

GISELLE MOREIRA SAMPAIO

FREQUÊNCIA DO ALELO HLA-DRB1 EM PORTADORES DE ANEMIA
FALCIFORME ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS

MANAUS – AMAZONAS

2020

GISELLE MOREIRA SAMPAIO

**FREQUÊNCIA DO ALELO HLA-DRB1 EM PORTADORES DE ANEMIA
FALCIFORME ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia.

Orientador: Prof^a Dra Viviana Maria Araújo de Oliveira

Coorientadora: Prof^o Msc. William Sérgio Sacramento

MANAUS – AMAZONAS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S192f Sampaio, Giselle Moreira
Frequência do alelo HLA-DRB1 em portadores de anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas / Giselle Moreira Sampaio. Manaus : [s.n], 2020.
93 f.: color.; 3 cm.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020.
Inclui bibliografia
Orientador: de Oliveira, Viviana Maria Araújo
Coorientador: do Sacramento, William Sérgio

1. Anemia Falciforme. 2. HLA-DRB1. 3. Antígenos de Grupos Sanguíneos . I. de Oliveira, Viviana Maria Araújo (Orient.). II. do Sacramento, William Sérgio (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Frequência do alelo HLA-DRB1 em portadores de anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

FICHA DE JULGAMENTO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 015/2020

1
2
3 Ao quarto dia do mês de dezembro do ano de 2020, às 09h00, realizou-se no Auditório,
4 Bloco A, 2º andar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas –
5 HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de
6 Mestrado da aluna **Giselle Moreira Sampaio**, sob o título “**Frequência Alélica de HLA**
7 **de Classe II em Portadores de Anemia Falciforme Atendidos na Fundação**
8 **Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas**”, tendo como orientadora a
9 Profa. Dra. **Viviana Maria A. de Oliveira**, e como coorientador o Prof. Msc. **William**
10 **Sérgio Sacramento**, segundo encaminhamento do Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji,
11 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia e de
12 acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do
13 Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o
14 parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a aluna o conceito discriminado no
15 parecer da referida Comissão.

16

Membros	Parecer	Assinatura
Profª. Dra. Leny Nascimento da Costa Passos – Presidente – HEMOAM	Aprovado(a) () Reprovado(a) ()	Assinatura: CPF: 029.842.462-00
Profª. Dra. Cristina Motta Ferreira – HEMOAM	Aprovado(a) () Reprovado(a) ()	Assinatura: CPF: 309.613.852-09
Prof. Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque – HEMOAM	Aprovado(a) () Reprovado(a) ()	Assinatura: CPF: 347.477.757-70

17

18 O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

19

20

21

22

23

24

25

26

 Aprovado Não Aprovado

Presidente da Banca Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus que na sua infinita misericórdia reergueu-me todas às vezes em que clamei por forças.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, força, coragem e por ter colocados pessoas tão especiais durante toda esta longa jornada.

A minha, doce e amada mãe, Lílian Wallace Moreira pelos intensos clamores a Deus em favor de minhas vitórias.

Ao meu pai Wellington Filgueira Sampaio por sempre acreditar em mim.

Ao meu querido marido José Alberto Macena Ventura pela força e encorajamento diários e a minha adorável filha Giulia Wallace Sampaio Ventura que com toda sinceridade que uma criança possa ter, reclamou todos os dias que eu estive mais tempo com o computador do que com ela própria. A autenticidade dessas palavras reafirmou em meu coração o valor da família, um laço de amor sem fim, o verdadeiro sentido da minha vida e luta diária.

Dra Viviana Maria Araújo de Oliveira pela orientação, dedicação em ensinar-me, pelas oportunidades dadas a mim e por ter acreditado em mim como pesquisadora.

Ao coorientador Msc. William Sérgio Sacramento por ter confiado a mim seus conhecimentos, pela paciência e incentivo.

Dra Andréa Monteiro por todo acolhimento, carinho e compreensão na fase final em que eu mais precisei.

A querida Regiane Costa de Oliveira, companheira de incontáveis madrugadas juntas, por todo apoio e carinho.

Aos queridos colegas Liliane Xábregas e Alexander Júnior por todo apoio e tempo dedicado a me ajudarem.

A grande amiga Kátia Maria da Rocha Cortêz, uma excelente profissional e muito carismática, que com todo amor envolveu-me num mar de conhecimentos imunohematológicos.

A minha estimada e verdadeira amiga Ingrid Alves, um ser humano excepcional dotado de maturidade, sabedoria e profissionalismo que Deus colocou na minha vida, e com muito otimismo foi capaz de acompanhar e torcer por mim em todas as etapas deste mestrado.

Dizer obrigado, neste momento, não me parece ser o suficiente para agradecer todo o sincero incentivo, apoio, amparo e carinho das maravilhosas amigas que Deus colocou em minha vida, Helen de Sousa L. Silva, Nayara Calheiros Viana, Olgacy dos

Santos B. Pontes e Sueny Moraes Barroncas, vocês foram conduzidas por nosso Senhor para que houvesse a real de transformação deste humilde ser. Estendo a vitória, pois essa conquista também é de vocês. Meus sinceros agradecimentos.

A todo corpo docente, discente e administrativo do Mestrado em Ciências Aplicadas à Hematologia e Hemoterapia que foram importantes no aprimoramento científico e desenvolvimento desta pesquisa.

À todas as pessoas que se dispuseram a ajudar-me nos diversos setores pelos quais estive presente inúmeras vezes, SAME, Laboratório de Imunohematologia e Laboratório de Hematologia do hemocentro.

Ao Laboratório de HLA pelo apoio e por ter permitido a realização da técnica de biologia molecular deste trabalho.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e a Fundação HEMOAM por ter nos permitido um aperfeiçoamento excelente.

E, por fim, agradecer com todo amor e admiração a todos os pacientes que participaram do estudo, sem vocês a realização deste trabalho não teria sido possível.

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Introdução: A anemia falciforme (AF) é uma das doenças genéticas de maior relevância epidemiológica determinada por uma mutação pontual no gene beta da cadeia globina, resultando numa hemoglobina variante causando inúmeras complicações. Embora utilize-se a terapia transfusional como modalidade terapêutica, há um risco de formação de anticorpos contra os antígenos dos grupos sanguíneos, levando a dificuldades na busca por sangue compatível para os portadores de AF. O antígeno leucocitário humano (HLA), responsável por codificar proteínas de superfície que reconhecem e apresentam antígenos possuem alelos e haplótipos que podem predispor ou proteger o surgimento de manifestações clínicas atuando como marcadores genéticos. **Objetivo:** Assim, nosso objetivo foi determinar a frequência dos antígenos HLA-DRB1 em pacientes portadores de anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHEMOAM. **Material e Métodos:** Um estudo transversal descritivo foi realizado com 109 amostras de DNA de pacientes com AF. A genotipagem foi realizada pelo método PCR-SSO para o locus DR do sistema HLA de classe II utilizando o Kit LABType™ SSO Classe II DRB1 (One Lambda) com tecnologia Luminex. A determinação das frequências genóticas e alélicas dos sistemas HLA e de grupos sanguíneos foi realizada por contagem direta com frequências absolutas (n) e relativas (%), e as variáveis numéricas foram analisadas através de medidas de posição e dispersão. **Resultados:** Houve predominância do sexo feminino (56,9%) e dos autodeclarados pardos (88,1%), a faixa etária variou entre 1 a 52 anos. A percentual de aloimunizados foi de 10% e os antígenos eritrocitários correspondiam para os sistemas Rhesus, Kell e Diego. Foram identificadas 13 especificidades para os alelos HLA, sendo os alelos HLA-DRB1*04 (19,3%), -DRB1*3 (10,6%) e -DRB1*16 (10,1%) mais representativos nos pacientes. **Conclusão:** a tipagem HLA dos pacientes corresponde ao encontrado em outras regiões, estando o alelo HLA-DRB1*04 presente em maior percentual nos pacientes com a formação de aloanticorpos.

Palavras-chave: Anemia Falciforme, HLA-DRB1, Antígeno de grupos sanguíneos

ABSTRACT

Introduction: Sickle cell anemia (AF) is one of the genetic diseases of greatest epidemiological relevance determined by a point mutation in the beta gene of the globin chain, resulting in a variant hemoglobin causing numerous complications. Although transfusion therapy is used as a therapeutic modality, there is a risk of the formation of antibodies against blood group antigens, leading to difficulties in the search for compatible blood for patients with SCA. The human leukocyte antigen (HLA), responsible for encoding surface proteins that recognize and present antigens, have alleles and haplotypes that can predispose or protect the appearance of clinical manifestations acting as genetic markers. **Objective:** Thus, our objective was to determine the frequency of HLA-DRB1 antigens in patients with sickle cell anemia treated at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM. **Material and Methods:** A cross-sectional descriptive study was carried out with 109 DNA samples from patients with FA. Genotyping was performed using the PCR-SSO method for the DR locus of the HLA class II system using the LABType™ SSO Class II DRB1 Kit (One Lambda) with Luminex technology. The determination of the genotype and allele frequencies of the HLA systems and blood groups was performed by direct counting with absolute (n) and relative (%) frequencies, and the numerical variables were analyzed using position and dispersion measures. **Results:** There was a predominance of females (56.9%) and of the self-declared browns (88.1%), the age range ranged from 1 to 52 years. A percentage of alloimmunized patients was 10% and the erythrocyte antigens corresponding to the Rhesus, Kell and Diego systems. 13 specificities were identified for the HLA alleles, the HLA-DRB1 * 04 (19.3%), -DRB1 * 3 (10.6%) and -DRB1 * 16 (10.1%) alleles being more representative in patients. **Conclusion:** the HLA typing of patients corresponds to that found in other regions, confirming the susceptibility of the HLA-DRB1 * 04 allele to the formation of alloantibodies.

