UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

LARISSA ESPÍNDOLA LEITE

**Genotipagem dos antígenos Rh (C, c, E, e) e Kell (K, k) como estratégia na
redução da aloimunização em pacientes com doença falciforme atendidos no
Hospital de Base do Distrito Federal**

Ribeirão Preto
2019

LARISSA ESPÍNDOLA LEITE

Genotipagem dos antígenos Rh (C, c, E, e) e Kell (K, k) como estratégia na redução da aloimunização em pacientes com doença falciforme atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal.

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).

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, pelo programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad

Ribeirão Preto

2019

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.

Leite, Larissa Espíndola

Genotipagem dos antígenos Rh(C, c, E, e) e Kell (K, k) como estratégia na redução da aloimunização em pacientes com doença falciforme atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal. Ribeirão Preto, 2019.

54 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Hemoterapia.

Nome: LEITE, Larissa Espíndola

Título: Genotipagem dos antígenos Rh (C, c, E, e) e Kell (K, k) como estratégia na redução da aloimunização em pacientes com doença falciforme atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal. (Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, pelo programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia, área de concentração Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos pacientes de Doença falciforme que
contribuíram com esse projeto.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer aos meus pais que sempre foram os maiores incentivadores dos meus projetos e me deram todo o apoio necessário;

Ao meu orientador Rodrigo Haddad, pela paciência, tranquilidade e disponibilidade;

Ao meu marido Felipe, que abdicou de vários finais de semana para me acompanhar ao laboratório;

À Dra. Simone Kashima Haddad, por me oferecer um treinamento no laboratório de Biologia Molecular da FHRP;

À Dra. Evandra Strazza, por me acompanhar atenciosamente durante uma semana de treinamento;

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular da FHRP e ao pessoal do Laboratório multidisciplinar da UnB, campus Ceilândia, especialmente à Lorena, que sempre foi muito solícita;

À amiga Ana Luisa, pela enorme ajuda;

À equipe do Hospital de Base do Distrito Federal, que de alguma forma me ajudou nesse projeto, principalmente aos amigos Patrícia, Ruth, Kléber e Rosângela;

À Edna Nakanishi, minha colega de quarto por quase 2 anos;

À querida Raquel, prestativa e atenciosa desde a seleção de mestrado e à Rosana, que sempre solucionou nossas dúvidas nos momentos de aflição, gentilmente;

Aos professores e funcionários da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e da USP, pelo compartilhamento de experiências, pelo conhecimento transmitido e pelo acolhimento.

“A ciência desperta um sentimento sublime de admiração”.

(SAGAN, 2006)

RESUMO

LEITE, Larissa Espíndola. **Genotipagem dos antígenos Rh (C, c, E, e) e Kell (K, k) como estratégia na redução da aloimunização em pacientes com doença falciforme tratados no Hospital de Base do Distrito Federal**. 2019. 52f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, 2019.

A doença falciforme é caracterizada pela presença intra-eritrocitária de Hemoglobina S, um tetrâmero composto de cadeias globina beta (β) mutadas (β^S), em que o aminoácido ácido glutâmico é substituído por uma valina. Tal modificação faz com que ocorra a formação de um polímero de HbS que interage com a membrana eritrocitária e deforma as hemácias quando a pressão de oxigênio é reduzida, processo esse conhecido como falcização e que provoca crises vaso-oclusivas no capilar venoso. Tal obstrução dos vasos sanguíneos produzem episódios de dor, anemia hemolítica, lesões em órgãos e mortalidade precoce. As transfusões sanguíneas crônicas em indivíduos com doença falciforme melhoram a qualidade de vida, diminuem os sintomas da anemia, reduzem a quantidade de HbS circulante e melhoram a capacidade de oxigenação. Porém, uma complicação reconhecida da transfusão é a aloimunização contra antígenos eritrocitários, que pode levar à reação transfusional hemolítica. A fenotipagem profilática é o método de prevenção contra a aloimunização em pacientes com doença falciforme, no entanto, essas estratégias não são tão eficazes uma vez que estudos mostraram que aloimunizações contra antígenos dos sistemas Rh e Kell continuam ocorrendo em pacientes com doença falciforme, apesar das transfusões terem sido realizadas com fenótipo compatível. Esse estudo genotipou os antígenos Rh (C/c e E/e) e Kell (K/k) de 77 pacientes com doença falciforme e comparou esses resultados ao fenótipo eritrocitário. A taxa de aloimunização foi de 36,4% e os anticorpos identificados foram, principalmente, contra o sistema Rh (55,17%); o anti-Kell foi encontrado em somente 5 pacientes (8,62%). Foram observadas 17 discrepâncias entre genótipo e fenótipo. Como resultado dessas avaliações, foi confeccionada uma carteirinha contendo as informações do fenótipo deduzido do genótipo para que os pacientes levem em seus atendimentos fora da rede pública do Distrito Federal e que auxiliará na escolha do hemocomponente compatível.

Palavras-chave: Doença falciforme. Aloimunização. Genótipo.

ABSTRACT

LEITE, Larissa Espíndola. **Molecular genotyping of Rh (C, c, E, e) and Kell (K, k) antigens as a strategy to reducing the alloimmunization in sickle cell disease patients treated at Base Hospital of Federal District.** 2019. 52f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, 2019.

Sickle cell disease is characterized by the presence of intra-erythrocyte hemoglobin S, a tetramer composed of mutated (β S) beta globin (β) chains, in which the glutamic acid is replaced by a valine. This modification causes 'the formation of an HbS polymer that interacts with the erythrocyte membrane and deforms the red blood cells when the oxygen pressure is reduced. This process is known as sickling and it causes vaso-occlusive crises in the venous capillary. The obstruction of the blood vessels produces episodes of pain, hemolytic anemia, organs damage and early mortality. Chronic blood transfusions in individuals with sickle cell disease improve quality of life, decrease the symptoms of anemia, reduce the amount of circulating HbS and improve oxygenation capacity. Nevertheless, a recognized complication of transfusion is the alloimmunization against erythrocyte antigens, which may lead to hemolytic transfusion reaction. Prophylactic phenotyping is the method of prevention against alloimmunization in patients with sickle cell disease. However, these strategies are not effective since studies have shown that alloimmunizations against antigens of the Rh and Kell systems continue to occur in patients with sickle cell disease, despite transfusions were performed with compatible phenotype. This study genotyped the Rh (C/c and E/e) and Kell (K/k) antigens of 77 sickle cell disease patients and these results were compared to the erythrocyte phenotype. The alloimmunization rate was 36.4% and the specificity of the antibodies identified was mainly against the Rh system (55.17%); anti-Kell was found in only 5 patients (8.62%). There were 17 discrepancies between genotype and phenotype. As a result of these evaluations, a personal card containing information about the phenotype deduced from the genotype was made in order to be taken by the patients to their appointments at the public health network outside Federal District. Furthermore, this personal card will assist in the choice of compatible blood component.

Keywords: Sickle cell disease. Alloimmunization. Genotype.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da doença falciforme	15
Figura 2: Processo de falcização dos eritrócitos	17
Figura 3: Fisiopatologia da doença falciforme	18
Figura 4: Genes Rh	23
Figura 5: Complexo Kell-XK.	24
Figura 6: Estratégia experimental do estudo.	29
Figura 7: PCR E/e	31
Figura 8: RFLP E/e.....	32
Figura 9: PCR K/k	33
Figura 10: RFLP K/k.....	34
Figura 11: PCR C/c	35
Figura 12: Produto da dissertação	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers e enzimas de restrição utilizadas com seus produtos resultantes.	35
Tabela 2. Perfil de aloimunização de acordo com gênero e faixa etária	37
Tabela 3. Aloimunizações de acordo com os diferentes grupos sanguíneos.....	38
Tabela 4. Discrepâncias entre fenótipo e genótipo	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ABO	Sistema de grupo sanguíneo
Ac.	Ácido
AVC	Acidente Vascular Cerebral
bp	Base pair
CD 81	Cluster of Differentiation 81
Chido/Rodgers	Sistema de grupo sanguíneo (Ch/Rg)
Co	Sistema de grupo sanguíneo Colton
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4
Di	Sistema de grupo sanguíneo Diego
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Deoxyribonucleotide Triphosphate
Do	Sistema de grupo sanguíneo Dombrock
Duffy	Sistema de grupo sanguíneo (Fy)
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
G	Guanina
H	Sistema de grupo sanguíneo
Hb	Hemoglobina
HbC	Hemoglobina C
HbS	Hemoglobina S
HbS/ β -talassemia	Forma heterozigota da doença falciforme associada a β -talassemia
HbSC	Forma heterozigota da doença falciforme
HbSD	Forma heterozigota da doença falciforme
HbSE	Forma heterozigota da doença falciforme

HbF	Hemoglobina F
HbSO	Forma heterozigota da doença falciforme
HbSS	Forma homozigota da doença falciforme
HLA	Human Leukocyte Antigen
I	Sistema de grupo sanguíneo
IgG	Imunoglobulina G
ISBT	International Society of Blood Transfusion
Kb	Kilobase
Kidd	Sistema de grupo sanguíneo (Jk)
Lewis	Sistema de grupo sanguíneo (Le)
Lu	Sistema de grupo sanguíneo Lutheran
MNS	Sistema de grupo sanguíneo
MSH	Multicenter Study of Hydroxyurea
NO	Óxido Nítrico
P	Sistema de grupo sanguíneo
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMPs	Paramagnetic Particles
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RTH	Reação Transfusional Hemolítica
SISTHEMO	Sistema informatizado
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRIM 21	Tripartite Motif-containing protein 21
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
Xg	Sistema de grupo sanguíneo
Xk	Sistema de grupo sanguíneo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Doença Falciforme	14
1.1.1. Distribuição Geográfica.....	14
1.1.2. Fisiopatologia.....	16
1.1.3. Tratamento.....	19
1.2. Antígenos Eritrocitários	21
1.2.1. Sistema Rh	22
1.2.2. Sistema Kell	23
1.3. Aloimunização.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. Casuística.....	30
4.2. Dados de Aloimunização.....	30
4.3. Extração de DNA.....	31
4.4. Determinação dos antígenos E/e – PCR – RFLP.....	32
4.5. Determinação dos antígenos K/k – PCR – RFLP.....	34
4.6. Determinação dos antígenos C/c - PCR – SSP	35
4.7. Análise dos dados.....	35
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Falciforme

Doença falciforme é um termo que compreende as síndromes caracterizadas pela presença intra-eritrocitária de Hemoglobina S, um tetrâmero composto de cadeias globina beta (β) mutadas (β^S), e incluem a doença homozigota (HbSS) e as formas heterozigotas: HbSC, HbS/ β -talassemia, HbSD, HbSO e HbSE (NOVELLI; GLADWIN, 2016). A forma mais comum e grave é causada pela homozigose da mutação da cadeia β^S , geralmente referida como anemia falciforme. Os outros tipos importantes ocorrem quando a HbS é co-herdada com uma mutação beta-talassêmica ou com a mutação da hemoglobina C (HbC). Em todos os tipos de doença falciforme, o processo fisiopatológico fundamental é a polimerização da molécula de hemoglobina desoxigenada (REES; ROBINSON; HOWARD, 2018).

