (CHs) transfundidos foi realizada pela atividade “Registro de transfusões para paciente” com data inicial de 01 de janeiro de 1996 até a data da emissão do relatório em 2019. O relatório fornece todos os hemocomponentes registrados para cada indivíduo no período solicitado. Foram contabilizados os CHs transfundidos antes da última pesquisa de anticorpos irregulares disponível. Eventuais transfusões de concentrados de plaquetas ou plasma fresco congelado não foram contabilizados.

Todos os pacientes com DF atualmente recebem apenas hemocomponentes leucorreduzidos. O início da leucorredução antecede a criação do departamento de Qualidade e os registros mais antigos desse setor mostram que a leucorredução com filtro beira-leito já era realizada antes de 2001. Posteriormente, em 2008, foi iniciada a leucorredução de bancada. O primeiro procedimento operacional que descreveu a indicação formal do uso dos hemocomponentes leucorreduzidos surgiu em setembro de 2002.

No momento da inclusão os pacientes foram questionados sobre a idade da primeira transfusão, sobre transfusões externas e a data da última transfusão. Posteriormente esses dados foram analisados em conjunto com o primeiro registro de transfusão no sistema informatizado.

3.2.3 Revisão de dados imuno-hematológicos

O levantamento dos exames imuno-hematológicos contou com os registros do sistema informatizado de banco de sangue, com os registros do prontuário eletrônico, utilizados exclusivamente pelas agências transfusionais do HCFMRP e com a revisão das fichas físicas de receptor, arquivadas no laboratório de imuno-hematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.2.3.1 Histórico de anticorpos irregulares

Três diferentes técnicas foram utilizadas na triagem e identificação de anticorpos irregulares no Hemocentro de Ribeirão Preto. Há pelo menos 15 anos a técnica utilizada na rotina é a hemaglutinação em microcolunas contendo gel e antiglobulina humana (130). Outras duas técnicas foram aplicadas à rotina antes

desse período: a hemaglutinação em tubo utilizando os potencializadores polietilenoglicol e a solução de baixa força iônica (131). Na análise dos registros foram avaliadas as seguintes informações:

- a) Presença ou ausência de anticorpos irregulares antieritrocitários no histórico de cada paciente.
- b) As especificidades de anticorpos confirmadas sorologicamente.
- c) Para os pacientes aloimunizados foi pesquisado se a primeira pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) realizada no Hemocentro de Ribeirão Preto ou no HCFMRP era positiva ou se positivou ao longo de seu acompanhamento.
- d) O tempo e número de transfusões até o primeiro resultado positivo, quando o primeiro exame era negativo.
- e) Perfil da última PAI em comparação com o histórico de cada paciente (permaneceu negativa, tornou-se positiva, permaneceu positiva).
- f) O tempo decorrido entre a última transfusão e a última PAI realizada.

3.2.3.2 Fenotipagem eritrocitária

Além da tipagem ABO e RhD (RH1), obrigatórias em todo teste pré-transfusional, o protocolo institucional determina a realização de fenotipagem estendida de pacientes com doença falciforme antes da primeira transfusão. A fenotipagem estendida compreende os antígenos C (RH2), E (RH3), c (RH4), e (RH5), K (KEL1), Jk^a (JK1), Jk^b (JK2), Fy^a (FY1), Fy^b (FY2), S (MNS3) e s (MNS4). A fenotipagem é realizada utilizando-se soros comerciais específicos (monoclonais ou humanos) que são incubados com uma suspensão de hemácias do indivíduo. Se o anticorpo encontra o respectivo antígeno na superfície da hemácia, a reação é positiva e é visualizada através da aglutinação das hemácias. A fenotipagem é atualmente realizada na técnica em gel. Os antígenos do sistema Rh, Kell e Kidd são testados em cartões que já contêm anticorpos monoclonais específicos, enquanto os demais antígenos são testados com soros IgG em gel contendo antiglobulina humana (teste indireto da antiglobulina).

Foi também realizado o levantamento da frequência fenotípica de doadores de sangue para permitir a comparação com a população de pacientes. Foram pesquisados os antígenos K (KEL1), Jk^a (JK1), Jk^b (JK2), Fy^a (FY1), Fy^b (FY2), S

(MNS3) e s(MNS4). Os fenótipos do sistema Rh e o antígeno k (KEL2) não foram pesquisados em doadores, pois existe seleção de amostras para fenotipagem estendida baseada no resultado da tipagem inicial RhD e Kell, de modo que os resultados de prevalência obtidos no banco informatizado não devem refletir a real proporção dos fenótipos entre os doadores.

Vale ressaltar que o protocolo institucional mudou ao longo dos anos. No ano 2000 uma pequena parcela dos doadores (2%) era fenotipada apenas com o objetivo de atender os pacientes já aloimunizados. A proporção de doadores fenotipados aumentou progressivamente ao longo dos anos, de forma que hoje a fenotipagem é realizada regularmente em 6 a 8% dos doadores. Em 2002 um novo procedimento operacional incluiu pela primeira vez a fenotipagem estendida de todos os pacientes com DF em transfusão e aos poucos foi instituída a estratégia de respeitar o fenótipo Rh e Kell de forma profilática. Atualmente, a seleção de mesmo fenótipo Rh (C,E,c,e) e Kell é obrigatória e, sempre que possível, respeita-se o fenótipo estendido, especialmente no paciente já aloimunizado. No entanto, não foi possível estabelecer uma data precisa para a implementação completa desse protocolo para os pacientes com DF.

3.2.3.3 Genotipagem eritrocitária

A genotipagem eritrocitária é realizada em todo paciente com DF em que a fenotipagem não pode ser realizada em virtude de transfusão de hemácias há menos de três meses ou que tenha teste direto da antiglobulina positivo. O exame tornou-se disponível no Hemocentro de Ribeirão Preto a partir de 2006. A metodologia é padronizada e aplicada desde 2008 no Hemocentro de Ribeirão Preto como técnica complementar para melhorar a segurança transfusional. Para os pacientes que já possuíam genotipagem prévia, os dados foram obtidos a partir dos registros no sistema informatizado e ficha de receptor.

3.3 Coleta e processamento de amostras

Foram coletados 5 ml de sangue total em tubo com EDTA (do inglês: “*ethylenediaminetetraacetic acid*”) e 5ml em tubo sem anticoagulante por profissional treinado. As amostras foram coletadas no dia da transfusão, no caso de pacientes em transfusão eletiva agendada, ou no dia da consulta ambulatorial. Os tubos sem

anticoagulante foram centrifugados, o soro separado e congelados a -20°C em microtubos devidamente identificados até o processamento. O tubo com EDTA foi armazenado a 4°C para extração de DNA (do inglês: “*deoxyribonucleic acid*”).

3.4 Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares

A pesquisa e a identificação dos anticorpos foram realizadas utilizando-se um conjunto comercial de hemácias fenotipadas (ID-DiaPanel®) e colunas de microaglutinação (LISS/Coombs ID-Cards®), seguindo as instruções do fabricante (Bio-Rad®, Cressier-sur-Morat). O soro ou plasma do participante (25µl) foi incubado com 50µl da suspensão de três hemácias comerciais (0,8%) de diferentes fenótipos na câmara superior da coluna de gel. O cartão foi então incubado por 15 min a 37°C . O teste foi posteriormente centrifugado em centrífuga própria para cartões e, ao final, foi realizada a leitura visual. A coluna de gel contém antiglobulina humana, a qual se liga ao anticorpo irregular que está sensibilizando a hemácia comercial, formando assim uma malha que impede a descida das hemácias pela coluna de gel. A intensidade de aglutinação é graduada de 0 a 4+ (figura 5).

Figura 5 - Intensidade de aglutinação na técnica em gel.

Fonte: próprio autor.

Na presença de aglutinação com qualquer uma das hemácias da triagem o resultado é considerado positivo (figura 6), sendo então realizada a identificação do anticorpo. Nessa segunda etapa aplicou-se a mesma técnica, porém utilizando um painel de 11 hemácias fenotipadas. Em paralelo, foi também realizado painel de 11 hemácias tratadas com papaína, que potencializa a intensidade de aglutinação de alguns

anticorpos e enfraquece outros, auxiliando a identificação das especificidades. A interpretação do resultado do painel é realizada analisando-se um diagrama fornecido pelo fabricante que contém os fenótipos de cada célula testada, buscando encontrar no diagrama um perfil antigênico compatível com o padrão de positividade observado no gel.

Figura 6 - Triagem de anticorpos irregulares.

Fonte: próprio autor.

A triagem 1 mostra um resultado negativo. A triagem 2 mostra um resultado positivo com aglutinação das hemácias II e III. Hc: Hemácia; Neg: Negativo; Pos: Positivo.

Para os pacientes em transfusão no momento da inclusão no estudo, os resultados da última PAI foram obtidos a partir dos resultados do último teste pré-transfusional realizado no laboratório de imuno-hematologia do hemocentro de Ribeirão Preto. Para os pacientes ambulatoriais e fora de contexto transfusional recente, foi realizada nova pesquisa de anticorpos irregulares com a amostra coletada ambulatorialmente. Nos casos em que não foi possível obter nova amostra, o último resultado de PAI registrado no sistema foi considerado.

3.5 Pesquisa de anticorpos anti-HLA

Os eventuais anticorpos anti-HLA presentes no soro dos pacientes ligam-se aos antígenos presentes em “beads” (pérolas) fluorescentes contendo os antígenos HLA I e II. Essa ligação é marcada por um segundo anticorpo (anti-IgG humano de cabra) conjugado com Ficoeritrina (PE; do inglês: “*phycoerythrin*”) (figura 7). Cada bead emite um sinal específico quando excitada por um laser devido à intensidade única do fluoróforo incorporado a ela. Um segundo laser detecta a emissão fluorescente produzida pelo

segundo anticorpo conjugado à PE. A reação é lida pelo analisador de fluxo que detecta simultaneamente a emissão fluorescente da PE (indica a presença do anticorpo) e a presença da fluorescência única de cada bead (indica a especificidade do anticorpo), permitindo uma aquisição de dados quase em tempo real.

Figura 7 - Pesquisa de anticorpos anti-HLA

Fonte: próprio autor.

O Kit utilizado nessa pesquisa foi o LABScreen® Mixed Class I and II (One lambda Inc West Hills, CA). O Kit é composto por cinco perfis de beads revestidas com antígenos Classe I e três perfis de beads com antígenos Classe II. Por se tratar de um teste de triagem, o kit utilizado neste ensaio aponta a presença ou ausência de anticorpos anti-HLA I e/ou HLA II. A identificação da especificidade dos anticorpos anti-HLA não foi prevista neste estudo.

O soro controle (controle negativo) e as amostras de soro dos participantes foram centrifugadas por 10 min a 10000-13000g e mantidas sobre placa térmica de gelo. A cada poço da placa de reação de 96 poços foram adicionados 2,5µl de beads, previamente homogeneizadas em vortex. O soro controle (10µl) foi adicionado ao poço correspondente, e 10µl do soro de cada participante foram distribuídos nos demais poços, de acordo com o mapa de trabalho previamente preenchido. A placa foi mantida sobre placa térmica de gelo durante o processo. A

placa foi vedada com tampa de silicone específica, homogeneizada por 30 segundos em vortex e incubada 30 min entre 20°C e 24°C em agitador de placa, protegida da luz. A cada poço foi adicionado 150µl de tampão de lavagem. A placa foi homogeneizada em vortex e centrifugada por cinco min a 1000-1300g. Essa última etapa foi repetida uma vez. A seguir, adicionou-se a cada poço 50µl do anticorpo de cabra conjugado, previamente diluído a 1% em tampão de lavagem. A placa foi novamente incubada por 30 min entre 20°C e 24°C em agitador de placa e em seguida centrifugada por 5 min a 1000-1300g. Seguiram-se mais duas novas lavagens com tampão e centrifugação por cinco minutos a 1000-1300g. A cada poço foi adicionado 65µl de PBS (do inglês: “*phosphate-buffered saline*”) homogeneizando com a pipeta o conteúdo, que foi transferido para uma placa de fundo “V”. A placa de fundo “V” foi levada para a leitura no analisador de fluxo LabScan 100.

O aparelho realiza a leitura da fluorescência emitida por cada amostra e libera o resultado como positivo ou negativo após realizar um cálculo que normaliza os valores de fluorescência ao subtrair o valor de fluorescência da bead controle negativo e dividir pela fluorescência emitida pelo soro controle negativo. Razões acima de 1,5 (score 8) são consideradas positivas, entre 1,2 e 1,5 (score 4) são indeterminadas e razões abaixo de 1,2 (score 1) são consideradas negativas. A positividade de qualquer uma das beads de cada classe configura um resultado positivo.

3.6 Genotipagem eritrocitária

A genotipagem eritrocitária foi realizada em 94 pacientes que não possuíam genotipagem prévia. As sequências de todos os primers e sondas utilizados nas reações são detalhadas no APÊNDICE B.

3.6.1 Extração do DNA

As amostras de sangue total foram centrifugadas a 900g por 10 minutos a 4°C e o plasma foi retirado. Após a centrifugação, o DNA foi extraído a partir da camada de leucócitos utilizando-se o kit Gentra Puregene Blood Kit (Quiagen). O tampão de lise (9ml) de glóbulos vermelhos gelado (*RBC Lysis Solution Buffer*) foi adicionado à camada de leucócitos. Em seguida, a mistura foi homogeneizada por 15 minutos e

centrifugada a 2000 g durante 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado. Esta última etapa foi repetida mais duas vezes. Ao botão de leucócitos lavado foi adicionado 3 ml de tampão de lise de glóbulos brancos (*Cell Lysis Solution*) e 15 µl de RNase solution, seguido de homogeneização em vórtex e incubação por 15 minutos a 37°C. Após a incubação, foi acrescentado 1ml de solução precipitante de proteínas e realizada agitação vigorosa por 30 segundos. A reação foi centrifugada a 2000 g por 5 minutos. O sobrenadante límpido foi transferido para um tubo cônico de 15 mL com o auxílio de uma pipeta, e a ele foi adicionado 3ml de isopropanol. Após a homogeneização por inversão, foi novamente realizada centrifugação a 2000 g por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. Ao *pellet* de DNA foi acrescentado 3 ml de etanol 70%, seguido de centrifugação a 2000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o tubo com a amostra de DNA permaneceu por 10 minutos em temperatura ambiente para secar. Após este intervalo, o DNA foi recuperado, diluído em 200 mL de água tipo I estéril (Milli-Q) e estocado a -20°C. Todas as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria e diluídas para 0.1 µg/µl.

3.6.2 Genotipagem por PCR-RFLP

O PCR-RFLP (do inglês: “*polymerase chain reaction*” e “*restriction fragment length polymorphism*”) foi aplicado à genotipagem do sistema Kell para os alelos *KEL*01* e *KEL*02* (c.578C>T). O alelo de referência é o alelo *KEL*02* (c.578C), que determina a expressão do antígeno celano (k ou KEL2), enquanto o alelo *KEL*01* (c.578T) determina a expressão do antígeno Kell (K ou KEL1). Os reagentes utilizados na reação estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Reagentes para a reação de PCR *KEL*01/KEL*02*.

Reagentes	Volumes
Tampão	2,5 µL
MgCl ₂	0,75 µL
dNTPs (1,25mM)	2,0 µL
Primer Kell R (2,5 pMol)	1,0 µL
Primer Kell F (2,5 pMol)	1,0 µL
Taq DNA Polimerase	0,3 µL
Água	15,45 µL
Volume final da reação	23 µL

Após pipetar os reagentes e homogeneizar em vortex por alguns segundos, 2µL de DNA da amostra foi adicionado ao mix e a reação foi levada ao termociclador, cuja ciclagem está descrita no Quadro 3.

Quadro 3 - Programação do termociclador para a genotipagem *KEL* *01/*KEL* *02.

Fase	Temperatura	Tempo	Repetição
1	94°C	02 min	1 vez
2	94°C	40 s	35 vezes
	61,5°C	50 s	
	72°C	1 min	
3	72°C	10 min	1 vez
4	4°C	-	término

Os produtos da amplificação (156 bp) foram visualizados em gel de agarose a 1 % corado com GelRed (Biotium, Fremont, CA). Após a amplificação foi realizada a digestão com a enzima Bsm I. Enzima (0,3 µL), água (8,7 µL) e tampão (1,1 µL) foram pipetados em fluxo laminar em microtubos identificados com o número da amostra e agitados em vortex. A seguir, 0,5 µL do produto do PCR foi adicionado à mistura, que foi então levada ao termociclador por 2 horas a 65°C. Ao término, o produto da reação foi aplicado em gel de poliacrilamida e corado com prata para visualização dos fragmentos de 156, 98 e 58pb (figura 8).

Figura 8 - Genotipagem por PCR-RFLP.

Fonte: próprio autor.

A figura ilustra um resultado de genotipagem por PCR-RFLP para o polimorfismo *KEL* c.578C>T.

3.6.3 Genotipagem por PCR em tempo real

O PCR em tempo real (RT-PCR; do inglês: “*real time polymerase chain reaction*”) foi aplicado à genotipagem dos seguintes polimorfismos de grupos sanguíneos: *RHCE* (c.307C>T e c.676 G>C), *GYPB*04/GYPB*03* (c.143C>T), *JK*01/JK*02* (c.838G>A), *FY*01/FY*02* (c.125 G>A) e *FY*02N.01* (c.-67T>C).

A reação de PCR foi realizada no equipamento Real-time system PCR 7500 (*Applied Biosystems, Califórnia, EUA*) utilizando a tecnologia Taqman[®], conforme protocolo previamente descrito (132). Para a definição dos alelos dos grupos sanguíneos foram utilizadas sondas de hidrólise de ácidos nucleicos específicas para cada alelo estudado (APÊNDICE B). Todas as reações foram realizadas em um volume final de 12,5 mL, utilizando 6,25 mL *Taqman[®] Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Califórnia, EUA*), 100 nM de sonda, e 200 ng de DNA extraído. A condição de ciclagem utilizou o mesmo protocolo para todas as reações: 2 minutos a 50 °C e 10 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de desnaturação durante 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C.

À medida que ocorre a amplificação a sonda específica é desligada da fita de DNA emitindo fluorescência crescente. Esta é detectada pelo aparelho gerando uma curva ascendente de amplificação, que pode ser visualizada em programa específico. Na ausência de amplificação, ou resultado negativo, não ocorre ascensão da curva (figura 9).

Figura 9 - Genotipagem por PCR em tempo Real.

Fonte: próprio autor.

A figura ilustra um resultado de genotipagem por PCR em tempo real para o polimorfismo c.143C>T no gene *GYPB*. 9A) Observa-se apenas a amplificação do alelo c.143T (curva azul), tratando-se, portanto, de um homozigoto TT (*GYPB*03/03* ou *GYPB*S/S*). 9B) Apenas a curva verde ascende, mostrando tratar-se de um homozigoto CC (*GYPB*04/04* ou *GYPB*s/s*). 9C) As duas curvas aumentam, mostrando amplificação de ambos os alelos, tratando-se portanto de um heterozigoto TC (*GYPB*03/04* ou *GYPB*S/s*).

Nos casos de discrepância entre fenótipo e genótipo no sistema Duffy, foi também analisado o polimorfismo *FY* c.265C>T com o mesmo protocolo apresentado de RT-PCR. Nas discrepâncias do sistema MNS, pesquisou-se a presença das duas variantes mais comuns do gene *GYPB* (*GYPB**P2 e *GYPB**NY), conforme descrito em Santos *et al* (133).

3.7 Análise estatística

3.7.1 Análise descritiva

As variáveis qualitativas foram descritas por suas frequências absolutas e percentuais. A distribuição das variáveis contínuas foi analisada por meio dos testes D'Agostino e Kolmogorov-Smirnov. A variável foi considerada como tendo distribuição normal se ambos os testes fossem concordantes. A variável com distribuição normal foi expressa pela média e desvio padrão (DP). A variável cuja distribuição não foi normal foi expressa pela mediana e pelo intervalo interquartil (IIQ) ou pela mediana e valores mínimo e máximo (mín-máx). A análise descritiva foi realizada no programa GraphPad Prism Version 8.4.3 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

A prevalência de aloimunização foi calculada considerando-se o número de pacientes com pelo menos um aloanticorpo confirmado sobre o número total de pacientes. A taxa de aloimunização foi calculada dividindo-se o número de pacientes aloimunizados pelo total de unidades de CHs transfundidas (não foram incluídos nessa análise os pacientes sem registros de transfusões antes da primeira PAI positiva). Nos aloimunizados foi considerado para esse cálculo o número de CHs até a aloimunização (primeira PAI positiva), enquanto que para os não aloimunizados foi considerado o número total de unidades transfundidas até a última PAI (83).

3.7.2 Testes estatísticos

As variáveis contínuas com distribuição normal foram analisadas pelo teste t-student, enquanto as variáveis contínuas de distribuição não normal foram analisadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (teste "U"). Na comparação de variáveis com distribuição normal entre mais de dois grupos foi

utilizado ANOVA. As variáveis categóricas foram analisadas por tabela de contingência usando o teste exato de Fisher. O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar variáveis categóricas em mais de dois grupos.

A sobrevida e o risco cumulativo de aloimunização foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e calculados em função do tempo e do número de CHs transfundidos (134). As diferenças de sobrevida entre os grupos estudados foram avaliadas pelo teste de log-rank. Na análise de correlação foi utilizado o coeficiente de Spearman. Para todos os testes foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

Os testes foram realizados no programa GraphPad Prism Version 8.4.3 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). Os gráficos foram realizados no GraphPad Prism Version 8.4.3 e no programa Excel versão 16.16.19 (Microsoft®).

Após a análise univariada, algumas variáveis contínuas e categóricas de interesse foram selecionadas para a análise utilizando o modelo de regressão Poisson com variância robusta de forma bruta e ajustada no software SAS 9.4 (135).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características da população estudada

Dentre os 669 pacientes cadastrados no ambulatório de hemoglobinopatias, 189 haviam perdido acompanhamento ou haviam iniciado seguimento recente. Outros 181 pacientes não apresentavam nenhum registro de transfusão no sistema informatizado, tampouco pesquisa de anticorpos irregulares prévia. Dos 299 restantes, 86 não apresentaram transfusões entre janeiro de 2014 e dezembro de 2018. Portanto, foram incluídos 213 pacientes, dos quais dois foram excluídos devido à presença isolada de anticorpos voltados contra antígenos presentes no próprio fenótipo. O resultado do processo de inclusão e exclusão está representado na figura 10.

Figura 10 - Representação do processo de inclusão e exclusão.

Fonte: próprio autor. Fluxograma do processo de inclusão e exclusão. Gráficos representam a proporção de genótipos da DF (HbSS, HbSβ⁰, HbSC e outros genótipos) em cada fase do processo.

No grupo estudado (n=211), os genótipos HbSS e HbSβ⁰ corresponderam a 83,8% do total, enquanto no grupo não transfundido nos últimos cinco anos (n=86) a proporção desses genótipos foi 59,3% ($p < 0,0001$; teste exato de Fisher). A composição de genótipos da DF no grupo de estudo é representada no gráfico 1.

Gráfico 1 - Composição de genótipos da doença falciforme.

Proporções de genótipos da DF na população estudada. PHHF: persistência hereditária da hemoglobina fetal.

Entre os 211 participantes, 111 (52,6%) eram do sexo feminino. A mediana de idade foi 27 anos (mín- máx;2-74 anos) e 51,1% (n=108) encontravam-se na terceira ou quarta década de vida (gráfico 2).

Gráfico 2 - Histograma de idade.

Os valores no topo de cada coluna indicam o número de indivíduos em cada faixa etária. Os números no eixo inferior indicam o centro de cada faixa etária (anos).

Entre as complicações clínicas agudas da doença falciforme, as mais frequentes foram a CVO de repetição (60,1%), seguida da STA (46,9%) e dos eventos neurológicos (31,7%), representados principalmente pelo AVC isquêmico (15,6%). Entre as complicações crônicas destacaram-se a osteonecrose do fêmur ou do úmero (15,6%), as úlceras maleolares (15,1%) e a hipertensão pulmonar (9,0%). Foram observados 23 eventos trombóticos venosos em 21 (9,9%) pacientes, sendo 15 tromboembolismos pulmonares, seis tromboes venosas profundas em membros, uma trombose de seio sagital e uma trombose de veia porta. Apenas 87 pacientes tinham resultados de dosagem de proteinúria e desses, 37,9% (n=33) tinham proteinúria pelo menos moderada, sendo que oito deles já apresentavam insuficiência renal (tabela 1).

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes com doença falciforme.

Características	Valor absoluto (n=211)	%
Idade, mediana (amplitude)	27 (2-74)	-
Sexo (feminino/masculino)	111/100	52,6/47,3
Genótipos		
SS	146	69,1
S β^0	31	14,6
SC	20	9,4
S β^+	7	3,3
SD	4	1,8
SS+ PHHF	3	1,4
Aloimunização eritrocitária	70	33,1
Complicação clínicas		
CVO	127	60,1
STA	99	46,9
Evento neurológico	67	31,7
AVC isquêmico	33	15,6
AVC hemorrágico	8	3,7
Vasculopatia	28	13,2
Osteonecrose	33	15,6
Úlcera maleolar	32	15,1
Sequestro esplênico	31	14,6
Trombose venosa	21	9,9
Priapismo	29/100	29
Hipertensão Pulmonar	19	9,0
Insuficiência renal crônica	10	4,7
Proteinúria* (total)	33/87	37,9
Proteinúria moderada	21/87	24,1
Proteinúria grave	12/87	13,7
Hepatopatia	9	4,2
Óbito	22	10,4
Gestação**	48/110	43,6
Esplenectomia	33	15,6
Tratamento medicamentoso		
Hidroxiureia	161	76,3
Quelante de ferro	65	30,8

*Dado obtido de 87 dos 211 pacientes. **Dado obtido de 110 das 111 pacientes do sexo feminino.