Keywords: Sickle Cell Anemia, HLA-DRB1, Blood Group Antigens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da hemoglobina.....	18
Figura 2: Dados epidemiológicos da doença falciforme distribuídos em estados brasileiros.....	22
Figura 3: Esquema da fisiopatologia da anemia falciforme.	24
Figura 4: Esquema da fisiopatologia da vaso-oclusão na anemia falciforme.	25
Figura 5: Representação esquemática dos antígenos dos principais grupos sanguíneos.	29
Figura 6: Mecanismo da ocorrência de formação de aloanticorpos.....	31
Figura 7: Representação esquemática do Complexo HLA contido no cromossomo 6.	34
Figura 8: Estrutura das moléculas de HLA classe I e II.....	35
Figura 9: Esquema de nomenclatura do sistema HLA.	36
Figura 10: Representação da progressão do número de alelos HLA identificados na população mundial no período de 1987 até março de 2020.	38
Figura 11: Fluxograma de coleta de dados do estudo.....	45
Figura 12: Extração de DNA	46
Figura 13: Imagem fotodocumentada da corrida eletroforética do DNA amplificado de amostras distintas.	48
Figura 14: Esquema de captura de duas fluorescências pelo analisador de fluxo dual-laser (Luminex).....	49
Figura 15: Luminex do Laboratório de HLA da Fundação HEMOAM.....	50

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Expressões alternativas de proteínas de HLA.	36
Tabela 2: Distribuição demográfica dos pacientes portadores de anemia falciforme da Fundação HEMOAM.....	51
Tabela 3: Média das transfusões realizadas.....	52
Tabela 4: Frequência de transfusões nos pacientes de anemia falciforme.	52
Tabela 5: Descrição dos anticorpos irregulares encontrados nos pacientes aloimunizados.	53
Tabela 6: Tipagem dos alelos HLA-DRB1 dos 109 pacientes com anemia falciforme.	54
Tabela 7: Frequência dos subtipos dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.	55
Tabela 8: Frequências fenotípicas e genotípicas dos alelos HLA-DRB1.....	55
Tabela 9: Frequência fenotípica e genotípica dos alelos HLA-DRB1 em pacientes aloimunizados e não-alloimunizados com anemia falciforme.	56
Tabela 10: Frequência do alelo HLA-DRB1 nos grupos dos aloimunizados e não-alloimunizados.	57
Tabela 11: Distribuição das variáveis entre os grupos Aloimunizados e Não-Aloimunizados.....	57
Tabela 12: Distribuição da frequência de alelos por raça.	58
Tabela 13: Distribuição da frequência de alelos por gênero.	59
Gráfico 1: Frequência de pacientes aloimunizados e não aloimunizados.	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAMP_s	Padrao Molecular Associado ao Dano (do inglês <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>)
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EDTA	Ácido Etileno de Aminotetracético Dissódico (do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
FHEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
ff	Frequência Fenotípica
fg	Frequência genotípica
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos (do inglês <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulatin Factor</i>)
Hb	Hemoglobina
Hb (ζ₂ ε₂)	Hemoglobina Embrionária Gower-1
Hb (ζ₂ γ₂)	Hemoglobina Embrionária Portland
Hb (α₂ ε₂)	Hemoglobina Embrionária Gower-2
HbA (α₂ β₂)	Hemoglobina A
HbA₂ (α₂ δ₂)	Hemoglobina A ₂
HbD	Hemoglobina D
HbAS	Traço Falciforme
HbCC	Hemoglobinopatia CC
HbF (α₂ γ₂)	Hemoglobina F
HbS	Hemoglobina S
HbSC	Hemoglobinopatia SC
HbSS	Hemoglobinopatia SS
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (do inglês <i>Human Leukocyte Antigen</i>)

HU	Hidroxiuréia (do inglês <i>Hydroxyurea</i>)
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1 (do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>)
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
ISBT	Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (do inglês <i>International Society of Blood Transfusion</i>)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MS	Ministério da Saúde
NO	Óxido Nítrico
O₂	Oxigênio
PCR-SSO	Sequência Específica de Oligonucleotídeos em Reação de Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polimerase Chain Reaction Sequence-Specific Oligonucleotide</i>)
PE	Ficoeritrina
SAME	Serviço de Arquivo Médico Estatístico
SAPE	Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina (do inglês <i>R-Phycoerythrinconjugated Streptavidin</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor - Alpha</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Anemia Falciforme: Aspectos Gerais	18
2.2	Origem e Definições	19
2.3	Métodos de Diagnóstico	20
2.4	Aspectos Epidemiológicos	21
2.5	Fisiopatologia da Anemia Falciforme	23
2.6	Quadro Clínico	26
2.7	Tratamento	27
2.8	Aloimunização Eritrocitária	29
2.9	Complexo Principal de Histocompatibilidade.....	32
2.9.1	Definição e Origem	32
2.9.2	Estrutura das Moléculas do HLA	33
2.9.3	Nomenclatura do Sistema HLA	35
2.9.4	Diversidade HLA na População	37
2.9.5	Relação do HLA associados às doenças humanas	38
2.9.6	Sistema HLA e a aloimunização eritrocitária	40
2.9.7	Relevância do Estudo	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	Geral	42
3.2	Específicos.....	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Modelo de Estudo	43
4.2	Aspectos Éticos da Pesquisa.....	43
4.3	Amostragem.....	43

4.4	Critérios de Elegibilidade.....	43
4.4.1	Critérios de Inclusão	43
4.4.2	Critérios de exclusão	44
4.5	Coleta de Dados	44
4.6	Coleta e Armazenamento de Amostra Biológica	44
4.7	Extração de DNA	45
4.8	Genotipagem HLA de Classe II (-DRB1)	46
4.8.1	Amplificação	46
4.8.2	Eletroforese	47
4.8.3	Foto documentação.....	47
4.8.4	Hibridização.....	48
4.8.5	Análise e interpretação da tipagem HLA	49
4.9	Análise Estatística e Descritiva	49
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Distribuição das Características Demográficas dos Pacientes com Anemia Falciforme da Fundação HEMOAM	51
5.2	Quantitativo de Transfusões Catalogadas dos Indivíduos entre os anos de 2016 a 2020 pelo Banco de dados HEMOSYS da FHEMOAM	52
5.3	Frequência de Aloimunização Eritrocitária nos Indivíduos Participantes da Pesquisa.....	52
5.4	Frequência das especificidades HLA de Classe II dos Pacientes incluídos na Pesquisa	54
5.5	Frequência Genotípica e Fenotípica dos Alelos HLA-DRB1.....	55
5.6	Avaliação de Variáveis com os Índices de Aloanticorpos nos Portadores de Anemia Falciforme	56
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÃO	65

8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
9	ANEXOS E APÊNDICES	77
9.1	Anexo I	77
9.2	Anexo II.....	81
9.3	Anexo III	83
9.4	Anexo IV	85
9.5	Anexo V	86
9.6	Anexo VI	87
9.7	Anexo VII.....	89
9.8	Anexo VIII	90

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é uma doença inflamatória crônica marcada pela alteração estrutural dos eritrócitos e a uma dolorosa sintomatologia. O curso clínico da doença é um imenso desafio tanto para seus portadores quanto para os profissionais de saúde, uma vez que, apresenta dotada complexidade nos processos fisiopatológicos, nas manifestações clínicas e no tratamento (1).

Durante as complicações agudas e as que colocam em risco a vida do paciente, adota-se a terapia transfusional tanto como opção de tratamento imediato, como também, modalidade preventiva das consequências da doença (2). A terapêutica transfusional tem por objetivo melhorar o estado clínico grave; evitar algumas das principais complicações crônicas da doença, como a vaso oclusão; aumentar a concentração de hemácias, favorecendo elevação da oxigenação sanguínea, diminuindo a hipóxia tecidual, e consequentemente, reduzindo o processo de falcização (3). Embora a transfusão melhore a sobrevida dos doentes e evite muitos dos problemas decorrentes da patologia, ao longo do tempo, podem surgir outros inconvenientes resultantes das múltiplas transfusões, o que torna o uso dessa modalidade terapêutica bastante criteriosa (1).

As intercorrências advindas das transfusões de hemocomponentes são denominadas reações transfusionais, destacam-se as reações hemolíticas, complicações pulmonares, desequilíbrio eletrolítico, sepses bacterianas, hipotermia, doença do enxerto versus hospedeiro, sobrecarga volêmica e de ferro, imunossupressão e a aloimunização (4). No caso de múltiplas transfusões, os pacientes tornam-se sensibilizados contra antígenos de superfície de células alogênicas. A aloimunização produz considerável impacto clínico, e por isso, é alvo de grande preocupação na hemoterapia (5).

Fatores de risco como idade, sexo e histórico transfusional estão associados a incidência de aloimunização, entretanto, outras covariáveis também estão relacionadas: unidade de glóbulos vermelhos recebidos, processos inflamatórios, presença de um ou mais autoanticorpo, genes da resposta imune que inclui o sistema HLA e citocinas (6). Estudos demonstraram que, em grupos étnicos específicos, a imunogenicidade intrínseca de um determinado antígeno eritrocitário está, em parte, associada às incompatibilidades entre o HLA de classe II do doador com o receptor (7).