As crises vaso-oclusivas ocorrem devido a um processo conhecido como falcização. Isso ocorre, pois as hemácias contendo a hemoglobina S possuem a capacidade reversível de modificar o seu formato, em resposta a alterações da pressão parcial do oxigênio. Quando a pressão do oxigênio é reduzida, essas células alteram a sua forma normal de disco bicôncavo para uma forma falcizada (de foice) (PAULING et al., 1949). Através de uma complexa interação de eventos adesivos entre as células sanguíneas, esses eritrócitos alterados podem obstruir os vasos sanguíneos produzindo episódios de dor, anemia hemolítica, lesões em órgãos e mortalidade precoce (MANWANI; FRENETTE, 2013).

1.1.1. Distribuição Geográfica

Estima-se que 100.000 americanos tenham doença falciforme. Ela ocorre em aproximadamente um a cada 365 afro-americanos e em um a cada 16.300 hispânicos americanos. A doença falciforme é mais comumente encontrada em indivíduos com ascendência da África subsaariana, da região mediterrânea (Grécia, Itália e Turquia), do Oriente Médio (Arábia Saudita), do Sul da Ásia, da América do Sul, do Caribe e da América Central. Porém, a presença da doença não é exclusivamente limitada à população desses grupos regionais (BENENSON; PORTER, 2018).

No Brasil, a incidência da doença falciforme é de aproximadamente de 1 a 3 para cada 1000 nascidos vivos. No estado da Bahia, onde predomina a ascendência africana, essa taxa chega a 1 para cada 650 recém-nascidos. A prevalência no estado do Rio de Janeiro é a segunda mais alta do Brasil depois do estado de Minas Gerais. Em 2016, cerca de 4000 pacientes com doença falciforme foram tratados no HEMORIO, esse número representa em torno de 80% dos pacientes do estado do Rio de Janeiro (ARDUINI; RODRIGUES; TROVÓ DE MARQUI, 2017; LOBO et al., 2018).

Não há dados recentes acerca da prevalência e distribuição da doença falciforme no Distrito Federal. Em estudo realizado com a população do Distrito Federal entre 2004 e 2006, de 137.040 crianças nascidas foram identificadas 3.760 (3,23%) portadoras do traço falciforme e 109 (0,09%) com anemia falciforme. Entre os fatores que podem explicar a elevada prevalência do traço falciforme encontrada no Distrito Federal naquele momento estão a posição geográfica e a rota migratória (DINIZ et al., 2009).

Fonte: (KATO, 2018)

Figura 1: Distribuição geográfica da doença falciforme.

1.1.2 Fisiopatologia

A doença falciforme está associada com a inversão de um par de bases ($A=T \rightarrow T=A$) no gene da cadeia de globina β . Assim, o sexto códon dessa cadeia (GAA) torna-se GTA, e consequentemente, o sexto aminoácido codificado (ácido glutâmico, carregado negativamente) é substituído pela valina. Essa substituição faz com que ocorra uma ligação hidrofóbica entre a fenilalanina na posição 85 e a leucina na posição 88, levando ao surgimento de um polímero de HbS que deforma as hemácias e provoca crises vaso-oclusivas no capilar venoso (RENAUDIER, 2014) (Figura 1).

A doença falciforme é caracterizada por forma intermitente, aguda e episódios largamente imprevisíveis da doença, principalmente a vaso-oclusão causando dor isquêmica e disfunção orgânica, como a síndrome torácica aguda; o nível de hemoglobina pode cair durante esses episódios agudos. Tais problemas ocorrem em um contexto de vasculopatia crônica e progressiva e lesão orgânica que inicia na primeira infância com hiperesplenismo e continuam ao longo da vida causando comprometimento renal, dano pulmonar, doença óssea, doença cerebrovascular e morte prematura (REES; ROBINSON; HOWARD, 2018).

Fonte: (LOBO, CLARISSE; MARRA, VERA; SILVA, 2007) (Adaptado)

Figura 2: Processo de falcização dos eritrócitos. Esquemática da substituição do sexto aminoácido codificado da cadeia beta (ácido glutâmico pela valina) com consequente formação de polímeros de HbS, na ausência de oxigênio, e alteração morfológica do eritrócito levando a vaso-oclusão

A propensão para polimerização da HbS é insuficiente para explicar a heterogeneidade clínica encontrada entre pessoas com doença falciforme. Há evidências crescentes de estudos que o estresse oxidativo e a inflamação estão associadas a fisiopatologia da doença. Evidências recentes sugerem que hemácias falciformes e micropartículas derivadas de eritrócitos iniciam uma cascata que ativa neutrófilos, monócitos e plaquetas, que então secretam várias citocinas e quimiocinas. Concomitantemente, a hemólise crônica libera grandes quantidades de hemoglobina livre ligando-se ao óxido nítrico (NO), potente vasodilatador. Citocinas solúveis, quimiocinas e baixos níveis de óxido nítrico potencializam a inflamação, a disfunção endotelial, e eventualmente, a lesão de órgãos alvo (AZAR; WONG, 2016) (Figura 2).

Fonte: (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010) (Adaptado).

Figura 3: Fisiopatologia da doença falciforme. As consequências da polimerização da HbS, hiperviscosidade, vaso-oclusão, hemólise e disfunção endotelial são mostradas. A desoxigenação faz com que a HbS polimerize causando a falcização da hemácia. A vaso-oclusão resulta da interação entre as hemácias falcizadas, os leucócitos e o endotélio vascular. Essa oclusão, então, leva ao infarto, hemólise e inflamação; A inflamação aumenta a expressão de moléculas adesivas, aumentando ainda mais a tendência dos eritrócitos falcizados a aderirem ao endotélio, piorando a vaso-oclusão. A reperfusão do tecido isquêmico gera radicais livres e dano oxidativo. As hemácias danificadas liberam hemoglobina livre no plasma, que se liga fortemente ao óxido nítrico causando deficiência de óxido nítrico funcional e contribuindo para o desenvolvimento da vasculopatia. NO: óxido nítrico; VCAM: molécula de adesão celular.

A fisiopatologia complexa dessa doença envolve ativação normal da cascata de coagulação e fibrinólise evidenciada pelo aumento do risco de manifestações trombóticas. É importante enfatizar que quase todos os componentes da hemostasia são alterados e um ambiente pró-inflamatório crônico com níveis plasmáticos aumentados de vários marcadores inflamatórios (por exemplo, citocinas, quimiocinas e endotelina-1) é continuamente favorecido, sendo capaz de ativar a coagulação (TOLEDO et al., 2019).

1.1.3. Tratamento

Atualmente, as opções disponíveis de tratamento para a doença falciforme são: i) a utilização da Hidroxicarbamida, mais conhecida como Hidroxiureia; ii) a transfusão sanguínea simples ou de troca manual ou automatizada e; iii) o transplante de células-tronco hematopoéticas. Uma futura abordagem com potencial curativo seria a terapia gênica, que encontra-se em fase de estudos clínicos (AZAR; WONG, 2016)

A Hidroxiureia, um redutor da ribonucleotídeo redutase, tem múltiplos efeitos fisiológicos, incluindo o aumento da hemoglobina fetal (HbF) na maioria dos indivíduos com anemia falciforme e a diminuição da contagem de leucócitos. O medicamento induz a HbF recrutando uma população de precursores eritróides que podem continuar a síntese da cadeia γ na idade adulta, que de outro modo, permanecem quiescentes na medula. O Estudo Multicêntrico de Hidroxiureia (MSH) foi o ensaio seminal randomizado que demonstrou uma redução de eventos vaso-occlusivos em quase 50%. Ele também mostrou um aumento na hemoglobina total e HbF e uma redução na incidência de síndrome torácica aguda, necessidade de transfusão e mortalidade, quando comparados com aqueles em placebo (AZAR; WONG, 2016; KATO et al., 2016).

O transplante de células-tronco hematopoéticas continua sendo a única abordagem potencialmente curativa da doença falciforme disponível até o momento. A decisão de proceder ao transplante é repleta de dificuldades, e a disponibilidade de doadores compatíveis pode ser uma limitação. Juntos, esses fatores podem explicar porque um número relativamente pequeno de pacientes foi transplantado até hoje (HAY; ATOYEBI, 2016; SHETH; LICURSI; BHATIA, 2013). Seu objetivo na doença falciforme é a eliminação das hemácias e células progenitoras falcizadas. Essas células serão substituídas por células-troco normais que produzirão eritrócitos com correção total ou parcial do fenótipo anormal de hemoglobina S (ORINGANJE; NEMECEK; ONIYANGI, 2016).

O processo de transfusão sanguínea (utilização do concentrado de hemácias) é a componente chave para o controle global de pacientes com doença falciforme, e aumentou ao longo do tempo como meio de prevenção do acidente vascular cerebral (AVC), tanto primário quanto secundário (FASANO et al., 2015). Os principais objetivos da transfusão de concentrado de hemácias são o alívio da

anemia, a redução da HbS presente nas hemácias circulantes e a melhoria na capacidade de carreamento do oxigênio (CHOU; FASANO, 2016). A transfusão crônica eficaz (necessária para manter a percentagem de HbS inferior a 30%) além de prevenir o AVC melhora a qualidade de vida dos pacientes. Porém, uma complicação reconhecida desta, principalmente para pacientes falcêmicos, é a aloimunização contra antígenos eritrocitários (NICKEL et al., 2016).