A mortalidade no período avaliado foi 10,4% (n=22), sendo 10 pacientes do sexo feminino e 12 do sexo masculino. A média de idade do óbito foi 40,3 anos (DP:±11,1 anos) e a mediana 40,5 anos (mín -máx:21- 57 anos). As causas dos óbitos estão descritas no APÊNDICE D.

O histórico gestacional foi obtido em 110 das 111 pacientes do sexo feminino. Quarenta e oito pacientes apresentavam gestações prévias, totalizando 89 episódios gestacionais, variando de 1 a 6 o número de gestações por paciente.

Ao todo, 161 (76,3%) os pacientes fizeram uso de hidroxiureia, sendo que 133 (63,3%) estavam fazendo uso atual da medicação e 28 (13,2%) estavam sem usar por falta da medicação, toxicidade, amamentação ou má adesão. A quelação de ferro foi indicada para 65 (30,8%) pacientes, sendo a monoterapia com deferasirox o regime mais comum (86,1%). Apenas quatro pacientes estavam em uso exclusivo de desferoxamina, três estavam em uso de deperiprona e dois estavam em terapia combinada com deferiprona e deferoxamina, ou com deferiprona e deferasirox. Em 13 (23,2%) pacientes que haviam feito uso de deferasirox, a medicação estava suspensa por queda da ferritina, intolerância, gestação/amamentação e má adesão ao tratamento.

Dos 211 pacientes, 45 (21,3%) responderam terem recebido apenas transfusões no Hemocentro de Ribeirão Preto ou no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, enquanto 63 (29,8%) referiam transfusões em outras cidades ou hospitais, mas todos em área de cobertura do Hemocentro de Ribeirão Preto. Cinquenta e oito pacientes (27,4%) referiam alguma transfusão em cidades não atendidas pelo Hemocentro de Ribeirão Preto ou em outros estados. Destacaram-se entre essas cidades aquelas abastecidas pelos centros de hemoterapia de Araraquara, Barretos e São José do Rio Preto, além de cidades de Minas Gerais.

Um total de 15.916 unidades de concentrados de hemácias foram transfundidos em 211 pacientes até a última pesquisa de anticorpos analisada. A mediana de concentrados transfundidos por paciente foi 31 unidades (mín-máx:1-426;IIQ:10-124 unidades). Cento e sete participantes (50,7%) apresentavam-se em regime transfusional regular no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2018 e os demais receberam apenas transfusões episódicas.

4.2 Aloimunização eritrocitária

A prevalência de aloimunização entre os participantes foi de 33,1% (n=70), enquanto no grupo de pacientes não transfundidos entre 2014 e 2018 apenas 13 pacientes (15,1%) eram aloimunizados ($p=0,0016$; teste exato de Fisher)(figura 10). Foram encontrados no total 230 anticorpos em 70 pacientes. A média de idade na ocasião do primeiro resultado positivo de PAI foi de 24,1 anos (DP:±13,3 anos) e mediana de 22,4 anos (mín-máx: 1,6– 54 anos). A prevalência de aloimunização foi crescente com a faixa etária, sendo a menor entre 0 a 10 anos (8,3%) e a maior acima de 50 anos (61,5%) (gráfico 3).

Gráfico 3 - Prevalência de aloimunização por faixa etária.

4.2.1 Especificidades dos anticorpos observados

As especificidades dos anticorpos encontrados estão detalhadas na tabela 2. Entre os 230 anticorpos encontrados, 179 (77,8%) eram aloanticorpos. Desses, 72 (40,2%) eram voltados contra os antígenos D (RH1), C (RH2), E (RH3), c (RH4) , e (RH5) e K (KEL1). O anticorpo anti-Di^a (DI1) foi o quarto aloanticorpo mais comum (n=16) , seguido por anti-Kp^a (KEL3) e anti-C^w (RH8) que juntos totalizaram 23 anticorpos. Ainda entre os anticorpos contra antígenos de frequência intermediária e de maior importância clínica depois do sistema Rh e Kell, o anti-S (MNS3) foi o mais comum (n=9), seguido pelo anti-Jk^a (JK1), anti-Fy^a (FY1) e anti-Jk^b (JK2). Quatro anticorpos eram dirigidos contra antígenos de alta frequência, sendo eles o anti-Hr^B (RH34), anti-Js^B(KEL7), anti-U (MNS5) e anti-FY3.

Tabela 2 - Especificidades dos anticorpos antieritrocitários.

Especificidade	Aloanticorpo	"Auto"**	Total
C	23	7	30 (13%)
E	20	8	28 (12,1%)
Não identificado	22	-	22 (9,5%)
K	22	-	22 (9,5%)
e	1	20	21 (9,1%)
D	5	11	16 (6,9%)
Di ^a	16	-	16 (6,9%)
Kp ^a	13	-	13 (5,6%)
C ^w	10	-	10 (4,3%)
S	9	-	9 (3,9%)
Le ^a	6	-	6 (2,6%)
Lu ^a	6	-	6 (2,6%)
c	1	4	5 (2,1%)
f	4	1	5 (2,1%)
Jk ^a	4	-	4 (1,7%)
M	3	-	3 (1,3%)
G	3	-	3 (1,3%)
Jk ^b	3	-	3 (1,3%)
Fy ^a	3	-	3 (1,3%)
U	1	-	1 (0,4%)
Hr ^B	1	-	1 (0,4%)
hr ^B	1	-	1 (0,4%)
Js ^b	1	-	1 (0,4%)
FY3	1	-	1 (0,4%)
Total	179	51	230 (100%)

*Foram aqui designados como "auto" os anticorpos Rh voltados contra antígenos presentes no próprio fenótipo, de modo que não é possível afirmar que são autoanticorpos uma vez que podem corresponder a anticorpos produzidos por portadores de variantes alélicas do sistema Rh, particularmente as especificidades anti-D,-C,-c e -e.

Anticorpos cujas especificidades não foram identificadas (n=22), foram descritos ao longo do histórico transfusional de alguns pacientes e estavam em geral associados a anticorpos em formação, evanescentes, ou apresentavam padrão sugestivo de anticorpo contra antígeno de baixa frequência, reagindo com apenas uma célula do painel de hemácias comerciais, mas sem corresponder a nenhum antígeno sabidamente testado no painel comercial.

Especificidades do sistema Rh voltadas contra antígenos próprios (antígenos presentes no fenótipo) representaram 22,1% (n=51) do total de anticorpos encontrados e foram identificados em 31 pacientes (tabela 2). Dezesesseis desses pacientes apresentavam também anticorpos com características de panaglutinina e autocontrole positivo. Os registros mostraram nesses casos que técnicas sorológicas avançadas, como a “aloadsorção”, foram aplicadas para permitir a visualização das outras especificidades presentes.

O número de aloanticorpos com especificidades confirmadas (n=208) por paciente variou de um a doze, sendo que 31 (44,3%) pacientes apresentaram três ou mais anticorpos confirmados (gráfico 4).

Gráfico 4 - Número de anticorpos por paciente.

Os valores no topo de cada coluna indicam o número absoluto de pacientes que apresentava o número de anticorpos indicado no eixo horizontal (1 a 12).

4.2.2 Fenótipos eritrocitários de pacientes e doadores de sangue

Dos 211 pacientes, 175 (82,9%) apresentavam fenotipagem completa no sistema informatizado, 13 (6,2%) tinham apenas fenotipagem Rh e Kell e 23 (10,9%) não possuíam fenotipagem. No total, 185 pacientes foram genotipados, sendo que em 94 a genotipagem foi realizada no curso do projeto, enquanto 91 deles já apresentavam resultados prévios de genotipagem. Os alelos *RHCE**C/c, *RHCE**E/e, *GYPB**04/*GYPB**03, *JK**01/*JK**02, *FY**01/*FY**02, e *FY**02N.01 foram avaliados em 185 pacientes, enquanto os alelos *KEL**01/*KEL**02 foram avaliados em 110 pacientes.

Nos pacientes, a frequência dos antígenos eritrocitários e dos fenótipos de cada sistema foram calculados a partir dos resultados de fenotipagem sorológica contida nos registros e dos fenótipos deduzidos do genótipo.

A distribuição dos fenótipos ABO e Rh está descrita nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Prevalência dos fenótipos ABO nos pacientes com doença falciforme.

Fenótipo ABO	Aloimunizados	Não aloimunizados	Total n=211
O	31	62	93 (44%)
A	27	49	76 (36%)
B	10	24	34 (16,1%)
AB	2	6	8 (3,7%)

Tabela 4 - Prevalência de fenótipos Rh nos pacientes com doença falciforme.

Fenótipo Rh	Aloimunizados n=69	Não aloimunizados n=135	Total n=204
ccee	8	8	16 (7,8%)
cCee	1	0	1 (0,48%)
Dccee	16	31	47 (22,9%)
DCcee	23	52	75 (36,7%)
DccEe	13	16	29 (14,1%)
DCCee	2	13	15 (7,3%)
DccEE	2	3	5 (2,4%)
DCcEe	4	10	14 (6,8%)
DCCEe	0	2	2 (0,97%)

As frequências dos antígenos JK1 (Jk^a), MNS3 (S) e FY1 (Fy^a) foram significativamente diferentes entre pacientes e doadores, enquanto que para os antígenos KEL1 (Kell), JK2 (Jk^b), e MNS4 (s) não houve diferença significativa (tabela 5).

Tabela 5 - Frequência antigênica em pacientes com doença falciforme e em doadores.

	Pacientes positivos/testados (%)	Doadores positivos/testados (%)	p
Kell	12/206 (5,8%)	5.065/89.386 (5,6%)	p=0,75
Jk ^a	173/202 (85,6%)	45.212 /5.6851 (79,5%)	p=0,022
Jk ^b	128/201(63,3%)	39.372/5.6851(69,2%)	p=0,06
S	81/200 (40,5%)	28.653/56.768 (50,4%)	p=0,005
s	185/200 (92%)	51.042 /56.768 (89,9%)	p=0,28
Fy ^a	85/197(43,1%)	32.491/57.197 (56,8%)	p<0,0001

Análise realizada pelo teste exato de Fisher.

As frequências dos fenótipos do sistema Kidd, Duffy e MNS (S e s) são descritos nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Frequências dos fenótipos do sistema Kidd em pacientes e doadores.

Fenótipo	Pacientes n=201	Doadores n=56.851
Jk(a-b+)	28 (13,9%)	11.639 (20,4%)
Jk(a+b+)	99 (49,2%)	27.733 (48,7%)
Jk(a+b-)	74 (36,8%)	17.479 (30,7%)

Tabela 7 - Frequências dos fenótipos do sistema MNS (S e s) em pacientes e doadores.

Fenótipo	Pacientes n=200	Doadores n=50.307*
S-s+	118 (59%)	24.932 (49,5%)
S+s+	67 (33,5%)	20.313 (40,4%)
S+s-	14 (7%)	5.008 (9,9%)
S-s-U-	1 (0,5%)	49 (0,09%)

*Resultado publicado em Santos, F.L.S. *et al.* "Molecular analysis of the rare S-s- red blood cell phenotype in blood donors and patients in south-east Brazil". *Vox Sanguinis*; 2019 (133) (APÊNCICE C).

Tabela 8 - Frequências dos fenótipos do sistema Duffy em pacientes e doadores.

Fenótipo	Pacientes n=191	Doadores n=57197
Fy(a-b+)	69 (36,1%)	21.449 (37,5%)
Fy(a+b+)	33 (17,2%)	18.881 (33,0%)
Fy(a+b-)	49 (25,6%)	13.610 (23,7%)
Fy(a-b-)	40 (20,9%)	3.257 (5,6%)

Devido à detecção frequente destas especificidades de anticorpos entre pacientes, foram também determinadas as frequências dos antígenos C^w (RH8), Di^a (DI1), Kp^a (KEL3) e Lu^a (LU1) entre doadores (tabela 9). Observa-se que as prevalências dos antígenos C^w e Kp^a aproximam-se da definição de antígeno de baixa frequência, ou seja, inferior a <1% (136), enquanto a prevalência do antígeno Di^a é superior.

Tabela 9 - Prevalência dos antígenos C^w, Di^a, Kp^a e Lu^a em doadores.

Antígeno	Positivos/ Testados	%
C^w	100/8.614	1,1%
Di^a	316/10.581	2,89%
Kp^a	260/16.339	1,5%
Lu^a	278/4.442	5,8%

Para o sistema Rh foram observadas três discrepâncias nas quais o fenótipo era “C” positivo e o fenótipo deduzido do genótipo era “C” negativo. No sistema Kidd, três amostras com fenótipo Jk(a+b-) e uma amostra com fenótipo Jk(a-b+) apresentaram fenótipo deduzido Jk(a+b+). Duas variantes em heterozigose do gene *GYPB* (*GYPB**04/NY e *GYPB**04/P2) explicaram duas das cinco discrepâncias observadas no sistema MNS. No sistema Duffy ocorreram 13 discrepâncias não explicadas pelo alelo silencioso *FY**02N.01 (c.-67T>C). O polimorfismo c.265C>T, o qual determina a expressão muito fraca do antígeno Fy^b (Fy^x), foi pesquisado nas amostras discrepantes. Em um caso ele foi encontrado em heterozigose com o alelo *FY**02N.01, levando ao fenótipo Fy (a-b+^w), e nos outros três casos ele estava em heterozigose com o alelo *FYA*, determinando o fenótipo Fy (a+b+^w). Nas outras nove amostras, a pesquisa do Fy^x foi negativa. Nenhuma discrepância foi encontrada no sistema Kell. As amostras discrepantes não foram contabilizadas nos cálculos de prevalência.

4.2.3 Fenótipos eritrocitários raros

Foram encontrados três fenótipos raros no grupo estudado, sendo um deles do sistema MNS, um do sistema Rh e o terceiro do sistema Kell (quadro 4). O paciente com fenótipo S-s-U^{neg} (MNS:-3,-4,-5) apresentava já na sua primeira PAI o anticorpo anti-U (anti-MNS5). O segundo fenótipo raro foi encontrado ao repetirmos a PAI, no curso deste projeto e fora de contexto transfusional, sete meses após a primeira transfusão de toda a vida do paciente, durante uma STA grave. O paciente desenvolveu os anticorpos anti-hr^B (RH31) e anti-Hr^B (RH34) e seu genótipo foi confirmado por biologia molecular em laboratório colaborador externo (ANEXO B). O último fenótipo raro encontrado foi o Js^b negativo (KEL:6,-7). Nesse caso, a paciente já apresentava histórico de outros anticorpos, mas nova PAI, realizada no presente projeto e fora de contexto transfusional, detectou o anticorpo anti-Js^b. A sua última transfusão havia acontecido há 4 anos na unidade de emergência do HCFMRP por STA.

Quadro 4 - Fenótipos eritrocitários raros.

Sexo	Idade (anos)	Fenótipo da DF	Anticorpo	Momento da detecção	Fenótipo eritrocitário raro*	Outros anticorpos
M	42	SS	anti-U	Desde a PAI inicial	S-s-U ^{neg} ou MNS:-3,-4,-5	anti-E
M	32	S β^0	anti-hr ^B /anti-Hr ^B	Sete meses após a sua primeira transfusão. (indicada por STA na UE).	Hr ^B e hr ^B ou RH:-31,-34	-
F	35	SS	anti-Js ^b	Quatro anos após a última transfusão. (indicada por STA na UE).	Js (a+b-) ou KEL:6,-7	anti-D, anti-G, anti-S

*Fenótipo indicado pela nomenclatura clássica e pela nomenclatura numérica ISBT (do inglês: "International Society of Blood Transfusion").

4.2.4 Evolução dos resultados de PAI dos pacientes aloimunizados

Dos 70 pacientes aloimunizados, 26 (37,1%) apresentavam a primeira pesquisa de anticorpos irregulares positiva. Dezesete deles possuíam registros de transfusões externas no sistema informatizado, com mediana de 4 CHs transfundidos (mín-máx,1-45 unidades) antes das primeira PAI no sistema. Nove pacientes não apresentavam registros de transfusão externa no sistema, mas sete deles apresentavam histórico de transfusões em outras cidades ou estados. Para os outros dois pacientes o histórico era desconhecido. Em apenas um caso não foi encontrada nos registros a data exata da aloimunização. A maior parte (80,9%) dos anticorpos encontrados nos pacientes que já se apresentaram aloimunizados pertenciam aos sistemas Rh e Kell. Os anticorpos presentes na PAI inicial (n=42) estão representados no gráfico 5.

Gráfico 5 - Anticorpos presentes na primeira pesquisa de anticorpos irregulares.

Os valores no topo de cada coluna indicam o número de anticorpos com cada especificidade indicada no eixo horizontal.

A mediana do tempo decorrido entre a última transfusão e a última pesquisa de anticorpos irregulares foi de 36 dias (IIQ:19-308 dias), sendo 22 dias (IIQ:16-33 dias) no regime regular e 223 dias (IIQ:41-578dias) no grupo com transfusões episódicas ($p < 0,0001$; Mann-Whitney).

A comparação do resultado da última PAI com os registros imunohematológicos prévios dos aloimunizados mostrou que em 54% dos pacientes a última PAI era negativa, 42% mantinham resultados positivos e em apenas 4% a última PAI foi o primeiro resultado positivo do histórico (gráfico 6).

Gráfico 6 - Resultado da última PAI nos pacientes aloimunizados.

PAI: pesquisa de anticorpos irregulares.

4.2.5 Aloimunização e características transfusionais

Dos 60 pacientes aloimunizados com registro de transfusão anterior à primeira PAI positiva, 55% (n=33) desenvolveram o primeiro anticorpo após os primeiros 10 CHs transfundidos e 73,3% (n=44) já estavam aloimunizados após 30 CHs (gráfico 7). A mediana do intervalo de tempo e do número de CHs transfundidos entre o primeiro registro de transfusão e a primeira PAI positiva foi 4,6 anos (IIQ: 1-11,2 anos) e 9 unidades (IIQ:4-33 unidades), respectivamente.

Gráfico 7 - Número de concentrados transfundidos antes da aloimunização.

Os valores no topo de cada coluna indicam o número de pacientes que receberam a quantidade de concentrados de hemácias (CHs) indicada no eixo horizontal.

A taxa geral de aloimunização foi calculada para 201 pacientes que receberam 10.005 unidades de CHs, o que levou a um índice de 0,59 para cada 100 unidades transfundidas. O gráfico 8 ilustra a probabilidade cumulativa de aloimunização em função do tempo e em função do número de CHs transfundidos (n=201). A probabilidade de 50% de aloimunização é alcançada após 21,2 anos da primeira transfusão e após 216 CHs transfundidos (Kaplan-Meier). Para o cálculo da taxa de aloimunização e da probabilidade cumulativa de aloimunização, foram excluídos os pacientes que tinham a primeira PAI positiva, mas que não possuíam registro de transfusão anterior (n=10).

Gráfico 8 - Risco de aloimunização em função do tempo e do número de transfusões.

Curva de Kaplan-Meier: A) Probabilidade cumulativa de aloimunização em função do tempo (anos) transcorrido a partir do primeiro registro de transfusão até a primeira PAI positiva. B) Probabilidade cumulativa de aloimunização em função do número de concentrados de hemácias transfundidos até a primeira PAI positiva.

A tabela 10 detalha a porcentagem cumulativa de aloimunização por intervalos de cinco anos e por número de CHs transfundidos.

Tabela 10 - Probabilidade cumulativa de aloimunização por tempo e número de transfusões.

Tempo a partir do 1º registro de transfusão	Sob risco*	% cumulativa de aloimunização	Nº CHs transfundidos	Sob risco*	% cumulativa de aloimunização
0	201	0	0	201	0
5 anos	115	17,5%	10	129	18,5%
10 anos	78	26,4%	20	96	24,2%
15 anos	41	39,8%	30	77	26,8%
20 anos	12	49,8%	40	61	29,9%
-	-	-	50	55	34,8%
-	-	-	100	36	40,5%
-	-	-	200	15	47,1%

*Número de indivíduos não aloimunizados que continuaram expostos ao risco (transfusão) a cada etapa.

O grupo em transfusão regular foi associado a uma mediana mais elevada de CHs transfundidos que o grupo em transfusão episódica (119 vs 10 CHs ;IIQ:40-200 vs 4-24,5 CHs; $p<0,0001$) e, acompanhando o maior número de transfusões, também apresentou mediana mais elevada de concentração de ferritina sérica (1.171 vs 343 ng/ml; IIQ: 570-2.390 vs 141-846ng/ml ; $p<0,0001$) (tabela 11). Não houve diferença na idade do primeiro registro entre dois regimes transfusionais.

Houve uma tendência a um menor número de CHs transfundidos antes da primeira PAI positiva no regime episódico (6,5 vs 10 CHs; IIQ: 3-16,7 vs 5-49,2 CHs; $p=0,05$) (tabela 11).

Tabela 11 - Características do regime transfusional regular e episódico.

	Regime Transfusional			<i>p</i>
	Geral (n=211)	Regular (n=107)	Episódico (n=104)	
Nº CHs transfundidos/paciente	31 (10-124)	119 (40-200)	10 (4-24,5)	$<0,0001$
Idade no 1º registro de transfusão (anos)	11,3 (3,9-24,5)	12 (3,8-23,6)	10,6 (3,9-25,1)	0,88
CHs até a primeira PAI +	9 (4-33)	10 (5-49,2)	6,5 (3-16,7)	$p=0,05$
Tempo (anos) até a primeira PAI +	4,6 (1-11,2)	6,3 (1,5-11,6)	4,1 (0,82-10,8)	$p=0,39$
Ferritina sérica (ng/ml) (n=189)	756 (303-1553)	1171 (570-2390)	343 (141-846)	$<0,0001$

Variáveis são expressas pela mediana e intervalos interquartis (IIQ) e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney.

A transfusão episódica foi associada a um maior risco de aloimunização, com uma taxa de aloimunização de 1,75/100 CHs, enquanto no regime regular essa taxa foi 0,41/100 CHs (RR:4,21; IC95%:2,47-7,03; $p<0,0001$; teste exato de Fisher) (tabela 12).

Tabela 12 - Taxa de aloimunização: regime regular vs episódico.

	Regime regular (n=103)	Regime episódico (n=98)
Número de aloimunizados	36	24
Número de CHs transfundidos (IC95%)	8.639 (6.901-10.320,6)	1.366 (980-1.744,4)
Incidência a cada 100 CHs	0,41 (0,34-0,52)	1,75 (1,3-2,4)
Risco relativo (IC95%)*	-	4,21 (2,47- 7,03)

*Risco relativo calculado pelo teste exato de Fisher.

O efeito do regime transfusional sobre a aloimunização é claramente visualizado pela curva de Kaplan-Meier que compara a probabilidade de aloimunização nos dois regimes transfusionais (gráfico 9).

Gráfico 9 - Regime transfusional e probabilidade de aloimunização.

Curva de Kaplan-Meier: probabilidade cumulativa de aloimunização em função do número de CHs até a primeira PAI positiva no regime regular e episódico. Diferença calculada pelo teste de Log-rank.

Sobre o regime regular e episódico, vale ressaltar que a proporção de pacientes que apresentavam histórico de transfusões externas foi semelhante entre os dois grupos (72,2% e 72,7%, respectivamente).

4.2.6 Comparação dos grupos aloimunizado e não aloimunizado

O grupo aloimunizado apresentou mediana de idade significativamente maior que o grupo não aloimunizado (31,5 vs 26 anos; IIQ:23,7-40 vs 12-33 anos; $p<0,0001$)(gráfico 10A). O sexo não foi associado à aloimunização, sendo o sexo feminino 55,7% do grupo aloimunizado e 51% do grupo não aloimunizado ($p=0,56$; teste exato de Fisher). A proporção dos genótipos HbSS/HbS β^0 foi um pouco maior no grupo aloimunizado, mas sem diferença significativa (88,5% vs 81,5%; $p=0,26$; teste exato de Fisher).

A mediana de concentrados transfundidos no grupo aloimunizado foi superior à mediana do grupo não aloimunizado (83,5 vs 22,5 CHs; IIQ:17,5-189 vs 8-78,4 CHs; mín-máx: 2-426 vs 1-368 CHs; $p<0,0001$) (gráfico 10B).

Gráfico 10 - Aloimunização vs idade e número de transfusões.

O teste de Mann-Whitney foi aplicado à análise das duas variáveis contínuas. A mediana é representada pela barra horizontal dentro dos retângulos, as margens dos retângulos representam o intervalo interquartil (percentil 25% a 75%). As barras nos extremos inferiores e superiores delimitam os valores correspondentes a 1,5 x o intervalo interquartil, de modo que os valores individuais (pontos) observados acima e abaixo são considerados discrepantes em relação ao conjunto.

Dos 211 pacientes, 67 apresentavam o primeiro registro de transfusão no sistema antes de completar cinco anos de idade, enquanto a idade da primeira transfusão era conhecida de 121 pacientes. Dos 144 pacientes cujo registro de transfusão ocorreu após os cinco anos, 74 conheciam a idade da primeira transfusão. Unindo esses dados, foi possível determinar em 66,8% dos pacientes ($n=141$) quem havia recebido transfusões antes ou somente após completar cinco anos. A aloimunização foi menor no grupo que recebeu transfusões antes de completar cinco anos (25% vs 42,2%; OR:0,49; IC95%:0,21-0,96; $p=0,049$; teste exato de Fisher) (gráfico 11). Além disso, a mediana de CHs transfundidos não foi diferente entre os grupos (35 vs 20 CHs; IIQ:11,2-130 vs 11,5 -117 CHs; $p=0,82$; Mann-Whitney).

