**Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**

VALÉRIA BRITO OLIVEIRA

**Associação entre os polimorfismos genéticos c.-318C>T e c.49A>G do gene
CTLA4 e o risco de aloimunização contra antígenos eritrocitários**

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Dra. Carla Luana Dinardo

São Paulo

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de
São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro,
CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Valéria Brito

Associação entre os polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G do gene *CTLA4*
e o risco de aloimunização contra antígenos eritrocitários > Valéria Brito
Oliveira. – São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Carla Luana Dinardo

Descritores: 1. POLIMORFISMO. 2. ANEMIA FALCIFORME. 3. IMUNO-
HEMATOLOGIA. 4. GENES. 5. TRANSFUSÃO.

USP>IMTSP>BIB-24>2019.

Este trabalho é dedicado:

Aos meus pais **Sérgio Joaquim de Oliveira** e **Maria Francisca de Brito Oliveira**, que foram meus primeiros mestres e modelos, pelo amor incondicional, pela fé em Deus, por me ensinarem sobre Jesus Cristo, pelo exemplo de vida íntegra e simples firmada na verdade. Não existem palavras que possam expressar a minha gratidão.

À minhas irmãs **Raquel**, **Ruth** e **Noemi** tesouros de Deus concedidos a mim e que alegram tanto o meu viver. Sempre pedi aos meus pais mais uma irmã e consegui as três melhores que alguém poderia vir a ter.

Aos meus sete sobrinhos: **Sarah**, **Laura**, **Benjamin**, **Matheus**, **Alice**, **Melissa** e **Lucas**, presentes do céu trazendo tanta alegria, diversão, renovo e beleza à minha vida.

A todos os meus **parentes** e **amigos** que sempre me apoiaram, oraram por mim, e de alguma forma foram expressão do amor de Deus na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo sou imensamente grata ao **meu Deus**, por sua graça e bondade serem tão abundantes em minha vida e ter me conduzido nessa jornada. Sem Ele nada seria possível, mas com Ele todas as coisas se tornam possíveis.

À minha orientadora **Dra. Carla Luana Dinardo** a quem sou profundamente grata pelo encorajamento recebido em todo percurso, pela paciência oferecida, por seu amor a pesquisa que “contagia” a todos ao redor, por toda assistência, orientação e conhecimento transmitido. Sou grata por seguindo de perto em cada etapa do projeto e pelo imenso auxílio na elaboração do artigo científico. Ser sua aluna e poder realizar este trabalho é motivo de grande gratidão e orgulho para mim.

À minha amiga e companheira de trabalho, **Marcia Regina Dezan** que tem sido minha professora e chefe ao longo desses anos, se esforçando ao máximo para transmitir todo seu conhecimento em Biologia Molecular. Sou muito grata pela sua amizade, paciência, perseverança e dedicação ao longo dessa jornada. Agradeço pelas valiosas sugestões para aprimorar este estudo, você acompanhou de perto cada dificuldade e progresso fazendo toda diferença, sua ajuda foi essencial.

A todos os meus **amigos** que trabalham ou passaram pelo Laboratório de Imunohematologia Avançada, Agência Transfusional Central, Imunohematologia Clínica e de Doadores e Controle de Qualidade da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de SP quero agradecer pela amizade e companheirismo, apoio, compreensão e incentivo para que esse trabalho fosse concluído.

Ao Prof. Dr. Jorge Simão Rosário Casseb e ao Prof. Dr. Paulo Caleb Júnior de Lima Santos, pelas valiosas sugestões, na qualificação do trabalho, que muito contribuíram para aprimorar este estudo.

À **Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo**, em especial ao **Prof. Dr. Vanderson Rocha** e ao **Prof. Dr. Alfredo Mendrone** por possibilitarem a realização do estudo e a todos os pacientes que gentilmente concordaram em participar desta pesquisa e tornaram o sonho possível.

*“O cavalo prepara-se para o dia da batalha
mas, a vitória vem do Senhor”.*

Provérbios 21.31

RESUMO

Oliveira VB. Associação entre os polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G do gene CTLA4 e o risco de aloimunização contra antígenos eritrocitários (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A molécula *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) é expressa na membrana dos linfócitos T e regula negativamente o processo de apresentação do antígeno, mediando a tolerância periférica e prevenindo doenças autoimunes. Expressão reduzida de CTLA-4, devido a polimorfismos genéticos, está associada ao aumento do risco de distúrbios autoimunes, cuja fisiopatologia é similar à aloimunização pós-transfusão de concentrado de hemácias (CH). **Objetivos:** Avaliar se polimorfismos do gene *CTLA4*, que afetam a expressão proteica, estão associados à aloimunização eritrocitária. **Métodos:** Estudo de caso-controle em que 134 pacientes com doença falciforme (DF) e 253 pacientes não-DF foram incluídos. Todos os pacientes foram genotipados para os polimorfismos c.49A>G e c.-318C>T do gene *CTLA4*. As frequências genotípicas foram comparadas entre os grupos de pacientes aloimunizados e não-alloimunizados. **Resultados:** A frequência do genótipo c.-318C>T diferiu significativamente entre pacientes com DF aloimunizados e não-alloimunizados, independentemente de potenciais confundidores clínicos ($p = 0,016$). Pacientes com DF heterozigotos para o alelo c.-318T apresentaram maior risco de desenvolvimento de aloanticorpos (OR: 5,4; IC: 1,15 - 25,6). **Conclusão:** O polimorfismo c.-318C>T do gene *CTLA4* está associado à aloimunização eritrocitária em pacientes com DF. Isso destaca o papel desempenhado pelo CTLA-4 no desenvolvimento de aloanticorpos pós-transfusionais.

Descritores: Polimorfismo. Anemia falciforme. Imuno-hematologia. Genes. Transfusão.

ABSTRACT

Oliveira VB. Association between the c.-318C>T and c.49A>G polymorphisms of the *CTLA4* gene and the risk of alloimmunization against erythrocyte antigens (Dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2019.

Background: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) molecule is expressed on T-lymphocyte membrane and negatively regulate the antigen-presenting process, mediating peripheral tolerance and preventing autoimmune diseases. Reduced expression of CTLA-4 due to gene polymorphisms is associated with increased risk of autoimmune disorders, whose physiopathology is similar to that of post-transfusion red blood cell (RBC) alloimmunization. Goal: Evaluate if polymorphisms of *CTLA-4* gene that affect protein expression are associated with RBC alloimmunization. Methods: Case–control study in which 134 sickle cell disease (SCD) patients and 253 non-SCD patients were included. All patients were genotyped for the polymorphisms c.49A>G and c.-318C>T of *CTLA-4* gene. Genotype frequencies were compared between groups of alloimmunized and non-alloimmunized patients. Results: The genotype frequency of c.-318C>T differed significantly between alloimmunized and non-alloimmunized SCD patients, irrespective of clinical confounders ($p = .016$). SCD patients heterozygous for c.-318C>T allele presented higher risk of alloantibody development (OR: 5.4, CI: 1.15–25.6). Conclusion: The polymorphism c.-318C>T of *CTLA-4* gene is associated with RBC alloimmunization among SCD patients. This highlights the role played by CTLA-4 on post-transfusion alloantibody development.

Descriptors: Polymorphisms. Sickle Cell Disease. Immunohematology. Genes. Transfusion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Apresentação de antígenos extracelulares e citosólicos a diferentes subpopulações de células T efectoras. ²	4
Figura 2 - Fases da resposta da célula T. ²	5
Figura 3 - Mecanismos de coestimulação das células T por CD28. ²	7
Figura 4 - Principais membros das famílias B7 e CD28. ²	8
Figura 5 - Mecanismos de ação do CTLA-4. ²	9
Figura 6 - Mecanismos de ação do CTLA-4. ²	10
Figura 7 - Representação do gene CTLA-4 com os 4 éxons e as devidas regiões: peptídeo de sinalização, domínio de ligação, domínio de transmembrana e a região citoplasmática. ⁷	11
Figura 8 - Representação dos transcritos do CTLA-4: fICTLA-4 e sCTLA-4. ⁷	12
Figura 9 - Representação completa do gene <i>CTLA-4</i> , apresentando os polimorfismos a ele relacionados. Em destaque os dois polimorfismos que serão estudados nesse trabalho. ⁹	16
Figura 10 - Genotipagem PCR-RFLP para verificar o polimorfismo c.-318C>T. 1) indicador de peso molecular de 100 pares de base, 2) produto de PCR antes da digestão pela enzima Mse I 3) amostra heterozigota para o polimorfismo c.-318C>T (WT/M) 4) amostra sem o polimorfismo c.-318C>T (WT/WT).	34
Figura 11 - Genotipagem PCR-RFLP para verificar o polimorfismo c.49A>G. 1) indicador de peso molecular de 100 pares de base. 2) produto de PCR sem digestão pela enzima 3) amostra homozigota para o polimorfismo c.49A>G (M/M). 4) amostra heterozigota para o polimorfismo c.49A>G (WT/M). 4) amostra sem o polimorfismo c.49A/G (WT/WT).	35
Figura 12 – Comparação dos níveis séricos de CTLA-4 (pg/ml) entre os grupos de pacientes com DF aloimunizados (cinza) e não aloimunizados (branco).....	49
Figura 13 - Comparação dos níveis séricos de sCTLA4 (pg/ml) entre os grupos de pacientes com DF aloimunizados com a mutação c.-318C>T em heterozigose (wt/m) e sem a presença da mutação (wt/wt).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	<i>Primers</i> desenhados para as metodologias de PCR e Sequenciamento.....	32
Tabela 2 -	Comparação entre pacientes aloimunizados e não aloimunizados em relação a variáveis clínicas e demográficas.....	44
Tabela 3 -	Comparação entre pacientes aloimunizados e não aloimunizados em relação ao rs231775 (c.49A>G).....	45
Tabela 4 -	Comparação entre pacientes aloimunizados e não aloimunizados em relação ao rs5742909 (c.-318C>T).....	46
Tabela 5 -	Análise demonstrando o resultado de equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> para os polimorfismos estudados.....	46
Tabela 6 -	Análise demonstrando resultado da frequência de haplótipos para os polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G do gene <i>CTLA4</i>	47
Tabela 7 -	Comparação da frequência Haplótípica do rs231775 (c.49A>G) e do rs5742909 (c.-318C>T) entre pacientes com DF e pacientes sem DF.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Níveis séricos de CTLA-4 (pg/mL). a) Pacientes com DF não aloimunizados (n= 21). b) Pacientes com DF aloimunizados (n= 19).....	49
Gráfico 2 -	Deteção dos níveis séricos de sCTLA-4 nos pacientes com DF aloimunizados. a) Pacientes com DF aloimunizados com a mutação c.-318C>T em heterozigose (n=8). b) Pacientes com DF aloimunizados sem a mutação c.-318C>T (n=12).....	50
Gráfico 3 -	Avaliação do perfil de aloanticorpos eritrocitários observados na população estudada (198 pacientes). a) Prevalência de aloanticorpos eritrocitários por indivíduo. b) Especificidade dos aloanticorpos detectados na população de estudo.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Tipos de Polimorfismos. Exemplo de uma sequência de DNA GAAT(CA) ₃ TGCCA. ³³	16
-------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAG	Anemia Aplástica Grave
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AN	Anemia
APCs	Células apresentadoras de antígenos
APSV	Aplasia Pura de Série Vermelha
ARSA-T	Artéria Subclávia Direita Aberrante
B7	Família de moléculas coestimuladora encontrada nas APCs
Bbv I	Enzima de restrição específica
Bcl-x, Bcl-2	Fatores anti-apoptóticos
CAPPeq	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CA	Câncer
CD	Antígeno CD
CD28	Receptor para B7 encontrado nos linfócitos T
CEC	Carcinoma Epinocelular
CH	Concentrado de Hemácias
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
CTL	Linfócito T citotóxico
CTLA-4	Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico
CTLA4-Ig	Bloqueador das ligantes B7 nas APCs
DF	Doença Falciforme
DH	Doença de Hodgkin
DHFRN	Doença Hemolítica do Feto/Recém-Nascido
DP	Desvio padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
Éxon	Região codificante do gene
FAF	Ferimento a Arma de Fogo
Fc	Fragmento constante da imunoglobulina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
fICTLA-4	Isoforma transmembranar do CTLA-4
FPS	Fundação Pró-Sangue
HC-FMUSP	Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HCV	Vírus da Hepatite C
HD a/e	Hemorragia Digestiva a esclarecer
HDA	Hemorragia Digestiva Alta
HDB	Hemorragia Digestiva Baixa
HLA	Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)
HPN	Hemoglobinúria Paroxística Noturna
HSA	Hemorragia Subaracnóide

HWE	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
ICR	Insuficiência Cardio Respiratória
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina Gamma
IgG1	Subclasse da imunoglobulina G
IL2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor de interleucina 2
<i>Intron</i>	Região do gene não codificante
IRA	Insuficiência Renal Aguda
IRC	Insuficiência Renal Crônica
ISBT	International Society of Blood Transfusion
LAG-3	Receptor inibitório de célula T
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LNH	Linfoma Não Hodgkin
LT	Linfócito T
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MM	Mieloma Múltiplo
mRNA	RNA mensageiro
Mse I	Enzima de restrição específica
NEO	Neocarcinoma
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PD-1	Receptor inibitório de célula T
PI3K/AKT	Via de ativação de linfócitos T
PPT	Púrpura pós-transfusional
<i>Primer</i>	Sequência de oligonucleotídeos sintéticos que iniciam a PCR
PTK	Proteína tirosinoquinase
PTP	Proteína tirosinofosfatase
PTT	Púrpura Trombocitopênica Trombótica
RHFRN	Reação Hemolítica do Feto/Recém-nascido
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por Minuto
rs	Número de registro de polimorfismos
sCTLA-4	Isoforma solúvel do CTLA-4
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
MID	Membro Inferior Direito
T.A.	Temperatura Ambiente
Taq DNA polimerase	Enzima termoestável com atividade polimerase
TCE	Trauma Cranioencefálico

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de Célula T
TIGIT	Receptor inibitório de célula T
TIM-3	Receptor inibitório de célula T
TNF α	Fator de necrose tumoral α
Treg	Células T regulatórias
UTR	<i>Untranslated region</i> ou região não codificadora
VISTA	Receptor inibitório de célula T

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	2
1.1	Sistema Imune.....	2
1.2	A Apresentação do antígeno	2
1.3	Sinais para a ativação do linfócito T	4
1.4	Regulação do linfócito T	7
1.4.1	Antígeno-4 do Linfócito T Citotóxico (CTLA-4).....	8
1.4.2	O Gene <i>CTLA4</i>	11
1.4.3	CTLA-4 e a modulação da resposta Imune.....	13
1.4.4	Polimorfismos do gene <i>CTLA4</i>	15
1.5	Aloimunização Eritrocitária	18
1.6	Justificativa do estudo	23
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos.....	25
3	MÉTODOS	27
3.1	Aspectos éticos.....	27
3.2	Recrutamento de pacientes e processamento de amostras	27
3.3	Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes analisados	28
3.4	Local da realização do estudo	29
3.5	Cálculo amostral.....	29
3.6	Seleção dos polimorfismos a serem estudados	30
3.7	Desenho geral do estudo.....	30
3.8	Extração do DNA genômico	31

3.9	Desenho dos iniciadores de reação (<i>primers</i>)	32
3.10	Controles usados na amplificação das sequencias alvos...	32
3.11	Genotipagem dos polimorfismos c.49A>G e c.-318C>T do gene <i>CTLA4</i>	33
3.12	Amplificação da sequencia alvo para Sequenciamento Sanger.....	35
3.12.1	Tratamento enzimático para purificação do produto de PCR.....	36
3.12.2	Reação de sequenciamento	36
3.12.3	Reação de precipitação do DNA amplificado.....	37
3.12.4	Sequenciamento Sanger.....	38
3.13	Análise do nível sérico do sCTLA-4.....	38
3.14	Análises estatísticas	40
3.15	Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	40
4	RESULTADOS	422
4.1	Validação e padronização da RFLP-PCR.....	422
4.2	Comparação dos dados clínicos entre os grupos de pacientes aloimunizados e não aloimunizados	42
4.3	Comparação da frequência genotípica dos polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G do gene <i>CTLA4</i> entre grupos de pacientes aloimunizados e não aloimunizados.....	44
4.4	Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).....	466
4.5	Análise dos Haplótipos formados pelo polimorfismo c.49A>G e c.-318C>T	47
4.6	Comparação da frequência haplotípica dos polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G	47
4.7	Comparação da concentração de CTLA-4 entre os grupos de pacientes com DF aloimunizados e não aloimunizados.....	48

4.8	Comparação dos níveis séricos de CTLA-4 entre os grupos de pacientes com DF aloimunizados em relação ao rs5742909 (c.-318C>T)	50
4.9	Perfil de anticorpos eritrocitários identificados.....	51
5	DISCUSSÃO.....	544
5.1	Limitações do estudo.....	59
6	CONCLUSÃO	62
7	REFERÊNCIAS	65
8	APÊNDICES.....	744
8.1	Apêndice A - Artigo publicado no International Journal of immunogenetics.	74
8.2	Apêndice B - Certificado de apresentação em painel com visita guiada do trabalho científico intitulado “c.-318C>T Polymorphism of the <i>CTLA-4</i> gene is na independente risk fator for RBC alloimmunization among sickle cell disease patients” no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2017.....	80
9	ANEXOS.....	822
9.1	Anexo A - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	82
9.2	Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	86
9.3	Anexo C - Planilha de Pacientes com DF aloimunizados ...	87
9.4	Anexo D - Planilha de Pacientes com DF não aloimunizados.....	89
9.5	Anexo E - Planilha de Pacientes não-DF aloimunizados....	91
9.6	Anexo F - Planilha de Pacientes não-DF não aloimunizados.....	94

9.7	Anexo G - Planilha de pacientes usados para validar e padronizar o PCR.....	966
-----	---	-----

Introdução e Revisão de Literatura

1 Introdução e Revisão de Literatura

1.1 Sistema Imune

O sistema imunológico abrange um conjunto de atividades complexas que conta com a participação de moléculas, células e órgãos que, coletivamente, funcionam para proporcionar imunidade ou proteção contra organismos estranhos. Este sistema é composto de duas divisões principais: o sistema imune inato ou não específico e o sistema imune adaptativo ou específico.^{1, 2}

O sistema imune inato, bem como o adaptativo, possui funções específicas na proteção de organismos invasores. O sistema imune inato possui sistemas de defesa que, em sua maior parte, estão constitutivamente presentes e prontos para serem mobilizados em uma infecção. Este sistema não é específico para um antígeno e reage da mesma maneira para uma variedade de organismos, além disso, não possui “memória” imunológica.^{1, 2}

O sistema imune adaptativo é específico para um antígeno e reage somente contra o organismo que o induz a resposta. É necessário algum tempo para responder contra um organismo invasor, mas possui “memória” imunológica, ou seja, possui a capacidade de “recordar” que teve contato prévio com um organismo invasor e reage rapidamente a uma exposição subsequente do mesmo organismo.

^{1, 2}

1.2 A Apresentação do antígeno

A molécula de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) tem papel primordial na apresentação de antígenos e a mesma é geneticamente muito ampla e responsável por codificar as moléculas de classe I e II. A função das moléculas de MHC classe I

e II é ligar-se a peptídeos oriundos de antígenos e apresentá-los para linfócitos T altamente específicos. Os peptídeos apresentados pelas moléculas de MHC classe I são reconhecidos por linfócitos T CD8+ e as moléculas de MHC classe II são responsáveis por apresentar peptídeos aos linfócitos T CD4+, também conhecido como célula T auxiliar. Toda molécula de MHC possui alta especificidade para peptídeos e tem a capacidade de ligar somente a um peptídeo por vez, no entanto, os diversos peptídeos que se ligam a uma molécula MHC em particular, apresentam estruturalmente padrões comuns. Essa ligação MHC/peptídeo é saturável e a taxa de degradação é relativamente baixa, sendo assim quando o complexo é gerado ambos permanecem unidos por tempo suficiente para serem reconhecidos pelas células T.¹⁻³

A expressão das MHCs ocorre em diversas células, porém cada uma possui sua particularidade. Todas as células nucleadas expressam as moléculas de classe I, já as moléculas de classe II são expressas nas células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente nas células dendríticas, nos macrófagos e nos linfócitos B. A expressão dos produtos dos genes MHC é aumentada quando ocorrem estímulos inflamatórios e imunológicos, como as citocinas (IFN- γ), que fazem com que ocorra a transcrição desses genes.¹⁻³

A resposta imunológica, envolvendo as células T CD4+, é iniciada nos órgãos linfoides periféricos, posteriormente ao transporte dos antígenos proteicos pelas células dendríticas residentes nos epitélios e tecidos.^{1,2}

As células T CD4+ reconhecem peptídeos oriundos principalmente de proteínas extracelulares, estes antígenos são endocitados pelas APCs e sofrem degradação proteolítica, sendo fragmentados em peptídeos dentro das vesículas endocitárias. Posteriormente, este peptídeo é transportado e associado a uma molécula de MHC classe II e apresentado aos linfócitos T CD4+. (Figura 1). Em contra partida, os linfócitos T CD8+ reconhecem os peptídeos derivados de proteínas encontradas no

citosol, sintetizadas endogenamente e complexadas ao MHC de classe I (Figura 1).