Existem duas formas de administração da transfusão em pacientes falcêmicos: a transfusão simples e a transfusão de troca manual ou automatizada. Numa situação aguda (Hb baixa), por necessidade de melhora na capacidade de transporte de oxigênio, opta-se por uma transfusão simples (a qual reduz moderadamente a porcentagem de HbS e aumenta a viscosidade sanguínea). A troca manual é um procedimento realizado através da flebotomia e substituição isovolumétrica com transfusão de eritrócitos. Uma transfusão de troca automatizada (numa máquina de eritrocitaférese) oferece vantagens sobre as outras, pois além de ser um procedimento mais rápido, diminui facilmente os níveis de hemoglobina S e leva à uma sobrecarga de ferro menor (REES; ROBINSON; HOWARD, 2018). Para os pacientes que fazem terapia transfusional por longos períodos, a sobrecarga de ferro apresenta risco elevado devido à liberação de heme livre no plasma. Essa é a principal causa de dano tecidual e deve ser gerenciada. Portanto, é essencial que esses pacientes façam a utilização de algum agente quelante (FERNANDES, 2017).

Alternativamente, a transferência terapêutica de genes *ex vivo* para células-tronco hematopoéticas autólogas (terapia gênica), têm sido apontados como possibilidade futura de tratamento de longo prazo e potencialmente curativo para a doença falciforme. Foi demonstrado que a terapia gênica baseada na transferência de lentivírus com uma hemoglobina modificada, capaz de codificar uma variante de hemoglobina β normal, levando à remissão clínica e reduzindo a presença dos marcadores biológicos da doença. No entanto, é necessário que haja um maior acompanhamento para se confirmar a durabilidade da eficácia e o perfil de segurança observados, como também, são necessárias outras avaliações adicionais em terapia gênica (JEAN-ANTOINE RIBEIL, SALIMA HACEIN-BEY-ABINA, EMMANUEL PAYEN et al., 2017).

1.2. Antígenos Eritrocitários

Depois da descoberta do sistema ABO, uma multiplicidade de antígenos de grupos sanguíneos foi descrita e muitas terminologias foram utilizadas. A Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) lista hoje mais de 360 antígenos de grupos sanguíneos classificados em 36 sistemas. Cada sistema é uma entidade genética de 1, 2 (Rh, Xg, Chido/Rodgers) ou 3 genes (MNS) fortemente ligados. Os sistemas Rh e MNS são os mais complexos com 55 e 49 antígenos, respectivamente. Alguns antígenos, para os quais os dados ainda são escassos, estão temporariamente classificados em coleções (MULLER; CHIARONI; GARRAUD, 2015; STORRY et al., 2019).

Cinco sistemas de grupos sanguíneos (ABO, Lewis, H, I e P) são definidos por estruturas de carboidratos, enquanto alguns são definidos por variação das estruturas protéicas, como Rh, Kell, Duffy, Kidd entre outros (MATTEOCCI; PIERELLI, 2014).

Especialmente anticorpos contra Rh, Kell, Duffy, Kidd e uma série de outros antígenos de grupo sanguíneo são considerados clinicamente significativos: dependendo da especificidade, classe de imunoglobulina e contexto clínico, tais anticorpos podem provocar não só reações hemolíticas transfusionais, mas também doença hemolítica do feto e do recém-nascido potencialmente fatal (KÖRMÖCZI; MAYR, 2014). Há também descrições de reações transfusionais hemolíticas tardias causadas por anticorpos contra antígenos dos sistemas LU (Lutheran), DI (Diego), CO (Colton) e DO (Dombrock) (AVENT, 2009).

Várias metodologias para detecção de antígenos eritrocitários são conhecidas. O método clássico é a fenotipagem, atualmente, realizada por testes de hemaglutinação, que detectam o produto gênico através da ligação de antissoros a antígenos específicos. A limitação dos testes sorológicos é encontrar anticorpos específicos para antígenos eritrocitários raros. Além disso, nem sempre são capazes de determinar o fenótipo devido a menor expressão de antígeno na superfície das hemácias, ou ainda, a transfusões recentes (menos de 3 meses) (QUIRINO et al., 2019).

Os esforços para a prevenção da aloimunização em pacientes com doença falciforme concentram-se na fenotipagem profilática. Essa profilaxia realizada para os antígenos Rh e Kell tem demonstrado diminuição da aloimunização nesses

pacientes, no entanto, essas estratégias não são tão eficazes como o previsto. Pelo menos três estudos têm mostrado que a aloimunização contra antígenos dos sistemas Rh e Kell continua ocorrendo em pacientes com doença falciforme, apesar das transfusões terem sido de fenótipo compatível (CASAS et al., 2015; TORMEY; HENDRICKSON, 2015).

A grande diversidade de grupos sanguíneos é resultado de diferentes mecanismos, o mais frequentemente identificado é o polimorfismo de único nucleotídeo (SNPs). Adicionalmente, também pode ocorrer deleção de genes, rearranjo com recombinação e mecanismos de conversão, tipicamente encontrado no sistema Rh que podem afetar a expressão dos antígenos (BAKANAY et al., 2013).

1.2.1. Sistema Rh

O sistema Rh é um dos mais importantes e complexos sistemas de grupos sanguíneos composto por dois genes homólogos *RHD* e *RHCE* que codificam as proteínas RhD e RhCE (ARNONI et al., 2016). Cada um dos genes é constituído de 10 éxons em orientações opostas e eles compartilham 97% de homologia de sequência nucleotídica. Por conta dessas características, e também da proximidade entre os genes ocorre o surgimento de muitas variantes e o desenvolvimento de alelos híbridos em ambos os loci (FASANO; CHOU, 2016) (Figura 3).

Genes variantes de *RHD* e *RHCE* são comuns em negros africanos e pessoas de etnias mistas. A prevalência de alelos *RH* que codificam antígenos D, C e e e mutados nesse grupo de pacientes explica o porque de pacientes com doença falciforme desenvolverem aloimunização contra o sistema Rh apesar de transfundirem unidades fenótipo compatível (WESTHOFF, 2006). Dois tipos de D variantes, parcial e fraco são codificados por mutações de ponto, mutações múltiplas *missense* ou alelos híbridos de genes *RHD* e *RHCE*. Dentro dos D variantes, DAR, DIII^a, DVI^a e alguns tipos de DAU podem desencadear aloimunização anti- D em pacientes africanos com doença falciforme. Algumas variantes são associadas com o gene *RHCE* como os antígenos C parcial e e parcial (MATTEOCCHI; PIERELLI, 2014).

Alelos RH alterados codificam a expressão fraca e/ou parcial dos antígenos D, C e e, menos frequentemente, c e E. O termo parcial descreve células vermelhas

que não possuem alguns epítomos comuns associados à expressão de um antígeno (CHOU et al., 2017).

Fonte: (CHOU; WESTHOFF, 2009) (Adaptado).

Figura 4: Genes Rh. A figura ilustra a orientação oposta dos genes *RHD* e *RHCE* e a deleção do *RHD* associada ao fenótipo RhD negativo. O modelo das proteínas transmembrana RhD e RhCE também podem ser visualizados e as diferenças de aminoácidos entre RhD e RhCE.

1.2.2. Sistema Kell

O sistema Kell é altamente polimórfico e expressa mais de 38 antígenos como resultado de mudanças de nucleotídeo no gene *KEL*. Tal gene engloba 19 éxons localizados no cromossomo 7q33 distribuídos em aproximadamente 21.5 kb de DNA. Quase todos os antígenos Kell são codificados por polimorfismos de único nucleotídeo, assim como o KEL1 (K, "Kell") e o KEL2 (k, "celano") que são codificados pelo c.578T (p.193Met) ou c.578C (p.193Thr) no éxon 6 do gene *KEL*, respectivamente. Esse gene codifica uma glicoproteína de membrana do eritrócito, de única passagem (tipo II) com 732 aminoácidos, que possui uma estrutura terciária complexa devido às várias ligações dissulfeto (JI et al., 2015; SILVY et al., 2016) (Figura 4).

A mudança de base única cria um sítio de enzima de restrição (BsmI), e vários procedimentos de genotipagem foram desenvolvidos para se detectar o

genótipo KEL 1. Esse procedimento foi de extrema importância para a determinação pré-natal dos genótipos KEL1/ KEL2 (LEE; RUSSO; REDMAN, 2000).

O antígeno K (KEL 1), o mais imunogênico, tem uma frequência de cerca de 9% na população caucasiana, sendo uma causa comum de produção de anticorpos quando as transfusões não são realizadas com fenótipo compatível. No entanto, seu antitético k (KEL 2) tem uma frequência maior que 99%. Anticorpos contra o sistema Kell são normalmente IgG, e podem causar reações transfusionais hemolíticas severas, assim como doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN). O anticorpo mais importante é o anti-KEL1, o qual é clinicamente significativo (ARNONI et al., 2013; DANIELS, 2009; LEE; RUSSO; REDMAN, 2000).

Fonte: (BONIFÁCIO; NOVARETTI, 2009; RUSSO; REDMAN; LEE, 1998) (Adaptado).

Figura 5: Complexo Kell-XK. Diagrama do complexo Kell-XK. Nos eritrócitos, a proteína XK está covalentemente ligada à glicoproteína Kell por uma ponte dissulfeto formando um complexo que afeta suas expressões reciprocamente. Os domínios transmembranares de Kell e XK são descritos como cilindros.

1.3. Aloimunização

Para que o receptor de transfusão sanguínea produza um aloanticorpo, é necessário que haja uma exposição a antígenos de hemácias não próprios. Os pacientes de doença falciforme são expostos constantemente a múltiplos antígenos, no entanto, alguns pacientes com ascendência africana são mais susceptíveis ao desenvolvimento de anticorpos devido à presença de variantes de Rh (BALBUENA-MERLE; HENDRICKSON, 2019).