Gráfico 11 - Aloimunização e transfusão antes ou após os cinco anos de idade.

Ao analisar apenas a idade no primeiro registro de transfusão, observamos que ela foi significativamente maior no grupo aloimunizado (15,4 anos vs 8,8 anos; mín-max:0,56-54 vs 0,2-69,4 anos; $p=0,005$; Mann-Whitney). No grupo aloimunizado menos pacientes tinham registros de transfusão antes dos cinco anos de idade (17,9% vs 40,2%; OR:0,32; IC95%:0,16-0,64; $p=0,0016$; teste exato de Fisher). Porém, os pacientes com registros de transfusões antes dos cinco anos receberam também menor número de transfusões (20 vs 36 CHs; IIQ: 6-77 vs 12,2 -140 CHs; $p=0,026$; Mann-Whitney) e a idade do primeiro registro foi colinear com a idade no momento da censura ($r=0,86$; $p<0,0001$; coeficiente de Spearman) (APÊNDICE E).

Acompanhando o maior número de transfusões, a dosagem de ferritina também foi superior no grupo aloimunizado (1.136 vs 566 ng/ml; $p=0,0015$; Mann-Whitney)(tabela 13).

Tabela 13 - Características transfusionais do grupo aloimunizado vs não aloimunizado.

	Total n=211	Aloimunizados n=70	Não aloimunizados n=141	p
Idade 1º registro de transfusão*	11,3 (0,2-69,4)	15,4 (0,56-54)	8,8 (0,2-69,4)	$p=0,005$
Nº CHs transfundidos	31 (10-124)	83,5 (17,5-189,5)	22 (8,0-78,5)	$p<0,0001$
Transfusão regular	107 (50,7%)	40 (57,1%)	67 (47,5%)	$p=0,19$
Ferritina (ng/ml)	756 (303-1553)	1.136 (469-2365) n=64	566 (259-1249) n=125	$p=0,0015$

*Expressa pela mediana e valor mínimo e máximo. As demais variáveis contínuas foram expressas pelas medianas e IIQ.

Não houve diferença na prevalência de aloimunização entre os regime transfusional regular e episódico (37,3% vs 28,8%; $p=0,19$; teste exato de Fisher), apesar da mediana de CHs transfundidos no grupo regular ter sido bem superior (119 vs 10 unidades; IIQ: 40-200 vs 4-24,5 CHs; $p<0,0001$; Mann-Whitney) (gráfico 12).

Gráfico 12 - Regime transfusional vs aloimunização e número de transfusões.

A) Aloimunização no regime transfusional regular e episódico (teste exato de Fisher).
 B) Número de CHs transfundidos por paciente no grupo em regime regular e episódico (Mann-Whitney).

As complicações clínicas agudas e crônicas da DF não mostraram relação com a aloimunização na análise univariada (tabela 14). Não obstante, a aloimunização foi mais prevalente no grupo de pacientes esplenectomizados (25,7% vs 10,6%; OR:2,9; IC95%:1,75-6,2; $p=0,008$; teste exato de Fisher).

Dentre os 33 pacientes esplenectomizados, a indicação da cirurgia foi sequestro esplênico ($n=18$), hiperesplenismo ($n=9$), desconforto abdominal por esplenomegalia volumosa ($n=1$), rotura esplênica durante o parto ($n=1$) e em quatro casos a indicação foi desconhecida. As informações clínicas dos pacientes esplenectomizados são detalhadas no APÊNDICE F. Em nove pacientes, a aloimunização ocorreu depois da esplenectomia e em sete deles, antes da esplenectomia. Em dois casos não foi possível estabelecer a relação temporal entre os dois eventos. Quando restringimos a análise apenas aos pacientes que foram aloimunizados após a esplenectomia, a diferença não é mantida (13,2% vs 10,6%; $p=0,64$; teste exato de Fisher). Observa-se também uma tendência à esplenectomia mais tardia no grupo aloimunizado (mediana: 9 vs 6 anos; mín-máx: 1-39 vs 3-27 anos; IIQ:5-17,2 vs 4-27 anos; $p=0,06$; Mann-Whitney).

Não houve diferença no uso de HU entre os grupos aloimunizados e não aloimunizados (81,4% vs 73,7%; $p=0,23$; teste exato de Fisher), ao passo que o primeiro grupo fez mais uso de quelante de ferro (44,2% vs 24,1%; $p=0,0042$, teste exato de Fisher), o qual é condizente com o maior número de transfusões observado nesse grupo.

Tabela 14 - Comparação das características clínicas do grupo aloimunizado e não aloimunizado.

	Total n=211	Aloimunizados n=70	Não aloimunizados n=141	p
Idade (mediana/amplitude)	27 (2-74)	31,5 (4-62)	26 (2-74)	$p<0,0001$
Sexo feminino	111	39 (55,7%)	72 (51%)	$p=0,56$
Sexo masculino	100	31 (44,3%)	69 (48,9%)	
Genótipos				
SS/ Sp ⁰	177	62 (88,5%)	115 (81,5%)	$p=0,23$
Outros	34	8 (11,4%)	26 (18,4%)	
Complicações clínicas				
CVO	127 (60,1%)	46 (65,7%)	81 (57,4%)	$p=0,29$
STA	99 (46,9%)	31 (44,2%)	68 (48,2%)	$p=0,66$
Evento neurológico	67 (31,7%)	27 (38,5%)	40 (28,3%)	$p=0,15$
AVC isquêmico	33 (15,6%)	13 (18,5%)	20 (14,1%)	$p=0,42$
AVC hemorrágico	8 (3,7%)	3 (4,2%)	5 (3,5%)	$p>0,99$
Vasculopatia	28 (13,2%)	12 (17,1%)	16 (11,3%)	$p=0,28$
Trombose venosa	21 (9,9%)	8 (11,4%)	13 (9,2%)	$p=0,63$
Sequestro	31 (14,6%)	9 (12,8%)	22 (15,6%)	$p=0,68$
Priapismo	29/100 (29%)	10/30 (33,3%)	19/70 (27,1%)	$p=0,63$
Hipertensão pulmonar	19 (9%)	7 (10%)	12 (8,5%)	$p=0,79$
Úlcera maleolar	32 (15,1%)	15 (21,4%)	17 (12%)	$p=0,10$
Osteonecrose	33 (15,6%)	14 (20%)	19 (13,4%)	$p=0,23$
IRC	10 (4,7%)	4 (5,7%)	6 (4,2%)	$p=0,73$
Proteinúria >150mg	33/87(37,9%)	10/30 (33,3%)	23/57 (40,3%)	$p=0,64$
Proteinúria >500mg	12/87 (13,7%)	3 /30 (10%)	9/57 (15,7%)	$P=0,53$
Hepatopatia	9 (4,2%)	4 (5,7%)	5 (3,5%)	$p=0,48$
Óbito	22 (10,4%)	11 (15,7%)	11 (7,8%)	$p=0,094$
Gestação prévia	48/110	17/38 (44,7%)	31/72 (43%)	$p>0,99$
Esplenectomia	33 (15,6%)	18 (25,7%)	15 (10,6%)	$p=0,008$ $OR=2,9 (1,37-6,2)$
Tratamento medicamentoso				
Hidroxiureia	161 (76,3%)	57 (81,4%)	104 (73,7%)	$p=0,23$
Quelante de ferro	65 (30,8%)	31 (44,2%)	34 (24,1%)	$p=0,0042$ $OR=2,5 (1,33-4,49)$

Apenas a variável "idade" foi analisada pelo teste Mann-Whitney. Todas as demais análises foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os resultados com valor de $p<0,05$ estão acompanhados do Odds ratio (OR) e seu intervalo de confiança de 95%. IRC: insuficiência renal crônica.

Algumas variáveis foram posteriormente selecionadas e analisadas pelo modelo de regressão de Poisson de forma bruta e ajustada, sendo que no modelo ajustado persistiram os mesmos fatores associados à aloimunização: idade, número de CHs transfundidos e esplenectomia. Foi estimado que o aumento de um ano na idade eleva em 3% a prevalência de aloimunização e que cada CH transfundido aumenta 0,4% (tabela 15).

Tabela 15 - Aloimunização vs variáveis de interesse: modelo bruto e ajustado.

	Modelo bruto			Modelo ajustado		
	RP	Intervalo de confiança (95%)	<i>p</i>	RP	Intervalo de confiança (95%)	<i>p</i>
Sexo (feminino vs masculino)	1,13	0,77- 1,67	0,53	1,12	0,78- 1,61	0,54
Idade	1,03	1,01-1,04	<0,01	1,03	1,01- 1,05	<0,01
SS/Sβ ⁰ vs outros	1,49	0,79-2,82	0,22	1,42	0,74- 2,74	0,30
Esplenectomia (sim vs não)	1,87	1,27-2,75	<0,01	1,95	1,28- 2,97	<0,01
Transfusão (regular vs episódica)	1,30	0,88-1,91	0,19	0,67	0,36- 1,24	0,20
CVO (sim vs não)	1,27	0,84-1,91	0,26	1,49	0,96 - 2,33	0,08
STA (sim vs não)	0,90	0,61-1,32	0,59	0,77	0,52- 1,15	0,20
Evento neurológico (sim vs não)	1,30	0,88-1,91	0,19	1,28	0,70 - 2,34	0,43
Sequestro (sim vs não)	0,86	0,48-1,54	0,61	1,05	0,55 -1,99	0,89
Úlcera (sim vs não)	1,53	0,99- 2,34	0,05	0,96	0,53- 1,71	0,88
Osteonecrose (sim vs não)	1,35	0,86- 2,12	0,20	1,03	0,67- 1,60	0,88
Nº CHs transfundidos	1,003	1,002- 1,005	<0,01	1,004	1,001- 1,006	<0,01

As variáveis de interesse foram analisadas utilizando-se o modelo de regressão Poisson com variância robusta bruto e ajustado (135). RP: razão de prevalência.

Foram observados 11 (15,7%) óbitos no grupo aloimunizado e 11 (7,8%) óbitos no grupo não aloimunizado. Não houve diferença de sobrevida entre os grupos ($p=0,86$; Log-rank)(gráfico 13).

Gráfico 13 - Sobrevida do grupo aloimunizado e não aloimunizado.

Curva de Kaplan-Meier. Diferença de sobrevida calculada pelo teste Log-rank.

4.3 Aloimunização HLA

A triagem de anticorpos HLA foi realizada em 118 pacientes com média de idade de 27,7 anos (DP: $\pm 12,8$ anos) e mediana 27,5 anos (mín-máx: 4- 57 anos; IIQ: 20-36 anos). A pesquisa foi positiva em 77,1% dos participantes. Anticorpos anti-HLA I foram detectados em 90 amostras e anti-HLA II em 46 amostras. Apenas uma amostra foi positiva exclusivamente para anticorpo anti-HLA II, 45 amostras foram positivas apenas para anti-HLA I e as outras 45 foram positivas para as duas classes de anticorpos (tabela 16).

Tabela 16 - Resultados da triagem de anticorpos anti-HLA I e II.

Resultados da triagem de anticorpo anti-HLA (n=118)			
Negativo	anti-HLA I e II	anti-HLA I	anti-HLA II
27 (22,8%)	45 (38,1%)	45 (38,1%)	1(0,8%)

Os grupos com pesquisa positiva e negativa apresentaram distribuição normal da idade. Não foram observadas diferenças em relação à idade, sexo, idade do primeiro registro de transfusão, número de concentrados de hemácias transfundidos ou regime transfusional (tabela 17). O grupo com anticorpos anti-HLA apresentou mais aloimunização eritrocitária que o grupo sem anticorpo anti-HLA, porém a

diferença não foi significativa (41,7% vs 22,2%; OR: 2,5; IC95%:0,91-6,7; $p=0,073$; teste exato de Fisher) (tabela 17).

Tabela 17 - Aloimunização anti-HLA: características dos aloimunizados e não aloimunizados

	Total (n=118)	anti-HLA+ (n=91)	anti-HLA (n=27)	<i>p</i>
Idade (anos)*	27,7 (12,8)	27,8 (12,8)	27,5 (13,2)	$p=0,93$
Sexo feminino**	67	53 (58,2%)	14 (51,8%)	$p=0,65$
Número de CHs transfundidos	68,5 (21,5-153,8)	73 (26-152)	34 (13-196)	$p=0,36$
Transfusão regular**	84 (71,1%)	67 (73,6%)	17 (62,9%)	$p=0,33$
Idade no 1º registro de transfusão	11,6 (4,1-24,2)	11,5 (4,1-24,1)	17,2 (4,1-27,8)	$p=0,34$
Aloimunização eritrocitária**	44 (37,2%)	38 (41,7%)	6 (22,2%)	$p=0,073$ OR=2,5 (0,91-6,7)

*Expressa pela média e desvio padrão, avaliada pelo teste t -Student. **Variáveis calculadas pelo teste exato de Fisher. As demais variáveis contínuas são expressas pelas medianas e IIQ e foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney.

4.4 O polimorfismo *FY c.-67T>C* e o perfil clínico e transfusional

Dos 185 pacientes genotipados, 35 (18,9%) apresentavam o genótipo *FY c.-67CC*, 80 (43,2%) eram heterozigotos e 70 (37,8%) eram homozigotos *FY c.-67TT*. Os três grupos não foram diferentes em relação a idade ou sexo. Na tabela 18 as características clínicas e transfusionais dos três grupos são comparadas.

Tabela 18 - Características clínicas e transfusionais de acordo com o genótipo *FY c-67T>C*.

	CC (n=35)	TC (n=80)	TT (n=70)	p
Idade (média/DP)	29,5 (12,4)	27,3 (14,2)	25,7 (11,8)	0,36
Sexo (F/M)	19/16	38/42	39/31	0,57
HbSS/Sβ0	32 (91%)	73 (91,2%)	57 (81,4%)	0,14
Aloimunização	13 (37,1%)	34 (42,5%)	17 (24,2%)	0,06
Complicações clínicas				
CVO	22 (62,8%)	43 (53,7%)	48 (68,5%)	0,17
STA	19 (54,2%)	29 (36,2%)	44 (62,8%)	0,0016
Evento neurológico	10 (28,5%)	33 (41,2%)	22 (31,4%)	0,3
AVC isquêmico	6 (17,1%)	18 (22,5%)	8 (11,4%)	0,2
AVC hemorrágico	1 (2,8%)	4 (5,0%)	3 (4,2%)	-
Vasculopatia	4 (11,4%)	13 (16,2%)	11 (15,7%)	-
Trombose venosa	4 (11,4%)	6 (7,5%)	10 (14,2%)	-
Sequestro	2 (5,7%)	10 (12,5%)	16 (22,8%)	0,047
Priapismo	3/15 (20%)	13/42 (30,9%)	11/31 (35,4%)	0,56
Hipertensão pulmonar	5 (14,2%)	9 (11,2%)	5 (7,1%)	0,48
Úlcera maleolar	9 (25,7%)	13 (16,2%)	7 (10%)	0,056
Osteonecrose	7 (20%)	14 (17,5%)	10 (14,2%)	0,6
IRC	2 (5,7%)	3 (3,7%)	4 (5,7%)	0,37
Proteinúria >150mg	7/21 (33,3%)	10/29 (34,4%)	14/30 (46,6%)	0,52
Proteinúria >500mg	1/21 (4,7%)	3/29 (10,3%)	7/30 (23,3%)	0,13
Hepatopatia	1 (5,7%)	4 (5,0%)	3 (4,2%)	-
Óbito	3 (8,5%)	11 (13,7%)	7 (10%)	0,85
Transfusão regular	19 (54,2%)	53 (66,2%)	32 (45,7%)	0,039
CHs transfundidos*	34 (15-131)	62,5(15-166,3)	30,5 (11-94,7)	-
Ferritina (ng/ml)*	971 (361-1951)	947 (390-1880)	590 (188-1274)	-
Quelante de ferro	16 (45,7%)	31 (38,7%)	15 (21,4%)	0,019
Hidroxiureia	28 (80%)	59 (73,7%)	59 (84,2%)	0,28

A análise das variáveis binomiais foi realizada pelo teste qui-quadrado. A comparação da idade foi realizada pelo método ANOVA. * Variáveis expressas pela mediana e intervalo interquartil.

Para as variáveis que apresentaram diferenças próximas à significância estatística, foi realizada a comparação de cada genótipo separadamente, bem como para o número de CHs transfundidos e ferritina (tabela 19).

Tabela 19 - Comparação dos genótipos *FY c.-67T>C*.

	<i>CC x TT</i>	<i>TC x TT</i>	<i>TC x CC</i>
Aloimunização	37,1% x 24,2% 0,17	42,5% x 24,2% 0,02 OR:2,3 (1,16-4,57)	42,5% x 37,1% 0,68
CVO	62,8% x 68,5% 0,66	53,7% x 68,5% 0,068	53,7% x 62,8% 0,41
STA	54,2% x 62,8% 0,28	36,2% x 62,8% 0,0005 OR:0,29 (0,14-0,59)	36,2% x 54,2% 0,09
AVCi	17,1% x 11,4% 0,54	22,5% x 11,4% 0,08	22,5% x 17,1% 0,62
Sequestro	5,7% x 22,8% 0,03 OR:0,2 (0,04-0,08)	12,5% x 22,8% 0,12	12,5% x 5,7% 0,34
Úlcera	25,7% x 10% 0,02 OR: 3,6 (1,21-9,75)	16,2% x 10% 0,23	16,2% x 25,7% 0,3
Transfusão regular	54,2% x 45,7% 0,41	66,2% x 45,7% 0,013 OR:2,3 (1,19-4,42)	66,2% x 54,2% 0,29
Número de CHs*	34 (15-131) x 30,5 (11-94,7) 0,49	62,5 (15-166,3) x 30,5 (11-94,7) 0,11	62,5 (15-166,3) x 34 (15-131) 0,43
Ferritina (ng/ml)* Mediana (IIQ)	971 (361-1951) x 590 (188-1274) 0,1	947 (390-1880) x 590 (188-1274) 0,034	947 (390-1880) x 971 (361-1951) 0,88
Quelante de ferro	45,7% x 21,4% 0,013 OR:3,0 (1,26-7,01)	38,7 % x 21,4% 0,032 OR:2,3 (1,13-4,9)	38,7% x 45,7% 0,53

Todas as análises foram realizadas pelo teste exato de Fisher, exceto para as variáveis contínuas (ferritina e número de CHs), para as quais utilizou-se o teste Mann-Whitney. Os valores em cada célula representam a prevalência ou as medianas de cada variável comparada, abaixo está o valor de “*p*” para cada análise realizada, e quando há significância estatística, o Odds ratio (OR) e seu intervalo de confiança são indicados.

A curva de aloimunização em função do número de CHs transfundidos mostrou uma tendência semelhante do homozigoto *c.-67CC* e do heterozigoto *c.-67TC* a apresentar aloimunização mais precoce, porém, depois de 200 CHs transfundidos o heterozigoto *c.-67TT* atinge probabilidade semelhante de aloimunização.

Gráfico 14 - Probabilidade de aloimunização conforme o genótipo *FY c.-67T>C*.

Curva de Kaplan-Meier: aloimunização em função do número de CHs transfundidos.

As taxas de aloimunização dos grupos *c.-67CC* e *TC* não foram diferentes entre si (RR:1,19; IC95%:0,61- 2,35), mas ambas foram superiores à taxa de aloimunização do grupo *c.-67TT* (tabela 20). Para a análise da taxa de aloimunização foram excluídos sete pacientes sem registro de transfusão antes da primeira PAI positiva.

Tabela 20 - Taxa de aloimunização e genótipos *FY c.-67T>C*.

	CC	TC	TT
Número de aloimunizados	12	24	15
Número de CHs transfundidos	1.447	4.312	4.026
Incidência a cada 100 CHs	0,82	0,69	0,37
Risco relativo (IC95%)*	2,22 (1,05-4,7)	1,86 (1,01-3,54)	-

*Análise realizada pelo teste exato de Fisher. Risco calculado em relação ao genótipo *c.-67TT*.

Considerando o comportamento semelhante transfusional e de aloimunização dos genótipos *FY c.-67CC/TC*, e não tendo sido observada nenhuma diferença marcante nas características clínicas entre os dois grupos, seus resultados foram unidos para comparação com o genótipo *FY c.-67TT* (tabela 21).

Tabela 21 - Comparação dos genótipos *FY.c-67CC/TC* vs *c.-67TT*.

	Total (n= 185)	CC/TC (n=115)	TT (n=70)	p
Idade mediana (mín-máx.)	27 (3-62)	27 (3-62)	27,5 (3-53)	<i>p=0,45</i>
Sexo feminino	96 (51,8%)	57 (49,5%)	39 (55,7%)	<i>p=0,45</i>
Fenótipo				
HbSS/Sβ⁰	162 (87,5%)	105 (91,3%)	57 (81,4%)	<i>p=0,065</i>
Complicações clínicas				
Aloimunização	64 (34,5%)	47 (40,8%)	17 (24,2%)	<i>p=0,025</i> <i>OR:2,15 (1,13-4,28)</i>
CVO	113 (61%)	65 (56,5%)	48 (68,5%)	<i>p=0,12</i>
STA	92 (49,7%)	48 (41,7%)	44 (62,8%)	<i>p=0,006</i> <i>OR:0,42 (0,23-0,78)</i>
Evento neurológico	66 (35,6%)	44 (38,2%)	22 (31,4%)	<i>p=0,42</i>
AVC isquêmico	32 (17,2%)	24 (20,8%)	8 (11,4%)	<i>p=0,11</i>
AVC hemorrágico	8 (4,3%)	5 (4,35%)	3 (4,29%)	<i>p>0,99</i>
Vasculopatia	28 (15,1%)	17 (14,7%)	11(15,7%)	<i>p>0,99</i>
Trombose venosa	20 (10,8%)	10 (8,7%)	10 (14,2%)	<i>p=0,32</i>
Sequestro	28 (15,1%)	12 (10,4%)	16 (22,8%)	<i>p=0,033</i> <i>OR:0,39 (0,16-0,85)</i>
Priapismo	27/88 (30,6%)	16 (28%)	11 (35,4%)	<i>p=0,47</i>
Hipertensão Pulmonar	19 (10,2%)	14 (12,1%)	5 (7,1%)	<i>p=0,32</i>
Úlcera maleolar	29 (15,6%)	22 (19,1%)	7 (10%)	<i>p=0,14</i>
Osteonecrose	31 (16,7%)	21 (18,2%)	10 (14,2%)	<i>p=0,54</i>
IRC	9 (4,8%)	5 (4,3%)	4 (5,7%)	<i>p=0,73</i>
Proteinúria>150mg	31/80	17/50 (34%)	14/30 (46,6%)	<i>p=0,34</i>
Proteinúria>500mg	11/80	4/50 (8,0%)	7/30 (23,3%)	<i>p=0,09</i>
Hepatopatia	9 (4,8%)	6 (5,2%)	3 (4,2%)	<i>p>0,99</i>
Óbito	21 (11,3%)	14 (12,1%)	7 (10%)	<i>p=0,81</i>
Tratamento medicamentoso				
Hidroxiureia	146 (78,9%)	87 (75,6%)	59 (84,2%)	<i>p=0,19</i>
Quelante de ferro	62 (33,5%)	47 (40,8%)	15 (21,4%)	<i>p=0,006</i> <i>OR:2,53 (1,29-4,95)</i>

As variáveis contínuas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney e variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste exato de Fisher.

A análise univariada não mostrou diferença entre os grupos em relação à idade, sexo ou prevalência dos genótipos Hb SS/S β ⁰ (tabela 21). Entre as complicações agudas da doença falciforme, a STA e o sequestro esplênico mostraram menor associação com os genótipos *c.-67CC/TC* (41,7% vs 62,8%; OR: 0,42; IC95%: 0,23-0,78; $p=0,006$ e 10,4% vs 22,8%; OR: 0,39; IC95%: 0,16-0,85; $p=0,033$, respectivamente). Não foi demonstrada diferença na frequência de complicações crônicas da DF (tabela 21), apesar de o genótipo *c.-67CC*, sozinho, ter apresentado maior prevalência de úlcera maleolar que o genótipo *c.-67TT* (25,7% vs 10%; OR: 3,6; IC95%: 1,21-9,75; $p=0,02$) (tabela 18).

No modelo de análise ajustado, os genótipos *c.-67CC/TC* permaneceram menos associados à STA (RP: 0,71; IC95%: 0,54-0,93; $p=0,01$), enquanto a relação com sequestro esplênico foi enfraquecida (RP: 0,54; IC95%: 0,28-1,03; $p=0,06$) (tabela 22 e 23).

Tabela 22 - Genótipo *Fy c.-67T>C* vs STA: modelo bruto e ajustado.

Efeito	Modelo bruto			Modelo ajustado		
	RP	IC95%	<i>p</i>	RP	IC95%	<i>p</i>
Genótipo <i>FY</i> (CC/TC vs TT)	0,66	0,50-0,88	<0,01	0,71	0,54- 0,93	0,01
Sexo (F vs M)	1,08	0,81- 1,44	0,60	0,99	0,76- 1,30	0,95
Idade	1,005	0,99 -1,01	0,32	1,014	1,003-1,025	0,02
Fenótipo (SS/Sβ⁰ vs outros)	1,08	0,71- 1,62	0,73	1,23	0,85-1,79	0,26
Transfusão (Regular vs episódica)	0,53	0,39- 0,73	<0,01	0,46	0,34- 0,63	<0,01

As variáveis de interesse foram analisadas utilizando-se o modelo de regressão Poisson com variância robusta bruto e ajustado (135). RP: razão de prevalência.

Tabela 23 - Genótipo *FY c.-67T>C* vs sequestro esplênico: modelo bruto e ajustado.