1, 2

Figura 1- Apresentação de antígenos extracelulares e citosólicos a diferentes subpopulações de células T efectoras. ²

1.3 Sinais para a ativação do linfócito T

O processo de ativação das células T, sua proliferação e diferenciação em células efectoras e de memória, requerem o reconhecimento do antígeno, mudanças na expressão de numerosas moléculas de superfície e a secreção de citocinas. Esses três fatores em conjunto irão exercer tanto funções de ativação da resposta,

como funções regulatórias e irão estabelecer limites seguros para a resposta imunológica.^{1,2}

O primeiro sinal de ativação necessário é o reconhecimento do antígeno pela ligação dos complexos peptídeo-MHC aos receptores de antígeno presentes nos linfócitos T, conhecido como receptor de célula T (TCR), ele garantirá a especificidade da resposta imune subsequente. Essa alta especificidade pelo antígeno que estimulou a resposta é uma característica fundamental da resposta das células T. Após o processo de ativação das células T, a partir de um pool de linfócitos imaturos específicos para um antígeno, é gerado um grande número de células efetoras com a mesma especificidade funcional para eliminar aquele antígeno (expansão clonal) e uma população de células de memória com sobrevivência longa que podem reagir rapidamente contra o antígeno caso ele seja reintroduzido (Figura 2).^{1,2,4}

Figura 2 - Fases da resposta da célula T.²

O segundo sinal requerido é fornecido por moléculas denominadas coestimuladoras expressas nas APCs. Os coestimuladores para linfócitos T são constituídos por duas proteínas homólogas, chamadas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que são reconhecidas por meio de receptores específicos nas células T.^{1, 2, 4}

O primeiro receptor para B7 descoberto foi o CD28, que é constitutivamente expresso em mais de 90% das células T CD4+ e em 50% das células T CD8+ em humanos (e em todas as células T imaturas de camundongos).⁷ Os sinais liberados pelo complexo MHC-peptídeo-TCR para ativar as células T naíves funcionam em conjunto com os sinais liberados pelo complexo B7-CD28. Os coreceptores ativadores, como o CD28, possuem motivos estruturais em suas caudas citoplasmáticas que ativam vias de sinalização PI3K/AKT pela ação das proteínas tirosinoquinases (PTKs) fosforilando substratos e desencadeando uma intensa ativação do linfócito, também promovem a secreção de citocinas. Em consequência disso ocorre um aumento no número de células T nos clones antígeno-específicos (expansão clonal); um aumento da sobrevivência e a diferenciação das células imaturas em células T efetoras e de memória, além da ativação de macrófagos, células B e inflamação (Figura 3).^{1, 2}

Figura 3 - Mecanismos de coestimulação das células T por CD28. ²

1.4 Regulação do linfócito T

A magnitude e duração de uma resposta imunológica são controladas por vias inibitórias ativadas pela função de reconhecimento de antígenos. ^{1, 2} Quando um linfócito interage com outra célula, o resultado é definido pela integração dos sinais gerados por uma gama de receptores ativadores e inibitórios que são expressos nos linfócitos e que interagem com os ligantes nas APCs. ^{1, 2} Mecanismos regulatórios podem agir no reconhecimento, ativação ou fases efetoras de uma resposta imunológica. ^{1, 2}

1.4.1 Antígeno-4 do Linfócito T Citotóxico (CTLA-4)

Após a descoberta do CD28, um segundo receptor para as moléculas B7 foi descoberto, o antígeno-4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4 ou CD152). O CTLA-4 é uma proteína coestimuladora formada por 149 aminoácidos, expressa em linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ recentemente ativados, e em células T reguladoras (Tregs). Pertence à mesma família dos receptores CD28 (Figura 4) e é estruturalmente semelhante à mesma. ^{1, 2, 5-7}

Figura 4 - Principais membros das famílias B7 e CD28. ²

Funcionalmente, o CTLA-4 é o receptor para as moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) das APCs e atua na regulação das células T CD4+ ativadas; é responsável por impedir os sinais liberados pelo CD28. Dessa forma, o CTLA-4 está envolvido na terminação das respostas das células T. ^{1, 2, 8, 9} A regulação das células T pelo CTLA-4 ocorre de duas maneiras diferentes (Figura 5), por meio de um mecanismo celular intrínseco e por meio de um mecanismo celular extrínseco.

Na **via celular extrínseca** o CTLA-4 expresso em células Tregs, células T CD4+ e a forma solúvel da proteína (sCTLA-4) atuam na regulação negativa competindo com CD28 pela ligação com as moléculas B7 nas APCs (Figura 5).^{1, 2,}

9-12

Figura 5 - Mecanismos de ação do CTLA-4. A) Via intrínseca. B) Via extrínseca.²

Na **via celular intrínseca**, as células T, quando ativadas, passam a expressar um número de receptores CTLA-4 de 30 a 50 vezes maior que o de receptores CD28; além disso, o receptor CTLA-4 possui uma afinidade pelo ligante B7 10 a 20 vezes maior que o receptor CD28, o que torna concreta a teoria de que ocorre uma competição desigual entre as moléculas CTLA-4 e CD28 pelos ligantes B7-1 e B7-2 das APCs e que o CTLA-4 acaba por remover o CD28 ocupando o seu lugar (Figura 5A). Além disso, estudos demonstram que o CTLA-4 ao se ligar as moléculas B7 nas APCs, as remove internalizando as mesmas e tornando os coestimuladores B7 indisponíveis para o CD28 exercer seu papel de ativação da célula T (Figura 6).^{1, 2, 13}

Outro mecanismo de regulação intrínseca se dá por meio de do motivo estrutural na cauda citoplasmática da proteína CTLA-4. Após o reconhecimento do

ligante B7, vias de sinalização são ativadas pela ação das proteínas tirosinofosfatases (PTP); essas enzimas neutralizam a sinalização induzida pelas quinases e inibem os sinais provenientes do complexo MHC-peptídeo-TCR e do CD28, resultando na inativação das células T.^{1, 2, 13}

Figura 6 - Mecanismos de ação do CTLA-4.²

Importante ressaltar que existem outras moléculas reguladoras, incluindo PD-1, LAG-3, TIM-3, VISTA e TIGIT, que também contribuem para a inibição de respostas imunes e são importantes na limitação da ativação de células T.^{1, 2}

O retorno do sistema imune a um estado de equilíbrio ou homeostase pelo processo de finalização da resposta é de extrema importância. A resposta das células T diminui após o antígeno ter sido eliminado pelas células efetoras. Conforme o antígeno é eliminado, os linfócitos são privados dos estímulos de sobrevivência que são fornecidos pelo antígeno, pelo coreceptor CD28 e por meio de citocinas produzidas durante reações inflamatórias ao antígeno e acabam por entrar em apoptose ou anergia.^{1, 2, 13}

1.4.2 O Gene *CTLA4*

O gene *CTLA4* pertence à superfamília das imunoglobulinas, e foi primeiramente mapeado em 1988 por Dariavach e colaboradores no cromossomo 2 humano (2q33), possui 10.917pb, sendo constituído por 4 éxons e 3 íntrons, que codificam as regiões do peptídeo de sinalização, o domínio de ligação ou extracelular, o domínio de transmembrana e a região citoplasmática (Figura 7).^{6,7}

Figura 7- Representação esquemática do gene *CTLA4* com seus 4 éxons codificantes das diferentes regiões do receptor: peptídeo de sinalização, domínio de ligação, domínio de transmembrana e a região citoplasmática.⁷

O gene *CTLA4* codifica dois transcritos (mRNA): o fICTLA-4 e o sCTLA-4. O fICTLA-4 representa a isoforma transmembranar, funciona como um homodímero interconectado por ligações de ponte dissulfeto e está presente na superfície dos LT-CD4+ e LT-CD8+ recentemente ativados e em células Tregs. O sCTLA-4 funciona como um monômero e representa a isoforma solúvel encontrada livre no soro humano (após ter sido secretado pelas células T ativadas), e que podem ligar-se as moléculas B7 gerando uma resposta inibitória na proliferação celular. Esta isoforma

possui uma particularidade, além de ser uma forma alternativa de *splicing* (mRNA), também se mostra ausente do éxon 3 (Figura 8).^{7, 13, 14}

Figura 8 - Representação esquemática das isoformas codificadas pelo *CTLA4*. Em *fCTLA-4* (isoforma de comprimento total) estão representados os éxons 1, 2, 3 e 4. Em *sCTLA-4* (isoforma solúvel) verifica-se a ausência do éxon 3.⁷

O controle da expressão do receptor CTLA-4 na membrana do linfócito T se dá por meio da restrição ou estimulação gênica e, dependendo da situação, a molécula CD28 irá atuar de forma negativa ou positiva frente ao linfócito T.^{7, 9} As células T apresentam um estoque de CTLA-4 inativo em vesículas intracelular, facilmente disponível para sua expressão na superfície celular, onde exercerá sua função.

Em 2004, Jago e colaboradores observou que moléculas de CTLA-4 estocadas em reservatórios intracelulares eram determinantes na capacidade de expressão dessas moléculas na superfície. Foi observada a regulação cinética da molécula de CTLA-4 em subtipos de linfócitos T (células T imaturas, células T de memória, células Tregs CD4+ e CD25+ e as células T não regulatórias) e os resultados obtidos deste estudo mostraram que as células T de memória são as que possuem maior estoque de CTLA-4, seguido das células CD4+ e CD25+, confirmando assim

sua ação em células Tregs. Outros estudos observaram que células de memória e células Tregs mantinham a expressão de CTLA-4 por mais tempo do que as demais células estudadas.^{7, 13-15}

1.4.3 CTLA-4 e a modulação da resposta Imune

A importância do CTLA-4 na indução de tolerância foi demonstrada pela descoberta de que camundongos *knockout* para CTLA-4, rapidamente desenvolvem uma infiltração linfocítica fatal em múltiplos órgãos, sugerindo que defeitos nesse mecanismo de controle resultariam em falha da tolerância periférica.

16-20

Alguns polimorfismos associados com a redução da expressão do CTLA-4 levam a uma diminuição da tolerância imunológica e desenvolvimento de alergias e doenças autoimunes, estando envolvido também na rejeição a transplantes.^{2, 8, 9, 20-}

²⁷ Em contrapartida, um aumento da tolerância pode levar a neoplasias e infecções crônicas ou recorrentes.^{1, 2, 10, 13, 20} Todos esses achados indicam que o CTLA-4 atua prevenindo a autoimunidade ou regulando as respostas imunes aos microrganismos continuamente, para manter as células T autorreativas sob controle.^{1, 16-20, 28}

Como o CTLA-4 limita a ativação inicial de células T dependente de coestimulação nos órgãos linfoides secundários, mutações no gene *CTLA4* ou bloqueio desse receptor leva a respostas imunes exacerbadas com linfonodos aumentados, linfoproliferação e inflamação múltipla de órgãos.^{17, 18} Em contrapartida, estudos empregando modelos tumorais murinos e cânceres humanos demonstraram que células T infiltrantes tumorais (célula T tumor-específica), apresentam um estado disfuncional, caracterizado pelas funções efectoras

comprometidas e pela expressão aumentada de CTLA-4, prejudicando assim sua função.^{1, 2, 13, 20}

A percepção de que o CTLA-4 define um ponto de controle nas respostas imunológicas levou à ideia de que a ativação do linfócito pode ser promovida ao reduzir-se a inibição, um processo conhecido como bloqueio dos pontos de controle.^{1, 2, 20}

O **bloqueio de moléculas inibidoras** da célula T emergiu como um dos métodos mais promissores para intensificar efetivamente as respostas imunes dos pacientes aos seus tumores. Essa abordagem é baseada na ideia de que as células tumorais exploram diversas vias normais de imunorregulação ou tolerância para evadir a resposta imune do hospedeiro. O primeiro fármaco dessa classe a ser desenvolvido é um anticorpo monoclonal específico para CTLA-4. A terapia com anti-CTLA-4 foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2011 para o tratamento de melanoma avançado, sendo efetiva para retardar a progressão tumoral em uma grande parcela dos pacientes. Esse anticorpo pode funcionar não só bloqueando a ação de CTLA-4 como também depletando células Tregs que expressam altos níveis de CTLA-4. O bloqueio de CTLA-4 com anticorpos, como parte da imunoterapia antitumoral, resulta em respostas imunológicas aumentadas aos tumores, porém alguns dos pacientes tratados desenvolvem manifestações de autoimunidade com inflamação em vários órgãos.^{1, 2, 20}

O **bloqueio das vias coestimuladoras** que ativam linfócitos pode ser usado para tratar doenças autoimunes e na prevenção da rejeição de transplantes. Uma proteína recombinante solúvel criada pela fusão do domínio extracelular do CTLA-4 a um fragmento modificado da porção Fc da IgG1 humana, o CTLA4-Ig, é um medicamento usado para fazer o bloqueio das ligantes B7 nas APCs e impedir sua ligação ao CD28 das células T. Tem sido empregado com sucesso no tratamento

de condições autoimunes como na psoríase e artrite reumatoide e na prevenção da rejeição a transplantes renais como um imunossupressor.^{1, 2, 20, 29}

Estudos realizados por Gilson e colaboradores sugeriram que o CTLA4-Ig poderia prevenir aloimunização e refratariedade após transfusão de concentrado de plaquetas em camundongos.³⁰ Baseado nesses estudos, esse medicamento também poderia ser utilizado para evitar a aloimunização quando não fosse possível fornecer concentrado de hemácias compatível.

Outros estudos que utilizaram modelos murinos *knockouts* da molécula CTLA-4, apresentam o funcionamento da célula T comprometido ocasionando aumento nos níveis de IgG.¹⁷⁻¹⁹

Recentemente, foi demonstrada a associação entre doenças autoimunes crônicas e aloimunização, destacando que marcadores moleculares de autoimunidade poderiam ser transpostos para o cenário de transfusão e usados para prever o desenvolvimento de aloanticorpos.^{16, 31, 32}

1.4.4 Polimorfismos do gene *CTLA4*

A mutação genica consiste na alteração permanente da sequência de nucleotídeos ou na disposição do DNA. A ocorrência de mutações no material genético origina as variantes genéticas. Para uma variante ser considerada formalmente como um polimorfismo sua frequência populacional deve ser superior a 1% dos alelos na população, e não depende do tipo de mutação que o causou, de quão grande é o segmento do genoma envolvido, da localização de uma variante em um gene ou se ele tem um efeito aparente sobre o indivíduo.

A tabela a seguir, mostra os tipos de polimorfismos existentes (Quadro 1).

Tipos de Polimorfismos	Descrição	Exemplo
Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)	Ocorre substituição de um único par de bases na sequência de nucleotídeos.	GAAT(CA) ₃ TGTCA
Polimorfismos de deleção ou inserção	Deleção ou inserção de um ou mais nucleotídeos na sequência.	GAAT(CA) ₃ TG G CCA
Número variável de repetições em tandem (micro/mini satélites)	Diferença no número de repetições de sequência, <i>e.g.</i> (CA) <i>n</i>	GAAT(CA) ₆ TGCCA

Quadro 1 - Tipos de Polimorfismos. Exemplo de uma sequência de DNA GAAT(CA)₃TGCCA.³³

O gene *CTLA4*, como qualquer outro gene, possui diversos polimorfismos (Figura 9). Esses polimorfismos podem levar a um gene não funcional ou modificar a expressão de CLTA-4 e já foram associados a múltiplas condições autoimunes, algumas doenças neoplásicas, infecciosas e podem estar implicados na formação de aloanticorpos pós-transfusionais.^{6, 8, 9, 16, 24-27, 31, 32, 34-40}

Figura 9 - Representação completa do gene *CTLA-4*, apresentando alguns dos polimorfismos a ele relacionados. Em destaque os dois polimorfismos que serão estudados nesse trabalho.⁹

Cada indivíduo possui duas cópias do gene *CTLA4*. Se apenas uma dessas cópias estiver funcionando, devido a algum polimorfismo deficitário na outra cópia, ela não será suficiente para produzir quantidades adequadas da proteína CTLA-4 e garantir um Sistema Imune saudável, ou seja, possui haplo-insuficiência.²

O primeiro polimorfismo identificado no gene *CTLA4* envolve o microssatélite (AT)_n na região 3' UTR.^{5, 38} Até o momento foram identificados 23 diferentes alelos que variam de 7 a 30 repetições AT. O primeiro caso de associação entre polimorfismo do gene *CTLA4* e doença autoimune foi feito em um estudo publicado em 1995 por Yanagawa e colaboradores, onde foram analisados 133 pacientes caucasianos e 85 controles e observou-se uma associação entre a variante de 17 repetições e a doença de Graves.⁴⁰

O segundo polimorfismo foi encontrado na posição 49 do éxon 1 (Figura 9) e trata-se da substituição de adenina por guanina (c.49A>G). Esse SNP leva a uma troca de aminoácido na posição 17 do peptídeo final (A17T) acarretando a diminuição da expressão do CTLA-4 na superfície celular. Em 1996 o diabetes tipo 1 foi a segunda doença autoimune associada a um polimorfismo do gene *CTLA4*, ao alelo variante c.49G ou a variante de 17 repetições do microssatélite.⁴² Posteriormente, vários estudos foram realizados com pacientes que apresentavam a doença de Graves e pacientes com tireoidite de Hashimoto, que são doenças autoimunes relacionadas à tireoide que em muitas populações estavam ligadas as mesmas variantes.^{26, 27} Nos anos posteriores, outros trabalhos demonstraram associação com o lúpus eritematoso sistêmico,²⁴ artrite reumatoide,^{43, 44} doença de Addison,²⁶ hipotireoidismo autoimune,^{37, 45} doença celíaca,²⁵ cirrose biliar primária³⁴ e esclerose múltipla progressiva primária.³⁶

O terceiro polimorfismo identificado trata-se de uma troca de citosina por timina na posição -318 na região promotora (Figura 9). Esse polimorfismo diminui a atividade promotora do gene e, conseqüentemente, a sua expressão.^{38, 46} O alelo

c.-318T foi associado a doenças autoimunes da tireoide a oftalmopatia de Graves e ^{6,32} estudando ambas as posições, c.49A>G e c.-318C>T, não foram encontradas associações com pênfigo foliáceo endêmico. ³⁸

Cinco outros polimorfismos no gene *CTLA4* foram descritos (CT60, MH30, JO30, JO31 e JO27) e associados com a doença de Graves. ¹⁶

1.5 Aloimunização Eritrocitária

A aloimunização eritrocitária corresponde à formação de aloanticorpos quando indivíduos são expostos a antígenos não próprios do seu organismo, sendo esta por meio de transfusões sanguíneas, gestações ou transplantes de órgãos. ⁴⁷⁻⁵¹

A aloimunização eritrocitária origina-se do evento de apresentação do antígeno, no qual a molécula HLA (*Human Leukocyte Antigen*) desempenha um papel central em conjunto com múltiplas proteínas coestimulatórias sendo o processo da resposta imunológica humoral a grande responsável por essa ação. Tal evento é mediado negativamente pelas células Tregs e positivamente por citocinas pró-inflamatórias. ^{10-12, 50, 52, 53}

Os peptídeos provenientes de antígenos eritrocitários são moléculas estruturais grandes localizadas na superfície extracelular da membrana dos eritrócitos, podendo apresentar-se como carboidrato, proteína ou glicoproteína. A resposta imunológica gerada contra esses peptídeos será uma resposta humoral, onde as moléculas de MHC classe II estarão envolvidas. ^{1, 2}

A Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) reconheceu até o momento 38 sistemas de grupos sanguíneo e mais de 350 antígenos eritrocitários. Cada antígeno de grupo sanguíneo possui uma característica estrutural particular que o difere dos outros, no entanto, todos possuem a capacidade de serem reconhecidos pelo sistema imunológico levando a produção de anticorpos

específicos contra esses antígenos. Os aloanticorpos que ocorrem com maior frequência, ou seja, os mais imunogênicos pertencem aos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS.^{47, 49, 54-58}

A transfusão de concentrado de hemácias (CH) corresponde à introdução intravenosa de tecido não-próprio em larga escala e fornece uma valiosa oportunidade para se estudar a resposta imunológica humana a antígenos não-próprios. A cada transfusão de hemácias o paciente é exposto a múltiplos antígenos eritrocitários e corre o risco de formar aloanticorpos contra antígenos eritrocitários de doadores.⁵⁹

A presença de aloanticorpos anti-eritrocitários está associada a atrasos transfusionais, reações hemolíticas pós-transfusionais e doença hemolítica do feto/recém-nascido (DHFRN).⁴⁸ A aloimunização eritrocitária é uma complicação pós-transfusional tardia que afeta aproximadamente 18% a 62% dos pacientes com doença falciforme (DF) e 0,2% - 2,8% dos receptores de sangue sem DF.⁴⁹⁻⁵¹ Um estudo realizado na Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo constatou que 62,5% dos doentes falciformes aloimunizaram e 33% desenvolveram aloanticorpos mesmo tendo iniciado o protocolo transfusional profilático antes da sua formação, evidenciando que esses pacientes apresentam alta susceptibilidade à aloimunização.⁴⁹

Muito se discute sobre o que leva certos indivíduos a desenvolverem aloanticorpos e outros não. Um estudo de modelagem estocástica realizado por Higgins & Sloan identificou que apenas uma proporção dos pacientes transfundidos é capaz de desenvolver aloanticorpos após transfusões com combinações de antígenos incompatíveis (13% dos pacientes estudados), fato que parece ser geneticamente determinado porque é independente de estados comuns de doença, idade do paciente ou do número de aloanticorpos formados e apenas fracamente dependente do número de transfusões recebidas. Esse subgrupo de pacientes

apresentou um alto risco de aloimunização o que lhes confere o status de “imunorespondedores”.^{50, 60} Também verificaram que após a formação de um primeiro aloanticorpo a chance de se formar um segundo, terceiro ou mais aloanticorpo dobra para 30%.⁶⁰⁻⁶² Em adição ao maior risco de nova aloimunização, pacientes com DF aloimunizados são mais propensos a formar autoanticorpos eritrocitários ou contra autoantígenos do sistema HLA.⁶³

Esses pacientes, se assertivamente identificados, poderiam ser transfundidos profilaticamente com unidades de hemácias antígenos compatíveis, evitando a sensibilização contra os antígenos eritróides mais relevantes.^{49, 50, 60, 62}

No entanto, sabemos que existem diversos fatores que influenciam no processo de aloimunização eritrocitária, entre eles, fatores relacionados à bolsa, fatores relacionados ao paciente e fatores genéticos.