A aloimunização eritrocitária pode causar sérias reações transfusionais hemolíticas (RTHs), as quais podem ser fatais e levar a síndrome de hiper-hemólise (NICKEL et al., 2016). Fatores de risco que influenciam a aloimunização em falcêmicos não foram descritos até o momento. Evidências preliminares sugerem que o sistema imune do paciente e a variância em certos genes podem ser potenciais determinantes para o desenvolvimento de anticorpos contra antígenos eritrocitários (SINS et al., 2016).

Alguns pacientes, chamados de respondedores, desenvolvem anticorpos contra antígenos eritrocitários precocemente após poucas transfusões, enquanto outros nunca aloimunizam, favorecendo o conceito de predisposição genética à aloimunização. Alguns estudos genéticos também identificaram polimorfismos que codificam proteínas moduladoras incluindo TRIM21, CD81, CTLA-4, bem como, certos alelos HLA associados com aloimunização em doença falciforme (PIRENNE; YAZDANBAKHSI, 2018).

Atualmente, é impossível prever o risco de aloimunização individual, portanto a imunogenicidade do antígeno é um fator importante que orienta as decisões na medicina transfusional, juntamente com as possíveis consequências clínicas da aloimunização (FLOCH et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

A abordagem sorológica para a determinação dos antígenos eritrocitários de determinada amostra tem-se como técnica de escolha por uma série de razões, incluindo confiabilidade, custo e conhecimento. Embora a hemoaglutinação seja o método de referência para detecção da presença ou ausência de antígenos de grupos sanguíneos expressos na superfície do eritrócito, as técnicas tradicionais de imunohematologia falham em certas situações: pacientes recentemente transfundidos, interferência de autoanticorpos e até mesmo, ausência de reagentes comerciais para fenótipos raros (AVENT, 2009; TOURNAMILLE, 2013).

A fenotipagem eritrocitária dos antígenos Rh e Kell em pacientes falciformes tem demonstrado diminuição da aloimunização. Porém, estudos demonstraram que essas estratégias podem não ser tão eficazes, uma vez que a aloimunização contra antígenos dos sistemas Rh e Kell continua ocorrendo em pacientes com doença falciforme, mesmo após a realização da transfusão sanguínea ser realizada com unidades fenótipo compatível (CASAS et al., 2015; TORMEY; HENDRICKSON, 2015).

Na tentativa de minimizar a aloimunização, a genotipagem molecular foi introduzida no Brasil em 2002 para o tratamento de pacientes com doença falciforme que necessitam de múltiplas transfusões, permitindo a determinação do genótipo do grupo sanguíneo verdadeiro, auxiliando na identificação de aloanticorpos suspeitos e ajudando a diminuir o risco de reações transfusionais, especialmente reações tardias a aloanticorpos existentes e para evitar a aloimunização (CASTILHO; DINARDO, 2018).

Métodos genéticos moleculares baseados em DNA fornecem uma ferramenta importante para terapia transfusional de pacientes com anemia falciforme. Embora seja uma grande ferramenta no estudo de antígenos eritrocitários, é importante reconhecer suas limitações. Várias alterações genéticas podem ser encontradas para muitos sistemas de grupos sanguíneos, levando ou não à aloimunização ou afetar o fenótipo. Assim, a utilização de técnicas moleculares não tem o intuito de substituir métodos sorológicos, mas sim de combinar as duas metodologias para fornecer sangue compatível e evitar aloimunização adicional (CHOU; WESTHOFF, 2011).

Como tentativa na redução da aloimunização eritrocitária e do risco de reação transfusional hemolítica nos pacientes com anemia falciforme, faz-se necessário esse estudo visando comparar genótipo e fenótipo para se estabelecer um perfil de polimorfismo em relação aos antígenos C/c, E/e e Kell, facilitando a busca por unidades compatíveis de hemocomponentes e melhorando a sobrevida desses pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver estratégias para reduzir a taxa de aloimunização pelos antígenos Rh (C, c, E, e) e Kell (K, k) e o risco de reação transfusional hemolítica nos pacientes com anemia falciforme em acompanhamento no Hospital de Base do Distrito Federal.

3.2. Objetivos específicos

- Genotipar os antígenos eritrocitários do sistema Rh (especificamente C, c, E, e) e do sistema Kell (K, k) e levantar o perfil de aloimunização dos pacientes com anemia falciforme em acompanhamento no Hospital de Base do Distrito Federal;
- Analisar discrepâncias entre fenótipo eritrocitário e genótipo;
- Avaliar a aloimunização em pacientes com discrepância;
- Elaborar um cartão de receptor (carteirinha) para que o paciente leve em todos os seus atendimentos e que contenha o fenótipo/genótipo deduzido do genótipo;

4. METODOLOGIA

O presente estudo foi desenvolvido de acordo com a estratégia experimental demonstrado na figura 5.

Figura 6: Estratégia experimental do estudo.

4.1. Casuística

O estudo realizado é de caráter descritivo com variáveis qualitativas nominais. Foi utilizado um roteiro como instrumento de coleta contendo as variáveis relativas aos pacientes. Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Distrito Federal sob CAAE: 63463316.7.0000.5553, foram incluídos os pacientes com doença falciforme (SS, SC), maiores de 18 anos, de ambos os sexos, que realizavam acompanhamento na Unidade de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base do Distrito Federal. Foram excluídos os pacientes com doença falciforme menores de 18 anos, os pacientes acompanhados por outras unidades de Hematologia e os pacientes que não forneceram seus dados corretos para contato. Por fim, 77 pacientes de doença falciforme participaram do estudo após eles mesmos ou seus responsáveis (no caso daqueles com limitações impostas pela doença) serem orientados acerca da importância do projeto e terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2. Dados de Aloimunização

Os dados referentes às aloimunizações (quantidade e identificação de anticorpos) e o fenótipo de cada paciente foram coletados do sistema informatizado utilizado na Hemorrede do Distrito Federal e na Fundação Hemocentro de Brasília, SISTHEMO - Módulo Transfusional. A pesquisa foi realizada no momento da coleta da amostra, e posteriormente, foi atualizada.

4.3. Extração de DNA

As amostras de sangue foram coletadas em um tubo de EDTA (5mL), e em seguida foram utilizadas para extração de material genético (ácido desoxirribonucleico) por meio de sangue total. Foi utilizada uma metodologia automatizada para extração do DNA, com utilização do kit Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit (Promega) em conjunto com o extrator automatizado Maxwell®. Em suma, o processo consiste na utilização de partículas paramagnéticas (PMPs) que fornecem uma fase sólida móvel que aperfeiçoa a captura, e posterior lavagem e eluição do DNA alvo. Foram utilizados 400 µL de sangue total e 300 µL de tampão

de eluição. Ao final das extrações, obtínhamos 200 µL de material genético eluído. Posteriormente, as amostras extraídas foram quantificadas utilizando-se o equipamento NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific).

4.4. Determinação dos antígenos E/e – PCR – RFLP

Para determinação dos antígenos RHCE*E/e foram adicionados em cada tubo 5 µL de buffer 10X, 1,5 µL de MgCl₂, 6 µL de dNTPs (1,25mM), 6 µL (2,5pMol) de cada um dos primers (tabela 1), 0,5 µL de Taq polimerase, 5 µL de DNA (100 a 300ng/µL) e água para um volume final de 50 µL. As condições de ciclagem foram as seguintes: 95° C por 7 minutos e 30 segundos seguido de 35 ciclos de 96° C por 1 minuto, 61° C por 30 segundos e 72° por 2 minutos; em seguida 72° C por 10 minutos para extensão final. Os produtos da amplificação foram observados por fotodocumentação após corrida em gel de agarose a 2 % corado com GelRed (Biotium, Fremont, CA), conforme demonstrado na Figura 6.

Fonte: acervo pessoal.

Figura 7: PCR E/e. Produtos de PCR amplificados para determinação dos antígenos RHCE*E/e. A diferenciação dos alelos é feita após a digestão desse produto com a enzima de restrição *MNLI*, sendo realizada uma nova eletroforese para visualização.

Após a observação da amplificação do material genético, foram realizadas as digestões com a enzima de restrição *MNLI*, específica para o polimorfismo RHCE*E/e. Assim, foram utilizados em cada tubo 1,2 µL de Buffer 10X, 0,2 µL da enzima *MNLI*, 5,6 µL de água e 5 µL do produto de PCR. Após a homogeneização, a

reação foi aquecida a 37°C por 30 minutos e os resultados foram observados após eletroforese em gel de agarose a 3,5% corado com GelRed (Biotium, Fremont, CA) (Figura 7).

Fonte: acervo pessoal.

Figura 8: RFLP E/e. Eletroforese em gel de agarose a 3,5% após RFLP, os dois fragmentos de 155 e 118 bp são utilizados para se identificar os dois alelos (RHCE*E/RHCE*e). As amostras de 1 a 5 possuem apenas o fragmento maior, sendo classificadas como homozigotas e (RHCE*e/RHCE*e)

4.5. Determinação dos antígenos K/k – PCR – RFLP

Para determinação dos antígenos KEL*01/KEL*02 foram adicionados em cada tubo 2,5 µL de buffer 10X, 0,75 µL de MgCl₂, 2 µL de dNTPs (1,25mM), 1 µL (2,5pMol) de cada um dos primers (tabela 1), 0,3 µL de Taq polimerase, 2 µL de DNA (100 a 300ng/ µL) e água para um volume final de 25 µL. As condições de ciclagem foram as seguintes: 94° C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94° C por 40 segundos, 61,5° C por 50 segundos e 72° por 1 minuto; em seguida 72° C por 10 minuto para extensão final. Os produtos da amplificação foram observados por fotodocumentação após corrida em gel de agarose a 2 % corado com GelRed (Biotium, Fremont, CA) (Figura 8).

Fonte: acervo pessoal.

Figura 9: PCR K/k. Produtos de PCR amplificados para determinação dos antígenos KEL*01/KEL*02. A diferenciação dos alelos é feita após a digestão desse produto com a enzima de restrição *Mva* 12691, sendo realizada uma nova eletroforese para visualização.