Efeito	Modelo bruto			Modelo ajustado		
	RP	IC95%	<i>p</i>	RP	IC95%	<i>p</i>
Genótipo <i>FY</i> (CC/TC vs TT)	0,46	0,23- 0,91	0,03	0,54	0,28- 1,03	0,06
Sexo (F vs M)	1,64	0,83- 3,25	0,16	1,36	0,72- 2,57	0,35
Idade	0,92	0,89- 0,95	<0,01	0,91	0,88 - 0,94	<0,01
Fenótipo (SS/Sβ⁰ vs Outros)	1,00	0,41- 2,42	0,99	0,71	0,34- 1,51	0,38

As variáveis de interesse foram analisadas utilizando-se o modelo de regressão Poisson com variância robusta bruto e ajustado (135). RP: razão de prevalência.

As características transfusionais dos dois grupos estão detalhadas na tabela 24. Os genótipos *c.-67CC/TC* associaram-se a um maior risco de aloimunização que o genótipo *c.-67TT* (40,8% vs 24,2%; OR:2,15; IC95%:1,13-4,28; $p=0,025$) e tiveram maior número de pacientes em regime transfusional regular (62,6% vs 45,7%; OR:1,98; IC95%:1,08-2,54; $p=0,032$), apesar de o número de CHs transfundidos não ter sido significativamente maior (54 vs 30,5 CHs; IIQ: 15-150 vs 11-94 ; $p=0,13$) (gráfico 15 A, B e C). O nível de ferritina também foi mais elevado nos genótipos *c.-67CC/TC* (959 vs 590 ng/ml; $p=0,024$) (gráfico 15D), assim como o uso de quelante de ferro mais frequente (40,8% vs 21,4%; OR:2,53; CI95%:1,29-4,95; $p=0,006$).

Para melhor avaliar o indivíduo “respondedor imune” nos dois grupos, foi realizada análise de pacientes aloimunizados com menos de 25 CHs transfundidos ($n=39$) e daqueles que não aloimunizaram mesmo com 25 ou mais CHs transfundidos ($n=67$). O intuito da análise foi aumentar a especificidade para o perfil respondedor ao remover pacientes sem anticorpos e com poucas transfusões, os quais poderiam não ter tido exposições suficientes para manifestar o fenótipo respondedor. O grupo *c.-67CC/TC* manteve-se associado ao fenótipo respondedor (44,2% vs 22,2%; OR:2,78; CI95% 1,14-6,82; $p=0,033$) (tabela 22).

Tabela 24 - Características transfusionais: genótipos *FY c.-67CC/TC* vs *FYc.-67TT*.

	Total n= 185	TC/CC n=115	TT n=70	<i>p</i>
Nº CHs transfundidos	38 (13,5-140,5)	54 (15-150)	30,5 (11-94)	$p=0,13$
Idade 1º registro de transfusão	11,6 (4,0-24,3)	12 (4,2-25,1)	11,1 (3,1-24,1)	$p=0,28$
Transfusão regular	104 (56,2%)	72 (62,6%)	32 (45,7%)	$p=0,032$ OR=1,98 (1,08-2,54)
Ferritina (ng/ml) 171/185	782 (312-1610)	959 (371-1918)	590 (188-1274)	$p=0,024$
Respondedor* (n=106)	39/106 (36,7%)	31/70 (44,2%)	8/36 (22,2%)	$p=0,033$ OR:2,78 (1,14-6,8)

As variáveis contínuas foram expressas pela mediana e IIQ analisadas pelo teste Mann-Whitney. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste exato de Fisher. OR: Odds ratio. *Incluídos na análise apenas pacientes aloimunizados com menos de 25 CHs transfundidos e pacientes não aloimunizados com pelo menos 25 CHs transfundidos.

Gráfico 15 - Genótipos *Fy c.-67T>C* e perfil transfusional.

Comparação dos genótipos *FY c.-67CC/TC* e *c.-67TT* em relação à prevalência de aloimunização (A), regime transfusional (B), número de CHs transfundidos (C) e concentração de ferritina sérica (D).

A probabilidade de aloimunização também foi maior nos genótipos *c.-67CC/TC*, apesar de o grupo com genótipo *c.-67TT* atingir probabilidade semelhante após 200 CHs transfundidos (gráfico 16).

Gráfico 16 - Probabilidade de aloimunização: genótipos *FY c.-67TC/CC* vs *FY c.-67TT*.

Curva Kaplan-Meier em função do número de CHs transfundidos (A) e do tempo em transfusão (B). Diferença entre os grupos calculada pelo teste de Log-rank.

Como a prevalência de pacientes não HbSS/S β^0 foi um pouco maior no grupo com genótipo *FY c.-67TT*, ainda que sem diferença estatística, realizamos a análise da frequência de aloimunização entre os dois grupos após excluir os genótipos diferentes de HbSS/S β^0 , e o grupo *c.-67CC/TC* manteve maior risco de aloimunização (40,9% vs 24,5%, OR:2,1; CI95%:1,06- 4,5; $p=0,04$; teste exato de Fisher).

No modelo de análise ajustado, a força de associação do genótipo *FY* com a aloimunização é enfraquecida (RP:1,62; IC95%:0,98-2,69; $p=0,058$) (tabela 23).

Tabela 25 - Aloimunização vs genótipo *FY c.-67T>C*: modelo bruto e ajustado.

	Modelo bruto			Modelo ajustado		
	RP	Intervalo de confiança (95%)	<i>p</i>	RP	Intervalo de confiança (95%)	<i>p</i>
Genótipo <i>FY</i> (<i>c.-67CC/TC</i> vs <i>TT</i>)	1,68	1,05-2,68	0,02	1,62	0,98-2,69	0,058
Sexo (feminino vs masculino)	1,13	0,77- 1,67	0,53	1,14	0,79-1,65	0,47
Idade	1,03	1,01-1,04	<0,01	1,03	1,01-1,05	<0,01
SS/S β^0 vs outros	1,49	0,79-2,82	0,22	0,97	0,49-1,89	0,92
Esplenectomia (sim vs não)	1,87	1,27-2,75	<0,01	1,67	1,07-2,59	0,02
Transfusão (regular vs episódica)	1,30	0,88-1,91	0,19	0,56	0,29-1,08	0,08
CVO (sim vs não)	1,27	0,84-1,91	0,26	1,40	0,88-2,24	0,15
STA (sim vs não)	0,90	0,61-1,32	0,59	0,83	0,54-1,26	0,38
Evento neurológico (sim vs não)	1,30	0,88-1,91	0,19	1,20	0,65-2,23	0,56
Sequestro (sim vs não)	0,86	0,48-1,54	0,61	1,49	0,76-2,93	0,25
Úlcera (sim vs não)	1,53	0,99- 2,34	0,05	0,92	0,50-1,67	0,78
Osteonecrose (sim vs não)	1,35	0,86- 2,12	0,20	0,88	0,55-1,41	0,59
Nº CHs transfundidos	1,003	1,002- 1,005	<0,01	1,004	1,002-1,006	<0,01

As variáveis de interesse foram analisadas utilizando-se o modelo de regressão Poisson com variância robusta bruto e ajustado (135). RP: razão de prevalência.

Foi realizada a comparação da prevalência de aloimunização por fenótipo negativo (antígeno negativo) entre os grupos com os genótipos *FY c.-67CC/TC* vs *FY c.-67TT* (tabela 24). Apesar de o genótipo *FY c.-67CC/TC* estar associado a mais fenótipos negativos (43,1% vs 35,7%; OR:1,37; IC95%:1,12-1,66; $p=0,002$; teste exato de Fisher), quando analisada a chance de aloimunização apenas entre os

fenótipos negativos para cada antígeno, os genótipos *FY c.-67 CC/TC* mostraram maior chance de aloimunização que o grupo com genótipo *FY c.-67TT* (13,8% vs 7,8%, OR:1,89; IC95%:1,11-3,18; $p=0,02$; teste exato de Fisher) (tabelas 26 e 27).

Tabela 26 - Proporção de fenótipos negativos de acordo com o genótipo *FYc.-67T>C*.

Antígeno	c.-67 (CC/TC) Ag-/ total*	c.-67(TT) Ag-/total*	<i>p</i>
D-	8/115	7/70	-
C-	62/113	28/68	-
c-	9/114	7/68	-
E-	88/115	50/70	-
e-	2/114	1/70	-
K-	109/115	62/68	-
Jk ^a -	18/113	8/68	-
Jk ^b -	44/113	25/68	-
S-	70/110	36/69	-
Fy ^a -	81/115	19/61	-
Total	491/1137 (43,1%)	243/680 (35,7%)	$p=0,002$ OR:1,36 (1,12-1,66)

*Para cada antígeno (Ag) estão relacionados o número de fenótipos negativos sobre os fenótipos positivos e negativos (total). Análise realizada pelo teste exato de Fisher.

Tabela 27 - Proporção de aloanticorpos por fenótipo negativo de acordo com o genótipo *FY c.-67T>C*.

	c.-67CC/TC	c.-67TT	
Antígeno	Nº anticorpos/Ag -*	Nº anticorpos/Ag-*	<i>p</i>
D-	3/8	1/7	0,56
C-	20/62	2/28	0,015
c-	0/9	1/7	0,43
E-	13/88	6/50	0,79
e-	1/2	0/1	>0,99
K-	18/109	4/62	0,09
Jk ^a -	4/18	0/8	0,27
Jk ^b -	2/44	1/25	>0,99
Fy ^a -	1/81	2/19	0,09
S-	6/70	2/36	0,71
Total	68/491 (13,8%)	19/243 (7,8%)	$p=0,02$ OR:1,89 (1,11-3,18)

*Número de anticorpos formados entre indivíduos Ag negativo/número de indivíduos Ag-. Análise realizada pelo teste exato de Fisher.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A doença falciforme ainda tem na transfusão de hemácias um de seus principais pilares terapêuticos. Enquanto a cura da DF, através do TCPH ou da terapia gênica, não estiver amplamente disponível e acessível, a transfusão continuará tendo um papel central no tratamento e profilaxia das complicações agudas e crônicas. Contudo, a terapia transfusional envolve efeitos adversos que podem agravar o curso da doença, como é o caso da aloimunização. No presente trabalho, avaliamos o perfil de aloimunização dos pacientes com DF e sua relação com as complicações clínicas da doença e com os aspectos transfusionais.

A prevalência de aloimunização em pacientes com DF descrita na literatura varia consideravelmente de acordo com o estudo, sendo que a faixa etária da população e as estratégias de compatibilidade de fenótipo utilizadas estão entre as principais responsáveis por essas diferenças (73). A prevalência de aloimunização de 33,1% na população estudada, na qual a mediana de idade foi de 27 anos, assemelha-se aos valores de 27% a 34,8% encontrados em outros estudos cujas populações apresentavam distribuição semelhante de idade, mas que não realizavam profilaxia com fenótipo compatível, ou nos quais a estratégia não foi descrita (72,76,137–140). A prevalência de aloimunização em indivíduos transfundidos com CHs respeitando apenas a tipagem ABO e RhD varia de 10 a 66% (137,139–143) e em pacientes cuja estratégia transfusional respeita também Rh (C/c e E/e) e Kell, a prevalência varia de 0 a 58%(84,140,141).

Analisando apenas a faixa etária de crianças até 10 anos, na qual os pacientes teriam sido submetidos apenas ao protocolo de profilaxia com fenótipo compatível Rh e Kell, encontramos apenas 8,3% de pacientes aloimunizados (gráfico 3), valor bastante semelhante aos da literatura. Vichinsky *et al.* descreveram 8% de aloimunização em crianças recebendo fenótipo Rh e Kell compatível (144), enquanto Lasalle *et al.* encontraram 7% de aloimunização em crianças e adolescentes transfundidos com fenótipo estendido (82). A menor prevalência de aloimunização foi descrita Fasano *et al.* em crianças, com 11% nos pacientes sem qualquer profilaxia, 2,6% na profilaxia com fenótipo Rh e Kell e apenas 0,7% na profilaxia com o fenótipo estendido (94).

A predominância de anticorpos Rh (anti-C,-E, -c, e, -e) e Kell em pacientes aloimunizados por transfusão não é exclusiva de pacientes falciformes e é um

achado comum entre os estudos envolvendo aloimunização (145). Ela é consequência da elevada imunogenicidade dos antígenos desses dois sistemas, associada à diferença de frequência antigênica na população de doadores e de pacientes (70,146). Vichinsky *et al.* descreveram que 68% dos anticorpos encontrados em pacientes com DF pertenciam aos sistemas Rh e Kell (72). Ao final de estudo prospectivo em que um grupo recebeu transfusões com mesmo fenótipo Rh e Kell e outro não, Tahhan *et al.* encontraram 34,7% de aloimunização no grupo sem profilaxia, sendo 55,8% Rh e Kell, enquanto o grupo com profilaxia não formou nenhum novo anticorpo (140). Por outro lado, Ameen *et al.* demonstraram redução significativa da aloimunização com a profilaxia Rh e Kell (23% vs 65%; $p=0,001$), mas a proteção não foi totalmente eficaz, uma vez que o grupo com a profilaxia também desenvolveu anticorpos contra antígenos desses sistemas (141).

Apesar de o protocolo do Hemocentro de Ribeirão Preto seguir a estratégia profilática e respeitar obrigatoriamente o fenótipo Rh e Kell, a prevalência de aloimunização é elevada e os anticorpos comuns desses dois sistemas (anti-C,-c,-E,-e e -K) ainda representam 53% do total de anticorpos (tabela 2). Nickel e colaboradores também observaram 29% de aloimunização com predominância de anticorpos anti-E e anti-K mesmo adotando a estratégia profilática (147). Esse achado pode ser explicado por transfusões que antecederam o início da profilaxia e por transfusões externas em locais onde a compatibilidade de fenótipo não é realizada (73,141).

Em nosso estudo, pelo menos 57,2% dos pacientes haviam recebido transfusões em alguma instituição externa, cuja conduta transfusional não segue o mesmo protocolo do Hemocentro de Ribeirão Preto. Foi ainda observado que 26 (37,1%) dos aloimunizados já apresentavam anticorpos na primeira PAI e que 24 deles tinham registros de transfusões externas ou relatavam transfusões em outras cidades ou estados. Os anticorpos encontrados na primeira PAI nesses pacientes (n=42) representaram 18,2% do total de anticorpos e 80,9% deles pertenciam ao sistema Rh (gráfico 5). Entre eles estão os cinco aloanticorpos anti-D detectados (tabela 2). Esse achado mostra que para ser realmente efetiva, a profilaxia Rh e Kell necessita de uma ação homogênea e integrada entre todos os locais em que o paciente é atendido.

Outro fator importante envolvido na formação de anticorpos Rh é a elevada prevalência de variantes Rh em afrodescendentes (85). Chou *et al.* mostraram que

45% dos pacientes com DF em transfusão crônica e 12% dos pacientes em transfusão episódica desenvolveram anticorpos do sistema Rh, sendo que a maioria era explicada por variantes alélicas presentes no receptor ou mesmo no doador (84). Recentemente, estudo francês com 175 crianças com DF, no qual a profilaxia com fenótipo Rh e Kell é realizada desde 1990, encontrou 13,5% de aloimunizados e 11,8% dos anticorpos imunes eram relacionados a variantes Rh (83). Considerando os anticorpos encontrados no presente estudo, a correta profilaxia Rh e Kell teria evitado a formação de 34,3% (n=79) do total de anticorpos, porém os demais anticorpos Rh (22,2%) não seriam evitados, uma vez que os pacientes expressam os respectivos antígenos, indicando que podem corresponder a variantes alélicas ou a autoanticorpos (148).

Entre os aloanticorpos, a especificidade mais comum foi o anti-C (n=23), seguido do anti-E (n=20) e anti-Kell (n=22). Depois das especificidades Rh e Kell, a especificidade mais comum foi o anti-Di^a (n=16), detectado em 7,5% dos pacientes. A aloimunização por Di^a é bastante característica na população brasileira e pouco descrita em estudos estrangeiros. No Brasil, ela já foi descrita por outros grupos em 6% e 11,3% de pacientes politransfundidos (149,150). Apesar de ser raro em populações caucasianas e africanas, o antígeno Di^a é comum em povos nativos americanos e asiáticos (151). No Brasil, a prevalência de Di^a em índios da Amazônia é superior a 70% e em descendentes de japoneses chega a 12,7% (152). A prevalência nos povos nativos americanos e em imigrantes asiáticos, aliada à importante miscigenação da população brasileira, explica a prevalência de 2,8% encontrada em doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto e também os 3,2% de doadores Di^a positivos descritos por Baleotti *et al.* (152). Portanto, por sua prevalência superior a 1%, o antígeno Di^a não é um antígeno de baixa frequência na população de doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, de forma que o paciente submetido a múltiplas transfusões deve ter exposições repetidas ao antígeno e maior chance de aloimunização.

Os anticorpos contra antígenos de baixa frequência anti-Kp^a (n=13) e anti-C^w (n=10), somados ao anti-Lu^a (n=6) representaram juntos 12,6% do total de anticorpos. As frequências dos antígenos correspondentes nos doadores de sangue foram 1,5%, 1,1% e 5,8%, respectivamente. Vale notar que uma limitação técnica na identificação de especificidades contra antígenos de baixa frequência pode explicar a ausência no presente estudo de anticorpos relativamente comuns encontrados em

pacientes com DF como o anti-Js^a(KEL6) e anti-VS (RH20) (85,147,153). Parte dos anticorpos não identificados (n=22) podem corresponder a algumas dessas especificidades. Essa limitação decorre da não testagem dos painéis comerciais para determinados antígenos ou mesmo pela raridade do antígeno na população, o que impede sua representação no painel comercial.

Os anticorpos de significado clínico anti-S, anti-Jk^a, anti-Fy^a e anti-Jk^b somaram 19 anticorpos, sendo o anti-S o mais comum (n=9). Apesar de ainda haver uma clara diferença fenotípica entre doadores e receptores na população do estudo (tabela 5), o que certamente contribui para a aloimunização por esses antígenos, quando as frequências são comparadas à literatura, observa-se uma clara tendência do perfil fenotípico dos pacientes em aproximar-se do perfil dos doadores, os quais ainda preservam um perfil mais próximo do caucasiano (154) (APÊNDICE G).

As frequências dos antígenos S e Fy^a foram significativamente menores nos pacientes que em doadores (40,5 % vs 50,4%; tabela 5), mas mostram-se superiores às encontradas na literatura em negros americanos (31% e 23%) (APÊNDICE G). Em contrapartida, a frequência do antígeno Jk^b, caracteristicamente menos prevalente em negros, não foi diferente estatisticamente da população de doadores (63,3 vs 69,2%; tabela 5), o que mostra a clara miscigenação dessa população, distanciando-se da prevalência descrita em negros americanos (46%) (154). Apesar da frequência do Jk^a ser maior nos pacientes com DF que em doadores (86% vs 79,5%; tabela 5) e de apenas 14% ser susceptível à formação do anticorpo, já foi demonstrado que a imunogenicidade do Jk^a é maior do que se acreditava previamente, elevando a chance de aloimunização por esse antígeno (146).

Cinco anticorpos contra antígenos de alta frequência foram encontrados em quatro pacientes: anti-U, anti-Hr^B/anti-hr^B, anti-Js^b e anti-FY3. Com exceção do anti-FY3, formado por indivíduos com o fenótipo Fy(a-b-), que é comum em afrodescendentes, os outros anticorpos estão relacionados a fenótipos raros que perdem a expressão de antígenos de alta frequência e são característicos da população afrodescendente (85) (quadro 4). Apenas o anti-U foi identificado já na primeira PAI, em paciente com transfusões externas prévias, enquanto os demais foram identificados após transfusões no Hemocentro de Ribeirão Preto ou no HCRP.

A mediana de idade na primeira pesquisa de anticorpos positiva foi de 22,4 anos, muito próxima à mediana de 21 anos encontrada por Sins e colaboradores

(134). Dos 70 pacientes aloimunizados, 31 (44,3%) apresentaram três ou mais anticorpos. Essa proporção de pacientes com múltiplos anticorpos assemelha-se aos resultados obtidos em alguns estudos, em que ela variou de 27,2 a 45% (72,76,143,153) e que exemplificam bem o perfil respondedor imune dessa população. Por outro lado, ela é bem superior aos 8%, 14%, 19% e 20,9% descritos por Allali (83), Elenga (155), Nickel (147) e Sins *et al.* (134), respectivamente. O menor número de pacientes com múltiplos anticorpos nesses três estudos pode estar associado à estratégia profilática de fenótipo Rh e Kell e ao fato de dois deles incluírem apenas crianças.

A comparação da última pesquisa de anticorpos com o histórico do grupo aloimunizado mostrou que 54% dos pacientes apresentavam resultados negativos na última pesquisa. Esse resultado corrobora o achado de Harm *et al.* (156) de que metade dos anticorpos não eram mais detectados em 63% dos pacientes em avaliação posterior. Rosse e colaboradores (153) também descreveram o desaparecimento de 37% dos anticorpos em pacientes com DF. Esses anticorpos evanescentes elevam o risco de reações transfusionais, especialmente se o paciente é transfundido em diferentes hospitais (156).

Estima-se que os intervalos de identificação de anticorpos aplicados à população geral detectam menos de um terço dos anticorpos e que a real taxa de aloimunização é subestimada. Isso ocorre porque para a maioria dos pacientes transfundidos não é realizado nenhum acompanhamento após a transfusão (157). Em nosso estudo, metade (n=107) dos pacientes encontrava-se em regime transfusional regular, dos quais 37,3% eram aloimunizados. Nesse grupo, a mediana do intervalo entre a última transfusão e a última PAI foi de 22 dias (IIQ:16-33 dias), enquanto no grupo com transfusões episódicas, com 28,8% de aloimunizados, a mediana foi de 223 dias (IIQ:41-578 dias). A triagem em intervalos mais curtos e regulares reduz a chance da não detecção de um novo anticorpo, de modo que a prevalência de aloimunização encontrada no grupo em regime regular deve ser o mais próximo do real, enquanto no grupo com transfusões episódicas, os intervalos mais longos podem ter sido responsáveis pela não detecção de alguns anticorpos (157).

Os 211 pacientes receberam um total de 15.916 transfusões realizadas entre os anos de 1996 e 2018. O número de CHs transfundidos foi significativamente maior no grupo aloimunizado (83,5 vs 22; tabela 13), o qual também apresentou

maior concentração de ferritina sérica (1.136 vs 566; tabela 13). Mesmo no modelo ajustado o número de CHs transfundidos persistiu como fator associado à aloimunização, sendo estimado um aumento de 0,4% na prevalência a cada CH transfundido (tabela 15). A relação do maior número de transfusões com a aloimunização é bem estabelecida na literatura, sendo maior nas primeiras transfusões (83,84,134,147,153).

Entre os 60 pacientes aloimunizados com registro de transfusão anterior à primeira PAI positiva, 55% desenvolveram o primeiro anticorpo após os primeiros 10 CHs transfundidos e 73,3% já estavam aloimunizados após 30 CHs (gráfico 7). A mediana de CHs transfundidos antes do primeiro resultado positivo foi de 9 unidades (IIQ:4-33 unidades). Esse dado assemelha-se aos achados de Vichinsky *et al.* (72) em que a aloimunização ocorreu em média após o 12º CH e que 75% dos novos anticorpos surgiram até a 21ª transfusão. No estudo de Sins *et al.* (134), metade dos pacientes aloimunizados também desenvolveu anticorpos até o oitavo CH transfundido, e Allali *et al.* (83) descreveram a mediana de 11 CHs até a aloimunização. Estudo na população de Uganda encontrou uma proporção ainda maior de pacientes (80,7%) que se aloimunizou até o 10º CHs transfundido (158).

A curva de Kaplan-Meier em função do número de CHs (gráfico 8B) também mostra um risco elevado de aloimunização após os primeiros CHs transfundidos e uma tendência à estabilização do risco, mesmo com o número crescente de transfusões. Com os primeiros 50 CHs transfundidos a probabilidade cumulativa de aloimunização atinge rapidamente 34,8%. Em contrapartida, a partir desse ponto, serão necessários mais 166 CHs transfundidos para atingir a probabilidade de 50% de aloimunização (tabela 10). Padrão muito semelhante foi demonstrado Sins *et al.* (134) ao realizar o mesmo tipo de análise.

Diferentemente da probabilidade em função do número de CHs, a curva em função do tempo não reflete tão bem esse comportamento e demonstra uma progressão mais linear e lenta (gráfico 8A) com mais aloimunização nos primeiros cinco anos e depois taxas menores e semelhantes a cada cinco anos (tabela 10). Assim como na literatura, apesar de a aloimunização ter ocorrido principalmente após as primeiras transfusões, novas aloimunizações continuaram acontecendo, ainda que de forma menos frequente até 218 CHs transfundidos (153).

Nossos resultados corroboram a teoria da existência de um grupo de pacientes caracterizado por predisposição à aloimunização precoce, após poucas

transfusões, e de outro grupo que não desenvolve anticorpos mesmo com múltiplas transfusões (95). Esse comportamento é descrito não só em pacientes com DF. Entender o perfil dos pacientes com maior risco de aloimunização deve ajudar a identificá-los precocemente e a estabelecer medidas profiláticas mais assertivas (95,134,148). A aplicação do conceito de respondedor imune vai além da aloimunização eritrocitária. Na hemofilia, por exemplo, sabe-se que o maior risco de desenvolver inibidor do fator VIII (anticorpo contra o fator VIII) da coagulação acontece logo nas primeiras exposições ao fator exógeno e que, enquanto uma parte dos pacientes desenvolve precocemente o inibidor, outro grupo não o fará apesar do número crescente de exposições (159).