Entre os fatores relacionados à bolsa podemos citar as diferenças antigênicas entre doador e receptor, a imunogenicidade do antígeno (que está associada à quantidade de sítios antigênicos expressos e ao número de polimorfismos que cada antígeno expressa), a quantidade de transfusões recebidas, a frequência das transfusões, o tempo de estocagem da bolsa, a via de exposição (a via intravenosa é menos imunogênica), leucorredução e irradiação da bolsa.^{10, 51, 54, 55, 57, 59, 64-71}

Entre os fatores relacionados ao paciente, o diagnóstico se mostrou muito importante. Já se sabe que os grupos de pacientes mais vulneráveis à aloimunização são aqueles com DF e doenças mielodisplásica, ao passo que doenças que levam a imunossupressão têm o risco diminuído.^{63, 72, 73} No entanto, um estudo experimental em camundongos que expressam (S) em homozigose mostrou que somente a condição genética de anemia falciforme, *per se*, não é suficiente para intensificar a aloimunização, sugerindo que outros fatores poderiam contribuir para as altas taxas de aloimunização eritrocitária observada em pacientes com DF.⁶¹

Outro fator de extrema importância para risco de aloimunização eritrocitária é o status inflamatório do paciente. Existem estudos mostrando que a predisposição dos pacientes com DF para a aloimunização se deve à inflamação crônica e não à sua condição genética.^{61, 73, 74} Clinicamente isso é evidenciado por taxas mais altas de desenvolvimento de aloanticorpos após transfusões que ocorrem durante a síndrome torácica aguda e episódios vaso-oclusivos.^{54, 69, 75} A molécula Heme e a hemoglobina livre no plasma, devido à hemólise das hemácias falcizadas, são os maiores promotores da inflamação nos pacientes com DF, levando aumento de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL1 β e ativação dos neutrófilos.^{58, 63, 76, 77}

Outros fatores relacionados ao paciente são gênero (alguns trabalhos sugerem que mulheres têm maior taxa de aloimunização em comparação aos homens),⁷⁸ idade do início das transfusões (primeira transfusão após os 5 anos de idade)^{66, 70, 79, 80} além da raça autodeclarada (ancestralidade negra).^{64, 78}

O aumento da porcentagem de células T de memória CD41+, presença de um ou mais autoanticorpos, e teste de antiglobulina direta (TAD) positivo também já foram descritos como fatores associados à aloimunização.⁵⁸

Fatores genéticos ou associados com as moléculas envolvidas na apresentação de antígenos, como os alelos codificando a molécula de HLA classe II de pacientes, passaram a ser estudados como possíveis elementos causais na aloimunização eritrocitária, visto que os estudos baseados somente em fatores clínicos não pareciam responder as questões fisiopatológicas associadas a esta complicação. Os estudos iniciais tentaram associar restrições de HLA classe II com a formação de anticorpos específicos e, até o momento, já foram associados com a aloimunização o *HLA-DRB1*15:03* e o *HLA-DRB1*04*, mais prevalentes em indivíduos imunorespondedores,^{52, 63, 81} e o *HLA*23*, *HLA-DQ2*, *-DQ3* e *-DQ5*, mais prevalentes em não respondedores.^{53, 58, 63} Entretanto, a aplicabilidade clínica

destes estudos ainda é baixa, porque envolveria a tipagem do HLA classe II em alta resolução para todos os receptores sanguíneos e trata-se de uma técnica cara e demorada.⁶⁰ Até o momento, 19 SNPs foram moderadamente associados à aloimunização eritrocitária, incluindo polimorfismo no gene codificador do receptor *Toll-like 1*, que foi detectado num locus regulatório no cromossomo 5 de indivíduos com ascendência africana e que esteve associado à aloimunização eritrocitária em pacientes com DF.⁶³

Outros fatores genéticos poderiam estar envolvidos como os polimorfismos que levam a baixa expressão de receptores inibitórios da resposta imunológica nas células T, entre eles o CTLA-4.^{82, 83}

Ainda não existem fatores clínicos ou testes laboratoriais capazes de identificar assertivamente o grupo de imunorespondedores para indicar transfusões antígeno-pareadas.⁵⁰ A estratégia de profilaxia frequentemente adotada pelos hemocentros é a transfusão prospectiva de transfusões antígeno-compatíveis ao menos para K, C, c, E, e para todos os pacientes com DF, embora 50% a 70% deles nunca desenvolvam aloanticorpos.^{49, 50, 60}

A cada novo anticorpo desenvolvido, torna-se cada vez mais difícil encontrar bolsa fenótipo compatível. Além disso, pacientes com DF continuam a formar novos anticorpos mesmo estando em esquema de transfusão profilática com unidades fenótipo compatíveis para os principais antígenos eritrocitários (K, C, c, E, e, Jka, Jkb, Fya, Fyb, S, s), devido, principalmente, à presença de antígenos variantes do sistema RH, muito comuns em indivíduos de ancestralidade negra, como acontece nos pacientes DF, e a predominância de indivíduos caucasóides dentre doadores de sangue.^{49, 56, 84}

1.6 Justificativa do estudo

O CTLA-4 é uma molécula de superfície presente nos linfócitos T, envolvida na manutenção da imunotolerância. Alguns polimorfismos associados com a redução da expressão do CTLA-4 levam a uma diminuição da tolerância imunológica e desenvolvimento de doenças autoimunes, neoplasias e infecções recorrentes^{22, 23, 36, 45, 83, 85} Com base no exposto, os polimorfismos c.49A>G e c.-318C>T encontrados no gene *CTLA4*, que levam a diminuição da expressão do CTLA-4, podem também ter associação com a ocorrência de aloimunização eritrocitária em receptores de sangue DF e não-DF, necessitando de maior investigação para confirmação deste pressuposto. Além disso, os marcadores moleculares de autoimunidade poderiam ser transpostos para o cenário de transfusão e utilizados para prever o desenvolvimento de aloanticorpos. Uma melhor compreensão do que distingue um paciente com múltiplos aloanticorpos eritrocitários de outro paciente que foi transfundido e não formou aloanticorpos é importante na busca e otimização de estratégias para segurança da terapia transfusional.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar associação entre polimorfismos no gene *CTLA4* (c.-318C>T e c.49A>G) e aloimunização eritrocitária.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a frequência genotípica envolvendo os polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G do gene *CTLA4* entre os grupos aloimunizados e não aloimunizados com e sem doença falciforme.
- Comparar os níveis séricos de CTLA-4 entre pacientes com DF aloimunizados e não-alloimunizados.

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Não constaram nesta proposta de estudo qualquer espécie de prejuízo aos pacientes envolvidos, sejam eles, físicos, morais ou éticos. Todas as exigências da Resolução 466/2012 foram cumpridas e o estudo foi conduzido de acordo com os princípios de Helsinki. Os participantes leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo A) aprovado por Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 02/02/2017 (Protocolo de Pesquisa nº 55381616.0.0000.0065).

3.2 Recrutamento de pacientes e processamento de amostras

Os pacientes foram recrutados à medida que recebiam indicação de transfusão na Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo (FPS), que é um hemocentro de referência e atende pacientes clínicos e cirúrgicos gerais de um hospital quaternário (Hospital de Clínicas de São Paulo / HC-FMUSP).

Amostras de 5mL de sangue de cada paciente foi coletada em tubo com anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tretra-acético) para realização dos testes de pré-transfusionais obrigatórios de tipagem ABO e RH, pesquisa e identificação de anticorpos irregulares e prova cruzada. Essas mesmas amostras foram reservadas para o ensaio de genotipagem e armazenadas em temperatura de 4 a 6°C até o processamento.

A pesquisa e a identificação de anticorpos irregulares foram realizadas utilizando um conjunto comercial de eritrócitos fenotipados (ID-DiaPanel®) e

colunas de micro aglutinação LISS/Coombs (LISS/Coombs ID-Cartões®), seguindo as instruções do fabricante (Bio-Rad®, Cressier-sur-Morat, Suíça). Os dados referentes às transfusões prévias e identificação dos aloanticorpos foram obtidos a partir dos arquivos eletrônicos do hemocentro (ISBS- Agência Gráfico).

3.3 Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes analisados

Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os sexos, sem limite de idade, sem qualquer grau de parentesco, que apresentavam necessidade de receber transfusão de concentrado de hemácias. Trata-se de um estudo de caso-controle, ou seja, uma pesquisa de modelo retrospectivo, na qual os participantes são selecionados entre indivíduos que já se encontram aloimunizados (**casos**) e entre indivíduos que não foram aloimunizados (**controles**); em cada um desses dois grupos, verifica-se o número de indivíduos expostos a antígenos não compatíveis.

Quanto ao diagnóstico de base foram analisados dois grupos separadamente: DF, quando apresentavam fenotipicamente HbSS, HbSβ° ou HbSβ+, e não-DF na ausência destes critérios. Estes dois grupos foram subdivididos em pacientes aloimunizados e não aloimunizados (grupo controle).

Os participantes foram incluídos no grupo aloimunizado se um ou mais aloanticorpos foram identificados no soro e no grupo não aloimunizado (grupo controle) se a triagem do anticorpo apresentava-se negativa e se o paciente tivesse recebido transfusão de CH em pelo menos três ocasiões diferentes. Este último critério de inclusão foi aplicado para assegurar que apenas os indivíduos não respondedores, ou seja, pacientes improváveis de desenvolver aloanticorpos pós-transfusionais, fossem incluídos no grupo controle e se apoiou em evidências

anteriores de que imunorespondedores tinham aproximadamente 30% de chance de aloimunização após cada transfusão de hemácias.⁶⁰

Pacientes que não apresentavam aloanticorpos e não haviam recebido transfusão de CH em pelo menos três ocasiões diferentes, foram excluídos do estudo.

Dessa forma ficou estabelecido como grupos de estudo: DF aloimunizados e não-DF aloimunizados; como grupos controles: DF não aloimunizados e não-DF não aloimunizados.

3.4 Local da realização do estudo

Todo o estudo foi realizado no laboratório de Imunohematologia Avançada da FPS Hemocentro de São Paulo.

3.5 Cálculo amostral

O tamanho da amostra foi calculado objetivando 70% de poder e 5% de significância. Para atender a esses critérios, 70 pacientes deviam ser incluídos em cada grupo de comparação. Foi planejado comparar a frequência genotípica dos polimorfismos c.49A>G e c.-318C>T do gene *CTLA4* entre os casos de DF e controles (pacientes DF não aloimunizados), e também entre os casos não-DF e controles (pacientes não DF e não aloimunizados). Esta simulação foi realizada no OSSE (Online Sample Size Estimator), website (<http://osse.bii.a-star.edu.sg/calculation1.php>).

3.6 Seleção dos polimorfismos a serem estudados

Selecionamos o rs231775 (c.49A>G) e o rs5742909 (c.-318C>T) do gene *CTLA-4* que sabidamente acarretam a diminuição da expressão do CTLA4 na superfície celular e que estão associados com doenças autoimunes.^{6, 8, 9, 23, 25-27, 32,}

34, 36, 37, 39, 40, 85

3.7 Desenho geral do estudo

Figura 10 - Desenho geral do estudo

3.8 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído da camada leucocitária (*buffycoat*) manualmente, utilizando kits comerciais (PureLink[®] Genomic; Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente, foi adicionado um volume de 20µL de Protease (ou Proteinase K) e 20µL de RNase a 200µL do *buffycoat*, isolado das amostras sanguíneas dos indivíduos incluídos na pesquisa, em microtubo de 1,5mL; seguido de 120 segundos de agitação em agitador automático (Vortex). Posteriormente, foram adicionados 200µL do Buffer AL (tampão de lise) e a mistura foi novamente submetida à agitação em Vortex por 15 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados por 10 minutos a 56°C e foi realizada breve centrifugação. Decorrido o tempo de centrifugação, foi adicionado volume de 200µL de etanol absoluto (Merk-Germany) ao microtubo, realizada agitação de 15 segundos, seguida de rápida centrifugação. As amostras foram transferidas para tubo de 1,5mL com filtro de sílica InvitrogenTM (coluna) e centrifugadas por 1 minuto a 10.000 x g. Ao final, foi desprezado o filtrado e o tubo contendo filtro (coluna) foi transferido para um novo microtubo de 1,5mL. Adicionou-se volume de 500µL do tampão de lavagem (Buffer AW1) e, em seguida, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 10.000 x g. Ao final, o filtrado foi desprezado novamente e a coluna transferida para um novo microtubo de 1,5mL estéril e foi adicionado um volume de 500µL do segundo tampão de lavagem (Buffer AW2). Foi realizada centrifugação por 3 minutos a 20.000 x g e ao final, o filtrado foi desprezado. O tubo com coluna foi transferido para novo microtubo de 1,5mL estéril e devidamente identificado. Foi adicionado volume de 50µL do tampão de eluição (Buffer AE) e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 10.000 x g, obtendo-se, dessa forma, o eluato (DNA genômico).

O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) e posteriormente diluídas para uma concentração final aproximada de 100ng/μL.

3.9 Desenho dos iniciadores de reação (*primers*)

Foram desenhados pares de *primers* (*forward* e *reverse*) para os rs231775 e rs5742909 correspondentes aos polimorfismos c.49G e c.-318C>T do gene *CTLA-4* (Tabela 1), respectivamente, por meio da utilização do *software* de domínio público disponível na internet - *primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). O acesso ao número de registro dos polimorfismos estudados (número rs) foi obtido na base de dados do Pubmed. Todos os *primers* foram sintetizados pela *Invitrogen*® (Carlsbad, CA, EUA). Esses *primers* foram empregados tanto nos ensaios moleculares convencionais como no sequenciamento Sanger.

Tabela 1 - *Primers* desenhados para as metodologias de PCR e Sequenciamento.

Gene	Método	SNP	<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>
CTLA-4	PCR	c.49A>G (rs 231775)	CTGAACACCGCTCCCATAAA	TTGCAGAAGACAGGGATGAA
		c.-318C>T (rs 5742909)	AAGGATGCCCAGAAGATTGA	AGCCGTGGGTTTAGCTGTTA

3.10 Controles usados na amplificação das sequências alvos

Amostras de DNA previamente sequenciadas na validação e padronização do experimento foram utilizadas como controles em todas as reações de PCR, sendo que em cada experimento para pesquisa do alelo c.49G usou-se um controle sem a mutação (selvagem), um com a mutação em heterozigose, um com a

mutação em homozigose e um branco. Para a pesquisa do alelo c.-318T usou-se em cada experimento um controle selvagem, um com a mutação em heterozigose e um branco. Não foi possível usar o controle com a mutação em homozigose para a pesquisa do alelo c.-318T, devido não termos encontrado nenhuma amostra com esse perfil entre as amostras previamente sequenciadas.

3.11 Genotipagem dos polimorfismos c.49A>G e c.-318C>T do gene *CTLA4*

Os polimorfismos c.49A>G e c.-318C>T do gene *CTLA4* foram genotipados por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), conforme descrito em outro trabalho.³⁹

A Polymerase Chain Reaction ou reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de amplificação quantitativa de fragmentos de ácidos nucleicos em que os produtos de um ciclo servem como molde para os ciclos subsequentes, levando a um aumento exponencial e não linear na quantidade de produto. É um método muito sensível de análise molecular e consiste basicamente em utilizar os mecanismos da replicação *in vitro*. Tem sido uma técnica comumente utilizada nos laboratórios de biologia molecular com diversos objetivos diferentes, entre eles, o sequenciamento de genes, diagnóstico de doenças hereditárias, testes de paternidade e a genotipagem de grupos sanguíneos.

Para a amplificação da sequencias alvo, a mistura ou *mix* para o PCR foi preparada com 100ng de DNA genômico, 0,1mM de cada trifosfato desoxinucleotídeo, 12,5 pmol de cada um dos *primers* (Tabela 1) e 1U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen), em volume final de 50µl. A reação de PCR foi realizada no termociclador convencional (Mastercycler®Pro-Eppendorf™, Hamburg, Germain). As condições de PCR foram às seguintes: 2 minutos a 94°C,

35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C (desnaturação, *annealing* e extensão), com ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

Para a análise RFLP usou-se 3,5µL de H₂Odd, 1,25µL de tampão, 0,5µL da enzima de restrição *Mse* I (*Thermo Scientific FastDigest*) específica para o polimorfismo c.-318C>T ou *Bbv* I (*Thermo Scientific FastDigest*) específica para o polimorfismo c.49A>G, e 15µL do produto de PCR, totalizando um volume final de 20µL de reação. Essa mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C e, em seguida, os fragmentos do produto de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 4%. As seguintes bandas puderam ser observadas no aparelho de transiluminação UV (Dolphin-DOC WEALTEC Corp.), de acordo com o genótipo dos pacientes: produto de PCR de 212pb com/sem duas bandas de 118 e 94pb (c.-318C>T) (Figura 10) e um produto de PCR de 130pb com/sem duas bandas de 74 e 56 pb (c.49A>G) (Figura 11).

Figura 10 - Genotipagem PCR-RFLP para verificar o polimorfismo c.-318C>T. **1)** Indicador de peso molecular de 100 pares de base **2)** Produto de PCR antes da digestão pela enzima *Mse* I **3)** Amostra heterozigota para o polimorfismo c.-318C>T (WT/M) **4)** Amostra sem o polimorfismo c.-318C>T (WT/WT).

Figura 11 - Genotipagem PCR-RFLP para verificar a presença do polimorfismo c.49A>G **1)** Indicador de peso molecular de 100 pares de base. **2)** produto de PCR sem digestão pela enzima *Bbv I* **3)** Amostra homozigota para o polimorfismo c.49A>G (M/M). **4)** Amostra heterozigota para o polimorfismo c.49A>G (WT/M). **5)** Amostra sem o polimorfismo c.49A/G (WT/WT).

3.12 Amplificação da sequencia alvo para Sequenciamento Sanger

Na padronização e validação do ensaio de PCR-RFLP para genotipagem dos polimorfismos c.49A>G e c.-318C>T, 15% das amostras incluídas na pesquisa (59 amostras) foram testadas em paralelo usando o método de sequenciamento Sanger convencional (anexo G).

Na amplificação da sequencias alvo para sequenciamento Sanger, a mistura ou *mix* para o PCR foi preparada com 100ng de DNA genômico, 0,1mM de cada trifosfato desoxinucleotídeo, 12,5 pmol de cada um dos *primers* (Tabela 2) e 1U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen), em volume final de 50µl. A reação de PCR foi realizada no termociclador convencional (Mastercycler®Pro-Eppendorf™, Hamburg, Germain). As condições de PCR foram às seguintes: 2 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C

(desnaturação, *annealing* e extensão), com ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

3.12.1 Tratamento enzimático para purificação do produto de PCR

Após a amplificação das sequências alvo, os produtos de PCR obtidos foram submetidos à purificação pela ação enzimática do ExoSAP-IT® (Applied Biosystems). Essa purificação visa remover excesso de *primers* e nucleotídeos livres. A reação foi realizada nas seguintes condições: foi adicionado o volume de 5 µL do DNA amplificado em um microtubo de 0,2 mL e acrescido de 2 µL do ExoSAP-IT®. A mistura foi incubada à 37°C por 15 minutos, seguida de outra incubação à 80°C por 15 minutos no termociclador (Mastercycler®Pro-Eppendorf™, Hamburg, Germany).

3.12.2 Reação de sequenciamento

Os sequenciadores empregam a técnica de *Cycle Sequencing* (sequenciamento em ciclos) nas reações, que inclui uma técnica de PCR onde apenas um “*primer*” sentido 5’ – 3’ (*forward*) ou 3’ – 5’ (*reverse*) é utilizado para síntese das fitas. Durante a reação de sequenciamento, o *primer* se liga à sequência complementar e os nucleotídeos são incorporados de acordo com a fita molde. Nesse processo são incorporados tanto os nucleotídeos livres de marcação quanto os nucleotídeos marcados com fluoróforos (capazes de emitir fluorescência quando excitados por uma luz ou laser), conhecidos como nucleotídeos de terminação (dNTPs). O sistema de sequenciamento utiliza quatro fluorocromos diferentes, sendo que os

mesmos possuem diferentes comprimentos de ondas que correspondem às cores azul, vermelho, amarelo e verde. Cada vez que um nucleotídeo de terminação é incorporado, a leitura da fita molde é interrompida, gerando um fragmento de tamanho correspondente ao local onde o nucleotídeo de terminação foi incorporado. Ao final da reação existem fragmentos de diversos tamanhos permitindo a identificação das cadeias resultantes e determinação da sequência de todos os nucleotídeos das duas fitas de DNA para o fragmento de interesse.

Após etapa de purificação do DNA, é necessária uma nova etapa de amplificação do DNA para que a reação de sequenciamento ocorra. Para Essa amplificação foi feito um mix com 1µL de BigDye (Applied Biosystems), 3µL do *buffer* e 3µL de H₂Odd por reação (uma reação *sense* e uma *anti-sense* para cada amostra). Pipetou-se 7µL do mix na placa de sequenciamento (MicroAmp® Fast Optical 96-Well-Applied Biosystems), 1µL *primer sense* ou *anti-sense* e 3µL do DNA purificado, totalizando um volume final de 11µL. Foi realizada uma PCR convencional no termociclador (Mastercycler®Pro-Eppendorf™, Hamburg, Germany), com um ciclo inicial de 96°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.12.3 Reação de precipitação do DNA amplificado

Após a reação de amplificação, é necessária etapa de precipitação do DNA. Para isso, adicionou-se 40µL de Isopropanol 70% (Merk-Germany), selou-se a placa com adesivo resistente a álcool (*MicroAmp™ Optical Adhesive Film-Applied Biosystems*) e agitou-se no vortex. A seguir, incubou-se a placa a temperatura ambiente (T.A.) no escuro por 15 minutos e, posteriormente, centrifugou-se por 50

minutos a T.A a 4.000 rpm. O excesso de isopropanol foi descartado e a placa foi invertida sobre papel toalha. Centrifugou-se a placa invertida em cima de um lenço de papel por 1 minuto a 700 rpm. Secou-se a placa no termociclador por 10 minutos a 95°C, deixando a tampa do termociclador e a placa aberta para evaporar o restante de isopropanol. Posteriormente, adicionou-se 10µL de formamida (ABI PRISM-Canadá), incubou-se 1 minuto a 95°C e, em seguida, 1 minuto no banho de gelo para choque térmico.

3.12.4 Sequenciamento Sanger

Após esta etapa, a placa estava pronta para ser processada no Sequenciador. O Sequenciador Sanger utilizado no estudo foi o ABI3500XL® (Applied Biosystems) que consiste em um sistema de eletroforese capilar para a separação dos fragmentos de DNA utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Kit contendo nucleotídeos livres (dNTP's), nucleotídeos marcados com fluorescência (ddNTP's), e a enzima Taq polimerase), cujas corridas são feitas em capilares utilizando o polímero POP7 (Applied Biosystems). O sequenciamento Sanger é considerado hoje padrão-ouro para a genotipagem de amostras de DNA. As sequencias obtidas foram analisadas pelo *software* DNASTAR Lasergene 9.0.

3.13 Análise do nível sérico do sCTLA-4

Os níveis séricos de sCTLA-4 de 40 pacientes com DF (19 aloimunizados e 21 não aloimunizados) foram quantificados por meio da metodologia de ensaio imunoenzimático (CTLA-4 Humano Platinum ELISA-Affymetrix eBioscience). A

placa de ELISA é comercializada com o anticorpo anti-CTLA-4 humano aderido na microplaca. Primeiramente, foram realizadas duas lavagens da microplaca utilizando 400µL de tampão de lavagem. Em seguida, adicionou-se 90µL do diluente e 10µL de cada amostra (soro de paciente) ou amostras controles de concentrações conhecidas (todas as amostras foram realizadas em duplicata). O CTLA-4, presente nas amostras ou nas amostras controles, ligou-se ao anti-CTLA-4 aderido na microplaca. Em seguida, foram adicionados 50µL do conjugado biotina/anticorpo anti-CTLA-4 humano, que ligou-se ao CTLA-4 das amostras ou controles. Após incubação, o conjugado de biotina/anticorpo anti-CTLA-4 humano que não se ligou, foi removido pela etapa de lavagem. Logo após, foram adicionados 100µL de Estreptavidina-HRP, incubado a temperatura ambiente por 60 minutos e lavado para remoção da Estreptavidina-HRP que não se ligou a biotina. Em seguida, foram adicionados 100µL do substrato TMB reativo com HRP, originando um produto de coloração proporcional à quantidade de CTLA-4 presente nas amostras ou nos controles. A reação foi bloqueada após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, adicionando mais 100µL de uma solução ácida. Finalmente, a absorbância foi mensurada a 450 nanômetros (nm) no espectrofotômetro e a curva padrão foi construída por 7 pontos obtidos a partir das diluições das amostras controles de concentrações conhecidas.

Os resultados foram analisados utilizando o Teste de Shapiro-Wilk e Teste-T Student com o *software* de análise estatística JASP 0.11.1.0.

3.14 Análises estatísticas

As frequências genotípicas dos polimorfismos c.49A>G e c.-318C>T foram comparadas entre os grupos aloimunizados e não aloimunizados utilizando o Teste de Fisher e apresentadas como odds ratio (OR) com intervalo de confiança (CI) de 95%. A análise multivariada foi realizada por regressão logística e considerando-se como potenciais confundidores clínicos: número de transfusões de hemácias ao longo da vida, gênero, raça autodeclarada e diagnóstico. Para essas comparações, um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Todos os testes foram realizados no software *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS software, Chicago, IL, USA)*, 18ª versão.

As comparações múltiplas entre os grupos aloimunizados e não aloimunizados foram realizadas utilizando o método de Bonferroni e os resultados foram considerados significativos com p -valor $< 0,025$.

3.15 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para c.49A>G e c.-318C>T do *CTLA4* foi calculado usando o teste de Qui-quadrado para marcadores bialélicos contidos no software OEGE (*Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*),⁸⁶ considerando 5% de significância e 1 grau de liberdade.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Validação e padronização da RFLP-PCR

Cinquenta e nove amostras (15% das amostras incluídas no estudo) foram genotipadas em paralelo usando o ensaio RFLP-PCR proposto e o sequenciamento Sanger convencional. Os polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G foram avaliados e apenas uma amostra apresentou genótipo discrepante entre as metodologias (sem a presença de mutação c.49A>G por RFLP-PCR e apresentando a mutação por sequenciamento). A precisão calculada do ensaio de RFLP-PCR foi de 99,24% para a mutação c.49A>G e 100% para a c.-318C>T.