Estudos anteriores comprovaram a associação do desenvolvimento de aloanticorpos eritrocitários aos antígenos leucocitários humanos (8,9). As moléculas de HLA são capazes de modular a resposta imune, através de uma adequada apresentação de peptídeos e das sequencias curtas de aminoácidos lineares oriundas de aloantígenos que contenha o epítipo alvo para serem reconhecidas pelas células TCD4+. O loci HLA de classe II mais envolvido na resposta da produção de aloanticorpos é o HLA-DR (10).

Conhecer a tipagem do sistema HLA é de extrema importância para auxiliar em inúmeros estudos populacionais, propiciar a seleção adequada de doadores em transplantes de órgãos e desempenhar importante ferramenta para estudos de associações com doenças (11).

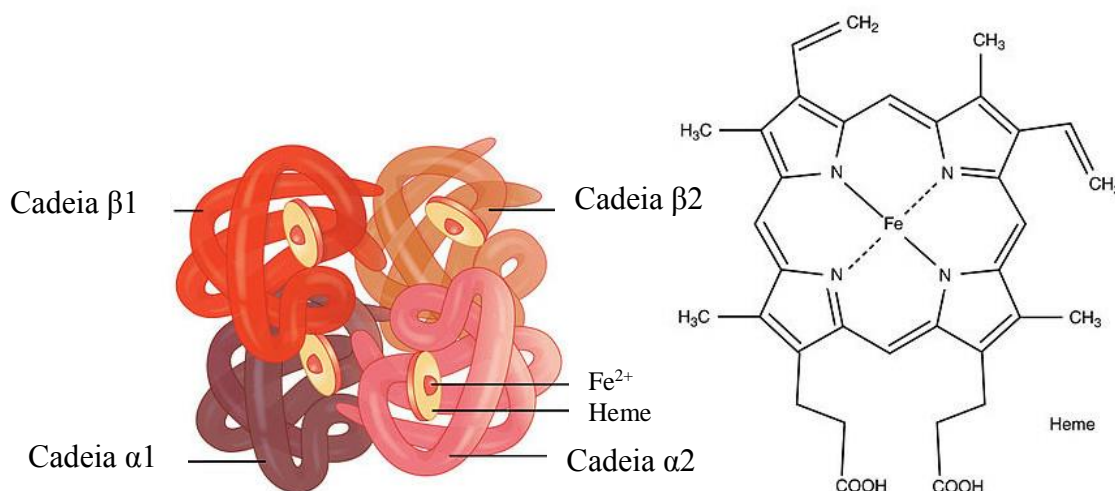
Por isso, nosso estudo tem por objetivo conhecer o perfil genotípico do sistema HLA dos pacientes portadores de anemia falciforme, através das semelhanças e das variações nas frequências alélicas do *locus* DR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anemia Falciforme: Aspectos Gerais

A hemoglobina (Hb) é o constituinte proteico dos eritrócitos, responsável pelo transporte de oxigênio (O₂) dos pulmões a todos os tecidos, além de conferir coloração avermelhada nas hemácias (12). Trata-se de uma proteína globular de estrutura quaternária, com peso molecular aproximado de 64.500 daltons, composta de dois pares de subunidades. Cada par distinto de subunidade globular varia conforme a fase de desenvolvimento ontogênico. Os diferentes tipos de cadeias globínicas determinam as variações de hemoglobinas (13). A figura 1 esquematiza a estrutura quaternária de uma hemoglobina.

Figura 1: Representação esquemática da hemoglobina.



Fonte: Adaptado (<https://openstax.org/>).

Assim, na fase embrionária tem-se as hemoglobinas: Gower-1 ($\zeta 2 \epsilon 2$), Portland ($\zeta 2 \gamma 2$) e Gower-2 ($\alpha 2 \epsilon 2$); fase fetal: a hemoglobina fetal (HbF) ($\alpha 2 \gamma 2$) e na fase adulta: hemoglobina A (HbA) ($\alpha 2 \beta 2$) e hemoglobina A2 (HbA2) ($\alpha 2 \delta 2$), as quais mudam sua estrutura de acordo com a regulação de seus genes, sendo expressadas ou silenciadas em

tempos específicos durante o desenvolvimento do indivíduo (14,16). Os genes das globinas ϵ , δ , β estão localizados no cromossomo 11, enquanto os genes das globinas ζ , α e γ estão no cromossomo 16 (14,16,17).

Entretanto, quaisquer mutações nos genes que codificam as hemoglobinas normais dão origem às hemoglobinopatias. As hemoglobinopatias são um conjunto de doenças da Hb controladas por um único gene transmitida ao longo das gerações e constitui um dos principais problemas de saúde atingindo aproximadamente 7% da população mundial (18,19).

Podem ser divididas quanto às alterações estruturais ou de síntese. As alterações estruturais são anormalidades na conformação da molécula de hemoglobina impedindo o correto desempenho de sua função, destacam-se as hemoglobinas variantes (assim denominadas por apresentarem padrão bioquímico anormal) S, C e E por causarem efeitos fisiopatológicos mais graves. Às de síntese, no entanto, são caracterizadas pela produção anormal da quantidade de hemoglobina e leva a graus variados de anemia, incluem-se as talassemias alfa e beta (12,14). Apesar de mais de 700 variantes estruturais da Hb já terem sido descritas, as mutações estruturais da HbS, HbE, HbC e HbD são as mais prevalentes no mundo (19).

2.2 Origem e Definições

Acredita-se que a mutação responsável pelo surgimento da hemoglobina S (HbS) tenha se originado em populações do continente africano, possivelmente, em decorrência de um processo de seleção natural contra os efeitos letais de infecções causadas por *Plasmodium spp.*, agente causador da malária (20).

Na África, as hemoglobinopatias estruturais mais recorrentes estão associadas às hemoglobinas S e C, mas se distribuem de forma divergente nas diversas regiões do continente, ao passo em que as talassemias decorrentes de defeitos na síntese são maiores em povos do Mediterrâneo, da Ásia e da China (21).

Tal variação genética foi capaz de configurar resistência à malária e apesar da predileção étnica, essa alteração está presente em todos os continentes, como consequência das migrações populacionais forçadas durante o lastimável período de escravidão, acometendo regiões dos continentes americanos, asiáticos, inclusive o europeu em torno do Mediterrâneo (15,22,23).

A doença falciforme (DF), dentre as diversas hemoglobinopatias, é considerada uma das enfermidades hereditárias mais comuns no mundo (24). Foi descrita pela primeira vez por um médico norte-americano James Herrick, em 1910, ao observar a característica alongada com formato de foice do eritrócito de um africano em quadro anêmico (25).

O termo DF é utilizado para categorizar um grupo de doenças genéticas marcadas pela presença da hemoglobina anômala S (26). A formação da HbS decorre de uma mutação pontual envolvendo a substituição do nucleotídeo adenina (A) por timina (T) - (GAG>GTG), na posição 6 no gene da β -globina existente no cromossomo 11, levando a troca do ácido glutâmico pela valina na posição da proteína (27). Assim, a substituição de um único aminoácido na cadeia globínica leva a HbS a assumir uma configuração diferente, que altera a forma redonda das hemácias, e faz com que adquiram o formato de foice (24).

As mutações herdadas pelos indivíduos com DF podem apresentar-se em estado homocigótico (HbSS), chamado de anemia falciforme (AF), sendo inclusive a variante de maior repercussão clínica ou heterocigótico composto, quando a doença é causada pela herança da HbS em associação com outra hemoglobina defeituosa (SC, SD, SE, S beta-talassemia, S alfa-talassemia) (21,28,29). As combinações associadas entre a hemoglobinopatia S e uma hemoglobina normal A denominam o portador como traço falciforme, ou seja, é apenas portador do gene, porém, não desenvolve a doença (12).

2.3 Métodos de Diagnóstico

O diagnóstico neonatal precoce da doença falciforme é realizado através do teste do pezinho, um exame obrigatório disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) através do Programa Nacional de Triagem Neonatal, o qual consiste na retirada de sangue do calcanhar do recém-nascido a ser coletado em papel filtro, entre o 3º e o 5º dia de vida (30). O exame laboratorial permite identificar se as hemoglobinas presentes no sangue são normais ou alteradas, além de enfermidades como hipotireoidismo, fenilcetonúria, fibrose cística, deficiência de biotinidase e hiperplasia adrenal congênita (24). Outros métodos de diagnóstico, quando surgem suspeitas da doença, incluem o teste de falcização, hemograma, eletroforese de hemoglobina, cromatografia líquida de alta performance, focalização isoelétrica e por biologia molecular (31). Benefícios adicionais

da detecção precoce possibilitam o início imediato do tratamento, melhoria da qualidade de vida e participação de programas de educação e aconselhamento genético para os pais (32).

2.4 Aspectos Epidemiológicos

Não há muitas informações sobre a história natural da doença falciforme, entretanto, sabe-se que a distribuição geográfica da HbS foi ocasionada principalmente por dois fatores: áreas africanas endêmicas a malária e os movimentos migratórios de portadores da hemoglobinopatia a outras regiões do mundo (33).