A despeito da forte associação do número de transfusões com a aloimunização e de o grupo em regime regular ter recebido mais transfusões que o grupo com transfusões episódicas, a prevalência de aloimunização não foi diferente entre os grupos em regime transfusional regular e episódico (gráfico 12). Essa aparente incongruência é explicada pela maior taxa de aloimunização associada à transfusão episódica com risco relativo de aloimunização 4,2 maior que a transfusão regular (tabela 12). Portanto, o potencial de cada transfusão no regime episódico de aloimunizar é bem maior que o de uma transfusão em regime regular. Quando apenas as prevalências de aloimunização nos dois regimes são comparadas, a diferença não fica evidente, pois o número crescente e contínuo de exposições do regime regular acaba por “compensar” seu menor potencial de aloimunização. Sins *et al.* (134) e Allali *et al.* (83) também encontraram um risco três a cinco vezes maior de aloimunização associada às transfusões episódicas. Allali e colaboradores (83) ainda observaram no grupo em transfusão episódica um menor número de CHs antes da aloimunização (5 vs 27 CHs), tendência que também foi observada em nosso estudo (6,5 vs 10 CHs; tabela 11). Todos esses achados apontam um maior risco de aloimunização associada às transfusões episódicas, indicadas em geral no tratamento de crises agudas da DF, durante as quais existe uma exacerbação da inflamação e maior lesão tecidual (92–94).

A ideia de que a transfusão em momentos de estresse inflamatório está associada ao maior risco de aloimunização está de acordo com a “teoria do perigo”, ou “the danger theory”, proposta pela primeira vez por Matzinger em 1994 (160). A teoria sugere que o que determina se a resposta imune será ou não desencadeada é a presença ou a ausência de “perigo” ou “dano” no momento da exposição, e não

apenas o carácter exógeno ou endógeno do estímulo (160). Assim, o sistema imune deve responder às moléculas que causam dano ao organismo e que fazem com que os tecidos danificados liberem sinais de alarme estimuladores. Se o organismo é exposto a uma molécula estranha no momento em que outro estímulo causou dano, o sistema imune irá associar aquela nova molécula ao dano e pode desencadear uma resposta contra ela (160,161).

Enquanto a transfusão em situações sem inflamação parece induzir a tolerância imune (93), a transfusão em situações de inflamação parece favorecer a aloimunização (92,162). Em seu estado basal, fora de complicações agudas, o paciente com DF já exibe um estado inflamatório crônico, caracterizado por níveis mais elevados de proteína C reativa, contagens mais elevadas de leucócitos, maior concentração de IFN γ , TNF α e IL-6 (163,164). Os quadros vaso-oclusivos agudos são caracterizados por elevação da concentração dos mediadores inflamatórios, isquemia tecidual e lesão de reperfusão (165–167). Esse cenário pode favorecer a ativação da imunidade inata e adaptativa, de forma que a exposição a antígenos alogênicos nesse momento aumentaria a chance de aloimunização (163). Contudo, a caracterização dos mecanismos envolvidos na resposta imune após a transfusão, bem como a caracterização do perfil inflamatório do paciente no momento do episódio transfusional, ainda são dois pontos que demandam investigação, já que a maior parte das pesquisas envolveu modelos animais, estudos *in vitro* ou a caracterização de indivíduos respondedores e não respondedores fora das crises agudas (89,93,162,168).

Apesar de termos demonstrado maior risco de aloimunização com transfusões episódicas, o presente estudo não demonstrou relação de aloimunização com nenhuma das complicações agudas da DF. No modelo ajustado, a razão de prevalência da CVO foi 1,49, mas ainda sem significância estatística (tabelas 14 e 15). Allali *et al.* (83) em estudo retrospectivo também não encontraram diferença no número de eventos agudos entre crianças aloimunizadas e não aloimunizadas, porém o número de pacientes aloimunizados foi pequeno, o que provavelmente prejudicou esta análise. Fasano e colaboradores, em contrapartida, demonstraram risco aproximadamente dez vezes mais alto de aloimunização associado a transfusões realizadas durante episódios inflamatórios agudos (STA e CVO) (94). Os autores conseguiram demonstrar essa associação com um desenho de estudo que envolveu a análise individual e retrospectiva de 3.166 transfusões em

52 pacientes já aloimunizados (respondedores), após as quais 128 novos anticorpos foram detectados. Esse método permitiu avaliar melhor o risco de aloimunização associado a cada tipo de intercorrência inflamatória aguda. Vale destacar que anticorpos contra antígenos de alta frequência surgiram após episódios de STA graves em dois pacientes de nosso estudo, sendo que em um dos casos aquele havia sido o primeiro evento transfusional de toda vida do paciente (quadro 4).

A idade mais elevada parece ser um fator de risco para a aloimunização (145,169), não obstante, pode haver forte associação com a carga transfusional. Ao comparar o grupo aloimunizado e não aloimunizado, observamos que no primeiro a mediana de idade foi maior (31,5 vs 26 anos) e mesmo após análise ajustada, incluindo número de transfusões, a idade permaneceu como fator relacionado à aloimunização. Foi estimado um aumento de 3% na prevalência de aloimunização a cada ano adicionado à idade. Nos pacientes com DF em transfusão crônica avaliados por Chou *et al.* (84) e Nickel *et al.* (147) o grupo aloimunizado também apresentou idade mais elevada, ao passo que Telen *et al.* (76) e Allali *et al.* (83) não mostraram associação de idade e aloimunização.

O risco de aloimunização também parece ter relação com a idade da primeira exposição à transfusão. Apesar de a idade mais precoce na ocasião da primeira transfusão ser um fator protetor mais bem estabelecido para pacientes com talassemia (71), essa tendência também é demonstrada em alguns estudos na DF. Rosse e colaboradores (153) apontaram que o início de transfusões antes dos 10 anos era um fator protetor contra a aloimunização, enquanto Sins *et al.* (134) concluíram que a primeira transfusão após os cinco anos é um fator de risco independente para a aloimunização. Ao contrário, Chou *et al.* (84) e Nickel *et al.* (147) não demonstraram essa associação.

Baseado na idade do primeiro registro de transfusão e na informação do paciente, foi possível determinar, em 141 casos, quem havia recebido transfusões antes ou somente após os 5 anos. Encontramos que a transfusão antes dos cinco anos conferiu alguma proteção contra a aloimunização (25% vs 42,2%; gráfico 11), principalmente se se considerar que o número de CHs transfundidos não foi diferente entre os grupos. Essa proteção pode se dever à imaturidade do sistema imune e a um mecanismo de tolerância imune ainda pouco compreendido (134).

Apesar de a competência imunológica aumentar após o período neonatal, alterações no número e função das células apresentadoras de antígenos ainda

persistem durante a primeira infância. O número de células dendríticas (DC) circulantes está diminuído em crianças de um ano, o que compromete também a síntese e função de IL-12. Esta última tem atividade pro-inflamatória e é indutora de resposta Th1. Um aumento progressivo dos níveis de IL-12 é observado aos 5 e aos 12 anos, mas os níveis ainda são inferiores aos encontrados em adultos (170). As células dendríticas são também importantes indutoras de autotolerância (171) e, além disso, um papel crescente vem sendo conferido a essas células na apresentação de antígenos eritrocitários ao sistema imune (79,172). Sendo assim, é possível que a alteração do perfil dessas células na primeira infância seja um dos mecanismos responsáveis pelo efeito protetor da transfusão nessa fase, porém, mais estudos são necessários para entender esses mecanismos. Curiosamente, Yazdanbakhsh e colaboradores (173) encontraram diferenças no controle de monócitos sobre o perfil de células Treg vs T efectoras em pacientes com DF aloimunizados e não aloimunizados em resposta ao heme extracelular. Nos testes com o grupo não aloimunizado, a proliferação de Treg *in vitro* aumentou, enquanto a polarização de Th1 diminuiu em resposta à hemina (uma forma oxidada de heme). Esse perfil de resposta foi em parte atribuído à regulação negativa de IL-12 por monócitos. Em contraste, monócitos de indivíduos aloimunizados não induziram um aumento nas Tregs e não foram capazes de conter a atividade de IL-12 ou a resposta Th1 após exposição à hemina. Esses dados sugerem que os pacientes com DF aloimunizados podem ter uma resposta anormal ao heme livre e sejam incapazes de conter o estímulo pró-inflamatório da IL-12, resultando em um estado de baixa atividade Treg baixo e alta resposta Th1(90). É possível imaginar que na DF as crianças teriam uma proteção natural ao estímulo inflamatório induzido pelo heme livre, devido ao menor número de células dendríticas e níveis mais baixos de IL-12 nessa fase da vida, mas nenhum estudo específico que testasse essa hipótese foi encontrado.

A análise isolada da idade no primeiro registro de transfusão foi colinear com a idade na censura (APÊNDICE E) e não deve ser utilizada para avaliar o efeito da idade na primeira transfusão sobre a aloimunização. Além disso, apesar do grupo aloimunizado ter menos pacientes com registros transfusionais antes dos cinco anos, esse grupo também foi menos transfundido.

A participação de mulheres e homens na população do estudo foi semelhante (52,6% e 47,3%, respectivamente). Não foi observada relação entre sexo e

aloimunização, sendo 55,7% a prevalência do sexo feminino no grupo aloimunizado e 51% no grupo não aloimunizado ($p=0,56$). Estudos na população geral apontam um risco mais elevado de aloimunização no sexo feminino, possivelmente relacionado aos antecedentes gestacionais (145,174,175). Considerando os estudos na DF, Nickel *et al.* (147), Tatari-Caderone *et al.* (100) e Natukunda *et al.* (158) não encontraram diferença significativa de aloimunização entre os sexos. Após correção pelos fatores de confusão, a diferença entre os sexos não persistiu no estudo de Rosse *et al.* (153). Os estudos na DF que encontram maior aloimunização no sexo feminino atribuem o achado em geral ao passado gestacional (76,134,143). Das 110 pacientes com histórico gestacional conhecido em nosso estudo, 43,6% apresentavam gestações prévias, mas não houve diferença na prevalência de pacientes com histórico gestacional entre o grupo aloimunizado e não aloimunizado (tabela 14).

A prevalência dos genótipos HbSS/HbS β^0 foi um pouco maior no grupo aloimunizado, mas sem diferença significativa (88,5% vs 81,5%), o que talvez de deva ao fato de os demais genótipos estarem pouco representados em nosso grupo. Vale lembrar que a prevalência de aloimunização no grupo estudado foi superior à do grupo não transfundido entre 2014 e 2018 (33,1% vs 15,1%), assim como a prevalência dos genótipos HbSS/S β^0 (83,8% vs 59,3%) (figura 10). Da mesma forma, Sins e colaboradores não encontraram associação com aloimunização, mas os genótipos HbSC e HbS β^+ representaram também apenas 17% da população do estudo (134).

Rosse *et al.* (153) e Telen *et al.* (76) encontraram maior prevalência de aloimunização nos pacientes com os genótipos HbSS/HbS β^0 , no entanto, esse achado parece refletir a maior gravidade dos dois genótipos e o maior número de transfusões desses pacientes. Estudos incluindo um maior número de pacientes com HbSC são necessários para entender melhor a aloimunização nesse grupo (36). Além disso, como pacientes com doença menos grave recebem em geral transfusões esporádicas e mais espaçadas, existe um maior intervalo de tempo entre as triagens de anticorpos e, conseqüentemente, maior chance de não identificar anticorpos evanescentes, o que pode subestimar a real prevalência de aloimunização nesses grupos (157).

No presente estudo, nenhuma das complicações clínicas agudas ou crônicas foram associadas à aloimunização, mesmo após análise pelo modelo ajustado (tabelas 14 e 15). A aloimunização eritrocitária pode representar um marcador de gravidade da doença falciforme, mas ainda são poucos os estudos que avaliam essa relação (66). Em nosso estudo, a porcentagem de óbitos no grupo aloimunizado (15,7%) foi maior que no grupo não aloimunizado (7,8%), mas não houve diferença na curva de sobrevida (gráfico 13). Em estudo com 319 pacientes adultos, os pacientes aloimunizados tiveram menor sobrevida e uma prevalência significativamente maior de dor crônica e maior dependência de opioides, mesmo sem ter sido encontrada relação com CVO. O grupo aloimunizado ainda teve maior prevalência de osteonecrose e lesões de órgão alvo (76). Os autores propuseram que a ativação do sistema imune contribui tanto para a aloimunização quanto para a dor crônica, a qual leva à dependência de opioides e também a menor sobrevida (76).

A morbidade e a mortalidade relacionadas à aloimunização são provavelmente subestimadas. As RTHs não são reconhecidas, pois os sinais e sintomas se sobrepõem aos da própria doença de base e são em geral diagnosticadas como novas crises agudas da DF (66,75,176). Não obstante, as complicações secundárias aos atrasos para obter doadores compatíveis e as consequências da suspensão de procedimentos clínicos ou cirúrgicos não são em geral notificadas formalmente como um problema relacionado à aloimunização. Nickel *et al.* descreveram três casos em que os pacientes acabaram indo a óbito por adiamento de transfusão em razão de dificuldade de se obter sangue compatível (66). A aloimunização também parece estar associada a maior mortalidade no TCPH, não necessariamente ligada a reações transfusionais hemolíticas (78). A busca ativa por RTHs ou atrasos transfusionais não fez parte do presente estudo, mas ao avaliar os casos que foram a óbito, encontramos que uma provável RTH tardia contribuiu para o agravamento do quadro clínico, apesar de não ter sido a causa direta do óbito (APÊNDICE D).

Os pacientes aloimunizados foram mais submetidos à esplenectomia cirúrgica que os não aloimunizados (25,7% vs 10,6%; tabela 14). Mesmo no modelo ajustado, a associação da esplenectomia à aloimunização foi mantida, juntamente com as variáveis idade e número de transfusões (tabela 15). No entanto, se considerarmos na análise apenas os pacientes que formaram anticorpos após a esplenectomia, não

observamos diferença entre o grupo aloimunizado e não aloimunizado. Dessa forma, o maior risco inicialmente associado à esplenectomia pode estar relacionado a outro fator presente nesse grupo e não propriamente à retirada do órgão. No trabalho de Nickel *et al.* (147), em pacientes com DF pediátricos, a esplenectomia não foi fator de risco para a aloimunização. Contudo, considerando o importante papel atribuído ao baço na resposta humoral, chama a atenção encontrar que nove pacientes desenvolveram anticorpos mesmo após a sua retirada. Em estudos com modelos animais a esplenectomia reduziu ou anulou a aloimunização eritrocitária (177), porém, não se sabe o quanto esse modelo é verdadeiro em humanos (79). O fato de ter sido demonstrado em modelo animal que o baço faz parte do processo de aloimunização, não exclui que pacientes sem o órgão possam ser aloimunizados (79). Muitos autores apontaram as altas taxas de aloimunização em pacientes com DF como evidência de que o baço não é necessário para a aloimunização eritrocitária em humanos, já que a maioria desses pacientes desenvolvem asplenia funcional (79). No entanto, a substância branca linfática pode persistir viável e a função do baço pode ser parcialmente recuperada em resposta ao tratamento com HU (178) ou após o TCPH (179). Portanto, permanece controverso o efeito da esplenectomia sobre a aloimunização, especialmente na DF (79).

A maior parte dos trabalhos que associou a esplenectomia à aloimunização eritrocitária foi conduzida em pacientes com talassemia (180–184). Seria intuitivo pensar que o maior risco de aloimunização dos pacientes esplenectomizados estaria na verdade relacionado ao maior número de transfusões antes da esplenectomia, no entanto, os trabalhos mostraram que o risco associado à esplenectomia persiste mesmo depois da correção pelo tempo de transfusão e que vários pacientes desenvolveram anticorpos após o procedimento. Singer e colaboradores descreveram 36% de aloimunização nos pacientes com talassemia esplenectomizados e 12,8% nos não esplenectomizados, sendo que 50% desenvolveram anticorpos após o procedimento (180). No grupo estudado por Thompson *et al.*, 343 (49,4%) pacientes haviam sido esplenectomizados e tiveram taxas significativamente maiores de aloanticorpos (OR = 2.59)(181). Além disso, mais da metade dos anticorpos surgiu após a remoção do baço (181). Mais recentemente, ao estudar a aloimunização em 188 pacientes com talassemia, Abdelrazik *et al.*(184) definiram a esplenectomia como fator de risco para a formação de anticorpos. Singer *et al.* demonstraram ainda que o perfil de deformabilidade das

hemácias de pacientes sem o baço eram mais alterados do que o de pacientes com órgão, propondo assim que mais antígenos seriam expostos ao sistema imune em decorrência da persistência de hemácias senescentes circulantes (180).

Apesar de nenhum estudo ter avaliado diretamente alterações imunológicas em pacientes esplenectomizados, aloimunizados e não aloimunizados, alterações da resposta inflamatória foram demonstradas em pacientes com talassemia esplenectomizados, os quais apresentaram níveis mais elevados de IL-6, TNF- α e proteína C reativa que os não esplenectomizados e voluntários normais (185,186). Estudo com modelo animal mostrou alterações diferenciais na função das células imunes em outros órgãos após a esplenectomia, com aumento da produção de IL-6 por macrófagos (187). Portanto, é possível que a teórica redução esperada no risco de aloimunização pela retirada do baço não se concretize, devido a outras alterações na regulação imune e à perda do mecanismo de filtração, o que leva à maior exposição de antígenos por eritrócitos senescentes.

A prevalência de anticorpos anti-HLA foi 77,1%, sendo que a aloimunização anti-HLA I foi mais frequente que a aloimunização anti-HLA II (76,2% vs 38,9%). Não foi observada diferença de idade, sexo, número de transfusões, regime transfusional ou idade do primeiro registro de transfusão entre o grupo aloimunizado e não aloimunizado. Utilizando a mesma técnica para a triagem de anticorpos HLA, estudo brasileiro com pacientes politransfundidos (n=122) de três diferentes regiões do país encontrou resultado muito semelhante para HLA I (77,9%) e maior taxa de aloimunização para HLAII (63,9%), porém as doenças de base não foram mencionadas (114). McPherson *et al.* encontraram 34% de aloimunização anti-HLA em pacientes com DF (112). Nickel *et al.* encontraram 33% de aloimunização anti-HLA I e 7% anti-HLA II em crianças com DF (111) e Salah *et al.*, utilizando técnica considerada menos sensível (linfotoxicidade dependente de complemento), descreveram 31,6% de aloimunização HLA I (188).

Assim como a diferença de perfil fenotípico eritrocitário entre doadores e pacientes contribui para a aloimunização eritrocitária nos pacientes com DF, as diferentes frequências de antígenos HLA entre doadores e pacientes e a intensa miscigenação de nossa população devem contribuir para a maior prevalência de aloimunização HLA em comparação aos estudos estrangeiros. A aloimunização HLA I foi superior em pacientes politransfundidos do sudeste e nordeste brasileiro que em pacientes politransfundidos da região sul, o que pode refletir a maior

homogeneidade HLA da população dessa última região, onde existe predominância de marcadores de ancestralidade europeus e muito pouca miscigenação (114,189).

O grupo com anticorpos anti-HLA também apresentou maior prevalência aloimunização antieritrocitária que o grupo sem anticorpos HLA, no entanto, a diferença não foi significativa (tabela 17). A associação entre aloimunização HLA e eritrocitária é descrita tanto em pacientes com DF como em pacientes com outras doenças (111,112,190). É possível que a elevada prevalência de aloimunização HLA e o número amostral relativamente pequeno encontrados em nosso estudo tenham impedido de demonstrar essa associação. Para Nickel *et al.* (111) e Mcpherson *et al.* (112), a presença de aloimunização eritrocitária foi o único fator preditor da aloimunização HLA, enquanto o número de transfusões não foi relevante.

Recentemente, Nickel *et al.* demonstraram anticorpos anti-HLA I em 29% dos pacientes com DF submetidos ao TCHP e, novamente, encontraram associação com aloimunização eritrocitária. Não obstante, a aloimunização foi associada ao maior número de transfusões de plaquetas no TCPH e à ocorrência de DECH aguda, mesmo em transplantes HLA compatíveis (110). Os autores sugerem que o paciente aloimunizado, e, portanto, respondedor imune, desenvolve uma resposta imunológica diferenciada que deve envolver APCs mais eficazes em estimular a resposta de células T contra antígenos eritrocitários e HLA, assim como em ativar a resposta de células T de doadores contra o receptor (110).

Considerando a elevada prevalência de aloimunização HLA encontrada nos pacientes com DF no presente estudo e a possível associação com complicações no TCPH, mesmo HLA compatível, a avaliação dessa complicação merece ser investigada de maneira mais aprofundada. A triagem de anticorpos anti-HLA não é realizada de rotina nos pacientes que são submetidos ao transplante HLA compatível (191), mas é possivelmente um marcador prognóstico. A pesquisa de anticorpos anti-eritrocitários, em contrapartida, é um exame de baixo custo e é realizado em todo paciente com DF candidato ao TCPH. Sabendo que existe associação entre a aloimunização HLA e eritrocitária, o histórico positivo de anticorpos antieritrocitários pode apontar o paciente de maior risco para complicações no TCPH. Vale lembrar que maior mortalidade entre os pacientes com anticorpos antieritrocitários submetidos ao TCPH aparentado e HLA idêntico foi recentemente descrita por nosso grupo (78).

A relação da expressão da proteína Duffy no eritrócito com o perfil clínico do paciente com DF ainda não é clara na literatura. Os nossos resultados indicam que o perfil clínico dos homozigotos *FY c.-67TT* é diferente dos outros dois grupos que não expressam, ou que expressam de forma reduzida os antígenos *FY* no eritrócito (*c.-67CC/TC*). Entre o genótipo *FYc.-67CC* (*FY null*) e o heterozigoto *FYc.-67TC* não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das variáveis clínicas ou transfusionais avaliadas (tabela 19), porém, esses dois genótipos foram menos associados à STA e ao sequestro esplênico que o genótipo *FY c.-67TT* (41,7% vs 62,8% e 10,4% vs 22,8%; respectivamente). Além disso, os genótipos *FYc.-67CC/TC* foram mais associados ao regime transfusional regular, tiveram níveis de ferritina sérica mais elevados, fizeram mais uso de quelante de ferro e foram mais aloimunizados (tabelas 21 e 24). Os pacientes com o genótipo *FY c.-67CC* apresentaram ainda prevalência de úlceras maleolares superior à do genótipo *FY c.-67TT* (OR: 3,6).

Várias teorias são propostas para explicar a ação da proteína Duffy na fisiopatologia na DF. Enquanto seu papel como receptor de quimiocinas inflamatórias é bem descrito, o seu exato mecanismo de ação, especialmente de sua fração expressa nos eritrócitos, ainda é controverso (118). Recentemente, concentrações muito superiores à plasmática de 46 citocinas inflamatórias foram obtidas de lisados de hemácias de indivíduos normais, apontando um papel importante do eritrócito como um reservatório dinâmico de citocinas e regulador da inflamação (192). Nesse contexto, a proteína Duffy é um receptor de alta afinidade de várias citocinas, incluindo a IL-8 e a RANTES, e deve também desempenhar papel na regulação da inflamação (192,193). A proteína Duffy expressa no eritrócito pode atuar como um verdadeiro regulador de citocinas, removendo esses mediadores de locais inflamados, onde estão concentrados, e distribuindo pelo organismo (119). Sua função parece ser mais complexa do que simplesmente um “escoador de citocinas”, como inicialmente proposto (120). Em indivíduos Duffy positivos, a maior parte das citocinas inflamatórias está ligada ao eritrócito (194). Após endotoxemia induzida, indivíduos caucasianos Duffy positivos (homozigotos) apresentaram elevação até cinquenta vezes maior de citocinas inflamatórias nos eritrócitos que indivíduos negros *FY null*, mas não é claro como isso se traduz clinicamente (194). Sabe-se também que o genótipo homozigoto *c.-67CC* (*Fy null*) está associado a contagens mais baixas de neutrófilos, enquanto o alelo *FY c.-67T* é dominante e determina contagem normal. É possível que a ausência de expressão

da proteína Duffy altere a concentração e a distribuição de citocinas inflamatórias interferindo na produção e migração dos neutrófilos (195).

Alguns mecanismos são propostos para a interação da expressão da proteína Duffy na DF. Durpès *et al.* mostraram que reticulócitos falciformes Duffy negativos expressam $\alpha 4\beta 1$ integrina em um estado de afinidade baixa, enquanto reticulócitos Duffy positivos (homozigotos e heterozigotos) a expressam em estado de alta afinidade, muito sensível às quimiocinas, e com maior poder de adesão à VCAM-1 e fibronectina (117). Os mesmos autores mostraram que as hemácias de pacientes Duffy positivos (homozigotos ou heterozigotos) são mais sensíveis às quimiocinas IL-8 e RANTES, o que leva à maior desidratação celular e a um número 17 vezes maior de hemácias com elevada densidade (desidratadas) do que o observado em indivíduos Duffy negativos (196). Os achados laboratoriais sugerem que os indivíduos Duffy positivos (homozigotos e heterozigotos) teriam maiores complicações clínicas que os Duffy negativos.

Em nosso estudo os genótipos *FYc*.-67CC/TC foram protetores em relação a STA e essa relação persistiu após correção para o regime transfusional regular, o qual também foi fator protetor. Isso sugere que a proteção conferida pelos genótipos *FYc*.-67CC/TC não deve ser apenas secundária ao fato de estarem mais em regime transfusional regular que os indivíduos com genótipo *FYc*.-67TT. A indicação mais frequente da transfusão regular para pacientes com os genótipos *FYc*.-67CC/TC (62,6% vs 45,7%; tabela 24), sinaliza por si só que eles devem ter um perfil clínico diferente, com mais manifestações crônicas que o genótipo *FYc*.-67TT.