4.2 Comparação dos dados clínicos entre os grupos de pacientes aloimunizados e não aloimunizados

Foram incluídos 198 pacientes aloimunizados e 189 não-alloimunizados no estudo, totalizando 387 pacientes. No grupo de pacientes com DF, 72 foram classificados como aloimunizados e 62 foram classificados como não aloimunizados (grupo controle); enquanto que no grupo de pacientes sem DF, 126 foram considerados aloimunizados e 127 foram considerados não aloimunizados (grupo controle).

No grupo de pacientes sem DF, 26,9% dos indivíduos apresentavam diagnóstico oncológico, enquanto que 73,1% apresentavam doenças benignas. Do

total de pacientes incluídos neste grupo, 39,1% foram acompanhados pela equipe de hematologia, enquanto 60,9% foram tratados por outras especialidades clínicas.

A maior parte dos pacientes incluídos no estudo, 255 indivíduos (65,9%), se autodeclararam brancos. No grupo de pacientes com DF, 67 indivíduos (50,0%) se autodeclararam como brancos e apenas 40 indivíduos (36,6%) se autodeclararam como negros (Tabela 2).

Houve um predomínio geral de mulheres (55,3%) incluídas na análise, sendo que o único subgrupo com maioria masculina foi no grupo controle de pacientes sem DF não aloimunizados. No subgrupo de pacientes sem DF, foi observada associação com significado estatístico entre sexo dos pacientes e aloimunização eritrocitária ($p = 0,001$), apontando que homens se aloimunizam menos que mulheres. No grupo de pacientes com DF esta associação não pode ser visualizada (Tabela 2).

A idade média dos pacientes DF aloimunizados foi de 30 anos ($SD \pm 13,1$), semelhante a idade média dos DF não aloimunizados que foi de 27 anos ($SD \pm 16,7$), mas quando comparada com a idade média do grupo sem DF (52 anos $SD \pm 17,9$ nos aloimunizados e de 41 anos $SD \pm 61,3$ nos não aloimunizados) foi bem menor (Tabela 2).

O número de unidades de concentrados de hemácias transfundidas apresentou-se positivamente relacionada com a aloimunização eritrocitária em ambos os grupos estudados: DF ($p = 0,009$) e não-DF ($p = 0,042$), sendo mais fortemente relacionada no grupo DF (Tabela 2).

Os dados clínicos de idade, sexo, raça autodeclarada e número de transfusões de hemácias em cada grupo estudado são descritos na Tabela 2 e os dados clínicos por paciente nos Anexos C, D, E e F.

Tabela 2 - Comparação entre pacientes aloimunizados e não aloimunizados em relação a variáveis clínicas.

	Pacientes com Doença Falciforme			Pacientes sem Doença Falciforme		
	Pacientes Aloimunizados	Pacientes Não Aloimunizados		Pacientes Aloimunizados	Pacientes Não Aloimunizados	
Nº Analisado	72	62	<i>p</i> val	126	127	<i>p</i> val
Etinia (n/%)			0,36			0,8
Branco	41 (57%)	26 (42%)		94 (74,6%)	94 (74%)	
Negro	23 (31,9%)	26 (42%)		24 (19,0%)	23 (18,1%)	
Asiático	0 (0%)	0 (0%)		1 (0,8%)	1 (0,8%)	
Ignorado	8 (11,1%)	10 (16%)		7 (5,6%)	9 (7,1%)	
Sexo (n/%)			0,49			0,001*
Feminino	44 (61%)	33 (53%)		82(65%)	55 (43%)	
Masculino	28 (39%)	29 (47%)		44 (35%)	72 (57%)	
Idade (anos) (média ± DP**)	30 ± 13,1	27 ± 16,7		52 ± 17,9	41± 61,3	
Unidades de CH transfundidas (média ± DP**)	79 ± 72,6*	50 ± 55,7*	0,009*	25 ± 62,8*	48 ± 19,9*	0,042*

*Com significado estatístico após análise multivariada ($p < 0,05$)

**DP desvio padrão

4.3 Comparação da frequência genotípica dos polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G do gene *CTLA4* entre grupos de pacientes aloimunizados e não aloimunizados

Foi realizada a genotipagem para os polimorfismos c.49A>G e c.-318C>T do gene *CTLA4* em 387 amostras. O genótipo c.49A>G foi inconclusivo em 12 pacientes (dois pacientes com DF e 10 pacientes sem DF), enquanto o genótipo c.-318C>T foi inconclusivo em 4 pacientes (um paciente com DF e três pacientes sem DF), devido à baixa quantidade ou qualidade das amostras de DNA.

A variante c.49A>G foi identificada em heterozigose ou em homozigose em 56,3% dos pacientes estudados (Tabela 3). A frequência do genótipo em homozigose para a mutação (GG) e em heterozigose (AG) foi semelhante entre os grupos aloimunizados e não-alloimunizados em ambos os grupos de pacientes com DF (58,6% vs. 56,5%, $p=0,57$) e pacientes sem DF (55,9% vs. 55,2%, $p=0,5$).

Tabela 3 - Comparação entre pacientes aloimunizados e não aloimunizados em relação ao rs231775 (c.49A>G).

	Pacientes com Doença Falciforme			Pacientes sem Doença Falciforme		
	Pacientes Aloimunizados	Pacientes Não Aloimunizados	p val	Pacientes Aloimunizados	Pacientes Não Aloimunizados	p val
Frequência genotípica do rs231775 (n/%)						
N°						
Analizado	70	62	0,571	118	125	0,499
c.49A>G						
GG	7 (10%)	7 (11,3%)		17 (14,4%)	13 (10,4%)	
AG	34 (48,6%)	28 (45,2%)		49 (41,5%)	56 (44,8%)	
AA	29 (41,4%)	27 (43,5%)		52 (44,1%)	56 (44,8)	

Entre os pacientes sem DF, a frequência da variante c.-318C>T (heterozigoze ou homozigoze) foi de 13,8% no grupo de aloimunizados e 14,2% no grupo de não-alloimunizados, sem diferença estatística ($p=0,61$).

No grupo de pacientes com DF, nenhum dos indivíduos foi genotipado como homozigoto mutado (TT), mas houve uma diferença significativa na frequência do genótipo heterozigoto (CT) entre pacientes aloimunizados e não-alloimunizados (15,5% e 3,2%, $p=0,016$). Esta diferença persistiu na análise multivariada ($p=0,025$), confirmando o genótipo como heterozigoto (CT) como associado com a aloimunização eritrocitária. O *Odds Ratio* (heterozigoto/tipo selvagem) calculado foi de 5,4 (IC 95% 1,15-25,6), demonstrando frequência 5,4 vezes maior de genótipo heterozigoto dentre os pacientes com DF aloimunizados em relação aos não-alloimunizados (Tabela 4).

Em todo o estudo, apenas um único paciente foi genotipado como homozigoto mutado (TT). Foi um homem de 68 anos, branco, com mieloma múltiplo que havia recebido 29 transfusões de CH previamente e não formou nenhum aloanticorpo (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação entre pacientes aloimunizados e não aloimunizados em relação ao rs5742909 (c.-318C>T).

	Pacientes com Doença Falciforme			Pacientes sem Doença Falciforme		
	Pacientes Aloimunizados	Pacientes Não Aloimunizados	<i>p</i> val	Pacientes Aloimunizados	Pacientes Não Aloimunizados	<i>p</i> val
Frequência genotípica do rs5742909 c.-318C>T (n/%)						
Nº Analisado	71	62	0,016* [†]	123	127	0,613
TT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (0,8%)	
CT	11 (15,5%)*	2 (3,2%)*		17 (13,8%)	17 (13,4%)	
CC	60 (84,5%)	60 (96,8%)		106 (86,2%)	109 (85,8%)	

*Com significado estatístico após análise multivariada ($p < 0,05$).

† valor de *p* com significado estatístico após correção de Bonferroni ($p < 0,025$).

4.4 Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)

A distribuição genotípica dos polimorfismos rs5742909 (HW p val =1,0) e rs231775 (HW p val =0,90) estava de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Tabela 5)

Tabela 5 - Análise demonstrando o resultado de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para os polimorfismos estudados.

ID	HW <p>val</p>	Alelos
rs5742909	1,0	C:T
rs231775	0,9075	A:G

4.5 Análise dos Haplótipos formados pelo polimorfismo c.49A>G e c.-318C>T

A análise dos haplótipos formados pelos dois polimorfismos estudados não mostraram associação com significância estatística na aloimunização eritrocitária (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise demonstrando resultado da frequência de haplótipos para os polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G do gene *CTLA4*.

Associação de Haplótipos	Frequência	Casos; Ratios Controles	Qui-quadrado	p valor
CA	0,596	0,612; 0,580	0,8	0,3712
CG	0,340	0,332; 0,348	0,15	0,6432
TA	0,064	0,056; 0,072	0,801	0,3707

4.6 Comparação da frequência haplotípica dos polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G

A comparação da frequência haplotípica do rs231775 (c.49A>G) e do rs5742909 (c.-318C>T) entre pacientes com DF e entre pacientes sem DF também não mostrou nenhuma associação com significância estatística na aloimunização eritrocitária (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação da frequência Haplotípica do rs231775 (c.49A>G) e do rs5742909 (c.-318C>T) entre pacientes com DF e pacientes sem DF.

Pacientes com Doença Falciforme				Pacientes sem Doença Falciforme			
		Pacientes Aloimunizados	Pacientes Não Aloimunizados	Pacientes Aloimunizados	Pacientes Não Aloimunizados		
Frequência haplotípica							
Nº Analisado		68	62	<i>p</i> val	116	125	<i>p</i> val
c.49A>G	c.-318C>T			0,14	0,92		
AG	CC	28 (41,2%)	26 (41,9%)		42 (36,2%)	50 (40%)	
AA	CC	23 (33,8%)	27 (43,6%)		42 (36,2%)	44 (35,2%)	
AG	CT	4 (5,9%)	2 (3,2%)		6 (5,2%)	6 (4,8%)	
GG	CC	7 (10,3%)	7 (11,3%)		16 (13,8%)	13 (10,4%)	
AA	CT ou TT	5 (8,8%)	0		10 (8,6%)	12 9,6%)	

4.7 Comparação da concentração de CTLA-4 entre os grupos de pacientes com DF aloimunizados e não aloimunizados

Observou-se grande variabilidade na concentração dos níveis séricos de sCTLA-4 nos indivíduos estudados, independente da presença da mutação c.-318C>T no gene *CTLA-4*, com uma concentração média de 91,7 pg/mL e índice de mediana em 96,3 pg/mL (Gráfico 1 e Figura 12).

Pacientes com DF aloimunizados apresentaram uma concentração média de 95,4 pg/mL (DP $\pm$ 26,5 pg/mL) e mediana de 98,1 pg/mL, enquanto que pacientes com DF não aloimunizados apresentaram uma concentração média 88,3 pg/mL (DP $\pm$ 34,1 pg/mL) e mediana de 94,5 pg/mL. Não foi possível detectar diferenças com significado estatístico ($p = 0,631$) na comparação da concentração de sCTLA-4 entre os grupos estudados.

Gráfico 1 - Níveis séricos de CTLA-4 (pg/mL). a) Pacientes com DF não aloimunizados (n= 21). b) Pacientes com DF aloimunizados (n= 19).

Figura 12 - Comparação dos níveis séricos de CTLA-4 (pg/mL) entre os grupos de pacientes com DF aloimunizados (cinza) e não aloimunizados (branco).

4.8 Comparação dos níveis séricos de CTLA-4 entre os grupos de pacientes com DF aloimunizados em relação ao rs5742909 (c.-318C>T)

Devido ao fato de o polimorfismo rs231775 (c.49A>G) não ter apresentado associação significativa com a suscetibilidade a aloimunização eritrocitária, investigou-se apenas a influência do genótipo rs5742909 (c.-318C>T) nos níveis séricos de CTLA-4 de pacientes DF aloimunizados.

Também não foi possível observar associação significativa ($p=0,899$) na comparação dos níveis séricos do sCTLA-4 de pacientes DF aloimunizados com presença do alelo c.-318T em heterozigose (média 102,4 DP $\pm 24,1$ pg/mL) e pacientes com DF aloimunizados sem a referida mutação (média 96,6 DP $\pm 27,4$ pg/mL), conforme demonstrado no Gráfico 2 e Figura 13.

Gráfico 2 - Detecção dos níveis séricos de sCTLA-4 (pg/mL) nos pacientes com DF aloimunizados. a) Pacientes com DF aloimunizados com a mutação c.-318C>T em heterozigose (n=8). b) Pacientes com DF aloimunizados sem a mutação c.-318C>T (n=12).

Figura 13 - Comparação dos níveis séricos de sCTLA4 (pg/mL) entre os grupos de pacientes com DF aloimunizados com a mutação c.-318C>T em heterozigose (wt/m) e sem a presença da mutação (wt/wt).

4.9 Perfil de anticorpos eritrocitários identificados

Os 198 pacientes aloimunizados do estudo apresentaram um total de 384 aloanticorpos identificados em algum momento das suas vidas, sendo que 105 desses pacientes apresentaram mais que um aloanticorpo (Gráfico 3a).

Os aloanticorpos encontrados com maior frequência foram contra o antígeno E (17,7%), C (13,5%), K (12,5%) e D (7,0%). O índice de aloanticorpo de classe IgG de especificidade indeterminada também foi bem expressivo (12,0%). Verificamos 10 pacientes com aloanticorpo dirigido contra o antígeno D, sem a presença de nenhum outro aloanticorpo associado. Interessante notar que a frequência de anti-Dia encontrada foi maior que a frequência de anti-Jka, anti-Jkb, anti-Fya, anti-Fyb, anti-S e anti-s (Gráfico 3b).

Gráfico 3 - Avaliação do perfil de aloanticorpos eritrocitários observados na população estudada (198 pacientes). a) Número de aloanticorpos eritrocitários por indivíduo. b) Especificidade dos aloanticorpos detectados na população de estudo.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O presente estudo revelou que o polimorfismo c.-318C>T do gene *CTLA4* está associado à ocorrência de aloimunização pós-transfusão em pacientes com DF. Isso representa um fator de risco molecular que pode ser obtido antes do início do programa de transfusão, predizendo maior chance de desenvolvimento de aloanticorpos e indicando a necessidade de profilaxia primária com transfusões antígeno compatível, independentemente da presença de anticorpos nos soros dos pacientes. Além disso, essa associação positiva lança luz sobre um importante papel desempenhado pelo CTLA-4 na fisiopatologia da aloimunização, representando um alvo plausível a ser avaliado em estudos futuros visando à supressão dessa complicação pós-transfusional.

A identificação de marcadores moleculares para prever aloimunização eritrocitária baseia-se no fato de que menos de 20% dos receptores de transfusão têm a capacidade de desenvolver aloanticorpos após transfusões antígenos incompatíveis⁶⁰ e que condições genéticas do paciente é um fator importante que leva esta susceptibilidade.^{50, 61, 73} Nosso estudo é o primeiro a avaliar o papel desempenhado pelos polimorfismos na molécula reguladora CTLA-4 no cenário de aloimunização, demonstrando a associação entre o polimorfismo c.-318C>T, que modifica a expressão da molécula CTLA-4 na superfície celular, e o risco de desenvolvimento de anticorpos pós-transfusão.

Outros estudos têm-se centrado principalmente na molécula HLA de classe II, identificando o alelo *HLA-DRB1*15:03* e o *HLA-DRB1*04* como fator de risco universal para o desenvolvimento de aloanticorpo, e o *HLA*23*, *HLA-DQ2*, *-DQ3* e *-DQ5* como fator de proteção.^{40, 52, 53, 58, 63, 81} Tanto os alelos de HLA envolvidos em

risco de aloimunização quanto o alelo c.-318T de *CTLA-4* poderiam ser utilizados na prática clínica para identificar pacientes com DF com alto risco de formação de aloanticorpo, indicando a necessidade de transfusões de unidades antígeno-compatíveis para os principais sistemas de grupos sanguíneos. Considerando nossos resultados, pacientes falciformes incluídos no programa de transfusão crônica poderiam ser genotipados para c.-318C>T do gene *CTLA-4* e, se em heterozigose, poderia ser indicada a transfusão de hemácias compatíveis para os antígenos C, c, E, e; K; JKa, JKb; Fya, Fyb; S, s; Dia ao invés de receberem unidades compatíveis apenas para C, c, E, e, K, devido ao seu maior risco de aloimunização.

A molécula CTLA-4 é expressa em células T CD4 + ativadas e em células Tregs, mediando a tolerância periférica e prevenindo doenças autoimunes.¹⁶ Os modelos murinos CTLA-4 *knockout* exibem importantes defeitos de funcionamento das células T, mediando o aumento dos níveis de IgG.¹⁹ Além disso, o CTLA-4 é um marcador da ativação das células Tregs, cujo papel na regulação das respostas de aloanticorpos em receptores de transfusão já foi demonstrado em modelos murinos.⁸⁷ A associação entre o alelo c.-318T do gene *CTLA-4*, que modifica a expressão de moléculas em linfócitos T ativados e em células Tregs, e o aumento da frequência de aloimunização eritrocitária é novidade na literatura. Essa associação possivelmente decorre do estímulo negativo que a molécula CTLA-4 exerce no evento de apresentação do antígeno, como no caso de transfusões de antígenos eritrocitários. Isso ressalta que a modulação da expressão de CTLA-4 ou o uso do medicamento CTLA4-Ig, atualmente indicado para prevenir a rejeição ao transplante, e no tratamento de algumas doenças autoimunes,³⁰ pode representar uma possível estratégia para prevenir a aloimunização contra antígenos eritrocitários em pacientes com DF que apresentem risco de desenvolvimento de

aloanticorpos contra antígenos de alta frequência, principalmente devido a variantes do sistema RH.

Embora o presente estudo tenha avaliado tanto pacientes com DF quanto sem DF, o polimorfismo c.-318C>T do gene *CTLA4* foi associado à aloimunização apenas no primeiro grupo. Já foi demonstrado que pacientes com DF apresentam uma maior proporção de Tregs que expressam CTLA-4 e CD39 em comparação com controles sem DF e que o predomínio desse fenótipo está relacionado à sua doença de base e não ao seu estado de aloimunização.¹¹ Considerando as diferenças fenotípicas das Tregs entre os indivíduos DF e sem DF é plausível que a modificação da expressão de CTLA-4 possa impactar diferentemente sua resposta imune, justificando nossos resultados. Além disso, sabe-se que os pacientes DF mantêm um estado inflamatório crônico em resposta ao seu característico estado hemolítico contínuo, e que esse é o principal responsável por sua suscetibilidade à aloimunização.⁶¹ Neste contexto, as Tregs são fundamentais na supressão do desenvolvimento de anticorpos pós-transfusionais.⁸⁷

Em 2017, um estudo envolvendo pacientes com DF cronicamente transfundidos, Yazdanbakhsh e colaboradores verificaram a função supressora de células Tregs periféricas e resposta efetora dos linfócitos T CD4+ alterada, com IFN- α circulante (citocina Th1) e menor nível da citocina IL-10 (anti-inflamatória) em pacientes imunorespondedores em comparação com não respondedores.¹⁰ Esse achado demonstra desregulação imunológica em pacientes com DF aloimunizados, apresentando desequilíbrio entre Tregs e células efectoras devido um estado inflamatório subjacente.⁷⁴ Neste contexto, as Tregs poderiam suprimir as células B diretamente^{12, 88} ou indiretamente por meio da inibição da ativação/expansão das células TCD4+ efectoras, que por sua vez podem controlar respostas de anticorpos IgG aumentada.⁷²

Nosso trabalho acrescenta informação à literatura da aloimunização ao colocar a molécula de CTLA-4 em destaque. Sabe-se que a resposta imune aumentada das células T efectoras e mecanismos regulatórios deficientes são capazes de levar a formação de anticorpos em DF aloimunizados.¹⁰ Também já foi descrito uma maior resposta das células T foliculares auxiliares, que estimulam a produção de anticorpos pelas células B, em DF aloimunizados.⁸⁹ Além disso, várias diferenças na resposta imune inata foram detectadas em pacientes DF aloimunizados, incluindo uma resposta anti-inflamatória comprometida contra a molécula heme livre no espaço extracelular.⁹⁰⁻⁹² Todas essas diferenças ou anormalidades reforçam que pacientes DF possuem risco aumentado de desenvolver maior resposta aos antígenos eritrocitários transfundidos e desenvolverem aloimunização.

Em vista disto, os polimorfismos que modificam a expressão de CTLA-4 podem ter uma relevância diferente para o processo de aloimunização entre pacientes com DF e sem DF, justificando nossos resultados terem encontrado diferença significativa apenas entre os pacientes DF. Descobrir a base dessas interações alteradas nos níveis celular e molecular ajudará na identificação futura de biomarcadores de aloimunização, com o objetivo de que essas informações ajudem a orientar a terapia nesses pacientes.

Na comparação dos níveis séricos da isoforma sCTLA-4 entre pacientes DF aloimunizados e não aloimunizados, não conseguimos ver diferença com significado estatístico entre os grupos, principalmente devido à grande variabilidade dos níveis séricos de sCTLA-4, independente do grupo analisado (aloimunizado ou não aloimunizado). Essa diferença provavelmente é um reflexo do momento específico em que a dosagem foi realizada, considerando-se principalmente a presença de agravos à saúde como infecção ou crise vaso oclusiva.

A presença do polimorfismo c.-318C>T em heterozigose também não se associou estatisticamente a mudança nos níveis séricos do sCTLA-4. No entanto, um estudo comparativo incluindo um número maior de pacientes seria necessário para uma melhor compreensão desse resultado.

Finalmente, a associação entre o polimorfismo c.-318C>T do gene CTLA-4 e a suscetibilidade ao desenvolvimento de aloanticorpos pós-transfusionais está de acordo com evidências recentes que apontam para fatores comuns subjacentes à autoimunidade e aloimunização.^{16, 31, 32} O *CTLA4* é um dos genes de suscetibilidade para várias doenças autoimunes e o polimorfismo c.-318C>T na sua região promotora já foi associado a doenças autoimunes da tireoide.^{16, 32} A relação entre doenças autoimunes crônicas e aloimunização por eritrócitos tem sido clinicamente demonstrada por Ryder e colaboradores como decorrente de condições inflamatórias semelhantes.³¹ Nesse sentido, nossos resultados reforçam essa associação positiva e incentivam novos estudos que tentem transpor marcadores moleculares autoimunes para o cenário de transfusão, visando à identificação precoce de pacientes imunorespondedores.