Após a observação da amplificação do material genético, foram realizadas as digestões com a enzima de restrição *Mva* 12691, específica para o polimorfismo KEL*01/KEL*02. A reação foi realizada da seguinte forma: foram utilizados em cada tubo 1,2 µL de Buffer 10X, 0,3 µL da enzima *Mva* 12691, 5,5 µL de água e 5 µL do produto de PCR. Após a homogeneização, a reação foi aquecida a 37°C por 30 minutos e os resultados foram observados após eletroforese em gel de agarose a 3,5% corado com GelRed (Biotium, Fremont, CA) (Figura 9).

Fonte: acervo pessoal.

Figura 10: RFLP K/k. Eletroforese em gel de agarose a 3,5% após RFLP. Os antígenos Kell e Celano são identificados a partir dos fragmentos mostrados. O controle positivo possui os três fragmentos de 156, 98 e 58 bp (heterozigoto KEL*01/KEL*02), no entanto, a maior parte da população possui apenas o fragmento maior (156bp) ou KEL*02/KEL*02, como as amostras de 1 a 5.

4.6. Determinação dos antígenos C/c - PCR – SSP

A metodologia de PCR-SSP ou PCR de sequências específicas foi utilizada para se determinar os antígenos RHCE*C/c. Para tal, foi utilizado um par de primers específico para cada tipo de alelo (tabela 1). Em cada tubo foram adicionados 5 µL de buffer 10X, 1,5 µL de MgCl₂, 3 µL de dNTPs (1,25mM), 2 µL (2,5pMol) de cada um dos primers, 0,5 µL de Taq polimerase, 5 µL de DNA (100 a 300ng/ µL) e água para um volume final de 50 µL. As condições de ciclagem foram as seguintes: 95° C por 15 minutos seguido de 30 ciclos de 94° C por 1 minuto, 65° C por 1 minuto e 72° por 3 minutos e 30 segundos; em seguida 72° C por 10 minutos para extensão final. Os produtos da amplificação foram observados por fotodocumentação após corrida em gel de agarose a 2 % corado com GelRed (Biotium, Fremont, CA) (Figura 10).

Fonte: acervo pessoal

Figura 11: PCR C/c. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com GelRed. PCR SSP para análise dos antígenos C e c. O controle positivo é uma amostra heterozigota (RHCE^{*C}/ RHCE^{*c}) identificada pelos dois fragmentos de 356 e 177 bp. A Amostra 1 possui apenas o fragmento menor de 177bp, classificada como homozigota para o alelo c (RHCE^{*c}/ RHCE^{*c}); as outras amostras tem o mesmo padrão do controle positivo, sendo classificadas como heterozigotas (RHCE^{*C}/ RHCE^{*c}).

Tabela 1. Primers e enzimas de restrição utilizadas com seus produtos resultantes.

Grupo sanguíneo	Iniciadores	Produto	Enzima de restrição	RFLP
RHCE ^{*C}	5'-TCGGCCAAGATCTGACCG-3' 5'-TGATGACCACCTTCCCAGG-3'	177pb	-	-
RHCE ^{*c}	5'- CAGGGCCACCACCATTTGAA-3' 5'-GAACATGCCACTTCACTCCAG-3'	356pb	-	-
RHCE ^{*E/e}	5'- GGCAACAGAGCAAGAGTCCA-3' 5'- CTGATCTTCCTTTGGGGGTG-3'	474pb	<i>MNLI</i>	155pb + 118pb
KEL ^{*01/02}	5'- AAGCTTGGAGGCTGGCGCAT-3' 5'- CCTCACCTGGATGACTGGTG-3'	156pb	<i>Mva16691</i>	156pb + 98pb + 58pb

4.7. Análise dos dados

Os resultados de genotipagem foram visualizados através de observação direta em gel de agarose. Os dados de genótipo encontrados foram comparados

com os dados da fenotipagem (obtidos no sistema informatizado SISTHEMO) e a porcentagem de discrepâncias entre fenótipo eritrocitário e genótipo foi calculada. A comparação das taxas de aloimunização entre homens e mulheres e entre as diferentes faixas etárias foram realizadas se utilizando de teste exato de Fisher (GraphPad Prism 7), considerando significativas as diferenças que apresentaram p valor < 0,05.

5. RESULTADOS

Foram selecionados 77 pacientes de doença falciforme, sendo 38 homens e 39 mulheres. Todos os indivíduos são adultos e foram segregados em duas faixas etárias, como mostrado na tabela 2. A primeira faixa etária (≤ 29 anos) foi composta por 35 pacientes, sendo 18 homens e 17 mulheres. A segunda faixa etária (≥ 30 anos) foi composta por 42 pacientes, sendo 20 homens e 22 mulheres. Apesar da taxa de aloimunização ser maior em mulheres (independente da faixa etária), não foram observadas diferenças significativas quando comparadas à taxa de aloimunização nos homens. Quando considerados todos os pacientes, foi observado que 26,3% (10/38) pacientes do sexo masculino foram aloimunizados, enquanto isso ocorreu em 46,2% (18/39) pacientes do sexo feminino; na faixa etária ≤ 29 anos, a aloimunização ocorreu em 22,2% (4/18) dos homens e em 41,2% (7/17) das mulheres; na faixa etária ≥ 30 anos, a aloimunização ocorreu em 30% (6/20) dos homens e em 50% (11/22) das mulheres. Não houve diferença estatística na taxa de aloimunização quando comparadas as duas diferentes faixas etárias, apesar de que pacientes com idade ≥ 30 anos apresentarem taxas maiores de aloimunização do que aqueles com idade ≤ 29 anos (40,5% e 31,4% respectivamente).

Tabela 2. Perfil de aloimunização de acordo com gênero e faixa etária.

	Homens	Mulheres	Total	p valor homens x mulheres
Idade ($\pm DP$)	31,68 ($\pm 8,98$)	34,25 ($\pm 11,90$)	32,98 ($\pm 10,57$)	
n	38	39	77	---
Aloimunizados (n)	10 (26,3%)	18 (46,2%)	28 (36,4%)	0,0977
Faixa etária				
≤ 29 anos	18	17	35	---
Aloimunizados (n)	4 (22,2%)	7 (41,2%)	11 ^a (31,4%)	0,2890
≥ 30 anos	20	22	42	---
Aloimunizados (n)	6 (30,0%)	11 (50,0%)	17 ^a (40,5%)	0,2225

^a p=0,4798

Ao todo, foram encontradas 58 aloimunizações (tabela 3), porém 4 delas (6,9%) não foram determinados o tipo de anticorpo por falhas da técnica ou por

conta da baixa titulação presente no soro do paciente. Dentre os antígenos que mais induziram a formação de anticorpos estão aqueles contra o sistema Rh, num total de 32 (55,17%) aloimunizações. Dentre eles, o anticorpo anti-C foi o mais produzido (12 / 20,69%), seguido do anti-E (7 / 12,06%). Outros anticorpos anti-Rh (13 / 22,41%) também foram encontrados, dentre eles, alguns anticorpos raros. Foram encontrados 5 (8,62%) anticorpos anti-Kell e 21 (36,20%) anticorpos contra outros sistemas.

Tabela 3. Aloimunizações de acordo com os diferentes grupos sanguíneos

	Anticorpos (n)						Total
	<i>Anti-C</i>	<i>Anti-E</i>	<i>Anti-Rh (outros)</i>	<i>Anti-Kell</i>	<i>Outros</i>	<i>Indeterminado</i>	
Número de Aloimunizações	12 (20,69%)	7 (12,06%)	13 (22,41%)	5 (8,62%)	17 (29,31%)	4 (6,90%)	58 (100%)
	Total sistema Rh			Total anti-Kell	Total outros sistemas		
	32 (55,17%)			5 (8,62%)	21 (36,20%)		

Os resultados de genotipagem obtidos foram comparados com os fenótipos; encontramos 9 (11,68%) discrepâncias para os antígenos C/c, 7 (9,09%) para os antígenos E/e e 1 (1,3%) para o K/k. Dentre os pacientes que apresentaram discrepâncias, um deles era aloimunizado contra o antígeno anti-C e o outro contra o anti-E, conforme observado na tabela 4.

Tabela 4. Discrepâncias entre fenótipo e genótipo

		Discrepantes (n)	
Sistema	Fenótipo vs genótipo		Aloimunizados
C/c	<i>C+ c+ vs RHCE*c/c</i>	6	1
	<i>C- c+ vs RHCE*C/c</i>	3*	0
	Total	9	1
E/e	<i>E+ e+ vs RHCE*e/e</i>	1	0
	<i>E- e+ vs RHCE*E/e</i>	6	1
	Total	7	1
Kell	<i>K- k+ vs KEL*01/02</i>	1*	0
	Total	1	0

* Um paciente possui discrepância entre fenótipo e genótipo para os sistemas C/c e Kell.

Por fim, após a obtenção dos dados de fenótipo no sistema SISTHEMO, e do genótipo a partir das técnicas moleculares, e como estratégia para a redução das taxas de aloimunização, foi confeccionado um modelo de carteirinha, para que o paciente possa levar em seus atendimentos fora da rede pública do Distrito Federal (Figura 10). A carteirinha personalizada ficará em posse do paciente, e terá um grande impacto na qualidade de vida do mesmo, podendo auxiliar no seu tratamento (terapia transfusional), e evitando possíveis complicações decorrentes de aloimunizações contra os antígenos estudados.

Figura 12: Produto da dissertação. Carteirinha confeccionada após a comparação dos dados de fenótipo e genótipo.