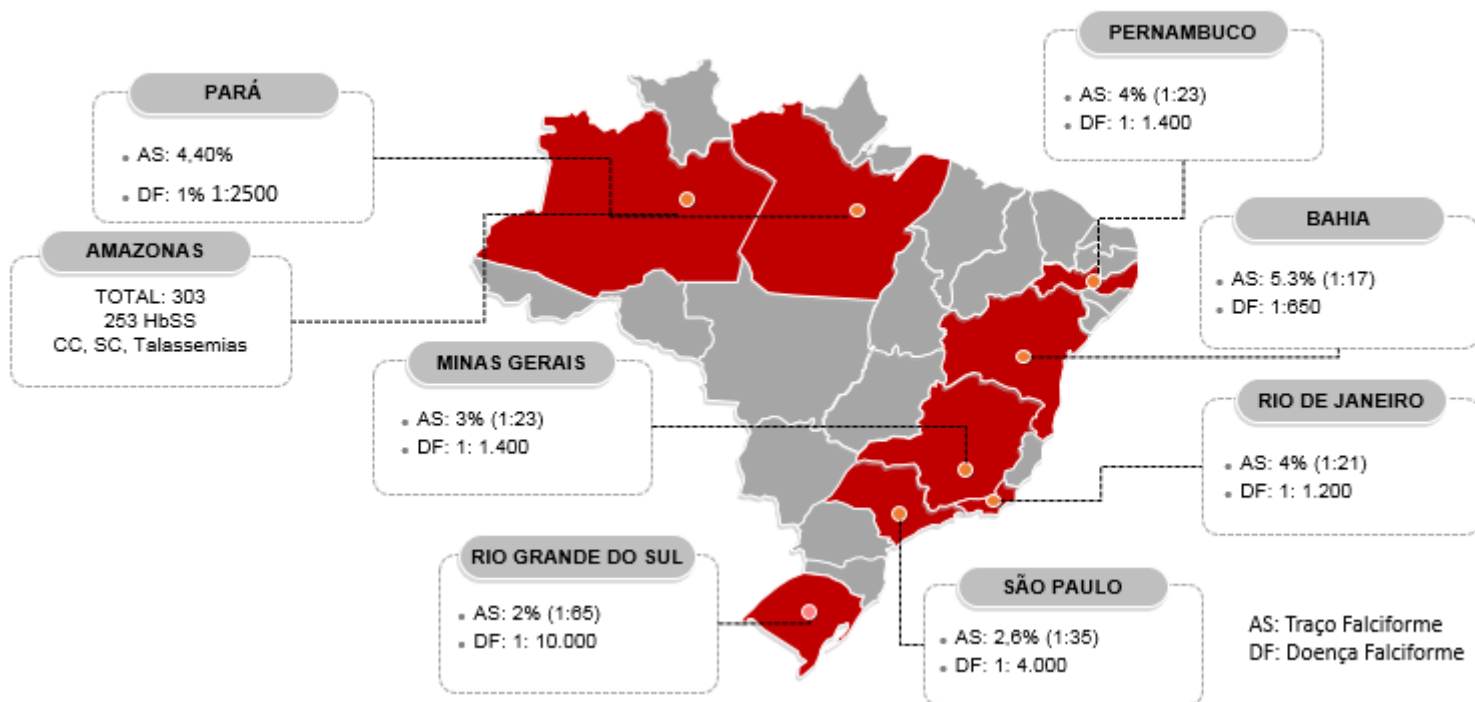
A hipótese de que portadores de traço falciforme (HbAS) seriam protegidos contra a malária, surge na década de 1950, por Haldene e Allison como resultado de um processo de seleção natural, e, atualmente é sustentada por evidências claras, o que justificaria as altas frequências da HbS na África Subsaariana, partes do Mediterrâneo, Oriente Médio e Índia (34,35). Na América do Norte e Europa Ocidental a distribuição teria se originado em decorrência de movimentos populacionais por conta do tráfico de escravos (36).

Cerca de 5% da população mundial é portadora de alguma hemoglobinopatia (37). As estimativas globais sugerem que aproximadamente 300.000 bebês por ano nascem com anemia falciforme, sendo a maioria desses nascimentos na Nigéria, República Democrática do Congo e Índia, podendo subir para 400.000 em 2050 (38). Em um estudo norte-americano, um em cada 500 bebês afro-americanos nascidos nos EUA é afetado pela doença falciforme, cerca de 100.000 indivíduos vivem nos EUA (39). Em 2018, a França teve mais de 26.000 pacientes diagnosticados com DF (40).

No Brasil, apesar da taxa da DF se apresentar em maior frequência nos descendentes de origem africana, é também descrita em outros grupos étnicos conforme o grau de miscigenação das regiões brasileiras (41). A anemia falciforme acomete de 0,1 a 0,3% da população negra, enquanto indivíduos portadores do traço falciforme (HbAS) são mais frequentes no Brasil afetando de 6 a 10% da população negra e variando a 2% na população em geral (41). Existem mais de dois milhões de portadores do gene da doença e mais de 30.000 indivíduos com DF em todo o país. A Bahia é o estado com maiores índices, são registrados cerca de 40 novos casos ao mês e 600 ao ano com o total de quase 15 mil portadores segundo dados do Ministério da Saúde (24). A figura 2 mostra a

distribuição epidemiológica da DF e dos traços falciformes (AS) em alguns estados brasileiros.

Figura 2: Dados epidemiológicos da doença falciforme distribuídos em estados brasileiros.



Fonte: Própria da autora.

De acordo com dados publicados, há aproximadamente 1 em cada 650 recém-nascidos no Estado da Bahia, 1 em cada 300 no Estado do Rio de Janeiro e 1 em 13.500 no Estado de Santa Catarina. Demonstrando que, no ano de 2016, 1.071 dos recém-nascidos foram diagnosticados com doença falciforme; e mais de 60.000 apresentaram o alelo heterozigoto HbS₊ (42). Na Região Norte, a incidência está em 1:2500 no Estado do Pará e em 1:4500 no Acre (43).

No estado do Amazonas, os dados epidemiológicos sobre a doença ainda são muito escassos. Entretanto, autores como, Acordi e Purim, entre 2016 – 2017, descrevem um total de 236 pacientes diagnosticados com DF e cadastrados na FHEMOAM (44,45). Em 2019, o pesquisador Cardoso relata aproximadamente 310 indivíduos correspondendo 0,007% de indivíduos portadores de DF da população no Estado do Amazonas (46).

Atualmente, conforme a base de dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), o Estado do Amazonas tem 303 portadores de doença falciforme (47).

2.5 Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A doença falciforme é um distúrbio multissistêmico causado pela mudança de um único aminoácido no sequenciamento de DNA da hemoglobina acarretando numa anormalidade na cadeia β -globínica originando a formação da HbS que adquire, então, diferentes características físico-químicas (48).

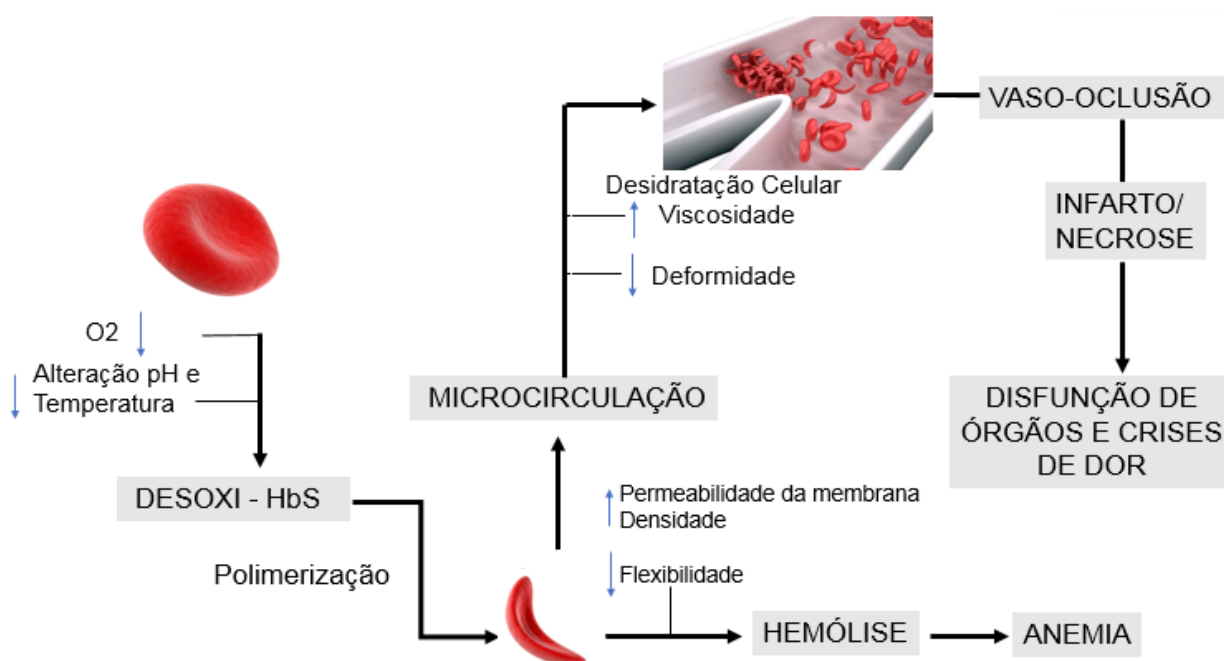
O ácido glutâmico por apresentar carga negativa, não permite a aproximação das moléculas de hemoglobina, diferentemente da valina, na qual, mantém-se em neutralidade favorecendo a formação de polímeros (aglomerados hemoglobínicos) quando sob desoxigenação (48,49). A literatura relata três processos fisiopatológicos principais: polimerização da HbS, oclusão de vasos, disfunção endotelial mediada por hemólise que conduz à doença clínica e, mais recentemente, a via da inflamação estéril (50).