O presente estudo também trouxe outras observações de interesse no estudo da aloimunização. A primeira delas é o fato da DF ser sabidamente associada à ancestralidade negra e era esperado que houvesse um predomínio de pacientes que se autodeclarassem negros, mas 67 indivíduos (50%) se autodeclararam como brancos e apenas 40 indivíduos (36,6%) se autodeclararam como negros. A raça autodeclarada, apesar de ser um indicador importante da raça, se mostra relativamente limitada em população tão miscigenada como a brasileira e, mais especificamente, a da cidade de São Paulo. Nosso estudo está de acordo com o encontrado por Carneiro-Proietti e colaboradores que, estudando 2795 pacientes com DF atendidos em 4 grandes Hemocentros do Brasil, verificaram que apenas naqueles atendidos no HC-FMUSP (105 pacientes) houve um predomínio dos

pacientes que se autodeclararam miscigenados (36,2%) e brancos (35,2%), e um menor número daqueles que se autodeclararam negros (24,8%).^{64, 93}

Uma segunda observação interessante foi que no subgrupo de pacientes sem DF, encontramos associação com significado estatístico entre o sexo dos pacientes e aloimunização eritrocitária ($p=0,001$), apontando que mulheres apresentam mais aloimunização eritrocitária do que os homens. Estudos indicam que esse fato pode ser explicado por gestações prévias ou abortamento, enquanto que outros apontam para uma associação independente entre gênero e risco de formação de aloanticorpos.^{78, 94} No grupo de pacientes com DF, esta associação não foi visualizada ($p=0,49$), provavelmente porque, nesta população de pacientes, o estímulo transfusional (e não gestacional) é o principal fator que desencadeia a aloimunização.

Como já era esperado, o número de unidades de concentrados de hemácias transfundidas apresentou-se positivamente relacionada com a aloimunização eritrocitária em ambos os grupos estudados: DF ($p=0,009$) e não-DF ($p=0,042$), sendo mais fortemente relacionada no grupo DF.

5.1 Limitações do estudo

Na tentativa de classificar corretamente os indivíduos não respondedores, apenas pacientes que foram transfundidos em três ocasiões diferentes e não desenvolveram aloanticorpos foram incluídos no grupo controle. Isso contribuiu para que o número de pacientes incluídos no estudo não fosse elevado.

Embora potenciais confundidores clínicos terem sido incluídos na análise multivariada tornando-a abrangente, é importante ressaltar que a fisiopatologia da aloimunização por eritrócitos é altamente multifatorial e que o histórico de inflamação basal dos pacientes não pode ser diretamente avaliado devido à falta de parâmetros assertivos para tal.⁵⁰ As interações entre o gene *CTLA4* e outros genes, além de fatores ambientais, também não foram contempladas no presente estudo.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Concluimos que o polimorfismo c.-318C>T do gene *CTLA4* está associado à aloimunização por eritrócitos em pacientes com DF. Nosso estudo foi o primeiro a avaliar o papel desempenhado pelos SNPs na molécula coestimulatória CTLA-4 no cenário da aloimunização e permitiu a identificação de marcador molecular para prever aloimunização eritrocitária em pacientes DF. Isso não apenas destaca o papel desempenhado pela molécula CTLA-4 no desenvolvimento de aloanticorpos pós-transfusionais, mas também representa um alvo molecular a ser abordado em estudos futuros visando à supressão dessa complicação pós-transfusional.

A comparação da frequência genotípica envolvendo o polimorfismo c.49A>G do gene *CTLA4* entre os grupos aloimunizados e não aloimunizados foi semelhante em ambos os grupos de pacientes com DF ($p=0,57$) e pacientes sem DF ($p=0,5$), dessa forma o polimorfismo não revelou qualquer associação positiva com o evento de aloimunização eritrocitária.

A comparação da frequência genotípica envolvendo o polimorfismo c.-318C>T do gene *CTLA4* entre os grupos aloimunizados e não aloimunizados sem DF não mostrou diferença estatística ($p=0,61$) e não foi possível associa-lo a aloimunização eritrocitária nesse grupo. No entanto, no grupo de pacientes com DF houve uma diferença significativa na frequência do genótipo heterozigoto (CT) entre pacientes aloimunizados e não-alloimunizados ($p=0,016$). Esta diferença persistiu na análise multivariada ($p=0,025$), confirmando o genótipo como heterozigoto (CT) como associado com a aloimunização eritrocitária. O *Odds Ratio* calculado foi de

5,4 demonstrando frequência 5,4 vezes maior de genótipo heterozigoto dentre os pacientes com DF aloimunizados em relação aos não-alloimunizados. Sendo assim foi possível concluir que o polimorfismo c.-318C>T do gene *CTLA4* está associado à aloimunização por eritrócitos em pacientes com DF.

A Comparação da concentração de sCTLA-4 entre pacientes com DF aloimunizados e não-alloimunizados revelou grande variabilidade na concentração dos níveis séricos de sCTLA-4 nos indivíduos estudados, independente da presença da mutação c.-318C>T no gene *CTLA-4*, não revelando diferenças com significado estatístico ($p = 0,631$) na comparação da concentração de sCTLA-4 entre os grupos estudados.

A aloimunização eritrocitária continua a ser uma barreira para um programa transfusional seguro e eficaz no atendimento dos pacientes com DF.

Como perspectivas propomos estudos futuros que busquem a compreensão detalhada de todas as alterações que ocorrem nos subgrupos de células envolvidas na resposta imune (inata e adaptativa), e que possam contribuir para resposta inadequada das células T em pacientes DF aloimunizados, poderão proporcionar não só o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico para identificação de pacientes em risco de aloimunização, mas também propor abordagens para tratar seletivamente as células do Sistema Imune que estão disfuncionais.

Referências

7 REFERÊNCIAS

- [1] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: *Imunologia celular e molecular*: Elsevier Brasil, 2015.
- [2] Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Imunobiologia*. 5ª edição. São Paulo, Artmed editora, 2002.
- [3] Rodgers JR, Cook RG: MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nature Reviews Immunology* 2005, 5:459.
- [4] Rossjohn J, Gras S, Miles JJ, Turner SJ, Godfrey DI, McCluskey J: T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annual review of immunology* 2015, 33:169-200.
- [5] Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP: Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 1988, 18:1901-5.
- [6] Bedin MR: Associação dos polimorfismos-318C>T, CT60 e A49G do gene CTLA4, R620W do gene PTPN22 e A946T do gene IFIH1 em pacientes pediátricos com doença autoimune tireoidiana e diabetes mellitus tipo 1. Universidade de São Paulo.
- [7] Lozano VF: Análise de polimorfismo no gene CTLA-4 em pacientes com paracoccidioidomicose. 2008.
- [8] Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT: Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2000, 31:49-53.
- [9] Gough SC, Walker LS, Sansom DM: CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev* 2005, 204:102-15.
- [10] Yazdanbakhsh K, Shaz BH, Hillyer CD: Immune regulation of sickle cell alloimmunization. *ISBT science series* 2017, 12:248-53.
- [11] Vingert B, Tamagne M, Desmarests M, Pakdaman S, Elayeb R, Habibi A, Bernaudin F, Galacteros F, Bierling P, Noizat-Pirenne F, Cohen JL: Partial dysfunction of Treg activation in sickle cell disease. *Am J Hematol* 2014, 89:261-6.
- [12] Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH: Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 2005, 175:4180-3.
- [13] Salama AK, Hodi FS: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4. *Clinical Cancer Research* 2011, 17:4622-8.

- [14] Valk E, Rudd CE, Schneider H: CTLA-4 trafficking and surface expression. Trends in immunology 2008, 29:272-9.
- [15] Jago C, Yates J, Olsen Saraiva Câmara N, Lechler R, Lombardi G: Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. Clinical & Experimental Immunology 2004, 136:463-71.
- [16] Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH: Association of the T-cell regulatory gene *CTLA4* with susceptibility to autoimmune disease. Nature 2003, 423:506.
- [17] Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH: Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. Immunity 1995, 3:541-7.
- [18] Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW: Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. Science 1995, 270:985-8.
- [19] Bour-Jordan H, Grogan JL, Tang Q, Auger JA, Locksley RM, Bluestone JA: CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T H 2 lineage commitment. Nature immunology 2003, 4:182.
- [20] Lo B, Abdel-Motal UM: Lessons from CTLA-4 deficiency and checkpoint inhibition. Current opinion in immunology 2017, 49:14-9.
- [21] Hamrich J, Wittig S, Ernst T, Gruhn B: CTLA-4 polymorphisms: influence on transplant-related mortality and survival in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Journal of cancer research and clinical oncology 2018, 144:587-92.
- [22] Anjos SM, Tessier M-C, Polychronakos C: Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2004, 89:6257-65.
- [23] Bacanlı A, Karakas AA, Sallakçi N, Topal SG, Uzun S, Alpsoy E: CTLA-4+ 49 A>G,-318 C>T,-1661 A>G, CT60 A>G Gene Polymorphisms in Patients with Pemphigus in Turkey. Turk Dermatoloji Dergisi 2017, 11:75.
- [24] Barreto M, Santos E, Ferreira R, Fesel C, Fontes MF, Pereira C, Martins B, Andreia R, Viana JF, Crespo F, Vasconcelos C, Ferreira C, Vicente AM: Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. Eur J Hum Genet 2004, 12:620-6.
- [25] Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, Mougenot JF, Bach JF, Caillat-Zucman S: CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. Gut 1998, 43:187-9.
- [26] Donner H, Braun J, Seidl C, Rau H, Finke R, Ventz M, Walfish PG, Usadel KH, Badenhop K: Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4

gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82:4130-2.

[27] Kotsa K, Watson PF, Weetman AP: A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997, 46:551-4.

[28] Gilson CR, Patel SR, Zimring JC: CTLA4-Ig prevents alloantibody production and BMT rejection in response to platelet transfusions in mice. *Transfusion* 2012, 52:2209-19.

[29] Tono T, Aihara S, Hoshiyama T, Arinuma Y, Nagai T, Hirohata S: Effects of CTLA4-Ig on human monocytes. *Inflammation and regeneration* 2017, 37:24.

[30] Gilson CR, Patel SR, Zimring JC: CTLA4-Ig prevents alloantibody production and BMT rejection in response to platelet transfusions in mice. *Transfusion* 2012, 52:2209-19.

[31] Ryder AB, Hendrickson JE, Tormey CA: Chronic inflammatory autoimmune disorders are a risk factor for red blood cell alloimmunization. *Br J Haematol* 2016, 174:483-5.

[32] Ting W-H, Chien M-N, Lo F-S, Wang C-H, Huang C-Y, Lin C-L, Lin W-S, Chang T-Y, Yang H-W, Chen W-F: Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) gene polymorphisms with autoimmune thyroid disease in children and adults: case-control study. *PloS one* 2016, 11:e0154394.

[33] Balasubramanian S, Cox A, Brown N, Reed M: Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 2004, 30:593-601.

[34] Agarwal K, Jones DE, Daly AK, James OF, Vaidya B, Pearce S, Bassendine MF: CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000, 32:538-41.

[35] Li N, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Diaz LA: The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Exp Med* 2003, 197:1501-10.

[36] Maurer M, Ponath A, Kruse N, Rieckmann P: CTLA4 exon 1 dimorphism is associated with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002, 131:213-5.

[37] Nithiyananthan R, Heward JM, Allahabadia A, Franklyn JA, Gough SC: Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. *Thyroid* 2002, 12:3-6.

[38] Pincerati MR: Polimorfismo dos genes CD28 e CTLA4. Fatores de susceptibilidade ao penfigo foliáceo endêmico?

[39] Svahn J, Capasso M, Lanciotti M, Marrone A, Haupt R, Bacigalupo A, Pongiglione C, Boschetto L, Longoni D, Pillon M, Pistorio A, Di Michele P, Iori AP, Calvillo M, Locasciulli A, Menna G, Riccardi R, Ramenghi U, Dufour C, Iolascon A: The polymorphisms -318C>T in the promoter and 49A>G in exon 1 of CTLA4 and

the risk of aplastic anemia in a Caucasian population. *Bone Marrow Transplant* 2005, 35 Suppl 1:S89-92.

[40] Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ: CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80:41-5.

[41] Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Sharpe AH, Gray GS, Collins M: Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics* 1999, 60:341-55.

[42] Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios M, Martinez Larrad MT, Teng WP, Park Y, Zhang ZX, Goldstein DR, Tao YW, Beaurain G, Bach JF, Huang HS, Luo DF, Zeidler A, Rotter JI, Yang MC, Modilevsky T, Maclaren NK, She JX: Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 1997, 6:1275-82.

[43] Vaidya B, Pearce SH, Charlton S, Marshall N, Rowan AD, Griffiths ID, Kendall-Taylor P, Cawston TE, Young-Min S: An association between the CTLA4 exon 1 polymorphism and early rheumatoid arthritis with autoimmune endocrinopathies. *Rheumatology (Oxford)* 2002, 41:180-3.

[44] Lee C-S, Lee Y-J, Liu H-F, Su C-H, Chang S-C, Wang B-R, Chen T-L, Liu T-L: Association of CTLA4 gene AG polymorphism with rheumatoid arthritis in Chinese. *Clinical rheumatology* 2003, 22:221-4.

[45] Kotsa K, Watson P, Weetman A: A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves' disease and autoimmune hypothyroidism. *Clinical endocrinology* 1997, 46:551-4.

[46] Deichmann K, Heinzmann A, Bruggenolte E, Forster J, Kuehr J: An Mse I RFLP in the human CTLA4 promotor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 225:817-8.

[47] Baiocchi E, Nardoza LM: [Alloimmunization]. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009, 31:311-9.

[48] Nickel RS, Hendrickson JE, Fasano RM, Meyer EK, Winkler AM, Yee MM, Lane PA, Jones YA, Pashankar FD, New T, Josephson CD, Stowell SR: Impact of red blood cell alloimmunization on sickle cell disease mortality: a case series. *Transfusion* 2016, 56:107-14.

[49] Dezan M, Oliveira V, Bianchi J, Rodrigues V, Solano J, Gomes F, Bonifácio S, Levi J, Guallandro S, Krieger J: Effectiveness of a red cell antigen-matching transfusion protocol in sickle cell disease patients. *ISBT Science Series* 2016, 11:132-9.

[50] Dinardo CL, Ito GM, Sampaio LR, Mendrone Junior A: Study of possible clinical and laboratory predictors of alloimmunization against red blood cell antigens in cancer patients. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013, 35:414-6.

[51] Rosse W, Gallagher D, Kinney T, Castro O, Dosik H, Moehr J, Wang W, Levy P: Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1990, 76:1431-7.

- [52] Verduin EP, Brand A, van de Watering LM, Roelen DL, Kanhai HH, Doxiadis II, Claas FH, Schonewille H: The HLA-DRB1* 15 phenotype is associated with multiple red blood cell and HLA antibody responsiveness. *Transfusion* 2016, 56:1849-56.
- [53] Tatari-Calderone Z, Gordish-Dressman H, Fasano R, Riggs M, Fortier C, Campbell AD, Charron D, Gordeuk VR, Luban NL, Vukmanovic S: Protective effect of HLA-DQB1 alleles against alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Human immunology* 2016, 77:35-40.
- [54] Allali S, Peyrard T, Amiranoff D, Cohen JF, Chalumeau M, Brousse V, de Montalembert M: 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* 2017, 177:641-7.
- [55] Bashawri L: Red cell alloimmunization in sickle-cell anaemia patients. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, 13 (5), 1181-1189, 2007 2007.
- [56] Chou ST, Jackson T, Vege S, Smith-Whitley K, Friedman DF, Westhoff CM: High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood* 2013, 122:1062-71.
- [57] Cox JV, Steane E, Cunningham G, Frenkel EP: Risk of alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. *Arch Intern Med* 1988, 148:2485-9.
- [58] da Cunha Gomes E, Machado L, de Oliveira L, Neto J: The erythrocyte alloimmunisation in patients with sickle cell anaemia: a systematic review. *Transfusion Medicine* 2019, 29:149-61.
- [59] Helman R, Cançado RD, Olivatto C: Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes com doença falciforme: experiência de um centro em São Paulo. *Einstein (São Paulo)* 2011, 9:160-4.
- [60] Higgins JM, Sloan SR: Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders. *Blood* 2008, 112:2546-53.
- [61] Hendrickson JE, Hod EA, Perry JR, Ghosh S, Chappa P, Adisa O, Kean LS, Ofori-Acquah SF, Archer DR, Spitalnik SL: Alloimmunization to transfused HOD red blood cells is not increased in mice with sickle cell disease. *Transfusion* 2012, 52:231-40.
- [62] Vichinsky EP: The prevention and management of alloimmunization in sickle cell disease: the benefit of extended phenotypic matching of red blood cells. *Immunohematology* 2012, 28:20-3.
- [63] Hudson KE, Fasano RM, Karafin MS, Hendrickson JE, Francis RO: Mechanisms of alloimmunization in sickle cell disease. *Current opinion in hematology* 2019, 26:434-41.
- [64] Vichinsky EP, Earles A, Johnson RA, Hoag MS, Williams A, Lubin B: Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. *N Engl J Med* 1990, 322:1617-21.

- [65] Girello AL, Kühn TIB: Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária. Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária, 2002.
- [66] Moreira Jr G, Bordin JO, Kuroda A, Kerbaux J: Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: the influence of racial and antigenic pattern differences between donors and recipients in Brazil. *American journal of hematology* 1996, 52:197-200.
- [67] Murao M, Viana M: Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. *Brazilian Journal of Medical and biological research* 2005, 38:675-82.
- [68] Santos FW, Magalhães SMM, Mota RMS, Pitombeira MH: Post-transfusion red cell alloimmunisation in patients with acute disorders and medical emergencies. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2007, 29:369-72.
- [69] Fasano RM, Booth GS, Miles M, Du L, Koyama T, Meier ER, Luban NL: Red blood cell alloimmunization is influenced by recipient inflammatory state at time of transfusion in patients with sickle cell disease. *British journal of haematology* 2015, 168:291-300.
- [70] Sins JW, Biemond BJ, van den Bersselaar SM, Heijboer H, Rijneveld AW, Cnossen MH, Kerkhoffs JLH, van Meurs AH, von Ronnen FB, Zalpuri S: Early occurrence of red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease. *American journal of hematology* 2016, 91:763-9.
- [71] Desai PC, Deal AM, Pfaff ER, Qaqish B, Hebden LM, Park YA, Ataga KI: Alloimmunization is associated with older age of transfused red blood cells in sickle cell disease. *American journal of hematology* 2015, 90:691-5.
- [72] Yazdanbakhsh K: Mechanisms of sickle cell alloimmunization. *Transfusion Clinique et Biologique* 2015, 22:178-81.
- [73] Hendrickson JE, Desmarests M, Deshpande SS, Chadwick TE, Hillyer CD, Roback JD, Zimring JC: Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. *Transfusion* 2006, 46:1526-36.
- [74] Platt OS: Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation* 2000, 106:337-8.
- [75] Papay P, Hackner K, Vogelsang H, Novacek G, Primas C, Reinisch W, Eser A, Mikulits A, Mayr WR, Körmöczí GF: High risk of transfusion-induced alloimmunization of patients with inflammatory bowel disease. *The American journal of medicine* 2012, 125:717. e1-. e8.
- [76] Nickel RS, Horan JT, Fasano RM, Meyer E, Josephson CD, Winkler AM, Yee ME, Kean LS, Hendrickson JE: Immunophenotypic parameters and RBC alloimmunization in children with sickle cell disease on chronic transfusion. *American journal of hematology* 2015, 90:1135-41.
- [77] Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, Brown PO: Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS biology* 2009, 7:e1000238.

- [78] Verduin EP, Brand A, Schonewille H: Is female sex a risk factor for red blood cell alloimmunization after transfusion? A systematic review. *Transfusion medicine reviews* 2012, 26:342-53. e5.
- [79] Verduzco LA, Nathan DG: Sick cell disease and stroke. *Blood* 2009, 114:5117-25.
- [80] Padmanabhan S, Chandrasekaran V: Incidence and significance of allo and auto antibodies in transfused adult sickle cell patients. *Blood: AMER SOC HEMATOLOGY 1900 M STREET. NW SUITE 200, WASHINGTON, DC 20036 USA, 2000. pp. 109B-B.*
- [81] Noizat-Pirenne F, Tournamille C, Bierling P, Roudot-Thoraval F, Le Pennec PY, Rouger P, Ansart-Pirenne H: Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion* 2006, 46:1328-33.
- [82] Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H, Tessier MC, Polychronakos C: A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem* 2002, 277:46478-86.
- [83] Maurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, Rieckmann P: A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* 2002, 54:1-8.
- [84] Vichinsky EP, Luban NL, Wright E, Olivieri N, Driscoll C, Pegelow CH, Adams RJ, Anemia SPTiSC: Prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. *Transfusion* 2001, 41:1086-92.
- [85] Wang JJ, Shi YP, Yue H, Chun W, Zou LP: CTLA-4 exon 1 +49A>G polymorphism is associated with renal involvement in pediatric Henoch-Schonlein purpura. *Pediatr Nephrol* 2012, 27:2059-64.
- [86] Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN: Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *American journal of epidemiology* 2009, 169:505-14.
- [87] Yu J, Heck S, Yazdanbakhsh K: Prevention of red cell alloimmunization by CD25 regulatory T cells in mouse models. *Am J Hematol* 2007, 82:691-6.
- [88] Iikuni N, Lourenço EV, Hahn BH, La Cava A: Cutting edge: regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology* 2009, 183:1518-22.
- [89] Crotty S: Follicular helper CD4 T cells (T_{fh}). *Annual review of immunology* 2011, 29:621-63.
- [90] Chauveau C, Rémy S, Royer PJ, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert F-X, Tesson L, Brion R, Beriou G, Gregoire M: Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 2005, 106:1694-702.

- [91] Rémy S, Blancou P, Tesson L, Tardif V, Brion R, Royer PJ, Motterlini R, Foresti R, Painchaut M, Pogu S: Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity. *The Journal of Immunology* 2009, 182:1877-84.
- [92] Godefroy E, Liu Y, Shi P, Mitchell WB, Cohen D, Chou ST, Manwani D, Yazdanbakhsh K: Altered heme-mediated modulation of dendritic cell function in sickle cell alloimmunization. *Haematologica* 2016, 101:1028-38.
- [93] Carneiro-Proietti AB, Kelly S, Miranda Teixeira C, Sabino EC, Alencar CS, Capuani L, Salomon Silva TP, Araujo A, Loureiro P, Máximo C: Clinical and genetic ancestry profile of a large multi-centre sickle cell disease cohort in Brazil. *British journal of haematology* 2018, 182:895-908.
- [94] Sanz C, Ghita G, Franquet C, Martinez I, Pereira A: Red-blood-cell alloimmunization and female sex predict the presence of HLA antibodies in patients undergoing liver transplant. *Vox sanguinis* 2010, 99:261-6.

Apêndices

8 APÊNDICES

8.1 Apêndice A - Artigo publicado no International Journal of immunogenetics.

Received: 22 March 2017 | Revised: 23 May 2017 | Accepted: 20 July 2017

DOI: 10.1111/iji.12334

ORIGINAL ARTICLE

WILEY INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOGENETICS

-318C/T polymorphism of the *CTLA-4* gene is an independent risk factor for RBC alloimmunization among sickle cell disease patientsV. B. Oliveira¹ | M. R. Dezan¹ | F. C. A. Gomes¹ | S. F. Menosi Gualandro² | J. E. Krieger³ | A. C. Pereira³ | J. D. Marsiglia³ | J. E. Levi¹ | V. Rocha² | A. Mendrone-Junior¹ | E. C. Sabino⁴ | C. L. Dinardo¹ ¹Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil²Discipline of Hematology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, São Paulo, Brazil³Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, São Paulo, Brazil⁴Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence

Carla L. Dinardo, Division of Immunohematology, Fundação Pró-Sangue, Pinheiros, São Paulo, SP, Brazil.
Email: caludinardo@gmail.com

Funding information

São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant/Award Number: 2014/50250-6

Summary

Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) molecule is expressed on T-lymphocyte membrane and negatively influences the antigen-presenting process. Reduced expression of CTLA-4 due to gene polymorphisms is associated with increased risk of autoimmune disorders, whose physiopathology is similar to that of post-transfusion red blood cell (RBC) alloimmunization. Our goal was to evaluate if polymorphisms of *CTLA-4* gene that affect protein expression are associated with RBC alloimmunization. This was a case-control study in which 134 sickle cell disease (SCD) patients and 253 non-SCD patients were included. All patients were genotyped for the polymorphisms 49A/G and -318C/T of *CTLA-4* gene. The genotype frequency of -318C/T differed significantly between alloimmunized and nonalloimmunized SCD patients, irrespective of clinical confounders ($p = .016$). SCD patients heterozygous for -318T allele presented higher risk of alloantibody development (OR: 5.4, CI: 1.15–25.6). In conclusion, the polymorphism -318C/T of *CTLA-4* gene is associated with RBC alloimmunization among SCD patients. This highlights the role played by CTLA-4 on post-transfusion alloantibody development.