6. DISCUSSÃO

A ausência de sistema informatizado integrado nacionalmente que permita o acesso às informações importantes relacionadas ao paciente com anemia falciforme (principalmente histórico transfusional, fenótipo eritrocitário e aloimunizações) dificulta a escolha do hemocomponente compatível utilizado para o tratamento desses pacientes, o que pode levar ao desenvolvimento da aloimunização ou de reações hemolíticas naqueles já aloimunizados (FASANO et al., 2019). Dentre os antígenos eritrocitários considerados clinicamente significativos no processo de aloimunização e reação hemolítica estão os antígenos do sistema Rh e do sistema Kell (KÖRMÖCZI; MAYR, 2014). Assim, como estratégia para reduzir a taxa de aloimunização pelos antígenos Rh (C, c, E, e) e Kell (K, k) e o risco de reação transfusional hemolítica nos pacientes com anemia falciforme do Distrito Federal, este estudo desenvolveu um modelo de carteirinha, para que o paciente possa apresentar em seus atendimentos fora da rede pública do Distrito Federal. Nessa carteirinha estão presentes informações pessoais do paciente e informações do fenótipo eritrocitário deduzido do genótipo.

A genotipagem eritrocitária estendida de doadores e receptores têm sido a estratégia mais amplamente utilizada com o objetivo de prevenir futuras aloimunizações e diminuir o risco de reações transfusionais hemolíticas (BELSITO; MAGNUSSEN; NAPOLI, 2017). Um estudo mostrou que a criação de um registro informatizado de doadores de repetição genotipados (genotipagem estendida) evitou o desenvolvimento da aloimunização dos pacientes com doença falciforme e talassemia, uma vez que permitiu a melhor escolha dos hemocomponentes (PUTZULU et al., 2017).

Estratégias para evitar a aloimunização baseadas unicamente em fenotipagem também têm sido desenvolvidas. Uma alternativa que pode ser utilizada é o recrutamento de doadores fenotipicamente compatíveis específicos para pacientes falcêmicos com o intuito de limitar a exposição desses pacientes a diferentes antígenos, o que leva a diminuição da taxa de aloimunização clinicamente relevante (ROBERTS et al., 2012). Outro estudo avaliou o fornecimento de concentrado de hemácias de doadores afro-americanos aos pacientes falcêmicos como estratégia para diminuir as taxas de aloimunização, baseado no princípio de que existe uma maior probabilidade desses indivíduos (doadores e receptores)

possuírem alguns antígenos semelhantes (CHOU; FASANO, 2016). Porém, esse estudo retrospectivo demonstrou que essa estratégia leva a altas taxas de aloimunização, principalmente contra antígenos Rh (CHOU et al., 2013). Por fim, a leucorredução das unidades a serem transfundidas é um procedimento importante para a diminuição das taxas de aloimunização. Um estudo demonstrou que este procedimento reduziu de 37,5% para 26,2% as taxas de aloimunização (Campbell Lee 2018). As unidades utilizadas para transfusão dos pacientes falciformes em nosso estudo foram leucorreduzidas.

Como observado, estratégias baseadas somente em fenotipagem nem sempre são eficientes, e podem levar a aloimunização e risco de reação hemolítica em transfusões subsequentes. Em nosso estudo, em que foram avaliados pacientes somente fenotipados, observou-se altas taxas de aloimunização nos pacientes falciformes politransfundidos (36,4%). Uma taxa igualmente elevada (46%) foi observada em pacientes falciformes adultos brasileiros; esses pacientes já estavam aloimunizados antes de serem acompanhados por um protocolo de transfusão baseado em compatibilidade de antígenos, sugerindo aloimunização ainda no atendimento pediátrico (CASTILHO; DINARDO, 2018). Por outro lado, outro estudo realizado no Brasil revela uma menor taxa de aloimunização. Foi observada uma taxa de aloimunização de 17,18% em pacientes com hemoglobinopatias politransfundidos em Minas Gerais (NETO et al., 2018). Taxas menores de aloimunização em pacientes falciformes também são apresentadas por estudos americanos, variando de 16 a 19,9% (COLEMAN et al., 2019; DESAI et al., 2015).

Vários fatores podem explicar diferentes taxas de aloimunização nos diferentes estudos. A heterogeneidade de eficácia dos protocolos de profilaxia é um fator importante. Enquanto alguns centros possuem protocolos de genotipagem estendida, outros centros não possuem nenhum tipo de protocolo que vai de encontro às necessidades do paciente com anemia falciforme. Ainda, a ocorrência de transfusão desses pacientes fora da sua instituição de referência e a presença de variantes de Rh também são fatores importantes. Adicionalmente, a intensa miscigenação, principalmente na população brasileira, leva a grandes discrepâncias entre doadores e receptores, favorecendo o aumento das taxas de aloimunização (CASTILHO; DINARDO, 2018). Essa observação vai de encontro à estudos com populações com maior homogeneidade racial, como por exemplo estudos africanos que mostram taxas de aloimunização em pacientes falciformes de 6,1% e 5,3%

(NATUKUNDA et al., 2010; SERJEANT; NDUGWA, 2003). Em linha, um estudo jamaicano também encontrou taxas menores (2,6%), o que pode ser creditado à menor taxa de miscigenação (OLUJOHUNGBE et al., 2001). Por fim, o número de unidades transfundidas também está relacionado com as taxas de aloimunização. Estudos mostram que quanto maior o número de hemocomponentes transfundidos maiores são as taxas de aloimunização (BOATENG et al., 2019; SIRANSY et al., 2019; Y. M., 2017; ZALPURI et al., 2012). Porém, esse aspecto não foi avaliado em nosso estudo por não haver todos os episódios de transfusão no SISTHEMO. Isso se deve ao fato de alguns episódios ocorrerem antes da implementação do sistema informatizado. Além disso, as transfusões possivelmente realizadas fora do Distrito Federal também não são registradas nesse sistema.

Diversos estudos comparam as taxas de aloimunização de acordo com o gênero. Este trabalho observou uma maior taxa de aloimunização em mulheres quando comparadas aos homens, independente da faixa etária. Porém, essa diferença não foi significativa do ponto de vista estatístico. O número relativamente baixo de indivíduos envolvidos no estudo pode justificar essa falta de significância estatística. Um estudo com número maior de pacientes mostra uma relação significativa entre o sexo feminino e maiores taxas de aloimunização (AMEEN; AL SHEMMARI; AL-BASHIR, 2009). Outros estudos também mostram taxas de aloimunização maiores em mulheres quando comparados aos homens, porém sem significância estatística assim como nosso estudo (DESAI et al., 2015; SAMARAH et al., 2018; SINS et al., 2016). Um desses estudos aponta para a possibilidade da relação entre a gestação e o risco aumentado de desenvolvimento da aloimunização pelo sexo feminino, embora isso também não tenha sido comprovado pelos testes estatísticos. Outro fator seria a maior longevidade nas mulheres com doença falciforme o que possibilita uma maior exposição a eventos imunes em relação aos homens (SINS et al., 2016; VERDUIN; BRAND; SCHONEWILLE, 2012). Por outro lado, um estudo realizado em Gana encontrou uma taxa de aloimunização menor no sexo feminino em relação ao sexo masculino (BOATENG et al., 2019). No entanto, esse fato foi significativamente associado ao número de unidades transfundidas, impedindo a comparação com nosso estudo, uma vez que não possuímos dados de número de transfusões devido aos fatores apontados anteriormente. Outro trabalho também mostrou taxa de aloimunização maior em homens quando comparada com

mulheres, devido ao pequeno número de pacientes avaliados (SIRANSY et al., 2019).

A faixa etária dos indivíduos politransfundidos é outro fator importante quando observadas as taxas de aloimunização. Este estudo observou uma maior taxa de aloimunização em indivíduos com mais de 30 anos, apesar da diferença não possuir significância estatística. Esses resultados corroboram com outros estudos que demonstram uma maior taxa de aloimunização em indivíduos mais velhos. Foi encontrada uma relação, embora não fosse estatisticamente significativa entre o aumento da idade e a presença de anticorpos anti-eritrocitários (KANGIWA et al., 2015), sustentando a hipótese de que o número de hemocomponentes transfundidos pode ser responsável por essa relação, conforme já discutido anteriormente. Um estudo palestino (SAMARAH et al., 2018) mostrou significância estatística entre idade e taxa de aloimunização; pacientes mais velhos foram mais aloimunizados do que pacientes mais novos. Um estudo americano encontrou diferença na taxa de aloimunização entre pacientes < 16 e ≥ 16 anos com significância estatística, onde os mais velhos, por terem sido mais expostos a transfusões, foram mais aloimunizados (CAMPBELL-LEE et al., 2018). Baseados na mesma teoria de que o número de transfusões durante a vida seria um fator importante para o desenvolvimento de anticorpos, trabalhos encontraram uma associação significativa entre o aumento da idade e o aumento da aloimunização (KARAFIN et al., 2018; SAMARAH et al., 2018).

Anticorpos contra os sistemas Rh e Kell são os mais comumente encontrados em pacientes de anemia falciforme (COLEMAN et al., 2019), representando mais de dois terços das aloimunizações identificadas (CHOU; WESTHOFF, 2017). Esse fato pode ser explicado uma vez que os antígenos desses sistemas são os mais imunogênicos (NOIZAT-PIRENNE, 2013). Nesse sentido, nosso estudo observou uma maior taxa de aloimunização contra os antígenos Rh (55,17%), e dentre eles os mais observados foram anti-C (20,69%) e anti-E (12,06%). O anti-Kell foi encontrado 8,62% dos pacientes. Alguns trabalhos também demonstraram que dentre os pacientes aloimunizados a maioria da especificidade dos anticorpos ocorre contra o sistema Rh (BOATENG et al., 2019; CHOU; JACKSON et al., 2013; GOGRI et al., 2015). Num estudo brasileiro, os aloanticorpos detectados foram também, em sua maioria, contra os sistemas Rh e Kell devido a transfusões prévias não compatíveis (GUELSIN et al., 2015). Um estudo realizado nos Estados Unidos

mostrou que, mesmo com pacientes transfundidos com hemocomponentes de doadores afro-americanos compatibilizados para Rh e Kell, 105/550 pacientes apresentaram anticorpos anti-Rh com diferentes especificidades. Dentre as aloimunizações, somente 16,5% surgiram como resultado de transfusão de unidades com antígeno positivo dos doadores para pacientes que não possuíam esse mesmo antígeno. Essas observações mostram que nem todos os anticorpos foram associados a herança de alelos Rh variantes, pois eles também podem surgir devido a epítomos alterados de Rh de doadores afro-americanos (CHOU et al., 2018).