A polimerização é o evento essencial na patologia da DF, está diretamente relacionada com altas concentrações de HbS e a desoxigenação na hemácia. Com a redução do oxigênio, a hemoglobina S polimeriza, danifica a estrutura da hemácia, deixando-a em estado rígido com formato de foice que favorece a perda de cátions e água (51).

As hemácias foiçadas têm uma vida média reduzida, pois, por sofrerem aumento da permeabilidade da membrana, diminuição da flexibilidade e aumento da densidade, são logo retiradas da circulação pelo sistema retículo-endotelial, fator contribuinte para o quadro de anemia hemolítica dos pacientes (28,52). A acentuada rigidez das hemácias irreversivelmente falcizadas gera a impossibilidade de se deslocar por entre os vasos de menores calibres da microcirculação levando à obstrução desses capilares – processo denominado de vaso-occlusão, além da redução do fluxo sanguíneo para os órgãos vitais, gerando isquemia e alterações no sistema imunológico. Tais alterações também promovem o aumento da adesão das hemácias ao endotélio e aos leucócitos, causam

lesões microvasculares, depleção de óxido nítrico (NO) que contribui para vasoconstrição, ativação da inflamação e coagulação (51, 53).

Figura 3: Esquema da fisiopatologia da anemia falciforme.



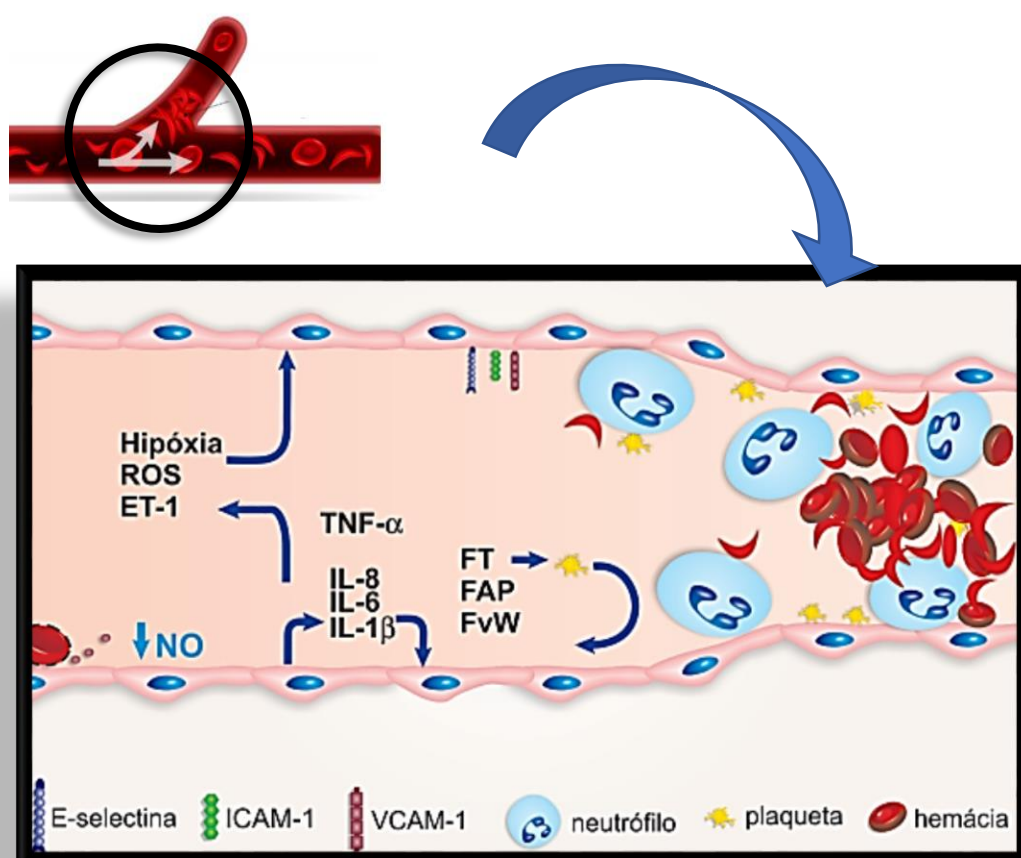
Fonte: Adaptado (Monteiro et Al, 2015).

A vaso-oclusão é um processo extremamente complexo que abrange diversas interações entre hemácias, leucócitos ativados, células endoteliais, plaquetas, proteínas do plasma e constitui o fenômeno causador da grande maioria da sintomatologia no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme. Estudos indicam que a vaso-oclusão é frequentemente desencadeada por um estímulo inflamatório ou ambiental, incluindo infecção, hipóxia, desidratação, acidose ou outros fatores não identificados (54).

Os danos à membrana eritrocitária decorrente da falcização levam à hemólise intra ou extravascular. Na hemólise extravascular, as hemácias falcizadas são removidas da circulação por meio da captação dos macrófagos no baço e do sistema retículo endotelial. A hemólise intravascular, no entanto, favorece a liberação de fatores promotores de inflamação (padrões moleculares associado ao dano - DAMPs), que em sua maior parte é causada pelo grupamento heme, capaz de ativar leucócitos, expor proteínas

intracelulares à superfície que levam a produção de radicais livres que desencadeia lesão nas células endoteliais passando a expressar moléculas de adesão, como VCAM-1 (molécula de adesão vascular-1), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) e E-selectina na superfície celular; produzem citocinas e quimiocinas como interleucina-8 (IL-8), IL-6 e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos), além do endotélio lesado liberar fatores pró-coagulantes e vasoconstritores potentes como endotelina-1 e 255 (56,57). O excesso de Hb nos vasos é tóxica ao organismo, por isso é degradada pela haptoglobina e da hemopexina, contudo, essas proteínas acabam tendo seus níveis reduzidos pelo excedente de Hb disponíveis, resultando em mais hemoglobina e heme livres que, por sua vez, consomem o NO, levando a vasoconstrição, inflamação e ativação de plaquetas favorecendo o efeito da vaso-oclusão (53), figura 4.

Figura 4: Esquema da fisiopatologia da vaso-oclusão na anemia falciforme.



Fonte: Adaptado (Kasvi, 2017; Costa et al. 2010).

Pacientes portadores de traço falciforme mesmo possuindo cerca de 30% a 40% de HbS, podem ser assintomáticos não apresentando alterações clínicas e laboratoriais significativas. A forma mais grave da doença falciforme inclui os portadores de anemia falciforme (HbSS), apresentam sintomatologia e complicações severas (28,58).

2.6 Quadro Clínico

De modo geral, a DF caracteriza-se por numerosas complicações, que podem afetar quase todos os órgãos e sistemas, com expressiva morbidade, redução da capacidade de trabalho e da expectativa de vida. As manifestações clínicas incluem comprometimento cognitivo, insuficiência cardíaca, cálculos vesiculares, artralgia, dores abdominais, síndrome mão-pé, infecções, septicemia, crises hemolíticas e algicas, sequestro esplênico, síndrome torácica aguda, insuficiência renal crônica, acidente vascular cerebral, priapismo, osteomielite, retinopatia, úlcera de perna, hipertensão pulmonar (58,59).

A dor é a complicação aguda mais comum e que leva o indivíduo ao atendimento emergencial (33). Os bebês geralmente são poupados dessa complicação devido aos seus níveis elevados de hemoglobina fetal (HbF) que fornece altas taxas de oxigenação dificultando o processo de falcização (60). Com o avanço da idade as complicações crônicas produzem disfunção orgânica que pode contribuir para a morte precoce. A síndrome torácica aguda é a desordem potencialmente fatal da DF com pico de incidência na primeira infância (61). As manifestações clínicas apresentam-se em diferentes padrões entre a AF e a DF. Os perfis genotípicos homozigóticos (SS) são marcados por manifestações clínicas mais intensas quando comparados com perfis heterozigóticos da DF com talassemia ou com outra hemoglobinopatia C (52).

Embora as pesquisas tenham evoluído nos últimos anos, o prognóstico permanece incerto devido à grande diversidade de manifestações clínicas, das variáveis que ocorrem entre diferentes faixas etárias, das condições socioeconômicas e da qualidade dos serviços de saúde. O curso clínico da AF depende de fatores genéticos, sociais, culturais e ambientais (62).

2.7 Tratamento

Dada a complexidade da fisiopatologia da DF, várias estratégias terapêuticas têm sido adotadas conforme a clínica do paciente. O tratamento dos portadores de DF, de maneira geral, consiste na prevenção, no uso de medicamentos como antibióticos, hidroxycarbamida e analgésicos para o suporte da dor e a terapia transfusional. Muitos estudos genéticos estão sendo realizados com intuito de tornar-se terapia curativa (60).

O tratamento preventivo mantém a oxigenação adequada, previne infecções e controla as crises de dor, favorece melhor prognóstico. Medidas gerais podem beneficiar o quadro clínico de pacientes falcêmicos como: educação dos familiares e pacientes sobre os principais aspectos da doença; nutrição, hidratação e imunização adequados; acompanhamento clínico regular; realização do esquema vacinal, além do aconselhamento genético para se evitar futuros membros familiares com o mesmo diagnóstico (63).