A despeito de os estudos experimentais terem demonstrado diferenças *in vitro* entre os fenótipos Duffy positivos e negativos, a correlação clínica dos efeitos da expressão da proteína na DF é ainda controversa. Nebor *et al.* constataram maior contagem de neutrófilos e concentrações mais elevadas de IL-8 e RANTES em pacientes Duffy positivos (predominantemente heterozigotos) que em Duffy negativos, mas não demonstraram diferenças clínicas (123). Os autores chegam a especular que a diferença observada na contagem de leucócitos não seria suficiente para determinar uma apresentação mais grave da DF (123). Da mesma forma, nenhuma correlação clínica com o fenótipo Duffy foi demonstrada por Schnog *et al.* (124). Afenyi-Annan *et al.* associaram o fenótipo Duffy negativo à maior chance de lesão renal (proteinúria) e lesão de órgão alvo, enquanto o fenótipo Duffy positivo (homozigoto e heterozigoto) foi associado ao uso mais frequente de HU (125).

Nesse estudo, um número muito pequeno de pacientes estava em transfusão regular, o que pode ter atrapalhado a análise dessa variável e deve refletir protocolos locais. Semelhantemente, o fato de não termos encontrado diferenças quanto ao uso de HU pode refletir uma peculiaridade de nossa conduta local, na qual é muito comum associar HU ao regime transfusional regular no tratamento da DF, de forma que a maioria (76,3%) dos pacientes estava em uso da medicação. Diferentemente do observado por Afenyi-Annan *et al.*, Drasar e colaboradores (126) associaram o fenótipo Duffy positivo (14 heterozigotos e 2 homozigotos) ao maior risco de úlceras maleolares e de lesão renal que o fenótipo Duffy negativo (n=163).

É válido notar que todos os estudos que analisaram a possível interação do genótipo Duffy com as manifestações clínicas da doença falciforme compararam os pacientes *FY null* (*FYc*.-67CC) com os heterozigotos *FYc*.-67TC. A prevalência do genótipo *FYc*.-67TT em pacientes com DF é muito baixa em populações pouco miscigenadas, de forma que os poucos indivíduos com esse genótipo foram unidos aos heterozigotos e comparados com os pacientes *FY null* (123–126). Nossos resultados sugerem que pode ser precipitado presumir que os dois genótipos (*FYc*.-67TT e TC) apresentam o mesmo comportamento clínico. É possível que o nível de expressão da proteína Duffy no heterozigoto não seja suficiente para resultar em uma apresentação clínica diferente do indivíduo *FY null*, apesar de laboratorialmente apresentarem perfis diferentes. Talvez a maior diferença no perfil clínico seja exibida pelo homozigoto *FY c*.-67TT, que expressa 100% dos sítios Duffy, mas que foram pouco representados nos estudos clínicos até o momento.

O único estudo brasileiro que avaliou o genótipo Duffy e complicações clínicas envolveu 133 crianças com distribuição dos genótipos muito semelhante àquela do presente estudo, porém, os fenótipos Duffy positivos foram unidos e comparados aos Duffy negativos, não sendo observada diferença entre eles (197). O outro estudo com maior representação de homozigotos *FYc*.-67TT (n=53) foi realizado no Egito (n=100) e sugeriu que haveria uma diferença no score de gravidade clínica entre indivíduos Duffy positivos e negativos (127).

Existem diversos fatores que podem explicar as diferenças entre os nossos resultados e os apresentados na literatura. Em primeiro lugar, nós analisamos os três genótipos separadamente para entender se existia uma semelhança entre eles, partindo do pressuposto de que poderiam corresponder a três diferentes perfis clínicos. Em segundo lugar, talvez esse seja o estudo que caracterizou de forma

mais detalhada o histórico transfusional, a ferritina sérica e o uso de quelante de ferro como marcadores de gravidade da DF. Nosso estudo incluiu pacientes de todas as faixas etárias e analisou a prevalência cumulativa das complicações agudas e crônicas e não a incidência dessas complicações em um determinado período de tempo. Além de tudo, o genótipo Duffy pode ser apenas um marcador da influência da miscigenação, predominantemente da herança europeia, sobre a manifestação clínica da DF e não o real fator biológico determinante das diferenças fenotípicas observadas. Assim, o genótipo homozigoto *FY c.-67TT* representaria indivíduos mais miscigenados, que teriam um fenótipo menos grave e menos dependente de transfusões regulares.

A aloimunização foi maior nos indivíduos com genótipo *FYc.-67CC/TC* que no genótipo *FYc.-67TT* (40,8% vs 24,2%; gráfico 15A). A taxa de aloimunização a cada 100 CHs transfundidos foi 0,82 no genótipo *FYc.-67CC*, 0,69 no genótipo *FYc.-67TC* e 0,37 no grupo *FYc.-67TT*, o que leva a um risco relativo de 2,2 e 1,8 de aloimunização dos dois primeiros genótipos em relação ao *FYc.-67TT*, respectivamente (tabela 20). A probabilidade de aloimunização em função do número de CHs e do tempo também foi significativamente diferente entre os genótipos *FYc.67CC/TC* e *FYc.-67TT*). Ao incluir o genótipo Duffy no modelo ajustado com outras variáveis, a associação com a aloimunização é enfraquecida (RP:1,62; IC95%0,98-2,69; $p=0,058$), possivelmente por sua interação com o regime regular e o número de transfusões (tabela 25).

Como demonstrado no início dessa discussão, os afrodescendentes apresentam com maior frequência fenótipos negativos para determinados antígenos. É possível que a maior prevalência de aloimunização encontrada nos genótipos *FYc.-67TC/CC* seja simplesmente decorrente do fato de esses indivíduos terem menor prevalência de alguns antígenos eritrocitários que os indivíduos com genótipo *FYc.-67TT*. Contudo, ao analisarmos o número de anticorpos formados em relação ao número total de antígenos negativos (possibilidades de aloimunização), os genótipos *FYc.-67TC/CC* desenvolveram proporcionalmente mais anticorpos que os indivíduos com genótipo *FYc.-67TT* (13,8% vs 7,8%). Sendo assim, o perfil fenotípico não parece explicar de forma isolada a maior prevalência de aloimunização observada nos genótipos *FYc.-67CC/TC*. Vale ressaltar, no entanto, que nesta análise retrospectiva não era possível saber o fenótipo dos concentrados

de hemácias recebidos pelos participantes de cada grupo, tampouco o número de exposições a doadores antígenos positivos.

Devemos pontuar que no presente estudo o alelo *FY c.265C>T* (rs34599082) foi encontrado em quatro pacientes com discrepâncias entre fenótipo e genótipo, porém não foi possível realizar a análise do polimorfismo em todas as amostras com os genótipos *FYc.-67TC* e *FYc.-67TT*. A alelo é mais comum em indivíduos de origem europeia e leva à fraca expressão do antígeno Fy^b (Fy^x) e à redução da expressão da proteína Duffy na membrana eritrocitária (151). Apesar de não ser esperada uma elevada prevalência do alelo na população de pacientes com DF, não podemos afastar uma possível interferência do fenótipo Fy^x , ou de outro alelo menos frequente, nos dados apresentados. Além disso, apesar de termos observado uma semelhança maior entre os genótipos *FYc.-67CC* e *c.-67TC* e de termos realizado a análise conjunta, acreditamos que é necessário expandir o número de pacientes com o genótipo *FYc.-67CC* para melhor delinear o perfil desse grupo.

Um ponto forte deste estudo está no fato de trazer uma caracterização clínica, transfusional e do perfil de aloimunização da população de pacientes com DF acompanhada no ambulatório de hemoglobinopatias do HCFMRP. O retrato da população aqui estabelecido pode servir como ponto de partida para várias outras pesquisas envolvendo a DF nessa instituição. O trabalho traz ainda a análise detalhada da dinâmica de aloimunização em função do tempo e do número de transfusões, mostrando o maior risco associado às transfusões episódicas. Este também parece ser o primeiro estudo brasileiro da aloimunização HLA em pacientes com DF. Por termos uma população de pacientes com DF muito mais miscigenada que pacientes com DF de outros países, essa caracterização é ainda mais importante, já que resultados de estudos estrangeiros podem não ser aplicáveis aos nossos pacientes.

Entre os possíveis fatores que podem interferir nos dados analisados está o histórico de transfusões externas. Porém, uma vez que esse antecedente estava presente em todos os grupos que foram comparados, é pouco provável que as diferenças encontradas possam ser atribuídas a ele. Em alguns casos, é possível que uma primeira PAI positiva seja na verdade uma reação anamnética, mas não foi possível fazer essa diferenciação na análise retrospectiva. Entretanto, para mais da metade dos pacientes com histórico de transfusões externas, a transfusão ocorreu em locais atendidos pelo Hemocentro de Ribeirão Preto, portanto, a maior

parte desses eventos foi registrada pelo sistema informatizado e contabilizada nesse trabalho. Além disso, um período de mais de 20 anos de transfusões foi avaliado, o que reforça a consistência dos resultados apresentados.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- Os anticorpos dos sistemas Rh e Kell são as especificidades mais prevalentes nos pacientes com DF. O anti-Dia é o segundo anticorpo mais prevalente.
- Os antígenos Fy^a e S foram menos frequentes em pacientes com DF que em doadores de sangue, enquanto o antígeno Jk^a foi mais frequente.
- A idade mais elevada e o maior número de CHs transfundidos são fatores de risco independentes para a aloimunização eritrocitária.
- O histórico de transfusão antes de cinco anos de idade é um fator protetor contra aloimunização eritrocitária.
- A maior parte dos pacientes desenvolveu anticorpos antieritrocitários até os primeiros 20 CHs transfundidos.
- O risco de aloimunização eritrocitária é maior na transfusão episódica que no regime transfusional regular.
- A aloimunização eritrocitária não foi associada a nenhuma complicação clínica aguda ou crônica da DF e não houve diferença de sobrevida entre os grupos aloimunizados e não aloimunizados.
- A esplenectomia não evitou a formação de novos anticorpos.
- A prevalência de aloimunização HLA encontrada é maior que aquela descrita na literatura em pacientes com DF.
- A prevalência de anticorpos anti-HLA I é maior que a de anti-HLA II.
- Não houve relação de idade, sexo ou número de CHs transfundidos e a aloimunização HLA.
- A aloimunização HLA e eritrocitária parecem estar associadas.
- Os pacientes com os genótipos *FY c-67CC/TC* foram mais associados ao regime transfusional regular, ao uso de quelante de ferro e à aloimunização eritrocitária, enquanto o risco de STA e sequestro esplênico foi maior nos indivíduos com genótipo *FYc.-67TT*.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O maior desafio de estudar a aloimunização eritrocitária é a caracterização do “cenário inflamatório” no momento do exato episódio transfusional que desencadeia a resposta imune. Em parte, essa dificuldade vem do fato de não sabermos quando e qual episódio transfusional vai causar o efeito que desejamos estudar. Sendo assim, um desenho de estudo prospectivo, com análise individual de diversos episódios transfusionais, caracterização do perfil inflamatório e imune do paciente antes e após a transfusão, bem como o acompanhamento longitudinal e periódico para avaliar o desfecho (aloimunização ou não), parece ser o melhor modelo para investigar esse fenômeno. Esse mesmo modelo pode ser aplicado a indivíduos esplenectomizados e não esplenectomizados para avaliarmos o mecanismo de resposta imune na ausência do órgão.

O presente estudo também aponta a necessidade de prosseguirmos a caracterização dos genótipos *FY* e sua relação com a clínica, especialmente por termos em nossa população uma prevalência elevada de homozigotos *FYc.-67TT*, que é incomum em estudos internacionais. Essa caracterização deve incluir a avaliação laboratorial, no intuito de encontrar também uma explicação biológica para as diferenças observadas. Havendo relação da herança *FY* com a apresentação clínica da DF, a outra questão a ser respondida é o quanto ela contribui diretamente para o fenótipo clínico observado, ou se é apenas um marcador da interação com outros genes.

Apesar da pesquisa de variantes alélicas dos genes *RHD* e *RHCE* já ser um tema bastante explorado na literatura, a caracterização dessas variantes na nossa população é imprescindível para estudos futuros, dado que grande parte dos anticorpos Rh encontrados ocorreram em pacientes positivos para os respectivos antígenos.

Por fim, do ponto de vista da prática clínica e transfusional, os resultados indicam a necessidade de reduzir ainda mais transfusões episódicas em situações com indicação duvidosa e de fazer um trabalho educativo e de treinamento com os bancos de sangue externos e com médicos não especialistas, no sentido de conscientizar sobre as indicações clínicas da transfusão na DF e da importância da prevenção de aloimunização com a seleção de mesmo fenótipo Rh e Kell.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS²

1. WILLIAMS, T. N.; THEIN, S. L. Sickle cell anemia and its phenotypes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 19, p. 113–147, Aug. 2018.
2. SHI, P.; MOHANDAS, N. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. In: **Reference Module in Biomedical Sciences**. [s.l.]: Elsevier, 2014.
3. SERJEANT, G. R.; VICHINSKY, E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, La Jolla, v. 70, p. 66–77, May 2018.
4. HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 6, n. 5, p. 517–521, Nov. 1910.
5. NEEL, J. V. The inheritance of sickle cell anemia. **Science**, New York, v. 110, n. 2846, p. 64–66, July 1949.
6. INGRAM, V. M. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. **Nature**, London, v. 180, n. 4581, p. 326–328, Aug. 1957.
7. MAROTTA, C. A. *et al.* Human beta-globin messenger RNA. III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 252, n. 14, p. 5040–53, July 1977.
8. REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**, London, v. 376, n. 9757, p. 2018–31, Dec. 2010.
9. PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, Apr. 2017.
10. PIEL, F. B. *et al.* Global epidemiology of Sickle haemoglobin in neonates: A contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **Lancet**, London, v. 381, n. 9861, p. 142–151, Jan. 2013.

² Adotado sistema numérico, conforme norma ABNT 6023 (2020).

11. CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 3, p. 204–206, Sept. 2007.
12. CONRAN, N.; BELCHER, J. D. Inflammation in sickle cell disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, Amsterdam, v. 68, n. 2–3, p. 263–299, Dec. 2018.
13. BROUSSE, V. *et al.* Erythroid Adhesion Molecules in Sickle Cell Anaemia Infants: Insights Into Early Pathophysiology. **EBioMedicine**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 154–157, Feb. 2015.
14. KALOGERIS, T. *et al.* Cell biology of ischemia/reperfusion injury. **International Review of Cell and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 298, p. 229–317, 2012.
15. BENSINGER, T. A.; GILLETTE, P. N. Hemolysis in sickle cell disease. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 133, n. 4, p. 624–631, Apr. 1974.
16. DE CATERINA, R. *et al.* Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 96, n. 1, p. 60–68, July 1995.
17. MORRIS, C. R. *et al.* Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. **JAMA**, Chicago, v. 294, n. 1, p. 81–90, July 2005.
18. CAMUS, S. M. *et al.* Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. **Blood**, New York, v. 125, n. 24, p. 3805–3814, June 2015.
19. KATO, G. J. *et al.* Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, London, v. 4, n. 1, p. 18010, June 2018.
20. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
21. YAWN, B. P. *et al.* Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. **JAMA**, Chicago, v. 312, n. 10, p. 1033–1048, Sept. 2014.

-
22. SMITH-WHITLEY, K. *et al.* Epidemiology of human parvovirus B19 in children with sickle cell disease. **Blood**, New York, v. 103, n. 2, p. 422–427, Jan. 2004.
 23. BROUSSE, V.; BUFFET, P.; REES, D. The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 166, n. 2, p. 165–176, July 2014.
 24. VICHINSKY, E. P. *et al.* Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 342, n. 25, p. 1855–1865, June 2000.
 25. OHENE-FREMPONG, K. *et al.* Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: Rates and risk factors. **Blood**, New York, v. 91, n. 1, p. 288–294, Jan. 1998.
 26. POWARS, D. *et al.* The natural history of stroke in sickle cell disease. **American Journal of Medicine**, New York, v. 65, n. 3, p. 461–471, Sept. 1978.
 27. ADAMS, R. J. *et al.* Prevention of a First Stroke by Transfusions in Children with Sickle Cell Anemia and Abnormal Results on Transcranial Doppler Ultrasonography. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 339, n. 1, p. 5–11, July 1998.
 28. MANTADAKIS, E. *et al.* Outpatient penile aspiration and epinephrine irrigation for young patients with sickle cell anemia and prolonged priapism. **Blood**, New York, v. 95, n. 1, p. 78–82, Jan. 2000.
 29. KLINGS, E. S.; FARBER, H. W. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 350, n. 24, p. 2521–2522; author reply 2521–2522, June 2004.
 30. PARENT, F. *et al.* A Hemodynamic Study of Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 365, n. 1, p. 44–53, July 2011.
 31. PARASURAMAN, S. *et al.* Assessment of pulmonary artery pressure by echocardiography – A comprehensive review. **IJC Heart & Vasculture**, Shannon, v. 12, p. 45–51, Sept. 2016.
 32. HABIBI, A. *et al.* French guidelines for the management of adult sickle cell disease: 2015 update. **Revue de Medecine Interne**, Paris, v. 36, n. 5, p. 5S3–5S84, May 2015.

33. MINNITI, C. P. *et al.* Leg ulcers in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, New York, v. 85, n. 10, p. 831–833, Oct. 2010.
34. THEOCHARIDOU, E.; SUDDLE, A. R. The Liver in Sickle Cell Disease. **Clinics in Liver Disease**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p. 177–189, May 2019.
35. DOWNES, S. M. *et al.* Incidence and natural history of proliferative sickle cell retinopathy: Observations from a cohort study. **Ophthalmology**, Rochester, v. 112, n. 11, p. 1869–1875, Nov. 2005.
36. PECKER, L. H.; SCHAEFER, B. A.; LUCHTMAN-JONES, L. Knowledge insufficient: the management of haemoglobin SC disease. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 176, n. 4, p. 515–526, Feb. 2017.
37. HAMIDEH, D.; ALVAREZ, O. Sickle cell disease related mortality in the United States (1999-2009). **Pediatric Blood and Cancer**, Hoboken, v. 60, n. 9, p. 1482–1486, Sept. 2013.
38. ADAMKIEWICZ, T. V. *et al.* Effectiveness of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with sickle cell disease in the first decade of life. **Pediatrics**, Springfield, v. 121, n. 3, p. 562–569, Mar. 2008.
39. MEIER, E. R. Treatment Options for Sickle Cell Disease. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 65, n. 3, p. 427–443, June 2018.
40. AZAR, S.; WONG, T. E. Sickle Cell Disease: A Brief Update. **The Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 101, n. 2, p. 375–393, Mar. 2017.
41. LIEM, R. I. *et al.* American Society of Hematology 2019 guidelines for sickle cell disease: Cardiopulmonary and kidney disease. **Blood Advances**, Washington, v. 3, n. 23, p. 3867–3897, Dec. 2019.
42. GALAL, A.; ASSLAN, M. Allogenic hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 399–405, Nov. 2019.
43. ARNOLD, S. D. *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease - current practice and new approaches. **British journal of haematology**, Oxford, v. 174, n. 4, p. 515–525, Aug. 2016.

44. KANTER, J. *et al.* Interim Results from a Phase 1/2 Clinical Study of Lentiglobin Gene Therapy for Severe Sick Cell Disease. **Blood**, New York, v. 130, Supl 1, p. 527–527, Dec. 2017.
45. RIBEIL, J.A. *et al.* Gene Therapy in a Patient with Sick Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 376, n. 9, p. 848–855, Mar. 2017.
46. TANHEHCO, Y. C.; BHATIA, M. Hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapy in sickle cell disease. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 448–452, Nov. 2019.
47. PLATT, O. S.; ORKIN, S. H.; DOVER, G. Hydroxyurea enhanced fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 74, n. 2, p. 652–656, Aug. 1984.
48. ALMEIDA, C. B. *et al.* Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. **Blood**, New York, v. 120, n. 14, p. 2879–2888, Oct. 2012.
49. STEINBERG, M. H. *et al.* Effect of Hydroxyurea on Mortality and Morbidity in Adult Sick Cell Anemia: Risks and Benefits Up to 9 Years of Treatment. **JAMA**, Chicago, v. 289, n. 13, p. 1645–1651, Apr. 2003.
50. KUTLAR, A. *et al.* Effect of crizanlizumab on pain crises in subgroups of patients with sickle cell disease: A SUSTAIN study analysis. **American Journal of Hematology**, New York, v. 94, n. 1, p. 55–61, Jan. 2019.
51. VICHINSKY, E. *et al.* A Phase 3 Randomized Trial of Voxelotor in Sick Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 381, n. 6, p. 509–519, Aug. 2019.
52. ADAMS, R. J.; BRAMBILLA, D.; OPTIMIZING PRIMARY STROKE PREVENTION IN SICKLE CELL ANEMIA (STOP 2) TRIAL INVESTIGATORS. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 353, n. 26, p. 2769–2778, Dec. 2005.
53. WARE, R. E. *et al.* Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia - TCD with Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWITCH): A multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. **Lancet**, London, v. 387, n. 10019, p. 661–670, Feb. 2016.

54. WARE, R. E.; HELMS, R. W. Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea (SWITCH). **Blood**, New York, v. 119, n. 17, p. 3925–3932, Apr. 2012.
55. HOWARD, J. *et al.* The Transfusion alternatives preoperatively in sickle cell disease (taps) study: a randomised, controlled, multicentre clinical trial. **Lancet**, London, v. 381, n. 9870, p. 930–938, Mar. 2013.
56. REES, D. C.; ROBINSON, S.; HOWARD, J. How I manage red cell transfusions in patients with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 180, n. 4, p. 607–617, Feb. 2018.
57. CHOU, S. T. *et al.* American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: transfusion support. **Blood Advances**, Washington, v. 4, n. 2, p. 327–355, Jan. 2020.
58. CHOU, S. T.; FASANO, R. M. Management of patients with sickle cell disease using transfusion therapy: guidelines and complications. **Hematology/oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 30, n. 3, p. 591–608, June 2016.
59. DRASAR, E. *et al.* Blood transfusion usage among adults with sickle cell disease - a single institution experience over ten years. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 152, n. 6, p. 766–770, Mar. 2011.
60. COATES, T. D.; WOOD, J. C. How we manage iron overload in sickle cell patients. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 177, n. 5, p. 703–716, June 2017.
61. BALLAS, S. K. Iron overload is a determinant of morbidity and mortality in adult patients with sickle cell disease. **Seminars in Hematology**, Philadelphia, v. 38, n. 1, Suppl 1, p. 30–36, Jan. 2001.
62. FUNG, E. B. *et al.* Morbidity and mortality in chronically transfused subjects with Thalassemia and Sickle Cell Disease: A report from the multi-center study of iron overload. **American Journal of Hematology**, New York, v. 82, n. 4, p. 255–265, Apr. 2007.
63. DARBARI, D. S. *et al.* Circumstances of death in adult sickle cell disease patients. **American Journal of Hematology**, New York, v. 81, n. 11, p. 858–863, Nov. 2006.

-
64. TAVARES, A. H. J.; BENITES, B. D.; FERTRIN, K. Y. Myocardial iron overload in sickle cell disease: a rare but potentially fatal complication of transfusion. **Transfusion Medicine Reviews**, Orlando, v. 33, n. 3, p. 170–175, July 2019.
65. PULIYEL, M. *et al.* Ferritin trends do not predict changes in total body iron in patients with transfusional iron overload. **American Journal of Hematology**, New York, v. 89, n. 4, p. 391–394, Apr. 2014.
66. NICKEL, R. S. *et al.* Impact of red blood cell alloimmunization on sickle cell disease mortality: a case series. **Transfusion**, Arlington, v. 56, n. 1, p. 107–114, Jan. 2016.
67. TORMEY, C. A.; HENDRICKSON, J. E. Transfusion-related red blood cell alloantibodies: induction and consequences. **Blood**, New York, v. 133, n. 17, p. 1821–1830, Apr. 2019.
68. TORMEY, C. A.; FISK, J.; STACK, G. Red blood cell alloantibody frequency, specificity, and properties in a population of male military veterans. **Transfusion**, Arlington, v. 48, n. 10, p. 2069–2076, Oct. 2008.
69. SANZ, C. *et al.* Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. **Transfusion**, Arlington, v. 53, n. 4, p. 710–715, Apr. 2013.
70. SINGHAL, D. *et al.* Red cell alloimmunization is associated with development of autoantibodies and increased red cell transfusion requirements in myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, Pavia, v. 102, n. 12, p. 2021–2029, Nov. 2017.
71. SHAH, F. T. *et al.* Challenges of blood transfusions in β -thalassemia. **Blood Reviews**, London, v. 37, p. 100588-100600, Sept. 2019.
72. VICHINSKY, E. P. *et al.* Alloimmunization in Sickle Cell Anemia and Transfusion of Racially Unmatched Blood. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 322, n. 23, p. 1617–1621, June 1990.
73. FASANO, R. M. *et al.* Impact of Red Blood Cell Antigen Matching on Alloimmunization and Transfusion Complications in Patients with Sickle Cell Disease: A Systematic Review. **Transfusion Medicine Reviews**, Orlando, v. 33, n. 1, p. 12–23, Jan. 2019.