KEYWORDS

alloimmunization, CTLA-4, polymorphism, sickle cell

1 | INTRODUCTION

Red blood cell (RBC) alloimmunization is a late post-transfusion complication which affects approximately 18%–62% of sickle cell disease (SCD) and 0.2%–2.8% of non-SCD blood recipients (Dezan et al., 2016; Dinardo, Ito, Sampaio, & Mendrone Junior, 2013; Rosse et al., 1990). The presence of RBC alloantibodies is associated with transfusion delays, post-transfusion haemolytic reactions and haemolytic disease of the foetus/newborn (Nickel et al., 2016). Stochastic modelling suggested that only a proportion of the transfused patients is capable of developing alloantibodies following antigen-mismatched transfusions, what confers them the status of "immune responders" (Higgins & Sloan,

2008). These patients, if assertively identified could be prophylactically transfused with antigen-matched RBC units, avoiding sensitization against the most relevant erythroid antigens (Vichinsky, 2012).

Evidences show that factors related to the patient, especially referring to the inflammation status, are the mainstream for post-transfusion alloantibody development (Hendrickson et al., 2006). It was already demonstrated the SCD patients' predisposition to alloimmunization is due to inflammatory signals and not inherent to their genetic condition (Hendrickson et al., 2012). Clinically, this is evidenced by higher rates of alloantibody development after transfusions taking place during acute thoracic syndrome and vaso-occlusive episodes (Fasano et al., 2015). There are yet no clinical factors or laboratorial

tests capable of assertively identifying the group of immune responders to indicate antigen-matched transfusions (Dinardo et al., 2013). The prophylaxis strategy frequently adopted by transfusion centres is the prospective transfusion of antigen-matched transfusions to all SCD patients, even though 50%–70% of them will never develop alloantibodies (Higgins & Sloan, 2008).

Red blood cell alloimmunization stems from the antigen-presenting event, in which HLA molecule plays a central role in conjunction with multiple co-stimulatory proteins (Sippert et al., 2016; Verduin et al., 2016). Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) is a co-stimulatory protein expressed on activated T lymphocytes and on T regulatory cells (Tregs), representing an important regulator of immunotolerance (Ueda et al., 2003). Functionally, CTLA-4 is the receptor for B7-1 and B7-2 molecules of antigen-presenting cells, negatively stimulating the activated T CD4⁺ cells (Bour-Jordan et al., 2003).

Recently, the association between chronic autoimmune diseases and alloimmunization has been demonstrated, highlighting that molecular markers of autoimmunity could be transposed to the transfusion scenario and used to predict alloantibody development (Ryder, Hendrickson, & Tormey, 2016). In this regard, polymorphisms modifying CTLA-4 expression, mainly 49A/G and -318C/T, have already been associated with multiple autoimmune conditions and could be implicated in the post-transfusion alloantibody formation (Kumar et al., 2015; Ting et al., 2016; Ueda et al., 2003).

Based on the exposed, the aim of this study was to evaluate if the polymorphisms 49A/G and -318C/T of CTLA-4 gene are associated with the occurrence of RBC alloimmunization among SCD and non-SCD blood recipients.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patient recruitment and sampling processing

The study was conducted in accordance to Helsinki principles. All participants read and signed the informed consent approved by our local ethics committee (protocol number 55381616.0.0000.0065). The sample size was calculated aiming 70% power and 5% of significance level, estimating a minor allele frequency of 8% (-318T)/50% (49G) in cases (alloimmunized patients) and 1% (-318T)/30% (49G) in controls (nonalloimmunized patients). To meet these criteria, 70 patients should be included in each group of comparison. It was planned to compare the genotype frequency of CTLA-4 49A/G and -318C/T polymorphisms between SCD cases and controls and also between non-SCD cases and controls. This simulation was held on OSSE (Online Sample Size Estimator) website (<http://osse.bii.a-star.edu.sg/calculation1.php>).

Patients were recruited sequentially as they were transfused at the haemocenter of reference (Fundação Pró-Sangue, São Paulo Hemocenter, São Paulo, Brazil), which serves general clinical and surgical patients of a quaternary hospital (Clinics Hospital, São Paulo, Brazil). They were classified as SCD patients if exhibiting HbSS, HbS β^0 or HbS β^+ genotype and as non-SCD in the absence of this criterion. Patients diagnosed with autoimmune conditions were excluded from the analyses.

Antibody screening and identification were performed using a commercial set of phenotyped erythrocytes (ID-DiaPanel[®]) and LISS/Coombs micro-agglutination columns (LISS/Coombs ID-Cards[®]), following the manufacturer's instructions (Bio-Rad[®], Cressier-sur-Morat, Switzerland). Data referring to previous transfusions were obtained from the haemocenter electronic files.

Patients were included in the alloimmunized group if one or more alloantibodies were identified in the sera and in the nonalloimmunized group (control group) if the antibody screening was negative and if the patient was transfused in at least three separate occasions. This last inclusion criterion was applied to assure that only nonresponders, that is patients incapable of developing post-transfusion alloantibodies, were included in the control group and was based on previous evidence that immune responders had approximately 30% chance of alloimmunization after each RBC transfusion (Higgins & Sloan, 2008).

The blood samples collected for the pretransfusion tests (EDTA tube) were designated for the genotyping assay and stored under 4–6°C until processing.

2.2 | Genotyping

The DNA was extracted from EDTA samples using commercial kits (PureLink[®] Genomic; Invitrogen), according to manufacturer's instruction. The polymorphisms 49A/G and -318C/T of CTLA-4 gene were genotyped by Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR as described elsewhere (Svahn et al., 2005). In brief, PCR was held on conventional thermocycler (Mastercycler[®] Pro, Eppendorf[™], Hamburg, Germany) with total volume of 50 μ l, with DNA concentration of 50–150 ng/ μ l and the following forward and reverse primers: 5'-AAGGATGCCAGAGATTGA-3' and 5'-AGCCGTGGGTTAGCTGTTA-3' (-318C/T); 5'-CTGAACACCGCTCCCAAAA-3' and 5'-TTGCAGAAGACAGGGATGAA-3' (49A/G). PCR conditions were as follows: 2 min at 94°C, 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 58°C and 30 s at 72°C, followed by 7 min at 72°C. RFLP analysis was carried out with 15 μ l reaction volume containing the PCR product and the specific restriction enzymes *Mse*I for the polymorphism -318C>T and *Bbv*I for the polymorphism 49A/G. PCR fragment products were subjected to electrophoresis in 3% agarose gel and the following bands could be observed according to the patients' genotype: 212 bp PCR product with/without two bands of 118 and 94 bp (-318C/T) and 130 bp PCR product with/without two bands of 74 and 56 bp (49A/G). All primers were synthesized by Invitrogen[®] (Carlsbad, CA, USA).

To standardize the RFLP-PCR assay, 15% of the included samples were tested in parallel using this method and conventional Sanger sequencing, which was considered the gold-standard. Sanger sequencing was performed as described elsewhere (Dezan et al., 2017), using the same set of primers.

2.3 | Hardy-Weinberg equilibrium

Hardy-Weinberg equilibrium fitness for both CTLA4 49A/G and -318C/T was calculated using the Chi-square test for biallelic

markers held on the software OEGE (Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies) (Rodriguez, Gaunt, & Day, 2009), considering 5% of significance and 1 degree of freedom.

2.4 | Statistics

The genomic frequency of 49A/G and -318C/T polymorphisms was compared between alloimmunized and nonalloimmunized groups using Fisher test. Correction for multiple comparisons using the Bonferroni method was applied for the significant results and a p value $< .025$ was considered significant. Multivariate analysis was performed by logistic regression and considering as potential clinical confounders: lifetime number of RBC transfusions, gender, self-declared race and diagnosis. For these comparisons, a p value $< .05$ was considered significant. All tests were held on SPSS software, 18th version.

3 | RESULTS

3.1 | Restriction fragment length polymorphism-PCR validation

Sixty-six samples were genotyped in parallel using both the proposed RFLP-PCR assay and conventional Sanger sequencing. Both -318C/T and 49A/G polymorphisms were evaluated. Only one sample presented discrepant genotype between methodologies (49AA by RFLP-PCR and 49AG by direct sequencing). The calculated accuracy of the RFLP-PCR assay was 99.24% for 49A/G and 100% for -318C/T.

3.2 | Genotype frequency (CTLA-4 -318C/T and 49A/G) comparison between alloimmunized and nonalloimmunized groups

We included 198 alloimmunized and 189 nonalloimmunized patients in the study. Among the SCD group, 72 were alloimmunized and 62 were nonalloimmunized; while in the non-SCD group, 126 were alloimmunized and 127 were nonalloimmunized. Also, in the non-SCD group, 26.9% of the patients had an oncologic diagnosis, while 73.1% exhibited benign diseases; and 39.1% were followed up by the haematology team, while 60.9% were treated by other clinical specialties. Age, gender, self-declared race and lifetime number of RBC transfusions of each studied group are described on Table 1. 49A/G genotype was inconclusive in 12 patients (two SCD and 10 non-SCD patients) while -318C/T genotype was inconclusive in four patients (one SCD and three non-SCD) due to low amount or quality of DNA samples. Both 49A/G and -318C/T were in linkage equilibrium ($\chi^2 = .02$ and $.23$, respectively).

The 49G allele was identified either in heterozygosis or in homozygosis in 56.3% of the studied patients. The frequency of GG and AG genotype was similar between alloimmunized and nonalloimmunized groups in both SCD patients (58.6% vs. 56.5%, $p = .57$) and non-SCD patients (55.9% vs. 55.2%, $p = .5$).

Among non-SCD patients, the frequency of -318T allele (heterozygosis or homozygosis) was 13.8% in the alloimmunized group and 14.2% in the nonalloimmunized group, without statistical difference ($p = .61$). In the SCD group, none of the patients was genotyped as TT but there was a significant difference in the frequency of the CT genotype between alloimmunized and nonalloimmunized patients (15.5% and 3.2%, $p = .016$). This difference persisted in the multivariate analysis ($p = .025$), confirming the CT genotype as independently associated with RBC alloimmunization. The calculated odds ratio (heterozygous/wild-type) was 5.4 (1.15–25.6).

4 | DISCUSSION

The present study revealed that the polymorphism -318C/T of the CTLA4 gene is associated with the occurrence of post-transfusion alloimmunization among SCD patients. This represents a molecular risk factor which can be accessed before the beginning of the transfusion programme, predicting increased chance of alloantibody development and indicating the need of primary prophylaxis with antigen-matched transfusions irrespective of the presence of antibodies in patients' sera. Further, this positive association sheds light into an important role played by CTLA-4 on alloimmunization physiopathology, representing a plausible target to be evaluated in future studies aiming the suppression of this post-transfusion complication.

Identifying molecular markers to predict RBC alloimmunization relies on the fact that $< 20\%$ of the transfusion recipients have the ability to develop alloantibodies after antigen-mismatched transfusions (Higgins & Sloan, 2008) and that patients' genetic background is an important factor driving this susceptibility (Dinardo et al., 2013; Sippert et al., 2016). Our study is the first to evaluate the role played by polymorphisms on CTLA-4 co-stimulatory molecule on the alloimmunization scenario, demonstrating the association between -318C/T polymorphism, which modifies the expression of CTLA-4 molecule on the cell surface, and the risk of post-transfusion antibody development. Other previous studies have focused mainly on HLA class II molecule, identifying that *HLA-DRB1*15:03* allele is an universal risk factor for alloantibody development as well as that diverse HLA restrictions are associated with alloimmunization to specific RBC antigens (Noizat-Pirenne et al., 2006; Verduin et al., 2016). Both HLA and CTLA-4 alleles can be used in clinical practice to identify SCD patients at high risk of alloantibody formation, indicating the need of extended antigen-matched transfusions. Considering our results, SCD patients entering the chronic transfusion programme could be genotyped for CTLA-4 -318C/T and, if heterozygous, intended to receive RBC units matching C, c, E, e; K; Jka, Jkb; Fya, Fyb; Ss; instead of receiving only CEK-matched units, due to their higher risk of alloimmunization.

CTLA-4 molecule is expressed on activated CD4⁺ T cells and on T regulatory cells (Tregs), mediating peripheral tolerance and preventing autoimmune conditions (Ueda et al., 2003). CTLA-4 knockout murine models exhibit important defects of T-cell functioning, mediating increase in IgG levels (Bour-Jordan et al., 2003). Also, CTLA-4 is a marker of Tregs activation, whose role in regulating alloantibody responses

TABLE 1 Comparison between alloimmunized and nonalloimmunized patients regarding demographics and CTLA-4 polymorphisms genotype

	Sickle cell disease		<i>p</i>	Nonsickle cell disease		<i>p</i>
	Alloimmunized	Nonalloimmunized		Alloimmunized	Nonalloimmunized	
Number	72	62		126	127	
Race (n/%)			.358			.798
White	41 (57%)	26 (42%)		94 (74.6%)	94 (74%)	
Black	23 (31.9%)	26 (42%)		24 (19%)	23 (18.1%)	
Asian	0 (0%)	0 (0%)		1 (0.8%)	1 (0.8%)	
Ignored	8 (11.1%)	10 (16%)		7 (5.6%)	9 (7.1%)	
Gender (female/male) (n/%)	44 (61%)/28 (39%)	33 (53%)/29 (47%)	.485	82 (65%)/44 (35%)	55 (43%)/72 (57%)	.001
Age (years) (mean ± SD)	30 ± 13.1	27 ± 16.7		52 ± 17.9	41 ± 61.3	
RBC units transfused (mean ± SD)	79 ± 72.6	50 ± 55.7	.009*	25 ± 62.8	48 ± 19.9	.042
Genotypic frequency of CTLA4 SNPs						
49A/G (n/%)						
Number of patients with valid genotype	70	62	.571	118	125	.499
GG	7 (10%)	7 (11.3%)		17 (14.4%)	13 (10.4%)	
AG	34 (48.6%)	28 (45.2%)		49 (41.5%)	56 (44.8%)	
AA	29 (41.4%)	27 (43.5%)		52 (44.1%)	56 (44.8%)	
-318C>T (n/%)						
Number of patients with valid genotype	71	62	.016* [†]	123	127	.613
TT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (0.8%)	
CT	11 (15.5%)	2 (3.2%)		17 (13.8%)	17 (13.4%)	
CC	60 (84.5%)	60 (96.8%)		106 (86.2%)	109 (85.8%)	
Haplotype frequency						
Number of patients with valid genotype	68	62	.14	116	125	.92
49AG -318CC	28 (41.2%)	26 (41.9%)		42 (36.2%)	50 (40%)	
49AA -318CC	23 (33.8%)	27 (43.6%)		42 (36.2%)	44 (35.2%)	
49AG -318CT	4 (5.9%)	2 (3.2%)		6 (5.2%)	6 (4.8%)	
49GG -318CC	7 (10.3%)	7 (11.3%)		16 (13.8%)	13 (10.4%)	
49 AA -318CT or -318TT	6 (8.8%)	0		10 (8.6%)	12 (9.6%)	

*With statistical significance after multivariate analysis.

[†]*p* value significant after Bonferroni correction (<.025).

in transfusion recipients has already been demonstrated in murine models (Yu, Heck, & Yazdanbakhsh, 2007). The association between CTLA-4 -318T allele, which modifies molecule expression on activated T lymphocytes and on T regulatory cells (Tregs), and increased frequency of RBC alloimmunization is new in literature. This association possibly stems from the negative stimulus CTLA-4 molecule exerts on the antigen-presenting event in the case of RBC antigen-mismatched transfusions. This highlights that modulating CTLA-4 expression or using the reagent CTLA4-Ig, currently being evaluated for preventing transplantation rejection (Gilson, Patel, & Zimring, 2012) may represent a possible strategy to prevent alloimmunization against RBC

antigens in SCD patients, especially when there is risk of developing alloantibodies against high-frequency antigens, mainly due to RH variants.

Even though the present study evaluated both SCD and non-SCD patients, the polymorphism -318C/T of CTLA4 gene was linked to alloimmunization only in the first group. It has already been demonstrated that SCD patients exhibit a higher proportion of Tregs expressing CTLA-4 and CD39 in comparison with non-SCD controls and that the predominance of this phenotype is related to their baseline disease rather than to their alloimmunization status (Vingert et al., 2014). Considering the phenotypic differences between Tregs

of SCD and non-SCD individuals, it is plausible that modifying the expression of CTLA-4 could impact differently on their immune response, justifying our results. Also, it is known that the chronic inflammatory status of SCD patients is the main responsible for their susceptibility to alloimmunization (Hendrickson et al., 2012) and that the Tregs are pivotal in the post-transfusion antibody development in this scenario (Yu et al., 2007). This reinforces that polymorphisms modifying CTLA-4 expression could have a different relevance to the alloimmunization process between SCD and non-SCD patients.

Finally, the association between CTLA-4 -318C/T polymorphism and the susceptibility to post-transfusion alloantibody development is in line with recent evidences pointing to common factors underlying autoimmunity and alloimmunization (Ryder et al., 2016). CTLA-4 is one of the susceptibility genes for various autoimmune diseases and its promoter polymorphism -318C/T has already been associated with autoimmune thyroid conditions (Park et al., 2000; Ting et al., 2016; Ueda et al., 2003). The relation between chronic autoimmune diseases and RBC alloimmunization has been clinically demonstrated by Ryder et al. (2016) and possibly stems from a similar inflammation background. In this regard, our results reinforce this positive association and encourage further studies trying to transpose autoimmune molecular markers to the transfusion scenario, aiming at the early identification of "immune responders."

This study has some limitations. In an attempt to correctly classify the "non-responder" individuals, only patients who have been transfused on three different occasions and did not develop alloantibodies were included in the control group. Considering the high rate of alloimmunization among our SCD patients (Dezan et al., 2016), the total number of patients included in the analysis was low. Also, even though the number of clinical confounders included in the multivariate analysis was comprehensive, it is important to highlight that RBC alloimmunization physiopathology is highly multifactorial and that patients' inflammation background was not taken into consideration due to the lack of assertive parameters (Dinardo et al., 2013). Finally, SCD patients exhibited higher frequency of African ancestry and were younger in comparison with non-SCD. This fact may have hampered the identification of similar -318C/T genotype frequency between alloimmunized and nonalloimmunized patients in the non-SCD group.

5 | CONCLUSION

The polymorphism -318C/T of CTLA4 gene is associated with RBC alloimmunization among SCD patients. This not only highlights the role played by CTLA-4 molecule on post-transfusion alloantibody development but also represents a molecular target to be addressed by future studies.

ETHICS

The study was approved by our local ethics committee (protocol number 55381616.0.0000.0065, University of São Paulo School of Medicine), date 02/02/2017.

CONFLICT OF INTEREST

We declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Bour-Jordan, H., Grogan, J. L., Tang, Q., Auger, J. A., Locksley, R. M., & Bluestone, J. A. (2003). CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment. *Nature Immunology*, 4, 182–188.
- Dezan, M. R., Oliveira, V. B., Bianchi, J. V. S., Rodrigues, V., Solano, J. H., Gomes, F. C., ... Dinardo, C. L. (2016). Effectiveness of a red cell antigen-matching transfusion protocol in sickle cell disease patients. *ISBT Science Series*, 11, 132–139.
- Dezan, M. R., Ribeiro, I. H., Oliveira, V. B., Vieira, J. B., Gomes, F. C., Franco, L. A., ... Dinardo, C. L. (2017). RHD and RHCE genotyping by next-generation sequencing is an effective strategy to identify molecular variants within sickle cell disease patients. *Blood Cells, Molecules, & Diseases*, 65, 8–15.
- Dinardo, C. L., Ito, G. M., Sampaio, L. R., & Mendrone Junior, A. (2013). Study of possible clinical and laboratory predictors of alloimmunization against red blood cell antigens in cancer patients. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 35, 414–416.
- Fasano, R. M., Booth, G. S., Miles, M., Du, L., Koyama, T., Meier, E. R., & Luban, N. L. (2015). Red blood cell alloimmunization is influenced by recipient inflammatory state at time of transfusion in patients with sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 168, 291–300.
- Gilson, C. R., Patel, S. R., & Zimring, J. C. (2012). CTLA4-Ig prevents alloantibody production and BMT rejection in response to platelet transfusions in mice. *Transfusion*, 52, 2209–2219.
- Hendrickson, J. E., Desmarest, M., Deshpande, S. S., Chadwick, T. E., Hillyer, C. D., Roback, J. D., & Zimring, J. C. (2006). Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. *Transfusion*, 46, 1526–1536.
- Hendrickson, J. E., Hod, E. A., Perry, J. R., Ghosh, S., Chappa, P., Adisa, O., ... Zimring, J. C. (2012). Alloimmunization to transfused HOD red blood cells is not increased in mice with sickle cell disease. *Transfusion*, 52, 231–240.
- Higgins, J. M., & Sloan, S. R. (2008). Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: Evidence for a distinct population of immunologic responders. *Blood*, 112, 2546–2553.
- Kumar, N., Kaur, G., Kanga, U., Mehra, N. K., Neolia, S. C., Tandon, N., & Zucman, S. C. (2015). CTLA4+49g allele associates with early onset of type 1 diabetes in north Indians. *International Journal of Immunogenetics*, 42, 445–452.
- Nickel, R. S., Hendrickson, J. E., Fasano, R. M., Meyer, E. K., Winkler, A. M., Yee, M. M., ... Stowell, S. R. (2016). Impact of red blood cell alloimmunization on sickle cell disease mortality: A case series. *Transfusion*, 56, 107–114.
- Noizat-Pirenne, F., Tournamille, C., Bierling, P., Roudot-Thoraval, F., Le Pennec, P. Y., Rouger, P., & Ansart-Pirenne, H. (2006). Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion*, 46, 1328–1333.
- Park, Y. J., Chung, H. K., Park, D. J., Kim, W. B., Kim, S. W., Koh, J. J., & Cho, B. Y. (2000). Polymorphism in the promoter and exon 1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans. *Thyroid*, 10, 453–459.
- Rodriguez, S., Gaunt, T. R., & Day, I. N. (2009). Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *American Journal of Epidemiology*, 169, 505–514.
- Rosse, W. F., Gallagher, D., Kinney, T. R., Castro, O., Dosik, H., Moehr, J., ... Levy, P. S. (1990). Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The cooperative study of sickle cell disease. *Blood*, 76, 1431–1437.