Os pacientes falcêmicos apresentam alterações imunológicas que os deixam mais susceptíveis às infecções. A redução da função esplênica tem sido apontada como a causa mais importante para suscetibilidade, pois há a diminuição da filtração adequada de corpos estranhos. Entretanto, em virtude do diagnóstico precoce realizado através da triagem neonatal, é possível adotar precocemente a profilaxia antibiótica, uma vez que possuem risco elevado para infecções decorrente da asplenia e o uso de hidroxiuréia. É a ação preventiva mais importante quando no manejo do paciente pediátrico (64).

A hidroxycarbamida (hidroxiuréia - HU) é um fármaco citotóxico e mielossupressor utilizado para melhora clínica e hematológica dos pacientes falciformes por reduzir o número de episódios de crises vaso-oclusivas e a síndrome torácica aguda. Sendo capaz de ativar a expressão dos genes γ -globina e aumentar os níveis de hemoglobina circulante, leva ao aumento do volume corpuscular médio que melhora a deformabilidade da hemácia ao passar pelos vasos de menores calibres (65). Aumenta a HbF o que favorece a redução da concentração de HbS no eritrócito e conseqüentemente menor chance de polimerizações proporcionando melhorias do quadro clínico. Atua também reduzindo a inflamação crônica e os riscos de eventos tromboembólicos por diminuir a contagem de leucócitos, de plaquetas, a expressão de moléculas de adesão ao endotélio e aumentar a disponibilidade de óxido nítrico (NO) na circulação (65).

Adotam-se também anti-inflamatórios, uma vez que, a inflamação é um fator preponderante na propagação e exacerbação da lesão tecidual causada pela doença, pois a ativação de componentes celulares do sistema imunológico, incluindo neutrófilos, linfócitos, monócitos, plaquetas e citocinas pró-inflamatórias são cronicamente elevadas e cooperam para este processo. Além de antitrombóticos em decorrência de múltiplos mecanismos de ativação do sistema de coagulação (66).

Como componente vital no tratamento de algumas complicações agudas e crônicas, destaca-se a transfusão sanguínea. A transfusão tem a capacidade aumentada de transportar oxigênio e de reduzir a viscosidade sanguínea favorecendo a diminuição do percentual da hemoglobinopatia S. A redução da quantidade de HbS é de extrema importância nos quadros em que ocorrem complicações agudas (como síndrome torácica aguda e exacerbação aguda de anemia, manejo pré-operatório e prevenção de acidente vascular cerebral (AVC) (60). No entanto, múltiplas transfusões podem levar à sensibilização dos pacientes, os quais passam a desenvolver anticorpos eritrocitários. Diversos fatores, incluindo a frequência de transfusões, a imunogenicidade do antígeno, a resposta imune do receptor e a não realização da fenotipagem, podem influenciar o sistema imune do receptor a reagir contra um antígeno. As reações transfusionais são todas as consequências que podem ocorrer após uma hemotransfusão. Podem ser a aloimunização e as reações hemolíticas (agudas, febris, anafiláticas, por contaminação bacteriana e urticariformes) (28,29).

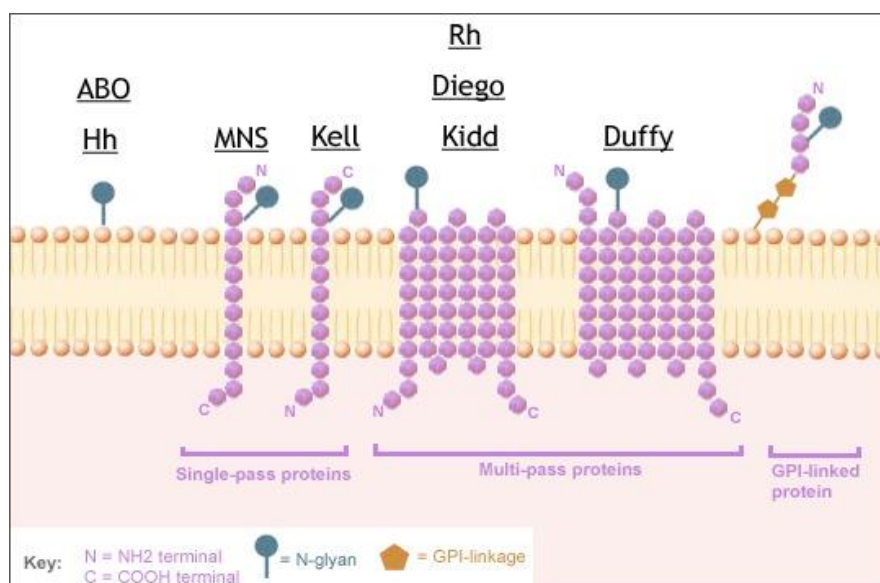
Uma estratégia curativa disponível atualmente é o transplante de células-tronco hematopoiéticas, porém, apresenta riscos significativos para segurança com potencial de morbimortalidade associada. E, a terapia gênica também com potencial curativo, baseia-se no cultivo isolado de células da medula óssea do paciente em que são inoculados vírus contendo um gene adicional que pode codificar uma β -globina anti-falcizante ou HbF e, após tratamento quimioterápico, o paciente recebe reinfusão de células-tronco hematopoiéticas autólogas modificadas, que expressarão o novo gene, contudo, está em um estágio inicial de desenvolvimento e ainda com muitos desafios técnicos (66,67).

2.8 Aloimunização Eritrocitária

Nas membranas de hemácias e plaquetas estão presentes estruturas moleculares nomeadas de antígenos, apresentam natureza variada como proteínas, glicoproteínas e carboidratos, os quais exibem dotada competência para a indução de respostas imunológicas no receptor e que por isso, expressam grande relevância na terapêutica transfusional (68,69).

De acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), são reconhecidos 360 de antígenos de grupos sanguíneos, dos quais 322 estão agrupados em 36 sistemas de grupos sanguíneos. Atualmente, 39 antígenos restantes ainda não foram atribuídos a um sistema sanguíneo conhecido. Continuamente os antígenos de grupo sanguíneo clinicamente significativos são descobertos mediante técnicas sorológicas, por sequenciamento e por tecnologias recombinantes ou genômicas, pois, aumentando a precisão de identificação do perfil individual de antígenos eritrocitários (70,71). Os anticorpos clinicamente significantes são detectados nos sistemas sanguíneos: ABO, Rh, Kell, Kidd, Duff e MNS e provocam, na maioria das vezes, reação transfusional hemolítica (72). O antígeno RhD por se tratar de um polipeptídeo e apresentar alto grau de polimorfismo tem maior potencial imunogênico predispondo ao risco de formação de aloanticorpos nos receptores (73).

Figura 5: Representação esquemática dos antígenos dos principais grupos sanguíneos.



Fonte: Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2264/>.

Os testes de fenotipagem são empregados para caracterizar os diferentes tipos de sistemas eritrocitários presentes nas membranas das hemácias de doadores e receptores para se evitar a sensibilização e o desenvolvimento de anticorpos irregulares. Os principais sistemas eritrocitários submetidos à fenotipagem são o RhD (antígenos D, C, c, E, e) e o Kell (antígeno K), por serem os que apresentam as maiores frequências de aloimunização em pacientes portadores de AF, por isso, é crucial a fenotipagem dos grupos sanguíneos. Desse modo, pacientes que contêm anticorpos irregulares (anticorpos produzidos após estímulo antigênico por hemácias não próprias) devem receber concentrado de hemácias com fenótipo compatível, com o propósito de minimizar reações transfusionais hemolíticas (74).

Assim, a aloimunização refere-se a formação de anticorpos contra os antígenos das hemácias do doador que inexistem no receptor durante o ato transfusional e embora este processo não ocorra de maneira igualitária em todos os pacientes, constitui um dos maiores riscos transfusionais pois leva ao risco de hemólise, atrasa o tratamento de base, retém o paciente por mais tempo internado e em casos mais graves pode ser fatal para o paciente (75,76). Além disso, a aloimunização eritrocitária em alguns casos pode reduzir a sobrevivência das hemácias, causar sobrecarga de ferro e limitar a disponibilidade de concentrados de hemácias disponíveis para futuras hemotransfusões, devido à dificuldade em se encontrar sangue compatível (77).