-
74. PIRENNE, F.; YAZDANBAKHS, K. How I safely transfuse patients with sickle-cell disease and manage delayed hemolytic transfusion reactions. **Blood**, New York, v. 131, n. 25, p. 2773–2781, June 2018.
 75. MEKONTSO DESSAP, A. *et al.* A diagnostic nomogram for delayed hemolytic transfusion reaction in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, New York, v. 91, n. 12, p. 1181–1184, Dec. 2016.
 76. TELEN, M. J. *et al.* Alloimmunization in sickle cell disease: Changing antibody specificities and association with chronic pain and decreased survival. **Transfusion**, Arlington, v. 55, n. 6, p. 1378–1387, June 2015.
 77. ALLEN, E. S. *et al.* Immunohaematological complications in patients with sickle cell disease after haematopoietic progenitor cell transplantation: a prospective, single-centre, observational study. **The Lancet Haematology**, Oxford, v. 4, n. 11, p. e553–e561, Nov. 2017.
 78. DE SANTIS, G. C. *et al.* Blood transfusion support for sickle cell patients during haematopoietic stem cell transplantation: a single-institution experience. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 190, n. 5, p. e295–e297, May 2020.
 79. ZIMRING, J. C.; HUDSON, K. E. Cellular immune responses in red blood cell alloimmunization. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, Washington, v. 2016, n. 1, p. 452–456, Dec. 2016.
 80. TATARI-CALDERONE, Z. *et al.* rs660 polymorphism in Ro52 (SSA1; TRIM21) is a marker for age-dependent tolerance induction and efficiency of alloimmunization in sickle cell disease. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 64–70, Nov. 2009.
 81. CASTRO, O. *et al.* Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. **Transfusion**, Arlington, v. 42, n. 6, p. 684–690, June 2002.
 82. LASALLE-WILLIAMS, M. *et al.* Extended red blood cell antigen matching for transfusions in sickle cell disease: A review of a 14-year experience from a single center (CME). **Transfusion**, Arlington, v. 51, n. 8, p. 1732–1739, Aug. 2011.
 83. ALLALI, S. *et al.* Prevalence and risk factors for red blood cell alloimmunization in 175 children with sickle cell disease in a French university hospital reference centre. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 177, n. 4, p. 641–647, May 2017.

-
84. CHOU, S. T. *et al.* High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. **Blood**, New York, v. 122, n. 6, p. 1062–1071, Aug. 2013.
 85. PIRENNE, F. Particularités immunohématologiques dans les populations africaines et antillaises. Implications transfusionnelles. **Transfusion Clinique et Biologique**, Paris, v. 10, n. 3, p. 185–91, juin 2003.
 86. HUDSON, K. E. *et al.* Mechanisms of alloimmunization in sickle cell disease. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 434–441, Nov. 2019.
 87. YEE, M. E. M. *et al.* Red blood cell minor antigen mismatches during chronic transfusion therapy for sickle cell anemia. **Transfusion**, Arlington, v. 57, n. 11, p. 2738–2746, Nov. 2017.
 88. BAO, W. *et al.* Immune regulation in chronically transfused allo-antibody responder and nonresponder patients with sickle cell disease and β -thalassemia major. **American Journal of Hematology**, New York, v. 86, n. 12, p. 1001–1006, Dec. 2011.
 89. BAO, W. *et al.* Regulatory B-cell compartment in transfused alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, New York, v. 88, n. 9, p. 736–740, Sept. 2013.
 90. ZHONG, H. *et al.* Hemin Controls T Cell Polarization in Sickle Cell Alloimmunization. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 102–110, July 2014.
 91. YAZDANBAKHSH, K.; SHAZ, B. H.; HILLYER, C. D. Immune regulation of sickle cell alloimmunization. **ISBT Science Series**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 248–253, Feb. 2017.
 92. HENDRICKSON, J. E. *et al.* Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. **Transfusion**, Arlington, v. 46, n. 9, p. 1526–1536, Sept. 2006.
 93. SMITH, N. H. *et al.* Transfusion in the absence of inflammation induces antigen-specific tolerance to murine RBCs. **Blood**, New York, v. 119, n. 6, p. 1566–1569, Feb. 2012.

94. FASANO, R. M. *et al.* Red blood cell alloimmunization is influenced by recipient inflammatory state at time of transfusion in patients with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 168, n. 2, p. 291–300, Jan. 2015.
95. HIGGINS, J. M.; SLOAN, S. R. Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: Evidence for a distinct population of immunologic responders. **Blood**, New York, v. 112, n. 6, p. 2546–2553, Sept. 2008.
96. CHIARONI, J. *et al.* Positive association of DRB1*04 and DRB1*15 alleles with Fya immunization in a Southern European population. **Transfusion**, Arlington, v. 49, n. 11, p. 2412–2417, Nov. 2009.
97. BALEOTTI, W. *et al.* HLA-DRB1*07:01 allele is primarily associated with the Diego a alloimmunization in a Brazilian population. **Transfusion**, Arlington, v. 54, n. 10, p. 2468–2476, Oct. 2014.
98. TIAN, L. *et al.* HLA-DRB1*09:01 allele is associated with anti-E immunization in a Chinese population. **Transfusion**, Arlington, v. 58, n. 6, p. 1536–1539, June 2018.
99. HOPPE, C. *et al.* HLA type and risk of alloimmunization in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, New York, v. 84, n. 7, p. 462–464, July 2009.
100. TATARI-CALDERONE, Z. *et al.* Protective effect of HLA-DQB1 alleles against alloimmunization in patients with sickle cell disease. **Human Immunology**, New York, v. 77, n. 1, p. 35–40, Jan. 2016.
101. COSTA-NETO, A. *et al.* FcyR2B B2.4 haplotype predicts increased risk of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease patients. **Transfusion**, Arlington, v. 60, n. 7, p. 1573–1578, July 2020.
102. MEINDERTS, S. M. *et al.* Nonclassical FCGR2C haplotype is associated with protection from red blood cell alloimmunization in sickle cell disease. **Blood**, New York, v. 130, n. 19, p. 2121–2130, Nov. 2017.
103. TATARI-CALDERONE, Z. *et al.* The association of CD81 polymorphisms with alloimmunization in sickle cell disease. **Clinical and Developmental Immunology**, Cairo, v. 2013, 2013. Doi: 10.1155/2013/937846. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/937846>. Acesso em: 20 nov. 2020.

104. KWIATKOWSKI, D. P. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 77, n. 2, p. 171–192, Aug. 2005.
105. BROWN, C. J.; NAVARRETE, C. V. Clinical relevance of the HLA system in blood transfusion. **Vox Sanguinis**, Oxford, v. 101, n. 2, p. 93–105, Aug. 2011.
106. LECHLER, R. I.; GARDEN, O. A.; TURKA, L. A. The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 3, n. 2, p. 147–158, Feb. 2003.
107. CHOO, S. Y. The HLA system: Genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 48, n. 1, p. 11–23, Feb. 2007.
108. CIUREA, S. O. *et al.* The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus recommendations for donor selection in haploidentical hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 55, n. 1, p. 12–24, Jan. 2020.
109. OEVERMANN, L. *et al.* HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients with hemoglobinopathies: current practice and new approaches. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 54, n. S2, p. 743–748, Aug. 2019.
110. NICKEL, R. S. *et al.* Human leukocyte antigen (HLA) class I antibodies and transfusion support in paediatric HLA-matched haematopoietic cell transplant for sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 189, n. 1, p. 162–170, Apr. 2020.
111. NICKEL, R. S. *et al.* Red blood cell transfusions are associated with HLA class I but not H-Y alloantibodies in children with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 170, n. 2, p. 247–256, July 2015.
112. MCPHERSON, M. E. *et al.* HLA alloimmunization is associated with RBC antibodies in multiply transfused patients with sickle cell disease. **Pediatric Blood and Cancer**, Hoboken, v. 54, n. 4, p. 552–558, Apr. 2010.
113. MALTA, M. C. F. S. *et al.* Human leukocyte antigen distribution and genomic ancestry in Brazilian patients with sickle cell disease. **HLA**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 211–218, Oct. 2017.

114. RODRIGUES, C. *et al.* Allele and haplotype frequencies of HLA-A, B, C, DRB1 and DQB1 genes in polytransfused patients in ethnically diverse populations from Brazil. **International Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 322–328, Oct. 2015.
115. TOURNAMILLE, C. *et al.* Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nature Genetics**, New York, v. 10, n. 2, p. 224–228, June 1995.
116. MILLER, L. H. *et al.* The Resistance Factor to Plasmodium vivax in Blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 295, n. 6, p. 302–304, Aug. 1976.
117. DURPÈS, M. C. *et al.* Activation state of $\alpha 4\beta 1$ integrin on sickle red blood cells is linked to the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) expression. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 4, p. 3057–3064, Jan. 2011.
118. RAPPOPORT, N. *et al.* The Duffy antigen receptor for chemokines, ACKR1,- “Jeanne DARC” of benign neutropenia. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 184, n. 4, p. 497–507, Feb. 2019.
119. FUKUMA, N. *et al.* A role of the Duffy antigen for the maintenance of plasma chemokine concentrations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 303, n. 1, p. 137–139, Mar. 2003.
120. DARBONNE, W. C. *et al.* Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 88, n. 4, p. 1362–1369, Oct. 1991.
121. LEE, J. S. *et al.* The Duffy Antigen Modifies Systemic and Local Tissue Chemokine Responses following Lipopolysaccharide Stimulation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 177, n. 11, p. 8086–8094, Dec. 2006.
122. LEE, J. S. *et al.* Enhanced expression of Duffy antigen in the lungs during suppurative pneumonia. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 51, n. 2, p. 159–166, Feb. 2003.
123. NEBOR, D. *et al.* Association between Duffy antigen receptor for chemokines expression and levels of inflammation markers in sickle cell anemia patients. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 136, n. 1, p. 116–122, July 2010.

124. SCHNOG, J. B. *et al.* Duffy phenotype does not influence the clinical severity of sickle cell disease. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 96, n. 3, p. 264–268, Sept. 2000.
125. AFENYI-ANNAN, A. *et al.* Lack of Duffy antigen expression is associated with organ damage in patients with sickle cell disease. **Transfusion**, Arlington, v. 48, n. 5, p. 917–924, May 2008.
126. DRASAR, E. R. *et al.* The effect of Duffy antigen receptor for chemokines on severity in sickle cell disease. **Haematologica**, Pavia, v. 98, n. 8, p. e87-e89, Aug. 2013.
127. FARAWELA, H. M. *et al.* Association between Duffy antigen receptor expression and disease severity in sickle cell disease patients. **Hematology**, Abingdon, v. 21, n. 8, p. 474–479, Sept. 2016.
128. SCHAEFER, B. A. *et al.* Genetic modifiers of white blood cell count, albuminuria and glomerular filtration rate in children with sickle cell anemia. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 10, Oct. 2016. Doi: 10.1371/journal.pone.0164364. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164364>. Acesso em: 20 Nov. 2020.
129. ANSTEE, D. J. The relationship between blood groups and disease. **Blood**, New York, v. 115, n. 23, p. 4635–4643, June 2010.
130. LAPIERRE, Y. *et al.* The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. **Transfusion**, Arlington, v. 30, n. 2, p. 109–113, Feb. 1990.
131. JUDD, W. J.; JOHNSON, S. T.; STORY, S. T. **Judd's methods in immunohematology**. 3rd ed. Bethesda: AABB Press, 2008.
132. RODRIGUES, E. S. *et al.* Rapid blood group genotyping by allelic discriminative real-time PCR in multiply-transfused patients. **Transfusion Medicine**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 111–114, Apr. 2015.
133. SANTOS, F. L. S. *et al.* Molecular analysis of the rare S–s– red blood cell phenotype in blood donors and patients in south-east Brazil. **Vox Sanguinis**, Oxford, v. 114, n. 3, p. 262–267, Apr. 2019.
134. SINS, J. W. R. *et al.* Early occurrence of red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, New York, v. 91, n. 8, p. 763–769, Aug. 2016.

-
135. ZOU, G. A Modified Poisson Regression Approach to Prospective Studies with Binary Data. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 159, n. 7, p. 702–706, Apr. 2004.
136. COGHLAN, G. Antibodies to low-incidence antigens. **Transfusion and Apheresis Science**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 199–202, June 2009.
137. AMBRUSO, D. R. *et al.* Experience with donors matched for minor blood group antigens in patients with sickle cell anemia who are receiving chronic transfusion therapy. **Transfusion**, Arlington, v. 27, n. 1, p. 94–98, Jan.-Feb. 1987.
138. WILKINSON, K. *et al.* Molecular blood typing augments serologic testing and allows for enhanced matching of red blood cells for transfusion in patients with sickle cell disease. **Transfusion**, Arlington, v. 52, n. 2, p. 381–388, Feb. 2012.
139. COX, J. V. *et al.* Risk of alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 148, n. 11, p. 2485–2289, Nov. 1988.
140. TAHHAN, H. R. *et al.* Antigen-matched donor blood in the transfusion management of patients with sickle cell disease. **Transfusion**, Arlington, v. 34, n. 7, p. 562–569, July 1994.
141. AMEEN, R.; AL SHEMMARI, S.; AL-BASHIR, A. Red blood cell alloimmunization among sickle cell Kuwaiti Arab patients who received red blood cell transfusion. **Transfusion**, Arlington, v. 49, n. 8, p. 1649–1654, Aug. 2009.
142. AGASA, S. B. *et al.* Transfusions multiples dans la drépanocytose en République démocratique du Congo: importance du dépistage du marqueur de l'hépatite virale C. **Transfusion Clinique et Biologique**, Paris, v. 17, n. 4, p. 254–259, oct. 2010.
143. AYGUN, B. *et al.* Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. **Transfusion**, Arlington, v. 42, n. 1, p. 37–43, Jan. 2002.
144. VICHINSKY, E. P. *et al.* Prospective RBC phenotype matching in a stroke-Prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. **Transfusion**, Arlington, v. 41, n. 9, p. 1086–1092, Sept. 2001.

145. KARAFIN, M. S. *et al.* Risk factors for red blood cell alloimmunization in the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) database. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 181, n. 5, p. 672–681, June 2018.
146. EVERS, D. *et al.* Red-blood-cell alloimmunisation in relation to antigens' exposure and their immunogenicity: a cohort study. **The Lancet Haematology**, Oxford, v. 3, n. 6, p. e284–e292, June 2016.
147. NICKEL, R. S. *et al.* Immunophenotypic parameters and RBC alloimmunization in children with sickle cell disease on chronic transfusion. **American Journal of Hematology**, New York, v. 90, n. 12, p. 1135–1141, Dec. 2015.
148. SILVY, M. *et al.* Red blood cell immunization in sickle cell disease: evidence of a large responder group and a low rate of anti-Rh linked to partial Rh phenotype. **Haematologica**, Pavia, v. 99, n. 7, p. e115–e117, July 2014.
149. CRUZ, R. O. *et al.* Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes poli transfundidos. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 173–178, jun. 2011.
150. BALEOTTI, W. *et al.* HLA-DRB1*07:01 allele is primarily associated with the Diego a alloimmunization in a Brazilian population. **Transfusion**, Arlington, v. 54, n. 10, p. 2468–2476, Oct. 2014.
151. DANIELS, G. **Human blood groups**. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013.
152. BALEOTTI, W. *et al.* A novel DI*A allele without the band 3-Memphis mutation in Amazonian Indians. **Vox Sanguinis**, Oxford, v. 84, n. 4, p. 326–330, May 2003.
153. ROSSE, W. F. *et al.* Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. **Blood**, New York, v. 76, n. 7, p. 1431–1437, Oct. 1990.
154. HASHMI, G. *et al.* Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. **Transfusion**, Arlington, v. 47, n. 4, p. 736–747, Apr. 2007.
155. ELENGA, N.; NIEL, L. Alloimmunization in Patients with Sickle Cell Disease in French Guiana. **Journal of Blood Transfusion**, New York, v. 2015, Feb. 2015. Doi: 10.1155/2015/812934. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4333280>. Acesso em: 20 nov. 2020.

156. HARM, S. K. *et al.* A centralized recipient database enhances the serologic safety of RBC transfusions for patients with sickle cell disease. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 141, n. 2, p. 256–261, Feb. 2014.
157. STACK, G.; TORMEY, C. A. Detection rate of blood group alloimmunization based on real-world testing practices and kinetics of antibody induction and evanescence. **Transfusion**, Arlington, v. 56, n. 11, p. 2662–2667, Nov. 2016.
158. NATUKUNDA, B. *et al.* Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease patients in Uganda. **Transfusion**, Arlington, v. 50, n. 1, p. 20–25, Jan. 2010.
159. WIGHT, J.; PAISLEY, S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. **Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 418–35, July 2003.
160. PRADEU, T.; COOPER, E. L. The danger theory: 20 years later. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, Sept. 2012. Doi: 10.3389/fimmu.2012.00287. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00287>. Acesso em: 20 nov. 2020.
161. MATZINGER, P. The evolution of the danger theory. **Expert Review of Clinical Immunology**, London, v. 8, n. 4, p. 311–317, May 2012.
162. ZIMRING, J. C.; HENDRICKSON, J. E. The role of inflammation in alloimmunization to antigens on transfused red blood cells. **Current opinion in hematology**, Philadelphia, v. 15, n. 6, p. 631–635, Nov. 2008.
163. YAZDANBAKHSH, K.; WARE, R. E.; NOIZAT-PIRENNE, F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. **Blood**, New York, v. 120, n. 3, p. 528–537, July 2012.
164. BOURANTAS, K. L. *et al.* Acute phase proteins and interleukins in steady state sickle cell disease. **European Journal of Haematology**, Copenhagen, v. 61, n. 1, p. 49–54, July 1998.
165. PATHARE, A. *et al.* Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **American Journal of Hematology**, New York, v. 77, n. 4, p. 323–328, Dec. 2004.
166. KAUL, D. K.; HEBBEL, R. P. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 106, n. 3, p. 411–420, Aug. 2000.

167. PLATT, O. S. Sick cell anemia as an inflammatory disease. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 106, n. 3, p. 337–338, Aug. 2000.
168. VINGERT, B. *et al.* Partial dysfunction of Treg activation in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, New York, v. 89, n. 3, p. 261–266, Mar. 2014.
169. KARAFIN, M. S. *et al.* Prevalence and risk factors for RBC alloantibodies in blood donors in the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study-III (REDS-III). **Transfusion**, Arlington, v. 59, n. 1, p. 217–225, Jan. 2019.
170. UPHAM, J. W. *et al.* Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 12, p. 6583–6588, Dec. 2002.
171. VELILLA, P. A.; RUGELES, M. T.; CHOUGNET, C. A. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 121, n. 3, p. 251–259, Dec. 2006.
172. GODEFROY, E. *et al.* Altered heme-mediated modulation of dendritic cell function in sickle cell alloimmunization. **Haematologica**, Pavia, v. 101, n. 9, p. 1028–1038, May 2016.
173. YAZDANBAKHS, K.; SHAZ, B. H.; HILLYER, C. D. Immune regulation of sickle cell alloimmunization. **ISBT Science Series**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 248–253, Feb. 2017.
174. VERDUIN, E. P.; BRAND, A.; SCHONEWILLE, H. Is female sex a risk factor for red blood cell alloimmunization after transfusion? A systematic review. **Transfusion Medicine Reviews**, Orlando, v. 26, n. 4, p. 342–353, Oct. 2012.
175. VERDUIN, E. P. *et al.* Female sex of older patients is an independent risk factor for red blood cell alloimmunization after transfusion. **Transfusion**, Arlington, v. 55, n. 6, p. 1478–1485, June 2015.
176. NARBAY, D. *et al.* Incidence and predictive score for delayed hemolytic transfusion reaction in adult patients with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, New York, v. 92, n. 12, p. 1340–1348, Dec. 2017.
177. HENDRICKSON, J. E. *et al.* The spleen plays a central role in primary humoral alloimmunization to transfused mHEL red blood cells. **Transfusion**, Arlington, v. 49, n. 8, p. 1678–1684, Aug. 2009.

178. NOTTAGE, K. A. *et al.* Predictors of splenic function preservation in children with sickle cell anemia treated with hydroxyurea. **European Journal of Haematology**, Copenhagen, v. 93, n. 5, p. 377–383, Nov. 2014.
179. NICKEL, R. S. *et al.* Improved splenic function after hematopoietic stem cell transplant for sickle cell disease. **Pediatric Blood and Cancer**, Hoboken, v. 63, n. 5, p. 908–913, May 2016.
180. SINGER, S. T. *et al.* Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. **Blood**, New York, v. 96, n. 10, p. 3369–3373, Nov. 2000.
181. THOMPSON, A. A. *et al.* Red cell alloimmunization in a diverse population of transfused patients with thalassaemia. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 153, n. 1, p. 121–128, Apr. 2011.
182. DANASOURY, A. S. *et al.* Red blood cell alloimmunization in transfusion-dependent Egyptian patients with thalassemia in a limited donor exposure program. **Transfusion**, Arlington, v. 52, n. 1, p. 43–47, Jan. 2012.
183. HUSSEIN, E. *et al.* Predictors of red cell alloimmunization in multitransfused egyptian patients with β -thalassemia. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v. 138, n. 5, p. 684–688, May 2014.
184. ABDELRAZIK, A. M. *et al.* Study of red blood cell alloimmunization risk factors in multiply transfused thalassemia patients: role in improving thalassemia transfusion practice in Fayoum, Egypt. **Transfusion**, Arlington, v. 56, n. 9, p. 2303–2307, Sept. 2016.
185. CHUNCHARUNEE, S. *et al.* Levels of serum interleukin-6 and tumor necrosis factor in postsplenectomized thalassemic patients. **Journal of the Medical Association of Thailand**, Bangkok, v. 80, Suppl 1, p. S86–91, Sept. 1997.
186. ARCHARARIT, N. *et al.* Serum C-reactive protein level in postsplenectomized thalassemic patients. **Journal of the Medical Association of Thailand**, Bangkok, v. 83, Suppl 1, p. S63–69, Mar. 2000.
187. SHIH-CHING, K. *et al.* Splenectomy differentially influences immune responses in various tissue compartments of the body. **Cytokine**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 101–108, Nov. 2004.
188. BEN SALAH, N. *et al.* Immunisation anti-érythrocytaire et anti-HLA au cours des hémoglobinopathies. **Transfusion Clinique et Biologique**, Paris, v. 21, n. 6, p. 314–319, Déc. 2014.

189. LINS, T. C. *et al.* Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, New York, v. 22, n. 2, p. 187–192, Mar. 2010.
190. BUETENS, O. *et al.* Prevalence of HLA antibodies in transfused patients with and without red cell antibodies. **Transfusion**, Arlington, v. 46, n. 5, p. 754–756, May 2006.
191. MORIN-ZORMAN, S. *et al.* Donor-Specific Anti-HLA Antibodies in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 7, Aug. 2016. Doi: 10.3389/fimmu.2016.00307. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00307>. Acesso em: 20 nov. 2020.
192. KARSTEN, E.; BREEN, E.; HERBERT, B. R. Red blood cells are dynamic reservoirs of cytokines. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, Dec. 2018. Doi: 10.1038/s41598-018-21387-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21387-w>. Acesso em: 20 nov. 2020.
193. GARDNER, L. *et al.* The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 321, n. 2, p. 306–312, Aug. 2004.
194. MAYR, F. B. *et al.* Duffy antigen modifies the chemokine response in human endotoxemia. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v. 36, n. 1, p. 159–165, Jan. 2008.
195. REICH, D. *et al.* Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 5, n. 1, Jan. 2009. Doi: 10.1371/journal.pgen.1000360. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000360>. Acesso em: 20 de nov. de 2020.
196. DURPÈS, M. C. *et al.* Effect of interleukin-8 and RANTES on the Gardos channel activity in sickle human red blood cells: Role of the Duffy antigen receptor for chemokines. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, La Jolla, v. 44, n. 4, p. 219–223, Apr. 2010.
197. ARAUJO, N. B. *et al.* Lack of association between the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) expression and clinical outcome of children with sickle cell anemia. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 166, n. 2, p. 140–142, Aug. 2015.

GLOSSÁRIO

Aloadsorção

Técnica sorológica utilizada para separar especificidades de anticorpos presentes no plasma quando múltiplos anticorpos estão presentes. O plasma é colocado em contato com hemácias com diferentes perfis fenotípicos, de modo que alguns anticorpos se ligam às hemácias alogênicas e outros permanecem livres no soro. Ao testar o soro novamente após a “adsorção”, é possível identificar os anticorpos que ficaram livres. O termo “adsorção” é adaptado do inglês “*adsorption*”, que se refere à ligação de moléculas à uma superfície, assim como o anticorpo se liga à membrana da hemácia, e difere do conceito de absorção, em que ocorre a penetração da molécula em outro fluido ou tecido.

Teste direto da antiglobulina

Teste realizado para verificar se as hemácias foram sensibilizadas por anticorpos *in vivo*. Utiliza-se a antiglobulina humana (ou soro de Coombs), um reagente contendo anticorpos voltados contra a porção Fc de outras imunoglobulinas e/ou contra frações do complemento, para detectar a presença desses elementos na superfície da hemácia. Se as hemácias estão sensibilizadas, a antiglobulina humana se liga e forma uma malha de hemácias que é visualizada como aglutinação (resultado positivo). O teste é utilizado para investigar reações transfusionais hemolíticas (anticorpo do paciente ligado à hemácia transfundida), anemia hemolítica (autoanticorpo ligado à hemácia) e doença hemolítica do perinatal (anticorpo da mãe ligada à hemácia do recém-nascido).