Vários estudos demonstraram a importância das análises moleculares como uma metodologia complementar (GEHRLE et al., 2017), principalmente em pacientes dependentes de transfusão, como em algumas doenças hematológicas, na insuficiência renal e nas hemoglobinopatias. A relevância desse método foi comprovada na determinação do verdadeiro genótipo de grupo sanguíneo em pacientes recentemente transfundidos, e também, como auxílio na identificação de anticorpos suspeitos (GUELSIN et al., 2010). Se utilizando de técnicas moleculares de genotipagem, o presente estudo encontrou um total de 17 discrepâncias entre fenótipo eritrocitário e genótipo, sendo 9 em relação aos antígenos C/c, 7 em relação aos antígenos E/e e 1 em relação aos antígenos K/k. A introdução de métodos moleculares na tipagem sanguínea de rotina e a ocorrência de discrepâncias com os métodos sorológicos estão levando a identificação de novos alelos de grupos sanguíneos (GOLDMAN et al., 2016). Assim como nosso estudo, outros grupos brasileiros mostraram discrepâncias entre fenótipo e genótipo eritrocitário, principalmente entre os antígenos Rh. Um deles também encontrou uma discrepância no sistema Kell (com fenótipo k/k e genótipo KEL*01/02) (GUELSIN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2009).

Dentre os discrepantes para C/c, 6 pacientes foram fenotipados como C+ c+ e genotipados como RHCE*c/c. Existe, portanto, a possibilidade desses pacientes desenvolverem aloimunização contra o antígeno C, caso seja respeitado apenas o fenótipo eritrocitário na escolha do hemocomponente. No entanto, apenas um paciente desenvolveu anti-C e também anti-D e anti-E, o que seria sugestivo de uma variante de RHCE, pois aproximadamente 20% dos pacientes falciformes com fenotipagem eritrocitária C+ expressam uma variante C que codifica uma proteína RHCE não convencional (CHOU; WESTHOFF, 2017). Os outros 3 foram fenotipados como C- c+ e genotipados como RHCE*C/c. Nesse caso, poderíamos levantar a

hipótese de que a fenotipagem estaria errada, ou ainda, esses pacientes poderiam apresentar um alelo RHCE*Ce silenciado (GOLDMAN et al., 2016).

Dentre as discrepâncias para E/e, um paciente foi fenotipado como E+ e+ e genotipado como RHCE*e/e; 6 pacientes foram fenotipados como E- e+ e genotipados como RHCE*E/e. Dentre esses últimos, um paciente foi aloimunizado com anti-E e também, anti-C, anti-D, anti-V, anti-VS, anti-G, anti-S e anti-Dia. Essa situação pode sugerir que esse paciente tenha uma variante RHCE, baseada na possibilidade desse paciente nunca ter entrado em contato com alguns desses antígenos e mesmo assim ter desenvolvido aloimunização contra eles (CHOU; WESTHOFF, 2017). Existe também uma chance do mesmo paciente ter recebido hemocomponente de um doador afro-americano com uma variante RHCE que codifica novos antígenos potencialmente imunogênicos como o V e o VS (ARNONI et al., 2016; FASANO; CHOU, 2016), reforçando a necessidade de estratégias para se obter o verdadeiro grupo sanguíneo e evitar o desenvolvimento de aloimunização. Um alelo RHCE variante pode codificar antígenos alterados (C/c, E/e), com ausência de epítomos. Pacientes homozigotos para o alelo RHCE variante ou heterozigotos com um alelo silenciado trans podem produzir anticorpos correspondentes aos epítomos ausentes após transfusão com hemocomponentes contendo esses epítomos. Estes pacientes são também tipicamente identificados após a produção de anti-C, anti-c, anti-E, anti-e ou por detecção de um antígeno marcador (por exemplo V/Vs, Rh32, Crawford e JAL) (REID et al., 2014).

Em relação à discrepância encontrada para o antígeno Kell, um paciente foi fenotipado como k/k, porém foi genotipado como KEL*01/02. Neste caso, por ser heterozigoto estaria descartada a possibilidade de aloimunização. Apesar dessa impossibilidade, a genotipagem é importante pois uma discrepância envolvendo um genótipo homozigoto (KEL*01/01 ou KEL*02/02) poderia levar à aloimunização no caso de transfusão com hemocomponente incompatível. Tais observações relacionadas às discrepâncias reforçam a utilização da carteirinha confeccionada por este estudo como estratégia para se evitar a aloimunização, uma vez que a escolha dos hemocomponentes respeitará sempre o fenótipo deduzido do genótipo. Por outro lado, embora os métodos moleculares sejam mais específicos e tenham uma maior sensibilidade, devemos considerar que a presença de um determinado gene não garante a sua expressão na membrana da hemácia (QUIRINO et al., 2019).

Um dos principais benefícios da genotipagem é a capacidade de determinação de vários polimorfismos de grupos sanguíneos, sendo potencialmente importante para pacientes aloimunizados. Assim, possibilita o aumento da correspondência de antígenos entre doadores e receptores e fornece informações para a identificação correta de alo ou autoanticorpos, prevendo a significância clínica e auxiliando nas decisões clínicas transfusionais. Alguns centros de doação de sangue e laboratórios de referência disponibilizam a genotipagem para doadores e pacientes. No entanto, a genotipagem de alta resolução e o sequenciamento do gene Rh são necessários para identificar as variantes de Rh e para interpretar com habilidade as associações de alelos em pacientes com doença falciforme (CHOU et al., 2018; CHOU; WESTHOFF, 2017).

7. CONCLUSÃO

Os antígenos dos sistemas Rh (C, c, E, e) e Kell (K e k) foram genotipados e o perfil de aloimunização foi avaliado, demonstrando que a taxa de aloimunização pode ser considerada alta quando comparada a outros estudos, ocorrendo predominantemente em mulheres e indivíduos com maior idade (apesar da diferença não ser estatisticamente significativa). Além disso, a maior parte das aloimunizações ocorrem contra os antígenos do sistema Rh.

Este trabalho também desenvolveu uma carteirinha com os dados do fenótipo deduzido do genótipo, para que o paciente possa levar em seus atendimentos fora da rede pública do Distrito Federal. Esta pode ser uma estratégia efetiva para redução da aloimunização, uma vez que: i) existem pacientes que apresentam discrepâncias entre fenótipo e genótipo; ii) pacientes com discrepância podem desenvolver aloimunização;

Por fim, a utilização de técnicas moleculares de alta resolução é necessária para identificar as possíveis variantes de Rh possibilitando uma maior segurança no tratamento de pacientes com doença falciforme.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, v. 49, n. 8, p. 1649–1654, 2009.
- ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 52–56, 2017.
- ARNONI, C. P. et al. An easy and efficient strategy for KEL genotyping in a multiethnic population. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 2, p. 99–102, 2013.
- ARNONI, C. P. et al. RHCE variants inherited with altered RHD alleles in Brazilian blood donors. **Transfusion Medicine**, v. 26, n. 4, p. 1–6, 2016.
- AVENT, N. D. Large-scale blood group genotyping - Clinical implications. **British Journal of Haematology**, v. 144, n. 1, p. 3–13, 2009.
- AZAR, S.; WONG, T. Sickle-Cell Disease. **International Encyclopedia of Public Health**, p. 506–512, 2016.
- BAKANAY, S. M. et al. Blood group genotyping in multi-transfused patients. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 48, n. 2, p. 257–261, 2013.
- BALBUENA-MERLE, R.; HENDRICKSON, J. E. Red blood cell alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. **Transfusion Clinique et Biologique**, p. 3–6, 2019.
- BATINA AGASA, S. 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**, v. 17, n. 4, p. 254–259, 2010.
- BELSITO, A.; MAGNUSSEN, K.; NAPOLI, C. Emerging strategies of blood group genotyping for patients with hemoglobinopathies. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 56, n. 2, p. 206–213, 2017.
- BENENSON, I.; PORTER, S. Sickle Cell Disease: Bone, Joint, Muscle, and Motor Complications. **Orthopaedic Nursing**, v. 37, n. 4, p. 221–227, 2018.
- BOATENG, L. A. et al. Red blood cell alloimmunization and minor red blood cell antigen phenotypes in transfused Ghanaian patients with sickle cell disease. **Transfusion**, p. 1–7, 2019.
- BONIFÁCIO, S. L.; NOVARETTI, M. C. Z. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 104–111, 2009.
- CAMPBELL-LEE, S. A. et al. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: assessment of transfusion protocols during two time periods. **Transfusion**, v. 58, n. 7, p. 1588–1596, 2018.

CASAS, J. et al. Changing practice: Red blood cell typing by molecular methods for patients with sickle cell disease. **Transfusion**, v. 55, n. 6, p. 1388–1393, 2015.

CASTILHO, L.; DINARDO, C. L. Optimized antigen-matched in sickle cell disease patients: Chances and challenges in molecular times - the brazilian way. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 258–262, 2018.

CHOU, STELLA; JACKSON, T. et al. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 1062–1071, 2013.

CHOU, S. T. et al. Whole-exome sequencing for *RH* genotyping and alloimmunization risk in children with sickle cell anemia. **Blood Advances**, v. 1, n. 18, p. 1414–1422, 2017.

CHOU, S. T. et al. RH genotype matching for transfusion support in sickle cell disease. **Blood**, v. 132, n. 11, p. 1198–1207, 2018.

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**, v. 30, n. 3, p. 591–608, 2016.

CHOU, S. T.; WESTHOFF, C. M. Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. **American Society of Hematology**, v. 2009, p. 178–184, 2009.

CHOU, S. T.; WESTHOFF, C. M. The role of molecular immunohematology in sickle cell disease. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 44, n. 1, p. 73–79, 2011.

CHOU, S. T.; WESTHOFF, C. M. Application of genomics for transfusion therapy in sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 67, n. December 2016, p. 148–154, 2017.

COLEMAN, S. et al. Alloimmunization in patients with sickle cell disease and underrecognition of accompanying delayed hemolytic transfusion reactions. **Transfusion**, p. trf.15328, 2019.

DANIELS, G. The molecular genetics of blood group polymorphism. **Human Genetics**, v. 126, n. 6, p. 729–742, 2009.