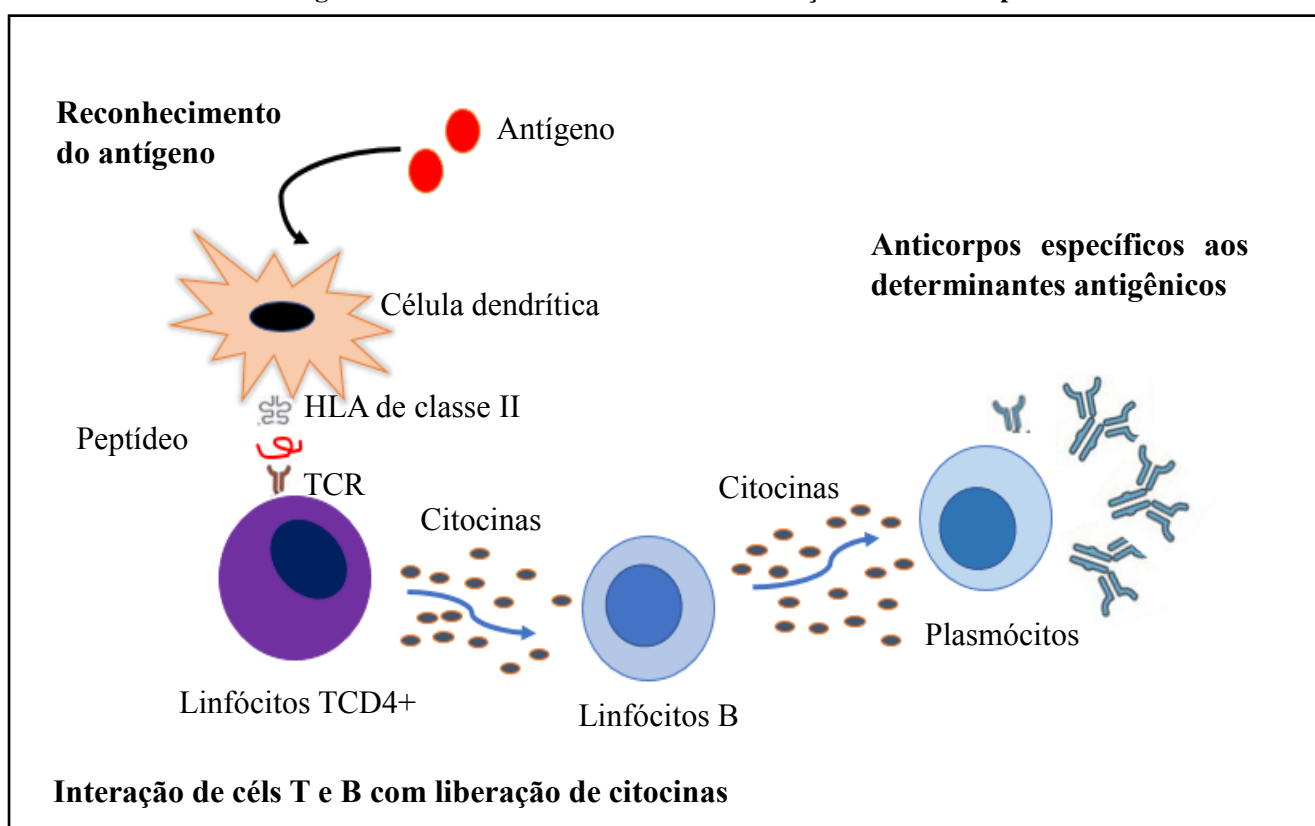
Este mecanismo compreende inicialmente o reconhecimento do antígeno através das células dendríticas, apresentação do peptídeo pelas moléculas do sistema HLA ao linfócito TCD4+ e ativação do mesmo, interação com linfócitos T e B seguidos da liberação de citocinas que ao ativar os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos e produzem anticorpos específicos aos determinantes antigênicos (78) figura 6.

Como controle da formação de aloanticorpos muitas instituições de saúde adotam protocolos transfusionais de compatibilidade fenotípica para os antígenos do sistema ABO, Rh e Kell (79) e Fy^a/Fy^b , Jk^a/Jk^b (antígenos correspondentes ao sistema Duffy) e Ss (sistema MNS) (80). Os genes alélicos *RH* codificadores dos antígenos variantes D, C, e em afrodescendentes são responsáveis pela produção de autoanticorpos e aloanticorpos complexos estando em alta frequência devido à enorme variedade de genes para o locus *RH* e a dificuldade de exames sorológicos para determinar as variantes antigênicas

(81,82). Os anticorpos geralmente identificados em pacientes com DF são anti-Rh (D, C, E), Kell, Duffy, Jk e S (83).

As frequências de aloimunização eritrocitária diferem-se entre regiões ou países, podendo inclusive, não ocorrer em todos os casos de incompatibilidade à antígenos. As possíveis diferenças entre os indivíduos que se tornam aloimunizados facilmente do que aqueles menos suscetíveis não são bem conhecidos, entretanto, podem estar associadas a predisposição genética (84,85).

Figura 6: Mecanismo da ocorrência de formação de aloanticorpos.



Fonte: Adaptado (Yazdanbakhsh et al 2013.).

Alguns fatores como: gênero, imunogenicidade do antígeno, número de transfusões, polimorfismo do gene dos antígenos leucocitários humanos (HLA) -DRB1, presença de autoanticorpos, interleucina, fator de necrose tumoral α , múltiplos eventos inflamatórios, crises vaso-oclusivas e síndrome torácica aguda estão fortemente associados a maior predisposição a aloimunizações eritrocitárias (71,86).

A influência do gênero ainda é um fator controverso, algumas pesquisas apontam o sexo feminino como grupo de maior risco. Este fator pode ser justificado pela maior exposição das mulheres portadoras de doença falciforme a eventos que podem levar à imunização, como a gravidez e as transfusões de sangue (87,88).

O estado inflamatório nos quadros de síndrome torácica aguda e de vaso-oclusão dos pacientes com anemia falciforme no momento da transfusão podem apresentar maior de risco de aloimunizações (89). Isso porque a inflamação tem a capacidade de desencadear uma resposta proliferativa maior dos linfócitos TCD4+ (90). Além disso, outros fatores imunes como as células T reguladoras também podem contribuir para este desfecho, pois extinguem a ativação e as funções efetoras de inúmeras células em diferentes situações (35).

Ultimamente os estudos vem demonstrando a participação de fatores genéticos na susceptibilidade à aloimunização que incluem os genes de citocinas e os genes do sistema HLA. Mesmo com muitos estudos, a prevenção ainda continua sendo um grande desafio e independente de não existir um padrão consistente, a pesquisa e os esforços vêm sendo direcionados à combinação de antígenos profiláticos de unidades para receptores de transfusão crônica (90).

2.9 Complexo Principal de Histocompatibilidade

2.9.1 Definição e Origem

O complexo principal de histocompatibilidade MHC (do inglês – Major Histocompatibility Complex) é um conjunto de genes que codificam moléculas responsáveis pela apresentação de antígenos ao sistema imunológico. Nos seres humanos, o MHC recebe a denominação de sistema HLA (do inglês – Human Leukocytes Antigen) e se localiza no locus 21 do braço curto (p) do Cromossoma 6 (6p21), sendo herdado em bloco e expresso em co-dominância. Essas moléculas são extremamente polimórficas e se diferem entre os indivíduos e entre as populações (91,92,93).

A partir do insucesso das primeiras tentativas de transplantes realizados em modelos animais entre 1909 e 1937 fez com que se percebesse a existência de fatores intrínsecos, os quais, seriam responsáveis por essa dificuldade. Em 1936, surge a primeira descrição

do MHC como resultado de experimentos de transplantes realizados em camundongos, executados por Peter Gorer e George Snell e que demonstraram a existência de grupos de antígenos envolvidos nos processos de rejeição dos transplantes (94). Somente por volta da década de 50, o MHC humano é então descoberto através de estudos realizados por Jean Dausset ao demonstrarem a existência de resposta celular mediada por leucócitos, após uma exposição alogênica. Essa evidência permitiu que em 1958, Dausset descrevesse o primeiro antígeno leucocitário em humanos (95).

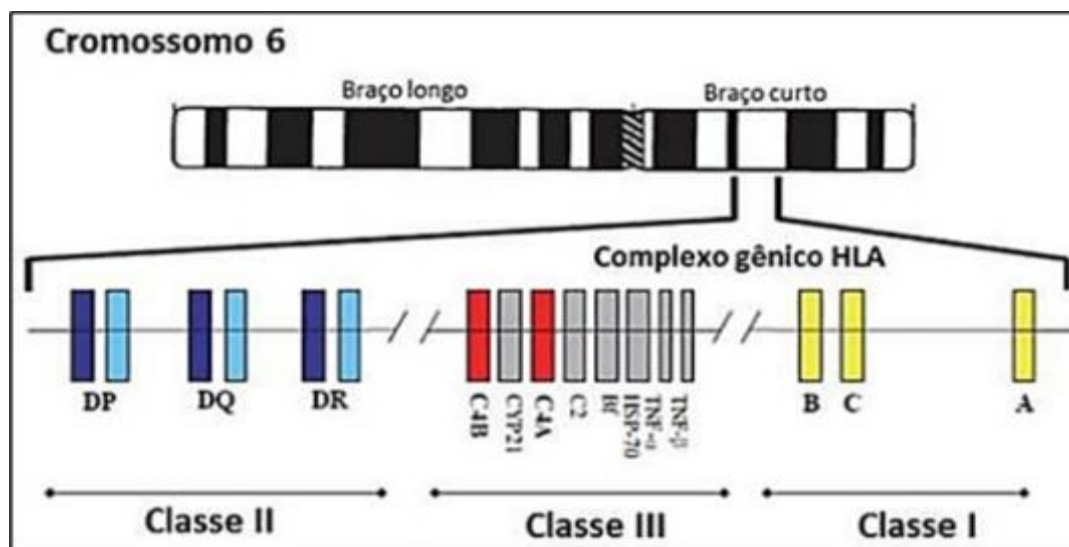
Seguido a esses achados, outros pesquisadores descreveram diferentes antígenos HLA e em resposta a essa motivação, em 1964 criou-se o primeiro Workshop Internacional de Histocompatibilidade que teve como objetivo a colaboração científica entre diferentes centros de pesquisa, a fim de acelerar a identificação de novos antígenos HLA, promover a compreensão da função dos genes HLA e determinar um teste eficaz para a detecção antigênica (96).

2.9.2 Estrutura das Moléculas do HLA

Os loci gênicos do HLA são agrupados didaticamente em três classes I, II e III, de acordo com sua estrutura, função e localização.