Teste indireto da antiglobulina

Teste realizado para verificar se hemácias são sensibilizadas *in vitro* por anticorpos. É aplicado na pesquisa/identificação de anticorpos irregulares, no teste de compatibilidade e na fenotipagem eritrocitária, quando soros da classe IgG são utilizados. O plasma ou o reagente da classe IgG é incubado com hemácias. Quando o anticorpo encontra o respectivo antígeno, ele sensibiliza a hemácia, mas não é capaz de aglutinar. Após adicionar o antiglobulina humana (reagente contendo anticorpos voltados contra a porção Fc de outras imunoglobulinas e/ou contra frações do complemento) a reação é revelada e ocorre a aglutinação (reação positiva). Um resultado positivo indica a presença de um anticorpo irregular no plasma, um teste incompatível com o doador e no caso da fenotipagem, indica que o antígeno testado está presente na membrana eritrocitária.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNCIDE A - Termo de consentimento livre e esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do projeto de pesquisa: Aloimunização antieritrocitária e anti-HLA em pacientes com hemoglobinopatias

Pesquisador responsável: Flávia Leite Souza Santos

Prezado voluntário,

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa que busca compreender porque alguns pacientes que recebem sangue desenvolvem anticorpos contra as células do sangue e outros não desenvolvem. A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se concordar em participar, solicitamos que assine este documento ao final.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

Os pacientes com doenças como a talassemia e a doença falciforme recebem muitas transfusões ao longo da vida. Nessas transfusões eles são expostos a proteínas diferentes das suas e por isso podem desenvolver anticorpos contra o sangue recebido. Esses anticorpos vão dificultar encontrar sangue compatível nas transfusões seguintes. Sabe-se que parte dos pacientes, mesmo recebendo muitas transfusões, nunca desenvolverão anticorpos, enquanto outros, mesmo com poucas transfusões, podem desenvolver muitos anticorpos. Esse trabalho busca identificar um mecanismo que seja capaz de prever quem desenvolverá e quem não desenvolverá anticorpos.

Como será feita esta pesquisa?

Para fazer essa pesquisa é necessário coletar 10 ml de sangue de uma veia do braço (2 tubos de exames). Essa coleta é realizada por profissional treinado no Hemocentro de Ribeirão Preto. Caso você já receba transfusão regularmente no Hemocentro, as amostras utilizadas nos testes pré-transfusionais serão usadas e não será necessária nova coleta. Amostras coletadas nos últimos 30 dias, utilizadas para a transfusão anterior também poderão ser utilizadas. Caso você não realize transfusão regular e tenha retorno ambulatorial, as amostras poderão ser coletadas no seu retorno.

O que será feito com as amostras de sangue?

Na parte amarela do sangue (soro ou plasma) será realizada a pesquisa de anticorpos contra as células do sangue. Também será extraído DNA (material genético) das células do sangue para pesquisar as características que determinam se um indivíduo deve ou não desenvolver anticorpos. Parte dos testes serão realizados em parceria com a Fundação Pró-Sangue de São Paulo e por isso uma pequena alíquota do DNA será enviado ao laboratório de imunohematologia avançada dessa instituição. Após a realização dos testes não haverá guarda de amostras.

Como você vai participar da pesquisa, quais são os riscos que podem ocorrer?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 10 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A coleta de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado, podendo levar a um leve desconforto passageiro. Além do desconforto da picada da agulha no momento da coleta de sangue, pode ocorrer: formação de hematomas no local da punção venosa, dor e mais raramente, infecção no local da punção. Se o participante tiver amostras coletadas nos últimos 30 dias, basta autorizar o uso das mesmas, sem necessidade de nova amostra. Os testes com o DNA serão exclusivamente destinados a testar marcadores genéticos relacionados à resposta imune. Nenhum outro teste será realizado.

Versão 2, 07 de Janeiro de 2019

O que acontece se eu não aceitar participar?

Caso não queira participar, não haverá prejuízo nenhum no seu tratamento.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. A curto prazo não haverá benefício direto para o participante individualmente. Os resultados obtidos nesse estudo podem contribuir para a melhora do tratamento dos portadores de talassemia e doença falciforme de forma coletiva no futuro.

- Garantimos o direito de ter acesso aos resultados da pesquisa. Os resultados também podem ser utilizados em congressos e publicações científicas, mas a identidade do participante é preservada em qualquer meio de divulgação do estudo.

- Garantimos o direito de retirar o seu consentimento a qualquer momento, mesmo após a coleta da amostra, e para isso basta comunicar o pesquisador (contato abaixo).

- Garantimos o direito de obter esclarecimento de quaisquer dúvidas acerca dos procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa. Para isso, o participante pode entrar em contato com o pesquisador (contato abaixo).

- O participante deve receber uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas pelo próprio participante e pelo pesquisador.

- Caso o participante apresente qualquer dúvida ética em relação à pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

- Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que estão sendo feitas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto está localizado no Subsolo do Hospital e funciona das 8:00 às 17:00. O telefone de contato é o (16) 3602-2228.

Ao assinar este documento o(a) senhor(a) declara que concorda voluntariamente em participar do projeto **“Aloimunização antieritrocitária e anti-HLA em pacientes com hemoglobinopatias”**

Nome do participante: _____ RG: _____

Assinatura: _____ Ribeirão Preto, ____/____/____.

Nome do Responsável legal : _____ RG: _____

Assinatura: _____ Ribeirão Preto, ____/____/____.

Pesquisador responsável: _____ RG: _____

Assinatura: _____ Ribeirão Preto, ____/____/____.

*Contato Pesquisador: Telefone: (16) 2101-9300 ramal 9346 (Hemocentro de Ribeirão Preto) ou Celular: (16) 997374557 – Falar com Flávia Leite Souza Santos (flss18@yahoo.com)

APÊNCIDE B - Sequência de primers e sondas

Grupo Sanguíneo	Gene	Polimorfismo	Alelos	Forward Primer	Reverse Primer	Sonda 1 Marcador = VIC	Sonda 2 Marcador= FAM
Duffy	FY ou ACKR1	c.-67T>C (rs2814778)	FY*02/FY*02 null [#]	CTGATGGCCCTCATTAGTCCTT	GCTGGGACGGCTGTCA	TGCTTCCAAGATAAGAGC	CTTCCAAGGTAAAGAGC
Duffy		c.125 G>A (rs12075)	FY*01/FY*02	CCTATGGTGTGAATGATTCCCTTCCC	CAGAGTCATCCAGCAGGTTACAG	TGGAGACTATGGTGCCA AC	TGGAGACTATGATGCCA AC
Duffy		c.265C>T	FY*02W	CTCTTCATGCTTTTCAGACCTCTCT	GGGCACCAATGCTGAAG	CCTGTCCTGGCACAGC	CCTGTCCTGCACACAGC
Kidd	SLC14A	c.838G>A (rs1058396)	JK*01/JK*02	TTCTGACCCCTCCTGTCTTAACA	GTTGAAACCCAGAGTCCAAAGT	CCCATTGAGGACATCT	CCATTGAGAACATCT
Rh	RHCE	c.307 C>T (rs676785)	RHCE* ^c /RHCE* ^c C	CTGCTGGACGGCTTCCT	CCCAATACCTGAACACAGTGTGATG AC	CCCAGGAGGGAACT	TCCCAGAAGGGAACT
Rh	RHCE	c.676G>C (rs609320)	RHCE* ^e /RHCE* ^e E	GCCCTCTTCTTGTTGGATGTTCTG	GCATTCTTCCCTTTGGATTGGACTT C	TGTCAACTCTGCTCTGCT	TGTCAACTCTCCTCTGCT
MNS	GYPB	c.143C>T (rs7683365)	MNS*04/MNS*03 CA	TGCACATGCTCTTCTTATTGGACTTA	CCTGGTACAGTGAAACGATGGA	TTGTCCCGTTTCTC	TTGTCCCATTTCTC
Kell	KEL	c.578 C>T (rs8176058)	KEL*02/KEL*01	AAGCTTGAGGGCTGGCGCAT	CCTCACCTGGATGACTGGTG	Não se aplica	Não se aplica

[#] O polimorfismo c.-67C está associado ao alelo FY02 ou FYB (c.125A). Existem raros relatos do polimorfismo c.-67C associado ao FY01 em áreas endêmicas de malária, o que leva a não expressão do FY^a nos eritrócitos.

APÊNCIDE C - Artigo publicado

VoxSanguinis

The International Journal of Transfusion Medicine

ISBT International Society
of Blood Transfusion

ORIGINAL PAPER

Vox Sanguinis (2019)

© 2019 International Society of Blood Transfusion
DOI: 10.1111/vox.12751

“Molecular analysis of the rare S-s- red blood cell phenotype in blood donors and patients in south-east Brazil”

Flávia Leite Souza Santos, Talitha Baldin Outer, Evandra Strazza Rodrigues, Émile Cristina Bettarello, Eugenia Maria Amorim Ubiali, Lilian Maria Castilho, Simone Kashima & Dimas Tadeu Covas
Regional Blood Center of Ribeirão Preto (Hemocentro de Ribeirão Preto), Ribeirão Preto, Brazil

Vox Sanguinis

Background and objectives The rare S-s- phenotype has two main molecular backgrounds. GYPB deletions give rise to the S-s-U- phenotype, which loses the expression of the U antigen, while variant GYPB alleles usually lead to the S-s-U^{var} phenotype, which express a variant U antigen. The S-s- phenotype is typically found in people of African origin and represents a challenge in transfusion sets, especially when S-s- patients develop anti-U. Molecular analysis is the most reliable method for determining U antigen status. We studied the molecular basis of the S-s- phenotype in donors and patients at Regional Blood Center of Ribeirão Preto.

Material and Methods Five patients and 25 donors with the S-s- phenotype were investigated through real-time PCR for the GYPB* S/s polymorphism, followed by an allele-specific RFLP-PCR for GYPB deletion (GYPB*) and for its main variants: GYPB*P2 and GYPB*NY. DNA sequencing was conducted in one sample.

Results Two samples were heterozygous GYPB*P2/GYPB*NY, eight were homozygous/hemizygous for GYPB*P2 and 19 samples were homozygous for GYPB*. A hybrid gene (GYPB-E-B.Ros) was found in one sample after discrepant results in the initial tests.

Conclusion GYPB deletion is the main mechanism responsible for the S-s- phenotype in our donors and patients. It is essential to evaluate the main GYPB variant alleles when genotyping in order to obtain the correct prediction of the phenotype. Hybrid genes lead to discrepancies between genotype and phenotype and may not be detected by conventional molecular assays.

Key words: anti-U, GYPB, MNS blood group.

Received: 12 June 2018,
revised 10 October 2018,
accepted 3 January 2019

Introduction

The MNS system (ISBT002) consists of 49 antigens, and its molecular basis is defined by three genes, GYPA, GYPB and GYPE, located in the chromosome 4q31-21 [1]. Glycophorin B (GPB), a product of the GYPB gene, carries the S (MNS3) and s (MNS4) antigens. The difference between these antigens is determined by an amino acid change (p.Met29Thr) in GPB, which is a consequence

of a single nucleotide polymorphism c.143T>C [2]. The S-s- (MNS-3,-4) red blood cell (RBC) phenotype, found in up to 1% of African Americans, originates from GYPB deletions or from GYPB variant forms that lead to altered expression of the high frequency U antigen (MNS5) [3]. Deletions of GPB determine the S-s-U- (MNS-3,-4,-5) phenotype, while GYPB variants give rise to the S-s-U^{var} phenotype [4]. Although the U antigen is present in the variant forms, its detection by serological methods requires a potent anti-U [4–6]. Anti-U is an antibody of clinical significance, and therefore, it is important to confirm its specificity and to provide compatible units to prevent haemolytic transfusion reactions [4]. Faced with the limitation of serology in the detection of

Correspondence: Flávia L. S. Santos, Hemocentro de Ribeirão Preto, Rua Tenente Celso Roxo, 2510, Monte Alegre, Campus Universitário (USP), Ribeirão Preto, SP 14051-140, Brasil
E-mail: flavia.leite@hemocentro.fmrp.usp.br

APÊNCIDE D - Óbitos: características dos pacientes e causa dos óbitos.

Paciente	Idade	Sexo	Genótipo	Regime transfusional	Causa do óbito
3	36	F	SS	Episódico	Insuficiência hepática/provável RTH tardia sobreposta
5	57	M	SS	Episódico	Complicação cirúrgica pós colecistectomia/Sepse foco abdominal
6	41	M	SS	Episódico	Endocardite infecciosa por <i>Staphylococcus aureus</i>
22	45	F	SS	Episódico	TEP e sepse
25	57	M	Sβ ⁰	Regular	Desconhecido (óbito externo)
46	44	M	SD	Regular	Sepse foco cutâneo celulite
53	26	F	SS	Episódico	Desconhecido (óbito externo no 29º dia de puerpério)
56	24	M	SS	Regular	Desconhecido (óbito externo) Complicações tardias de AVC hemorrágico grave
73	51	F	SS	Regular	Desconhecido (óbito externo)
74	37	M	SS	Regular	STA/sepse de foco pulmonar/AVCi basilar
76	45	M	SS	Regular	Desconhecido (óbito externo)
77	40	F	SS	Regular	TEP/STA
123	31	F	SS	Regular	Sepse por <i>Acinetobacter baumannii</i>
125	25	M	Sβ ⁰	Episódico	Sepse/STA
128	57	M	SS	Regular	Desconhecido (óbito externo)
131	35	M	SS	Regular	Desconhecido (óbito externo)
135	57	F	SS	Regular	Sepse por pneumonia hospitalar (investigava quadro neurológico/impregnação de ferro em SNC?)
145	39	F	SC	Episódico	TEP
172	33	F	Sβ ⁰	Episódico	Sepse de foco pulmonar/provável falcização intra-hepática
176	21	M	SS	Regular	TEP/STA
178	45	M	SS	Regular	Peritonite, síndrome hepatorenal e sepse
201	41	F	SS	Regular	Desconhecido (óbito externo pós-parto)

RTH:Reação transfusional hemolítica; TEP: tromboembolismo pulmonar; AVC:acidente vascular cerebral; STA:Síndrome torácica aguda; SNC: sistema nervoso central.

APÊNCIDE E - Gráficos suplementares.

Gráfico de dispersão para idade vs idade do primeiro registro. Coeficiente de Spearman.

APÊNCIDE F - Informações clínicas dos pacientes esplenectomizados.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Fenótipo Hb	Aloimunização	Momento da aloimunização*	Idade da esplenectomia	Indicação da esplenectomia
12	31	F	S β^0	Sim	antes	14	esplenomegalia e desconforto abdominal
13	7	F	SS	Não	-	5	sequestro
14	9	F	SS	Não	-	3	sequestro
15	36	F	S β^0	Não	-	7	sequestro
17	8	F	SS	Não	-	3	sequestro
29	24	F	S β^0	Sim	depois	8	sequestro
36	33	M	SS	Sim	depois	4	sequestro
44	24	F	SS	Sim	antes	21	hiperesplenismo
50	20	M	S β^0	Não	-	4	sequestro
61	27	F	SS	Sim	antes	12	hiperesplenismo
63	36	M	S β^0	Não	-	7	hiperesplenismo
71	9	M	S β^+	Sim	antes	5	sequestro
73	51	F	SS	Sim	depois	21	desconhecido
82	37	M	SS	Sim	depois	7	hiperesplenismo
85	8	M	SS	Não	-	6	sequestro
99	37	M	S β^0	Sim	antes	34	hiperesplenismo
101	31	M	SD	Sim	indeterminado	8	sequestro
105	33	F	SC	Não	-	27	rotura esplênica no parto
108	17	F	SS	Sim	antes	10	hiperesplenismo
115	16	F	SS	Sim	depois	2	sequestro
120	34	F	S β^0	Não	-	16	hiperesplenismo
121	11	F	S β^+	Não	-	4	sequestro
129	16	M	SS	Não	-	6	hiperesplenismo
138	14	F	SS	Sim	depois	1	sequestro
139	14	F	S β^0	Não	-	4	sequestro
145	39	F	SC	Sim	antes	39	hiperesplenismo
146	20	F	SS	Sim	depois	5	sequestro
159	27	F	S β^0	Sim	depois	7	desconhecido
175	31	M	S β^0	Sim	indeterminado	11	desconhecido
187	43	F	S β^0	Sim	depois	16	desconhecido
193	14	F	S β^0	Não	NA	3	sequestro
209	16	M	SS	Não	NA	6	sequestro
211	12	F	SS	Não	NA	9	sequestro

*Momento da aloimunização em relação à data da esplenectomia.

APÊNCIDE G - Frequência antigênica em pacientes, doadores de sangue e dados da literatura.

Antígeno	População do estudo		Hashmi 2007*	
	Pacientes com DF	Doadores	Afrodescendentes	Caucasianos
Kell	5,8%	5,6%	2%	5%
Jk ^a	86%	79,5%	91%	48%
Jk ^b	63,1%	69,2%	46%	70%
S	40,5%	50,4%	31%	54%
s	92,%	89,9%	93%	86%
Fy ^a	42,4%	56,8%	23%	61%

*Frequências antigênicas obtidas a partir da genotipagem de doadores que se auto-declararam como de origem africana (n=695) ou caucasiana (n=1244)(154).

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ALOIMUNIZAÇÃO ANTIERITROCITÁRIA E ANTI-HLA EM PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIAS

Pesquisador: Flávia Leite Souza Santos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 05394918.2.0000.5440

Instituição Proponente: Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.118.117

Apresentação do Projeto:

A talassemia e a doença falciforme estão entre as doenças hereditárias severas mais comuns no mundo. Apesar das diferentes fisiopatologias envolvidas, elas têm em comum a transfusão de hemácias como importante pilar no tratamento de seus portadores. Entre os riscos relacionados à transfusão de hemácias está a aloimunização eritrocitária, que além de aumentar a chance de reações transfusionais hemolíticas e de doença hemolítica perinatal, dificulta encontrar unidades de hemácias compatíveis para o paciente. Embora a exposição ao antígeno alogênico seja necessária para que a aloimunização ocorra, isoladamente isto não é suficiente. Sabe-se que apenas parte dos pacientes transfundidos é capaz de desenvolver anticorpos após transfusão com incompatibilidade antigênica, conferindo a estes um status de “respondedor imune”. Identificar os potenciais gatilhos da aloimunização e as assinaturas de “respondedores” e “não respondedores” é necessário para aperfeiçoar estratégias de prevenção. Evidências apontam um papel importante do status inflamatório e imune do receptor na formação de aloanticorpos. Isto é evidenciado por taxas mais elevadas de aloimunização em pacientes com doença falciforme transfundidos durante episódios vaso-occlusivos e de síndrome torácica aguda. Neste contexto, polimorfismos modificadores da expressão/função do gene do FcRIIB poderiam estar implicados na formação de aloanticorpos após transfusão, já que estes vêm sendo associados a várias doenças autoimunes

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 3.118.117

como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e trombocitopenia imune. Ademais, evidências demonstram que este receptor também influencia a imunidade inata e que isto pode ser importante na condução de inflamação e propagação da resposta autoimune. O presente estudo visa avaliar polimorfismos do gene do FcRIIB como marcadores moleculares do fenótipo "respondedor" para aloimunização eritrocitária e HLA em pacientes portadores de hemoglobinopatias.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar marcadores clínicos e moleculares preditores do status respondedor e não respondedor entre pacientes portadores de hemoglobinopatias.

Objetivo Secundário:

• Avaliar a aloimunização eritrocitária entre pacientes com doença falciforme e com talassemia. • Avaliar a aloimunização HLA entre pacientes com doença falciforme e com talassemia. • Avaliar fatores clínicos relacionados a aloimunização: idade, sexo, número de concentrados transfundidos, indicação da transfusão, reações transfusionais. • Avaliar associação de aloimunização eritrocitária e HLA • Avaliar polimorfismos de FCR como fator de risco para aloimunização eritrocitária e HLA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos para o participante consistem nas reações locais decorrentes da punção venosa para coleta das amostras de sangue total. A coleta por outro lado será sempre que possível realizada no mesmo momento da coleta dos exames de rotina previamente solicitados pela equipe médica assistente. Poderão também ser utilizadas amostras pré-transfusionais que são retidas por 30 dias (protocolo do serviço), após completar esse período. Os estudos moleculares que serão realizados nas amostras dos doadores são unicamente destinados à investigação de polimorfismos relacionados à resposta imune. Nenhuma outra mutação/variante relacionada a outros genes que possa gerar conflito ético será avaliada. Não será realizado nenhum estudo com cobertura para exoma ou genoma.

Benefícios:

Os resultados obtidos nesse estudo podem contribuir para a melhora da terapêutica dos portadores de hemoglobinopatias de forma coletiva no futuro. Os riscos e benefícios são descritos no TCLE (Anexo).

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 3.118.117

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo observacional tipo caso-controle que será desenvolvido no Hemocentro de Ribeirão Preto. A população estudada consistirá em todos os pacientes portadores de hemoglobinopatias (doença falciforme e talassemia) com transfusão de hemácias entre Janeiro de 2014 e Dezembro de 2018 no Hemocentro de Ribeirão Preto. Serão revisados os prontuários eletrônicos e registros imuno-hematológicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados e estão de acordo com as normas vigentes.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 2, 07 de Janeiro de 2019, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2, 07 de Janeiro de 2019, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1269400.pdf	07/01/2019 12:19:21		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Aloimunizacao.pdf	07/01/2019 12:12:21	Flávia Leite Souza Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_aloimunizacao.pdf	07/01/2019 12:07:37	Flávia Leite Souza Santos	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	17/12/2018 11:26:18	Flávia Leite Souza Santos	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	17/12/2018 11:25:59	Flávia Leite Souza Santos	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 3.118.117

Orçamento	UPCassinada_aloimunizacao.pdf	17/12/2018 10:28:58	Flávia Leite Souza Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_aloimunizacao.pdf	17/12/2018 10:28:18	Flávia Leite Souza Santos	Aceito
Outros	Chefes_ambulatorio_hemocentro.pdf	06/12/2018 15:31:56	Flávia Leite Souza Santos	Aceito
Outros	Hemocentro.pdf	06/12/2018 15:30:38	Flávia Leite Souza Santos	Aceito
Outros	Coparticipante_Pro_Sangue.pdf	06/12/2018 15:16:21	Flávia Leite Souza Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termoinfraestrutura.pdf	06/12/2018 15:13:23	Flávia Leite Souza Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 22 de Janeiro de 2019

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO B - Laudo externo do fenótipo raro RH:-31,-34.

Paciente	[REDACTED]	Prontuário Ext. :	-
Procedência	Hemocentro de Ribeirão Preto	Prontuário HIAE :	-
Material	Sangue Total	Amostra nº :	-
Data da Coleta	16/02/2019	Data de Envio	28/02/2019

ANÁLISE SOROLÓGICA E MOLECULAR

O grupo sanguíneo do paciente revelou-se: A RhD-negativo. O Teste Direto da Antiglobulina (TDA) foi negativo nas técnicas de tubo e gel (IgG e C3d).

A pesquisa e identificação de anticorpos detectou a presença de um anticorpo reativo com hemácias C+ (RH:2) / e+ (RH:5), nas técnicas de gel centrifugação em meio de baixa força iônica (Gel - LISS) e na técnica de gel centrifugação com hemácias tratadas com Papaína (Gel - Enzima).

A genotipagem eritrocitária foi realizada pela técnica do BloodChip (Kit ID Core XT, Progenika - Grifols) e a análise molecular foi realizada no equipamento Luminex (xMAP® Technology).

Os resultados da genotipagem e o fenótipo deduzido do genótipo demonstraram os seguintes resultados:

Genotipagem RHCE: *RHD-CE(4-7) D (haplótipo (C) ce^S tipo2)*

- Fenótipo deduzido do genótipo : C_{PARTIAL} c_{PARTIAL} E⁻ e_{PARTIAL} Cw⁻ (r^s r^s)

Genotipagem variantes RHCE

- Fenótipo deduzido do genótipo : V⁻ (RH:-10), VS⁺(RH:20), hr^s+ (RH:19),

hr^B- (RH:-31), Hr^B- (RH:-34)

Genotipagem Estendida : *KEL*2/2; KEL*4/4; KEL*7/7; JK*1/1; FY*1/FY*2-67C/T;*

*GYPA*1/1; GYPB*4/4; GYPB*5; DI*2/2; DO*1/2; DO:4; DO:5; CO*1/1; YT*1/1; LU*2/2*

- Fenótipo deduzido do genótipo : K-k⁺; Kp(a-b⁺); Js(a-b⁺); Jk(a+b⁻); Fy(a+b⁻);

M+N-S-s⁺; U⁺; Di(a-b⁺); Do(a+b⁺); Hy⁺; Jo(a⁺); Co(a+b⁻); Yt(a+b⁻); Lu(a-b⁺)

Foi realizado estudo de adsorção e eluição com hemácia de doador fenótipo R₂R₂ tratada com Papaína 1%, confirmando a presença dos anticorpos anti-hr^B, anti-Hr^B, respectivamente, no soro aloadsorvido e no eluato pós adsorção.

O soro do paciente também foi testado com painel de hemácias : c+/e+/ hrB- /HrB- ; R₂R₂ no qual foi possível excluir a presença de anti-D, anti-C, anti-c, anti-e.

CONCLUSÃO

O paciente [REDACTED] apresenta no soro os anticorpos de importância clínica **Anti-hr^B**, **Anti-Hr^B**, responsáveis por reações transfusionais hemolíticas graves e Doença Hemolítica do Feto e do Recém Nascido.

Se esse paciente necessitar de transfusão de sangue, concentrados de hemácias do Grupo "O" ou "A" RhD-negativo, fenótipo r^sr^s ou Rh_{null} (RH:-29) ; K- /KEL:-1 ; Jkb(-)/JK:-2 ; S-/GYPB:-3 devem ser selecionados para as provas de compatibilidade.

Devido à baixa incidência desse fenótipo em caucasianos, recomenda-se investigar população de doadores afrodescendentes para busca de indivíduos com genótipo compatível ao paciente.

Gostaríamos se possível do envio de um volume maior de soro e hemácia do paciente, pois se trata de material importante para pesquisa.

Em caso de dúvida, colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Dra. Carolina Bonet Bub
Depo. de Hematologia e Terapia Celular
Albert Einstein

Nome : Dra Carolina Bonet Bub
Responsável Médico
CRM: 113.377

Maria Gisela Aparecida
Coordenadora Técnica
Dep. Hematologia e Terapia Celular HIAE
CRBM: 2.862

Nome : Maria Gisela Aparecida
Coord Técnica Imunohematologia
CRBM : 2.862