- Ryder, A. B., Hendrickson, J. E., & Tormey, C. A. (2016). Chronic inflammatory autoimmune disorders are a risk factor for red blood cell alloimmunization. *British Journal of Haematology*, 174, 483–485.
- Sippert, E. A., Visentainer, J. E., Alves, H. V., Rodrigues, C., Gilli, S. C., Addas-Carvalho, M., ... Castilho, L. (2016). Red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease: Correlation with HLA and cytokine gene polymorphisms. *Transfusion*, 57, 379–389.
- Svahn, J., Capasso, M., Lanciotti, M., Marrone, A., Haupt, R., Bacigalupo, A., ... Iolascon, A. (2005). The polymorphisms -318C>T in the promoter and 49A>G in exon 1 of CTLA4 and the risk of aplastic anemia in a Caucasian population. *Bone Marrow Transplantation*, 35(Suppl 1), S89–S92.
- Ting, W. H., Chien, M. N., Lo, F. S., Wang, C. H., Huang, C. Y., Lin, C. L., ... Lee, Y. J. (2016). Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) gene polymorphisms with autoimmune thyroid disease in children and adults: Case-control study. *PLoS One*, 11, e0154394.
- Ueda, H., Howson, J. M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., ... Gough, S. C. (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423, 506–511.
- Verduin, E. P., Brand, A., van de Watering, L. M., Roelen, D. L., Kanhai, H. H., Doxiadis, I. I., ... Schonewille, H. (2016). The HLA-DRB1*15 phenotype is associated with multiple red blood cell and HLA antibody responsiveness. *Transfusion*, 56, 1849–1856.
- Vichinsky, E. P. (2012). The prevention and management of alloimmunization in sickle cell disease: The benefit of extended phenotypic matching of red blood cells. *Immunohematology*, 28, 20–23.
- Vingert, B., Tamagne, M., Desmarests, M., Pakdaman, S., Elayeb, R., Habibi, A., ... Cohen, J. L. (2014). Partial dysfunction of Treg activation in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, 89, 261–266.
- Yu, J., Heck, S., & Yazdanbakhsh, K. (2007). Prevention of red cell alloimmunization by CD25 regulatory T cells in mouse models. *American Journal of Hematology*, 82, 691–696.

How to cite this article: Oliveira VB, Dezan MR, Gomes FCA, et al. -318C/T polymorphism of the CTLA-4 gene is an independent risk factor for RBC alloimmunization among sickle cell disease patients. *Int J Immunogenet*. 2017;00:1–6.
<https://doi.org/10.1111/iji.12334>

8.2 Apêndice B - Certificado de apresentação em painel com visita guiada do trabalho científico intitulado “c.-318C>T Polymorphism of the *CTLA-4* gene is na independente risk fator for RBC alloimmunization among sickle cell disease patients” no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2017.

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho abaixo foi aprovado para **apresentação em painel com visita guiada** no **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2017**, a ser realizado no período de 8 a 11 de novembro de 2017 em Curitiba/PR.

Título: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ANTÍGENO RHD COM EXPRESSÃO SOROLÓGICA ALTERADA EM DOADORES DE SANGUE DA FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE / HEMOCENTRO DE SÃO PAULO

Autores: Luz FJ, Rossite D, Oliveira VB, Gallucci A, Rocha V, Mendrone-Junior A, Dezan MR, Dinardo CL

Data e horário da exposição do painel: 10/11/2017 (Sexta-feira) das 08:30 – 18:00

Horário da visita guiada com os debatedores: Das 10:15 - 11:15

Número do painel: 220

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR

Rua Tenente Catão Roxo, 2501 – Campus USP

14051-140 – Ribeirão Preto – SP - Brasil

CNPJ: 11.422.382/0002-49

Inscrição Estadual – Isenta

9 ANEXOS

9.1 Anexo A - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Associação entre os polimorfismos -318C>T e 49A>G do gene CTLA4 e o risco de aloimunização contra antígenos eritrocitários

PESQUISADOR: CARLA LUANA DINARDO

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 120232

UNIDADE DO HCFMUSP: FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 ANOS.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

O(A) senhor(a) está sendo convidado a participar do presente estudo “Associação entre os polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G do gene *CTLA4* e o risco de aloimunização contra antígenos eritrocitários”. Este tem como objetivo verificar se a presença de alterações no gene nomeado *CTLA4*, que está relacionado ao funcionamento do sistema imunológico, aumenta o risco, que os pacientes que recebem transfusão de sangue têm, de desenvolver anticorpos (reação de defesa) contra substâncias presentes na superfície dos glóbulos vermelhos dos doadores de sangue, que são nomeados de antígenos. A formação destes anticorpos só ocorre em alguns pacientes e tem como consequência deletéria a necessidade de se selecionar doadores que não possuam os antígenos, para o qual este anticorpo se direciona, para transfusões futuras; fato que pode dificultar a identificação de bolsas de sangue compatíveis e retardar as transfusões. Se as alterações do gene *CTLA4* estiverem associadas ao risco de formar estes anticorpos após a transfusão, os pacientes em risco poderiam receber medicações ou até mesmo bolsas selecionadas, evitando esta complicação.

Para este estudo será realizada a avaliação do gene em questão por meio da técnica de genotipagem do DNA (material genético obtido a partir do sangue) de pacientes que sejam transfundidos pela Agência Transfusional Central da Fundação Pró-Sangue, e que tenham idade superior a 18 anos ou inferior a 18 anos com autorização do responsável legal, como o caso do senhor(a). O banco de sangue rotineiramente pesquisa se existem anticorpos contra antígenos dos glóbulos vermelhos antes de liberar qualquer transfusão e estas só são liberadas se estiverem totalmente compatíveis.

Não precisaremos coletar nenhuma amostra adicional do senhor(a). Pedimos autorização para utilizar a amostra que já foi coletada para determinar seu tipo sanguíneo pelo banco de sangue, para extrair o DNA e fazer a técnica de genotipagem;

Não existem, desta forma, riscos físicos para o(a) senhor(a) envolvidos com esta pesquisa;

Não há benefício direto para o participante desta pesquisa. Entretanto, se identificarmos que esta modificação do gene *CTLA4* está associada ao risco de formação de anticorpos, pode-se evitar esta consequência no futuro, para os pacientes que recebem transfusões de forma frequente. É importante lembrar que

as alterações que estamos estudando no gene *CTLA4* não estão associadas ao aparecimento de doenças, sendo somente um possível marcador de indivíduos com maior tendência à formação de anticorpos (defesa imune) após a exposição a substâncias de outros indivíduos (doação de sangue);

Esse estudo não interferirá com nenhum de seus tratamentos;

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal pesquisadora é a aluna de mestrado Valéria Brito Oliveira, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1º andar, laboratório de Imunohematologia; ou pelo telefone 45737657. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): **Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000** Tel: 3893-4401>4407 E-mail: cep.fm@usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e com isso, deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais desta pesquisa;

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação;

Somente utilizaremos os dados e o material coletado para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo Associação entre os polimorfismos c.-318C>T e c.49A>G do gene *CTLA4* e o risco de aloimunização contra antígenos eritrocitários.

Eu discuti com a pesquisadora Valéria Brito Oliveira sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as

garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente

Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Assinatura do responsável legal do
paciente menor de idade

Data ____/____/____

9.2 Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 16 de Novembro de 2016

Ilmo(a)
Dr(a). Ester Cerdeira Sabino
(aos cuidados de Valéria Brito Oliveira)

A Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, tomou ciência do projeto classificado sob o número CPE-IMT 000306 e intitulado '**Associação entre os polimorfismos -318C>T e 49A>G do gene CTLA4 e o risco de aloimunização contra antígenos eritrocitários**'

O projeto deverá ser enviado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para aprovação final.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

9.3 Anexo C - Planilha de Pacientes com DF aloimunizados

DNA	Idade	Sexo	Etnia	Nº transfusões	Diagnóstico	Anticorpos	rs231775	rs5742909
P2	32	feminino	branco	97	AF	auto anti-D, K, C, Dia, Jka, anti-Ch/Rg, HTLA, alo IgG ind., auto anti-e	WT/M	WT/WT
P3	20	masculino	negro	118	AF	C, e, auto IgG ind.	WT/M	WT/WT
P4	42	masculino	branco	74	AF	E, Cw, alo anti-C variante, auto IgG ind.	WT/M	WT/WT
P5	24	masculino	branco	263	AF	alo anti- D variante, anti-C, E, K, Fya, Lua, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
P6	27	masculino	negro	212	AF	auto anti-D, C, alo IgG ind., alo anti-e variante	WT/WT	WT/WT
P7	27	masculino	negro	237	AF	auto anti-D, E, V, autocrioaglutinina ind.	WT/M	WT/M
P10	34	masculino	branco	111	AF	anti-C	WT/M	WT/WT
P17	37	feminino	branco	127	AF	alo anti-C variante, S, alo IgG ind., auto IgG ind.	M/M	WT/WT
P18	33	feminino	branco	137	AF	anti-K, Bga, alo IgG ind.	WT/WT	WT/M
P20	37	feminino	mulato	53	AF	anti-E, c	WT/WT	WT/M
P21	26	masculino	branco	179	AF	anti -C, Lua,	WT/M	WT/WT
P22	38	feminino	mulato	27	AF	anti-K, Fya, V, Dia, auto anti-e, auto IgG ind., alo IgG ind.	WT/M	WT/M
P23	35	masculino	branco	145	AF	auto anti-D, C, anti-E, auto IgG ind.	M/M	WT/WT
P24	54	feminino	negro	77	AF	anti-E, Lea	WT/M	WT/WT
P25	21	feminino	branco	159	AF	anti-c, E, auto IgG ind.	WT/M	WT/WT
P26	20	feminino	branco	140	AF	auto anti-D, C, Jsa, alo IgG ind., alo anti-e variante	WT/WT	WT/M
P27	34	masculino	branco	102	AF	K, E, c, Dia, auto anti-e, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
P28	36	feminino	branco	197	AF	anti-Dia	WT/WT	WT/WT
P30	30	feminino	branco	32	AF	anti-k, E, Dia, Jka, anti-c variante, alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
P31	22	masculino	pardo	148	AF	auto anti-D, Dia, alo anti-e variante, autocrioaglutinina ind.	WT/M	WT/M
P32	47	feminino	mulato	80	AF	anti-K, C	WT/M	WT/WT
P37	56	feminino	negro	51	AF	anti-S, Vs, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
P39	27	feminino	ignorado	136	AF	anti-E, K, c, auto anti-e, auto IgG ind.	WT/WT	WT/WT
P40	30	masculino	branco	85	AF	auto anti-D, K, E, auto IgG ind.	WT/M	WT/WT
P42	27	masculino	branco	123	AF	alo anti-C variante, anti-K, alo anti-e variante, autocrioaglutinina ind.	WT/M	WT/M
P44	57	feminino	branco	4	AF	anti-E, K	M/M	WT/WT
P48	38	masculino	negro	36	AF	anti-C, E, auto IgG ind., autocrioaglutina ind.	WT/M	WT/WT
P49	24	masculino	negro	26	AF	anti-C, auto IgG ind.	WT/M	WT/WT
P53	36	feminino	negro	33	AF	anti-K, E, c, CW	WT/WT	WT/WT
P54	33	feminino	negro	28	AF	anti-S, Fya, C, Jkb, E, alo anti-D variante, alo IgG ind., autocrioaglutinina ind.	M/M	WT/WT
P55	27	feminino	branco	32	AF	anti-Jkb	WT/WT	WT/WT
P56	34	feminino	branco	41	AF	anti-E	WT/M	WT/WT
P61	22	feminino	branco	13	AF	anti-K	WT/WT	WT/WT
P64	53	feminino	branco	28	AF	anti-D, C	WT/M	WT/WT

Anexo C - Planilha de Pacientes com DF aloimunizados (conclusão)

DNA	Idade	Sexo	Etnia	Nº transfusões	Diagnóstico	Anticorpos	rs231775	rs5742909
P67	32	feminino	negro	15	AF	anti-D variante, anti-C	WT/WT	WT/WT
P68	28	feminino	branco	39	AF	auto anti-anti-D, K, Dia	WT/M	WT/WT
P69	21	feminino	mulato	142	AF	anti-Fya, c, E	WT/M	WT/WT
P70	25	feminino	branco	139	AF	anti-E, c	WT/M	WT/WT
P79	30	feminino	branco	9	AF	anti-Jka	WT/WT	WT/WT
P80	37	feminino	negro	16	AF	anti-C, E, alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
P81	23	feminino	pardo	7	AF	anti-C	WT/M	WT/WT
P84	37	masculino	branco	14	AF	anti-C, alo anti-e variante, anti-Bga, alo IgG ind., auto IgG ind.	WT/M	WT/WT
P86	71	feminino	ignorado	7	AF	anti-Jka, M, K, C, auto IgG ind.	WT/WT	WT/WT
P87	38	masculino	branco	26	AF	anti-D, C	WT/WT	WT/WT
P89	25	feminino	ignorado	2	AF	anti-C	WT/WT	WT/WT
P95	34	masculino	negro	16	AF	anti-E, alo IgG ind., auto crio ind.	WT/WT	WT/WT
P103	51	feminino	branco	12	AF	anti-C, e	WT/WT	WT/M
P109	22	feminino	branco	19	AF	anti-e variante, anti-s, C, K, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
P110	22	masculino	negro	8	AF	anti-C, V, E	M/M	WT/WT
P112	35	feminino	branco	7	AF	anti-K	WT/M	WT/WT
P118	19	masculino	branco	18	AF	anti-E, K, jkb, alo IgG ind., auto IgG ind.	M/M	WT/WT
P120	13	feminino	branco	2	AF	anti-D	WT/WT	WT/WT
P121	2	masculino	branco	19	AF	anti-E, K, Jka, Lua, auto IgG ind.	WT/M	WT/WT
P122	45	feminino	mulato	11	AF	anti-E, alo anti-C variante, anti-Fya, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
P131	15	masculino	ignorado	127	AF	alo anti-C variante, auto IgG ind.	WT/WT	WT/M
P132	8	feminino	branco	88	AF	anti-C, E, alo anti-e variante, alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
P136	20	feminino	branco	8	AF	anti-E, c	WT/M	WT/WT
P139	15	masculino	ignorado	82	AF	anti-C, S, Fya, K, anti-Jkb, auto anti-e	WT/M	WT/WT
P142	17	feminino	pardo	179	AF	anti-c, S, alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
P143	17	feminino	branco	122	AF	anti-D, C, auto IgG ind.	WT/M	WT/M
P151	8	masculino	branco	46	AF	anti-E	WT/WT	WT/WT
P155	10	masculino	branco	96	AF	anti-Dia, E, auto IgG ind.	WT/WT	WT/M
P163	30	feminino	ignorado	15	AF	anti-C, E, alo anti-e, auto IgG ind.	WT/WT	WT/WT
L38	32	feminino	ignorado	4	AF	anti-D	WT/M	WT/WT
L54	29	feminino	mulato	1	AF	anti-E	WT/WT	WT/WT

9.4 Anexo D - Planilha de Pacientes com DF não aloimunizados

DNA	Idade	Sexo	Etnia	N° transfusões	Diagnóstico	rs231775	rs5742909
P8	39	feminino	branco	96	AF	WT/M	WT/WT
P11	32	masculino	branco	236	AF	M/M	WT/WT
P13	30	masculino	branco	96	AF	WT/WT	WT/WT
P15	61	feminino	negro	111	AF	WT/WT	WT/WT
P16	43	masculino	branco	29	AF	WT/WT	WT/WT
P19	36	feminino	branco	132	AF	WT/M	WT/M
P33	21	feminino	ignorado	9	AF	WT/M	WT/WT
P35	31	masculino	negro	55	AF	WT/WT	WT/WT
P36	24	feminino	mulato	120	AF	M/M	WT/WT
P38	36	masculino	negro	6	AF	WT/M	WT/WT
P41	30	masculino	branco	16	AF	WT/WT	WT/WT
P45	36	masculino	ignorado	183	AF	WT/M	WT/WT
P46	58	feminino	branco	78	AF	WT/M	WT/WT
P50	23	feminino	mulato	24	AF	WT/WT	WT/WT
P51	69	feminino	negro	10	AF	M/M	WT/WT
P52	38	masculino	parda	22	AF	M/M	WT/WT
P57	64	masculino	branco	5	AF	WT/WT	WT/WT
P60	27	masculino	ignorado	29	AF	WT/M	WT/WT
P66	31	masculino	negro	3	AF	WT/M	WT/WT
P76	28	feminino	branco	19	AF	M/M	WT/WT
P77	20	feminino	ignorado	19	AF	WT/WT	WT/WT
P78	20	feminino	branco	121	AF	WT/WT	WT/WT
P90	23	feminino	ignorado	20	AF	WT/WT	WT/WT
P91	29	masculino	branco	6	AF	WT/WT	WT/WT
P92	31	feminino	branco	30	AF	WT/M	WT/M
P93	29	feminino	branco	18	AF	WT/M	WT/WT
P94	32	feminino	mulato	9	AF	M/M	WT/WT
P97	24	feminino	mulato	13	AF	WT/WT	WT/WT
P101	35	feminino	negro	7	AF	WT/M	WT/WT
P102	63	masculino	ignorado	5	AF	WT/WT	WT/WT
P104	52	feminino	mulato	74	AF	WT/WT	WT/WT
P107	38	masculino	negro	4	AF	WT/WT	WT/WT
P111	35	masculino	mulato	7	AF	WT/M	WT/WT
P116	20	masculino	branco	125	AF	WT/M	WT/WT
P125	2	feminino	parda	4	AF	WT/M	WT/WT
P126	21	feminino	branco	5	AF	WT/WT	WT/WT
P128	33	feminino	mulato	3	AF	WT/WT	WT/WT
P130	17	masculino	mulato	122	AF	WT/M	WT/WT
P134	7	feminino	parda	19	AF	WT/WT	WT/WT
P135	36	feminino	ignorado	14	AF	WT/WT	WT/WT
P137	55	masculino	ignorado	29	AF	WT/M	WT/WT
P140	16	feminino	negro	58	AF	WT/M	WT/WT
P141	12	feminino	branco	123	AF	WT/M	WT/WT

Anexo D - Planilha de Pacientes com DF não aloimunizados (conclusão)

DNA	Idade	Sexo	Etnia	Nº transfusões	Diagnóstico	rs231775	rs5742909
P144	11	masculino	branco	56	AF	WT/M	WT/WT
P145	5	feminino	negro	53	AF	WT/M	WT/WT
P146	13	feminino	branco	108	AF	M/M	WT/WT
P147	9	masculino	branco	85	AF	WT/M	WT/WT
P148	15	masculino	branco	108	AF	WT/M	WT/WT
P149	17	feminino	parda	192	AF	WT/WT	WT/WT
P150	8	masculino	branco	18	AF	WT/WT	WT/WT
P152	63	masculino	branco	25	AF	WT/WT	WT/WT
P156	17	feminino	mulato	125	AF	WT/M	WT/WT
P158	14	feminino	ignorado	4	AF	WT/WT	WT/WT
P160	13	masculino	branco	135	AF	WT/WT	WT/WT
P162	15	masculino	ignorado	14	AF	WT/M	WT/WT
P174	3	feminino	negro	12	AF	WT/WT	WT/WT
P176	43	feminino	negro	21	AF	WT/M	WT/WT
P182	6	masculino	parda	4	AF	WT/M	WT/WT
P185	17	masculino	parda	24	AF	WT/WT	WT/WT
P188	7	feminino	branco	12	AF	WT/WT	WT/WT
P196	7	masculino	branco	17	AF	WT/M	WT/WT
P201	13	masculino	branco	5	AF	WT/M	WT/WT

9.5 Anexo E - Planilha de Pacientes não-DF aloimunizados

DNA	Idade	Sexo	Etnia	Nº transfusões	Diagnóstico	Anticorpos	rs231775	rs5742909
P34	32	masculino	branco	49	AAG	anti-D, C, E	WT/M	WT/WT
P43	33	masculino	mulato	58	LINFOMA	anti-Jka	WT/WT	WT/WT
P47	85	feminino	branco	58	SMD	anti-k, E, auto anti-D, alo IgG ind., autocrioaglutinina ind.	M/M	WT/WT
P58	40	feminino	branco	16	NEO DE TIREÓIDE	anti-D	WT/M	WT/M
P74	24	feminino	ignorado	595	SÍNDROME DE BLUE RUBER BLED NERRES	anti-E, Wra, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
P75	76	feminino	branco	145	SMD	anti-E, K, alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
P83	70	masculino	branco	65	SMD	alo anti-D variante	WT/WT	WT/WT
P100	48	feminino	branco	13	ANEMIA HEMOLÍTICA	anti-M, K, E, Jka	WT/M	WT/WT
P108	66	masculino	branco	172	NEO CEREBRAL + SMD	anti-E, prov. anti-C variante, Alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
P113	54	masculino	branco	Ignorado	SÍNDROME NEFRÓTICA	Alo IgG contra antígeno de alta frequência	WT/M	WT/WT
P115	54	masculino	branco	32	VON WILLEBRAND + ANGIODISPLASIA	anti-D, C, E, Dia, V, Jsa, alo IgG ind.	WT/WT	WT/M
P117	39	masculino	branco	31	LMC	prov. anti-D, prov. anti-E, alo IgG ind., auto IgG ind.	WT/WT	WT/M
P124	52	masculino	negro	2	NEO DE PÂNCREAS	anti-D	WT/WT	WT/WT
P129	17	feminino	branco	154	B TALASSEMIA	anti-Jkb, C, Kpa, auto anti-e	WT/WT	WT/WT
P153	36	feminino	mulato	3	DHFRN	anti-E, K, auto IgG ind.	WT/WT	WT/WT
P157	48	feminino	branco	25	NEO	alo anti-e, anti-Fya, anti-C, auto IgG ind	M/M	WT/WT
P165	36	feminino	branco	3	RHFRN	anti-D, C	WT/WT	WT/WT
P169	66	feminino	branco	4	HDB	anti-Jkb, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
P171	71	feminino	branco	16	NEO DE FÍGADO	anti-K, S, C	WT/M	WT/WT
P172	70	masculino	negro	3	CIRURGIA CARDÍACA	anti-Dia, Lu, Jk	WT/WT	WT/WT
P175	62	feminino	branco	12	NEO DE BASE DO CRÂNIO	anti-c, E, Bga, alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
P179	43	feminino	amarelo	4	NEO DE FÍGADO	anti-E, auto anti-c	M/M	WT/WT
P181	8	masculino	branco	87	APLASIA DE SÉRIE VERMELHA	anti-K	WT/M	WT/WT
P189	62	feminino	branco	5	NEO DE RETO	anti-D, Fya, anti-E	WT/M	WT/WT
P191	57	feminino	ignorado	3	NEO	auto anti-C, auto anti-e	WT/WT	WT/WT
P192	47	feminino	branco	156	MIELOFIBROSE	anti-E, KPA, Wra, Cw, c, alo IgG ind., autocrioaglutinina ind.	M/M	WT/WT
CT1	27	masculino	branco	24	CIRROSE HEPÁTICA	anti-E	M/M	WT/WT
CT3	74	feminino	branco	9	ARSA-T	anti-E, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
CT4	62	masculino	branco	77	B TALASSEMIA	anti-K	WT/WT	WT/M
CT5	66	feminino	branco	53	B TALASSEMIA	anti-K, Kpa, s, Jsa, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
CT6	50	feminino	branco	10	LAPAROTOMIA EXPLORATÓRIA	Anti-M reagindo até 37°C	WT/WT	WT/WT
CT7	59	masculino	mulato	49	HDA	anti-E, Lua, auto IgG ind	WT/WT	WT/M
CT8	50	masculino	branco	6	CIRROSE HEPÁTICA	anti-K	WT/M	WT/WT
CT10	82	feminino	branco	5	ARDIOPATIA ISQUÊMICA	anti-D	WT/M	WT/WT
CT11	67	feminino	negro	2	OCCLUSÃO ARTERIAL AGUDA	alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
CT12	54	masculino	branco	50	CIRROSE HEPÁTICA	anti-Lua, C, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
CT13	51	feminino	branco	7	TRANSPLANTE RENAL	anti-K	WT/WT	WT/WT
CT14	57	feminino	branco	3	CRANIOPLASTIA	anti-E	WT/M	WT/WT
CT15	64	feminino	branco	10	ICC + OBSTRUÇÃO ARTERIAL CENTRAL	anti-K	WT/M	WT/WT