DESAI, P. C. et al. Alloimmunization is associated with older age of transfused red blood cells in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 8, p. 691–695, 2015.

DINIZ, D. et al. Prevalência do traço e da anemia falciforme em recém-nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 188–194, 2009.

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**, v. 168, n. 2, p. 291–300, 2015.

FASANO, R. M. et al. Transfusion service knowledge and immunohaematological practices related to sickle cell disease and thalassemia. **Transfusion Medicine**,

2019.

FASANO, R. M.; CHOU, S. T. Red Blood Cell Antigen Genotyping for Sickle Cell Disease, Thalassemia, and Other Transfusion Complications. **Transfusion Medicine Reviews**, 2016.

FERNANDES, Q. Therapeutic strategies in Sickle Cell Anemia: The past present and future. **Life Sciences**, v. 178, p. 100–108, 2017.

FLOCH, A. et al. High immunogenicity of red blood cell antigens restricted to the population of African descent in a cohort of sickle cell disease patients. **Transfusion**, v. 58, n. 6, p. 1527–1535, 2018.

GEHRIE, E. A. et al. Medical and economic implications of strategies to prevent alloimmunization in sickle cell disease. **Transfusion**, v. 57, n. 9, p. 2267–2276, 2017.

GOGRI, H. et al. Partial matching of blood group antigens to reduce alloimmunization in Western India. **Transfusion and Apheresis Science**, 2015.

GOLDMAN, M. et al. Identification of six new *RHCE* variant alleles in individuals of diverse racial origin. **Transfusion**, v. 56, n. 1, p. 244–248, 2016.

GUELSIN, G. A. S. et al. Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the South of Brazil. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 24, n. 5, p. 311–316, 2010.

GUELSIN, G. A. S. et al. Molecular matching for Rh and K reduces red blood cell alloimmunisation in patients with myelodysplastic syndrome. **Blood transfusion = Trasfusione del sangue**, v. 13, n. 1, p. 53–58, 2015.

HAY, D.; ATOYEI, W. Update on sickle cell disease. **British journal of hospital medicine (London, England : 2005)**, v. 77, n. 4, p. C55-9, 2016.

JEAN-ANTOINE RIBEIL, SALIMA HACEIN-BEY-ABINA, EMMANUEL PAYEN, A. M. et al. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 9, p. 848–855, 2017.

JI, Y. et al. Novel alleles at the Kell blood group locus that lead to Kell variant phenotype in the Dutch population. **Transfusion**, v. 55, n. 2, p. 413–421, 2015.

JOHNSON, C. S. Sickle-Cell Disease. **International Encyclopedia of Public Health**, v. 4, p. 506–512, 2016.

KANGIWA, U. et al. Pattern and prevalence of alloimmunization in multiply transfused patients with sickle cell disease in Nigeria. **Biomarker research**, v. 3, p. 26, 2015.

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**, v. 181, n. 5, p. 672–681, 2018.

KATO, GREGORY J.; PIEL, FRÉDÉRIC B.; REID, CLARICE D.; GASTON, MARILYN H.; OHENE-FREMPONG, K.; KRISHNAMURTI, LAKSHMANAN; SMITH, WALLY R.; PANEPINTO, JULIE A.; WEATHERALL, D. J. .; COSTA, FERNANDO F.;

- VICHINSKY, E. P. Sick Cell Disease. **Nature Reviews**, n. September, p. 1–22, 2018.
- KÖRMÖCZI, G. F.; MAYR, W. R. Responder individuality in red blood cell alloimmunization. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 446–451, 2014.
- LEE, S.; RUSSO, D.; REDMAN, C. Functional and structural aspects of the Kell blood group system. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 14, n. 2, p. 93–103, 2000.
- LOBO, CLARISSE; MARRA, VERA; SILVA, R. Crises dolorosas na doença falciforme. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 247–258, 2007.
- LOBO, C. L. DE C. et al. Mortality in children, adolescents and adults with sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 1, p. 37–42, 2018.
- MAMADOU, S. Y. ET AL. Anti-Erythrocyte Allo-Immunization to Sickle Cell Disease Patients Followed in Transfusion Therapy Unit of the National Blood Transfusion Center of Abidjan Côte D'Ivoire. **International Journal of Immunology**, v. 5, n. 1, p. 1, 2017.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-Occlusion in sickle cell disease: Pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**, v. 122, n. 24, p. 3892–3898, 2013.
- MATTEOCCI, A.; PIERELLI, L. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease and in thalassaemia: Current status, future perspectives and potential role of molecular typing. **Vox Sanguinis**, v. 106, n. 3, p. 197–208, 2014.
- MULLER, J. Y.; CHIARONI, J.; GARRAUD, O. S??curit?? immunologique des transfusions. **Presse Medicale**, v. 44, n. 2, p. 200–213, 2015.
- NATUKUNDA, B. et al. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease patients in Uganda. **Transfusion**, v. 50, n. 1, p. 20–25, 2010.
- NICKEL, R. S. et al. Impact of red blood cell alloimmunization on sickle cell disease mortality: A case series. **Transfusion**, v. 56, n. 1, p. 107–114, 2016.
- NOIZAT-PIRENNE, F. Relevance of blood groups in transfusion of sickle cell disease patients. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 336, n. 3, p. 152–158, 2013.
- NOVELLI, E. M.; GLADWIN, M. T. Crises in sickle cell disease. **Chest**, v. 149, n. 4, p. 1082–1093, 2016.
- OLUJOHUNGBE, A. et al. Red cell antibodies in patients with homozygous sickle cell disease: A comparison of patients in Jamaica and the United Kingdom. **British Journal of Haematology**, v. 113, n. 3, p. 661–665, 2001.
- ORINGANJE, C.; NEMECEK, E.; ONIYANGI, O. Hematopoietic stem cell transplantation for children with sickle cell disease. [Review] [43 refs]. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 5, p. CD007001, 2009–, 2016.

ORSETTI, PAULO GOMES DO VALLE NETO; ALVES, V.; ARAÚJO PEREIRA, G.; MOREAES-SOUZA, HELIO; JULIANO MARTINS, H. Clinical and epidemiological profile of alloimmunized and autoimmunized multi-transfused patients against red blood cell antigens in a blood center of Minas Gerais. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 2, p. 107–111, 2018.

PAULING, L. et al. Sick Cell Anemia, a Molecular Disease. **Science**, v. 110, n. 2865, p. 543–548, 1949.

PIRENNE, F.; YAZDANBAKHS, K. How I safely transfuse patients with sickle-cell disease and manage delayed hemolytic transfusion reactions. **Blood**, v. 131, n. 25, p. 2773–2781, 2018.

PUTZULU, R. et al. The role of molecular typing and perfect match transfusion in sickle cell disease and thalassaemia: An innovative transfusion strategy. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 56, n. 2, p. 234–237, 2017.

QUIRINO, M. G. et al. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 41, n. 1, p. 44–49, 2019.

REES, D. C.; ROBINSON, S.; HOWARD, J. How I manage red cell transfusions in patients with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 180, n. 4, p. 607–617, 2018.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.

REID, M. E. et al. Genomic analyses of RH alleles to improve transfusion therapy in patients with sickle cell disease. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 52, n. 4, p. 195–202, 2014.

RENAUDIER, P. Physiopathologie de la drépanocytose. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 21, n. 4–5, p. 178–181, 2014.

RIBEIRO, K. R. et al. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. **Vox Sanguinis**, v. 97, n. 2, p. 147–152, 2009.

ROBERTS, D. O. et al. Directed blood donor program decreases donor exposure for children with sickle cell disease requiring chronic transfusion. **Immunohematology**, v. 28, n. 1, p. 7–12, 2012.

RUSSO, D.; REDMAN, C.; LEE, S. Association of XK and kell blood group proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 22, p. 13950–13956, 1998.

SAGAN, C. **O Mundo Assombrado Pelos Demônios**. 1. ed. São Paulo: Editora Schwarcz, 2006.

SAMARAH, F. et al. Frequency of Red Blood Cell Alloimmunization in Patients with Sickle Cell Disease in Palestine. **Advances in Hematology**, v. 2018, p. 1–7, 2018.

SERJEANT, G. R.; NDUGWA, C. M. Sickle cell disease in Uganda: A time for action. **East African Medical Journal**, v. 80, n. 7, p. 384–387, 2003.

SHETH, S.; LICURSI, M.; BHATIA, M. Sick cell disease: time for a closer look at treatment options? **British Journal of Haematology**, v. 162, n. 4, p. 455–464, 2013.

SILVY, M. et al. New *KEL*01M* and *KEL*02M* alleles: structural modeling to assess the impact of amino acid changes. **Transfusion**, v. 56, n. 5, p. 1223–1229, 2016.

SINS, J. W. R. et al. Early occurrence of red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 00, n. 00, p. 1–7, 2016.

SIRANSY, L. K. et al. Immune Status and Red Cell alloimmunization among SCD Patients in Côte d'Ivoire. **Journal of Clinical & Experimental Immunology**, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2019.

STORRY, J. R. et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. **Vox Sanguinis**, v. 114, n. 1, p. 95–102, 2019.

TOLEDO, S. L. D. O. et al. Sick cell disease: Hemostatic and inflammatory changes, and their interrelation. **Clinica Chimica Acta**, v. 493, n. January, p. 129–137, 2019.

TORMEY, C. A.; HENDRICKSON, J. E. Routine non-ABO blood group antigen genotyping in sickle cell disease: The new frontier in pretransfusion testing? **Transfusion**, v. 55, n. 6, p. 1374–1377, 2015.

TOURNAMILLE, C. Les technologies de biologie moléculaire en immunohématologie. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 20, n. 2, p. 72–79, 2013.

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**, v. 26, n. 4, p. 342–353.e5, 2012.

WESTHOFF, C. M. Molecular testing for transfusion medicine. **Curr Opin Hematol**, v. 13, p. 471–475, 2006.

ZALPURI, S. et al. Red-blood-cell alloimmunization and number of red-blood-cell transfusions. **Vox Sanguinis**, v. 102, n. 2, p. 144–149, 2012.