Anexo E - Planilha de Pacientes não-DF aloimunizados (continuação para as demais)

DNA	Idade	Sexo	Etnia	Nº transfusões	Diagnóstico	Anticorpos	rs231775	rs5742909
CT16	43	feminino	branco	9	HDB	anti-D	WT/M	WT/WT
CT17	35	feminino	branco	2	RETICULITE ULCERATIVA	anti-C, K, Kpa,	WT/M	WT/WT
CT18	47	feminino	branco	1	PÊNFIGO VULGAR	anti-Kpb	WT/WT	WT/WT
CT19	71	masculino	branco	9	ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL	anti-D, C	WT/WT	WT/WT
CT22	66	feminino	branco	1	IRC	anti-kpa	WT/WT	WT/WT
CT23	74	feminino	branco	122	HDB + DOENÇA DE CHAGAS	anti-E, Bga, alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
CT24	33	feminino	branco	3	TUMOR CEREBRAL	anti-K	WT/WT	WT/WT
CT25	23	masculino	branco	8	CHOQUE SÉPTICO	anti-K, alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
CT26	66	masculino	branco	8	LMC	prov. Anti-E, autocrioaglutinina ind.	M/M	WT/WT
CT27	85	masculino	branco	4	DOENÇA RENAL CRÔNICA	anti-C, K, S auto IgG ind.	M/M	WT/WT
CT28	88	feminino	branco	Ignorado	FRATURA TRASFEMURAL	prov. Anti-C, auto IgG ind.	M/M	WT/WT
CT29	78	feminino	branco	32	SMD	anti-C, auto anti-e	WT/M	WT/WT
CT30	50	masculino	mulato	6	HDB	anti-M reagindo a 37°C	WT/WT	WT/WT
CT31	62	masculino	mulato	5	CEC perna	anti-S	M/M	WT/WT
CT32	56	masculino	mulato	1	IRC	anti-M reagindo até 37°C	WT/WT	WT/WT
CT33	58	masculino	branco	11	SMD	anti-Jka	WT/M	WT/WT
CT34	67	feminino	branco	17	INSTABILIDADE HEMODINÂMICA	anti-E	WT/M	WT/M
CT35	46	feminino	branco	57	SMD	anti-e, auto IgG ind.	WT/WT	WT/WT
CT36	42	feminino	branco	8	TRANSPLANTE RENAL	anti-K, Dia	WT/WT	WT/WT
CT37	33	feminino	mulato	4	RHFRN	anti-D, C	WT/WT	WT/WT
CT38	31	masculino	branco	Ignorado	TROMBASTENIA	anti-Dia	M/M	WT/WT
CT39	61	masculino	branco	4	HDA	anti-Fya, E, alo IgG ind.	WT/M	WT/M
CT40	55	feminino	branco	2	HDB	anti-c, E, K	WT/M	WT/WT
CT42	23	masculino	mulato	Ignorado	POLITRAUMA	anti-Dia	WT/WT	WT/WT
CT44	58	feminino	branco	1	SEPSE GRAVE + INFECÇÃO URINÁRIA	anti-e	WT/WT	WT/WT
CT45	92	masculino	branco	3	SMD	anti-M reagindo até 37°C	WT/WT	WT/M
CT46	64	masculino	branco	26	ANEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FERRO	anti-E, prov. Anti-c variante, autocrioaglutinina ind.	WT/WT	WT/WT
CT47	73	feminino	branco	43	SMD	anti-Dia	WT/M	WT/WT
CT48	82	feminino	branco	5	SEPSE GRAVE + INFECÇÃO URINÁRIA	anti-N reagindo até 37°C, autocrioaglutinina ind.	WT/M	WT/WT
CT49	60	feminino	negro	3	MM	alo IgG ind. em 57% das He testadas	WT/M	WT/WT
CT50	37	feminino	branco	5	ANEMIA FETAL	anti-D, C, Jkb, S, auto IgG ind.	WT/WT	WT/WT
CT51	68	feminino	branco	6	HD a/e	anti-Lea reagindo até 37°C, anti-Leb	WT/WT	WT/M
CT53	28	feminino	branco	11	PTT	anti-E, Lua, alo IgG ind.	WT/M	WT/M
CT54	40	masculino	branco	9	LAPAROTOMIA EXPLORATÓRIA	anti-Fya, autocrioaglutinina ind.	M/M	WT/WT
CT55	58	masculino	branco	Ignorado	CIRURGIA DE QUADRIL E	anti-Lea reativo até 37°C, autocrioaglutinina ind.	WT/WT	WT/WT
CT56	56	feminino	branco	2	ABCESSO HEPÁTICO	anti-D	WT/WT	WT/WT
L1	39	feminino	mulato	Ignorado	NEO UTERO	anti-Lea reagindo até 37°C, autocrioaglutinina ind.	M/M	WT/WT
L2	45	feminino	branco	9	NEO COLON UTERO	anti-E, c	WT/WT	WT/WT
L3	68	feminino	branco	43	NEO ADENO RETO	anti-D, C, Alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
L4	35	feminino	branco	26	NEO COLO UTERO	anti-E, c, Dia	WT/M	WT/WT

Anexo E - Planilha de Pacientes não-DF aloimunizados (conclusão)

DNA	Idade	Sexo	Etnia	Nº transfusões	Diagnóstico	Anticorpos	rs231775	rs5742909
L5	58	feminino	mulato	8	NEO ÚTERO	anti-D, autocrioaglutinina ind.	WT/M	WT/WT
L6	49	masculino	mulato	Ignorado	SARCOMA RETROPERITONIAL	anti-Dia	WT/WT	WT/M
L7	81	feminino	negro	19	LNH	alo IgG ind.	WT/M	WT/M
L8	36	feminino	branco	42	NEO COLON	anti-D, autocrioaglutinina ind.	WT/M	WT/WT
L10	66	feminino	branco	7	NEO VIAS BILIARES	alo IgG ind., autocrioaglutinina ind.	WT/WT	WT/M
L11	58	feminino	branco	5	LNH	anti-E, autocrioaglutinina ind.	WT/WT	WT/WT
L13	51	feminino	branco	14	NEO MAMA	anti-Jka	WT/WT	WT/WT
L14	53	feminino	branco	7	LNH	anti-E	M/M	WT/WT
L15	69	masculino	branco	12	NEO RETO	anti-C, e	WT/M	WT/WT
L16	61	masculino	branco	10	NEO PULMÃO	anti-k	WT/WT	WT/WT
L17	60	masculino	ignorado	1	NEO DE PRÓSTATA	alo IgG ind contra antígeno de baixa frequência	WT/WT	WT/WT
L18	83	feminino	branco	3	LNH	anti-C, anti-e	WT/WT	WT/WT
L19	70	masculino	branco	10	NEO DE ESÔFAGO	anti-M	WT/WT	WT/WT
L20	71	feminino	ignorado	1	NEO RETO	anti-D, C	M/M	WT/WT
L21	71	feminino	ignorado	Ignorado	NEO PULMÃO	anti-E	WT/WT	WT/M
L22	56	feminino	branco	21	NEO	anti-K	WT/M	WT/WT
L23	62	feminino	branco	22	NEO RETOSIGMOIDE	anti-D, C	WT/M	WT/WT
L24	48	feminino	branco	16	NEO CÔLON	alo IgG em formação	WT/M	WT/WT
L25	72	masculino	ignorado	1	NEO PARTES MOLES	anti-Dia	M/M	WT/WT
L26	50	feminino	branco	4	NEO ÚTERO	anti-M	WT/M	WT/WT
L27	70	feminino	branco	1	ICC	anti-D, C	WT/WT	WT/WT
L28	63	feminino	branco	10	CHOQUE SEPTICO+ HEMATESE	anti-Dia	WT/WT	WT/M
L29	86	feminino	branco	16	NEO RIM	anti-E	WT/WT	WT/WT
L30	62	feminino	branco	13	NEO COLON	anti-E, C	WT/WT	WT/WT
L31	41	masculino	branco	8	SÍNDROME DE SCOTT	anti-E, S, Fyb, alo IgG ind	WT/M	WT/WT
L32	40	feminino	branco	24	TX HEPÁTICO	anti-E	WT/M	WT/WT
L33	42	feminino	branco	Ignorado	GRANDE QUEIMADO	alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
L34	52	feminino	ignorado	2	MIELOMA MÚLTIPLO	anti-D	WT/WT	WT/WT
L37	32	masculino	mulato	3	TRANSPLANTE RENAL	anti-Jkb	WT/M	WT/WT
L39	67	feminino	branco	1	HISTERECTOMIA	anti-e, C, S	WT/M	WT/M
L40	35	feminino	mulato	3	LOBECTOMIA	anti-c	WT/M	WT/WT
L41	24	feminino	branco	215	B TALASSEMIA	anti-K, E, auto IgG ind.	M/M	WT/WT
L51	33	feminino	ignorado	12	ICR + TX RENAL	anti- K, Kpa, alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
L56	38	feminino	negro	2	CESÁRIA	alo IgG ind.	WT/M	WT/WT
L58	49	feminino	branco	2	AN. HEMOLÍTICA	anti-E, auto IgG ind.	WT/M	WT/WT
L81	42	feminino	branco	47	SMD	anti-Dia	WT/M	WT/WT
L110	55	feminino	branco	48	NEO COLON	anti-K	M/M	WT/WT
L122	33	masculino	mulato	60	LINFOMA	anti-Jka, Alo IgG ind.	WT/WT	WT/WT
L133	48	masculino	mulato	11	ESQUITOSOMOSE	anti-K	WT/M	WT/WT
L219	32	feminino	negro	7	COLANGITE	alo IgG ind. em 8 % das He	WT/WT	WT/WT
L230	70	masculino	negro	7	ESTENOSE CERVICAL	Alo IgG ind. Em 59% das He	WT/M	WT/WT

9.6 Anexo F - Planilha de Pacientes não-DF não aloimunizados

DNA	Idade	Sexo	Etnia	Nº transfusões	Diagnóstico	rs231775	rs5742909
L48	24	masculino	mulato	267	AAG	WT/WT	WT/WT
L64	57	masculino	branco	232	SMD	WT/M	WT/WT
L66	23	masculino	mulato	96	AAG	WT/WT	WT/WT
L68	23	feminino	ignorado	27	ANEMIA DE FANCONI	WT/WT	WT/WT
L69	71	masculino	amarelo	94	HPN	WT/WT	WT/WT
L70	30	feminino	ignorado	111	AAG	WT/WT	WT/M
L71	77	masculino	branco	234	SMD	WT/M	WT/M
L72	70	masculino	branco	369	SMD	WT/M	WT/WT
L73	24	masculino	mulato	138	ANEMIA DE FANCONI	WT/WT	WT/WT
L75	53	masculino	branco	62	SMD	WT/M	WT/WT
L76	62	masculino	branco	52	NEO DE RETO	M/M	WT/WT
L77	43	masculino	branco	96	LMA	WT/WT	WT/WT
L78	59	feminino	branco	10	AAG+HPN	WT/M	WT/WT
L79	52	feminino	branco	39	DH	WT/M	WT/WT
L83	51	feminino	branco	37	APSV	WT/M	WT/WT
L84	17	masculino	branco	17	AAG	M/M	WT/WT
L86	67	feminino	branco	8	APLASIA DE MEDULA	WT/WT	WT/WT
L89	60	feminino	branco	49	MM	WT/WT	WT/WT
L91	55	masculino	negro	6	MM	M/M	WT/WT
L93	20	masculino	branco	69	AN. FANCONI	M/M	WT/WT
L95	61	masculino	branco	53	SMD	WT/M	WT/M
L97	62	masculino	branco	32	CIRROSE	WT/M	WT/WT
L98	22	feminino	branco	250	B TALASSEMIA	WT/M	WT/WT
L99	53	feminino	branco	8	LNH	WT/M	WT/WT
L102	66	feminino	branco	9	MM	WT/M	WT/WT
L106	21	feminino	parda	5	TRANSPLANTE RENAL	WT/M	WT/WT
L107	36	masculino	branco	62	LLA	M/M	WT/WT
L108	44	feminino	mulato	49	HEPATITE FULMINANTE	WT/WT	WT/WT
L109	70	feminino	branco	10	CIVD	M/M	WT/WT
L111	22	masculino	branco	34	AAG	WT/WT	WT/WT
L113	65	masculino	negro	5	LNH	WT/WT	WT/WT
L116	40	feminino	ignorado	15	SANGRAMENTO APÓS PERMCATH	WT/WT	WT/WT
L117	70	feminino	branco	11	MM	WT/WT	WT/WT
L118	59	masculino	branco	6	NEO MEDULAR	WT/M	WT/WT
L119	31	masculino	branco	15	TCE	WT/M	WT/M
L120	35	feminino	branco	5	PTT	WT/M	WT/WT
L121	76	masculino	branco	8	NEO LARINGE	WT/M	WT/WT
L123	83	feminino	branco	16	ANEMIA HEMOLÍTICA	WT/M	WT/WT
L124	18	masculino	branco	6	FAF CRÂNIO	WT/WT	WT/WT
L125	36	feminino	branco	8	TRANSPLANTE DE RIM E PANCREAS	WT/WT	WT/M
L126	43	feminino	negro	38	TRANSPLANTE DE FÍGADO	WT/WT	WT/M
L127	53	feminino	ignorado	9	LES + IRC	WT/M	WT/WT
L128	72	masculino	branco	5	NEO DE VIAS BILIARES	WT/M	WT/WT
L130	37	masculino	branco	21	OSTEOMIELITE DE SACRO	WT/M	WT/WT
L131	61	masculino	branco	8	CIRROSE HEPATICA	WT/WT	WT/M
L134	71	masculino	branco	14	TRANSPLANTE HEPÁTICO	WT/M	WT/WT
L135	73	masculino	branco	94	LMA	WT/M	WT/WT
L137	24	masculino	branco	5	GRANDE QUEIMADO	WT/WT	WT/WT
L138	29	feminino	branco	19	HPN	WT/WT	WT/WT
L141	101	masculino	mulato	8	SMD	M/M	WT/WT
L142	72	feminino	branco	24	SMD	WT/M	WT/WT
L144	68	masculino	branco	99	MIELOFIBROSE	WT/WT	WT/M
L146	36	masculino	branco	89	AAG	WT/M	WT/WT
L152	79	masculino	branco	30	SMD	WT/M	WT/WT
L154	63	feminino	branco	6	CA DE PÂNCREAS	WT/M	WT/WT
L157	29	masculino	branco	6	AAG	WT/WT	WT/WT
L163	61	feminino	branco	20	MM	WT/M	WT/WT
L168	60	feminino	mulato	10	LUPUS + IRA	WT/M	WT/WT
L169	59	masculino	branco	11	SMD	M/M	WT/WT
L170	48	masculino	branco	8	NEFROLIPTIPSIA	WT/WT	WT/WT
L171	18	feminino	ignorado	13	LUPUS + IRA	WT/WT	WT/WT

Anexo F - Planilha de Pacientes não-DF não aloimunizados (conclusão)

DNA	Idade	Sexo	Etnia	Nº transfusões	Diagnóstico	rs231775	rs5742909
L176	63	feminino	branco	8	CIRROSE	WT/WT	WT/WT
L177	28	feminino	branco	28	TRANSPLANTE RENAL	WT/M	WT/WT
L178	59	masculino	branco	69	NEO TIMO	WT/WT	WT/WT
L180	45	feminino	branco	121	APSV	WT/M	WT/WT
L182	61	feminino	mulato	8	LNH	WT/WT	WT/M
L186	53	masculino	branco	4	TRANSPLANTE RENAL	WT/M	WT/WT
L193	60	masculino	branco	92	SMD	WT/M	WT/WT
L196	55	masculino	ignorado	15	TRANSPLANTE HEPÁTICO	WT/M	WT/WT
L197	31	masculino	mulato	32	GRANDE QUEIMADO	WT/WT	WT/WT
L198	39	masculino	branco	5	S/O MID	WT/WT	WT/WT
L199	36	masculino	branco	22	LINFOMA	WT/WT	WT/WT
L202	81	feminino	branco	17	IRC + HEPATOPATIA	WT/WT	WT/WT
L203	50	masculino	branco	17	CIRROSE POR HCV	WT/M	WT/WT
L205	21	feminino	branco	11	FERIMENTO DESCOLANTE	WT/M	WT/WT
L206	43	masculino	branco	7	AIDS	WT/WT	WT/WT
L207	68	masculino	ignorado	31	AIDS	M/M	WT/WT
L211	24	masculino	branco	16	FAF	WT/WT	WT/WT
L212	57	masculino	branco	16	MM	WT/M	WT/WT
L213	51	masculino	branco	34	IRC + LNH	WT/M	WT/WT
L217	80	feminino	branco	12	GRANDE QUEIMADO	WT/M	WT/WT
L218	55	feminino	branco	17	MACROADENOMA DE HIPÓFISE	WT/WT	WT/M
L220	39	feminino	mulato	30	S/O COLUMA CERVICAL	WT/M	WT/M
L221	66	masculino	branco	4	HDA	WT/M	WT/WT
L225	58	masculino	branco	11	CIRROSE HEPÁTICA	WT/WT	WT/WT
L226	25	masculino	branco	15	NEO MALIGNO	WT/WT	WT/WT
L228	62	feminino	branco	6	HSA	M/M	WT/WT
L229	34	masculino	branco	6	PANCREATITE + TRAUMA	M/M	WT/WT
L236	20	masculino	branco	10	POLITRAUMA	WT/WT	WT/WT
L237	31	feminino	branco	13	IRA + LUPUS	WT/WT	WT/WT
L238	62	feminino	branco	17	FRATURA DE TÍBIA	WT/M	WT/WT
L239	53	masculino	branco	13	HEMORRAGIA	WT/WT	WT/WT
L240	53	masculino	mulato	12	IRC	WT/M	WT/WT
L242	36	masculino	mulato	85	TRANSPLANTE MULTIVISCERAL	WT/WT	WT/WT
L244	49	masculino	branco	19	POLITRAUMA	WT/M	WT/WT
L245	38	feminino	ignorado	73	AAG+HPN	WT/WT	WT/M
L246	79	masculino	branco	5	INTOXICAÇÃO CUMARÍNICA	M/M	WT/WT
L247	66	masculino	branco	14	CIRROSE POR HCV+HDA	WT/M	WT/WT
L248	84	masculino	branco	10	NEO COLON	WT/WT	WT/M
L249	56	feminino	mulato	14	HDA	WT/M	WT/WT
L250	53	feminino	mulato	18	CIRROSE HEPATICA + HISTERECTOMIA	WT/M	WT/WT
L251	68	masculino	branco	21	OBSTRUÇÃO INTESTINAL	WT/M	WT/WT
L252	48	masculino	mulato	16	TUBERCULOSE + IRA	WT/M	WT/M
L253	28	masculino	branco	9	AAG	WT/WT	WT/WT
L254	50	masculino	branco	4	TRAUMA ABDOMINAL	WT/M	WT/WT
L256	45	masculino	branco	5	HDA	WT/WT	WT/WT
L260	68	masculino	branco	29	MM	WT/WT	M/M
L262	47	feminino	branco	28	ANEURISMA	M/M	WT/WT
L263	54	masculino	branco	11	POLITRAUMA	WT/M	WT/WT
L264	61	feminino	mulato	24	HIV + TUBERCULOSE	WT/WT	WT/WT
P71	59	feminino	branco	79	AAG	WT/M	WT/M
P72	67	masculino	branco	230	APSV	WT/WT	WT/M
P73	28	masculino	branco	207	B TALASSEMIA	WT/M	WT/WT
P106	48	masculino	branco	8	LINFADENOMEGLIA	WT/M	WT/WT
P114	47	masculino	mulato	3	NEO SNC	WT/WT	WT/M
P123	63	feminino	negro	17	HIDROCEFALIA	WT/M	WT/WT
P127	9	feminino	branco	92	B TALASSEMIA	WT/M	WT/WT
P168	15	feminino	branco	129	ANEMIA DESERITROPOIETICA	WT/WT	WT/WT
P173	7	feminino	branco	15	ANEMIA DE BLACK FAN DIAMONT	WT/WT	WT/WT
P180	3	feminino	negro	5	ANEMIA DE BLACK FAN DIAMONT	WT/WT	WT/WT
P187	65	feminino	branco	15	TORACOTOMIA EXPLORATÓRIA	WT/WT	WT/WT
P197	9	feminino	parda	45	ANEMIA DESERITROPOIETICA	WT/WT	WT/WT
P198	1	masculino	branco	16	ANEMIA DE BLACK FAN DIAMONT	WT/WT	WT/WT

9.7 Anexo G - Planilha de pacientes usados para validar e padronizar o PCR

DNA	Sequenciamento Sanger		PCR-RFLP	
	rs231775	rs5742909	rs231775	rs5742909
P2	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
P5	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
P8	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
P20	WT/WT	WT/M	WT/WT	WT/M
P27	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
P34	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
P56	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
P64	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
P72	WT/WT	WT/M	WT/WT	WT/M
P74	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
P75	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L1	M/M	WT/WT	M/M	WT/WT
L2	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L3	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L4	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L5	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L6	WT/WT	WT/M	WT/WT	WT/M
L7	WT/M	WT/M	WT/M	WT/M
L8	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L10	WT/WT	WT/M	WT/WT	WT/M
L11	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L12	WT/WT	WT/M	WT/WT	WT/WT
L13	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L14	M/M	WT/WT	M/M	WT/WT
L15	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L16	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L17	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L18	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L19	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L20	M/M	WT/WT	M/M	WT/WT
L21	WT/WT	WT/M	WT/WT	WT/M
L22	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L23	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT

**Anexo G - Planilha de pacientes usados para validar e padronizar o PCR
(conclusão)**

DNA	Sequenciamento Sanger		PCR-RFLP	
	rs231775	rs5742909	rs231775	rs5742909
L24	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L26	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L27	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L28	WT/WT	WT/M	WT/WT	WT/M
L29	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L30	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L31	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L32	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L33	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L34	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L37	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L39	WT/M	WT/M	WT/M	WT/M
L40	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L41	M/M	WT/WT	M/M	WT/WT
L51	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L58	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L81	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L48	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L64	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L66	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L75	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L76	M/M	WT/WT	M/M	WT/WT
L77	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
L79	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT
L84	M/M	WT/WT	M/M	WT/WT
L97	WT/M	WT/WT	WT/M	WT/WT