Na região telomérica tem-se o HLA de classe I contendo os genes que codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA-A, -B e -C. A região centromérica contém o HLA de classe II, o qual apresenta os genes que codificam as moléculas clássicas HLA -DR, -DQ e -DP e, por fim, a região de Classe III que é telomérica em relação à região de classe II que não inclui genes que codificam moléculas de histocompatibilidade, mas sim, outras moléculas, como os componentes do complemento (C2, Fator B e C4), 21- hidroxilase, linfotóxina e Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (91,97). A Figura 7 mostra detalhadamente a localização do complexo gênico HLA no cromossomo 6.

Figura 7: Representação esquemática do Complexo HLA contido no cromossomo 6.

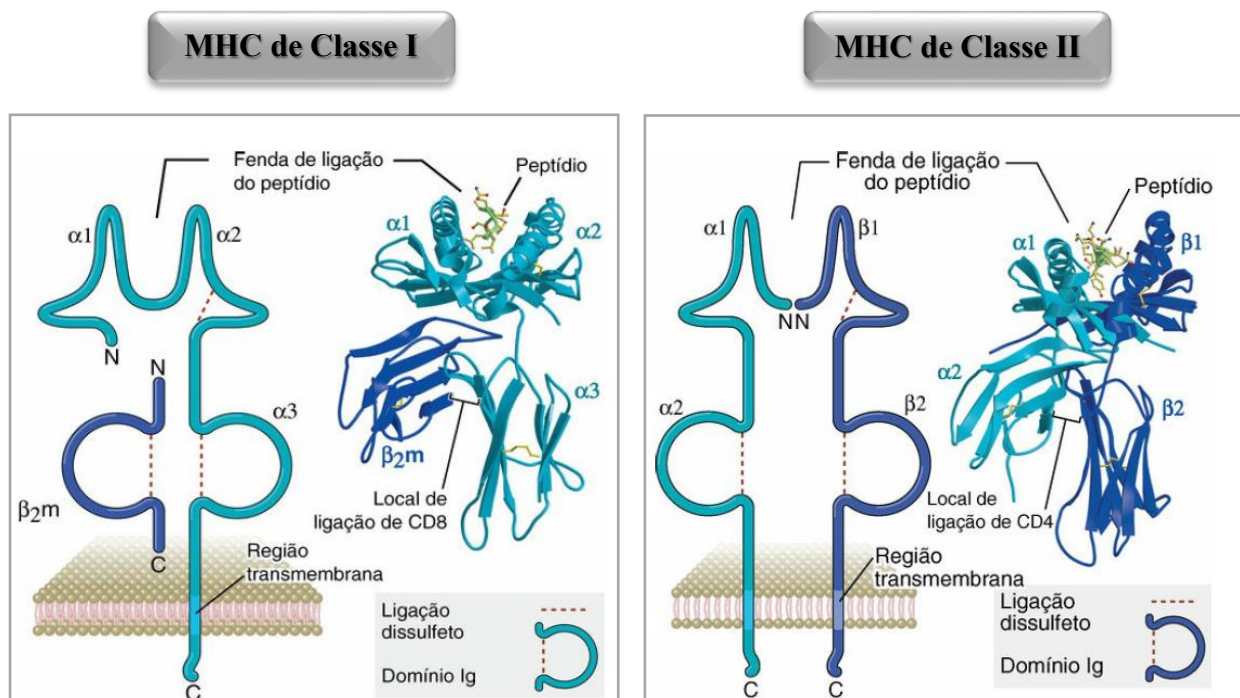


Fonte: Adaptado (Westover et al. 2011).

As moléculas de MHC Classe I: compreendem os genes clássicos nos loci HLA-A, HLA-B e HLA-C, presentes na superfície de todas as células nucleadas e plaquetas. Classe II: estão presentes em linfócitos B, macrófagos, monócitos, células endoteliais, células de Langerhans, células dendríticas e linfócitos T quando ativados. São codificadas por genes nas regiões HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. E Classe III: esta região codifica diversas moléculas importantes na inflamação, incluindo os componentes do sistema complemento (C2, C4 e fator B), TNF- α e β , e 21-hidroxilase (98).

As moléculas de classe I e II têm aspecto estrutural equivalente. Os resíduos de aminoácidos polimórficos que representam as inúmeras moléculas estão alocados nas fendas de ligação com o peptídeo, como demonstra a Figura 8. O sulco de ligação ao peptídeo na molécula de classe I é formado pela interação dos segmentos $\alpha 1$ e $\alpha 2$, enquanto na molécula de classe II a interação se dá pelos segmentos $\alpha 1$ e $\beta 1$ (91,99,100).

Figura 8: Estrutura das moléculas de HLA classe I e II.



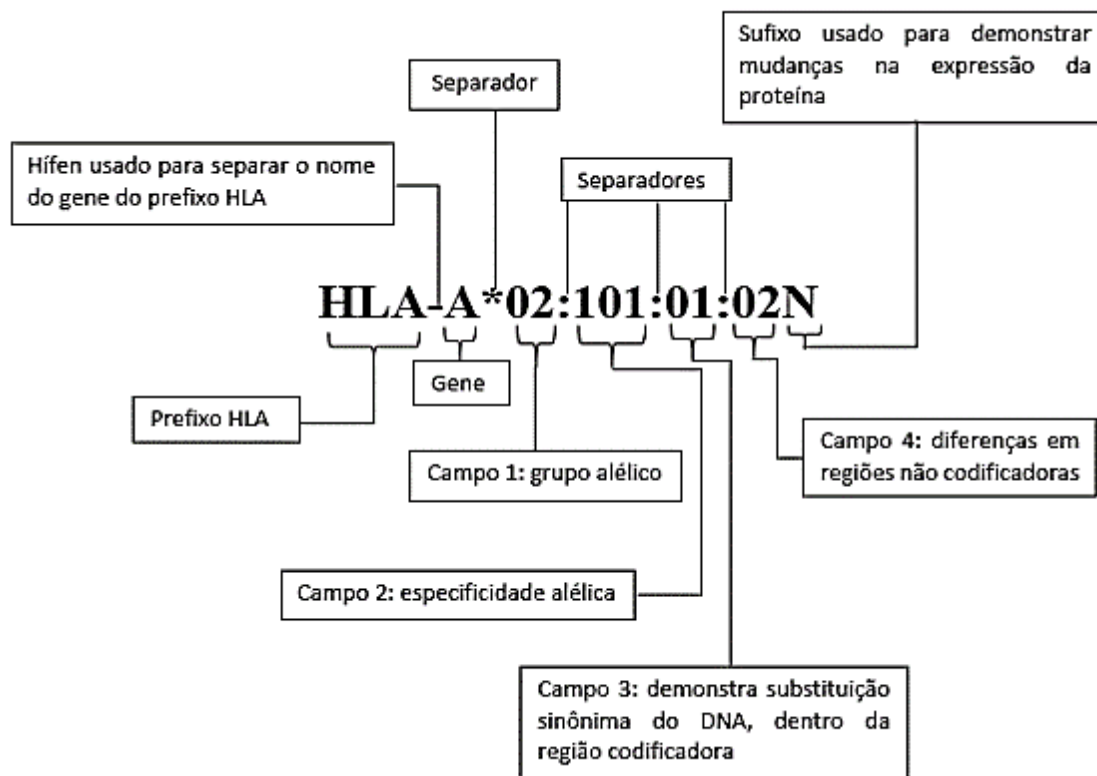
Fonte: Adaptado (Abbas et al. 2012).

2.9.3 Nomenclatura do Sistema HLA

Cada alelo HLA tem uma designação numérica única podendo variar em até 4 dígitos, cada dígito traz uma informação importante sobre a estrutura genética da molécula HLA em questão. Por padronização, a nomenclatura contém a denominação HLA-, seguida da identificação do gene (por exemplo: A/B/C/DRB1/DQB1 e assim por diante), a seguir estarão as designações numéricas, as quais são separadas por dois pontos.

O 1º campo identifica o grupo alélico correspondente ao HLA, que com frequência corresponde à designação sorológica do antígeno, o 2º campo corresponde a especificidade desse alelo, que são alterações não sinônimas as quais resultam em diferenças na molécula HLA, refletindo assim, na produção de proteínas diferentes. Todas as designações alélicas das tipificações HLA terão ao menos esses dois campos. O 3º campo identifica uma mudança de nucleotídeo sem alteração da proteína, enquanto no 4º campo as diferenças relatadas referem-se a mutações existentes em regiões não codificadoras, representadas pelas regiões de íntrons ou pelas porções não traduzidas de éxons que sofrem splicing alternativo (Figura 3) (98,100,101).

Figura 9: Esquema de nomenclatura do sistema HLA.



Fonte: Adaptado de IMGT (link: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>)

Ao final da identificação numérica poderá ainda haver informações quanto a padrões não normais de expressão dessa proteína pelas células, sendo representadas pelas letras (A, C, L, N, Q ou S) demonstrado na tabela 1 (101).

Tabela 1: Expressões alternativas de proteínas de HLA.

FORMAS DE EXPRESSÃO	ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Aberrante	A	Quantidade de proteína expressa é quase o dobro da expressão normal.
Citoplasma	C	A proteína produzida tem expressão citoplasmática.
Baixa (do inglês Low)	L	Apresenta menor expressão celular quando comparada com a proteína normal.
Nulo	N	A proteína produzida não é expressa.
Secretada	S	Proteínas solúveis secretadas, não se mantem na superfície celular.
Questionável	Q	Mutações que parecem afetar a expressão de outros alelos normais.

Fonte: Adaptado de IMGT (link: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>).

2.9.4 Diversidade HLA na População

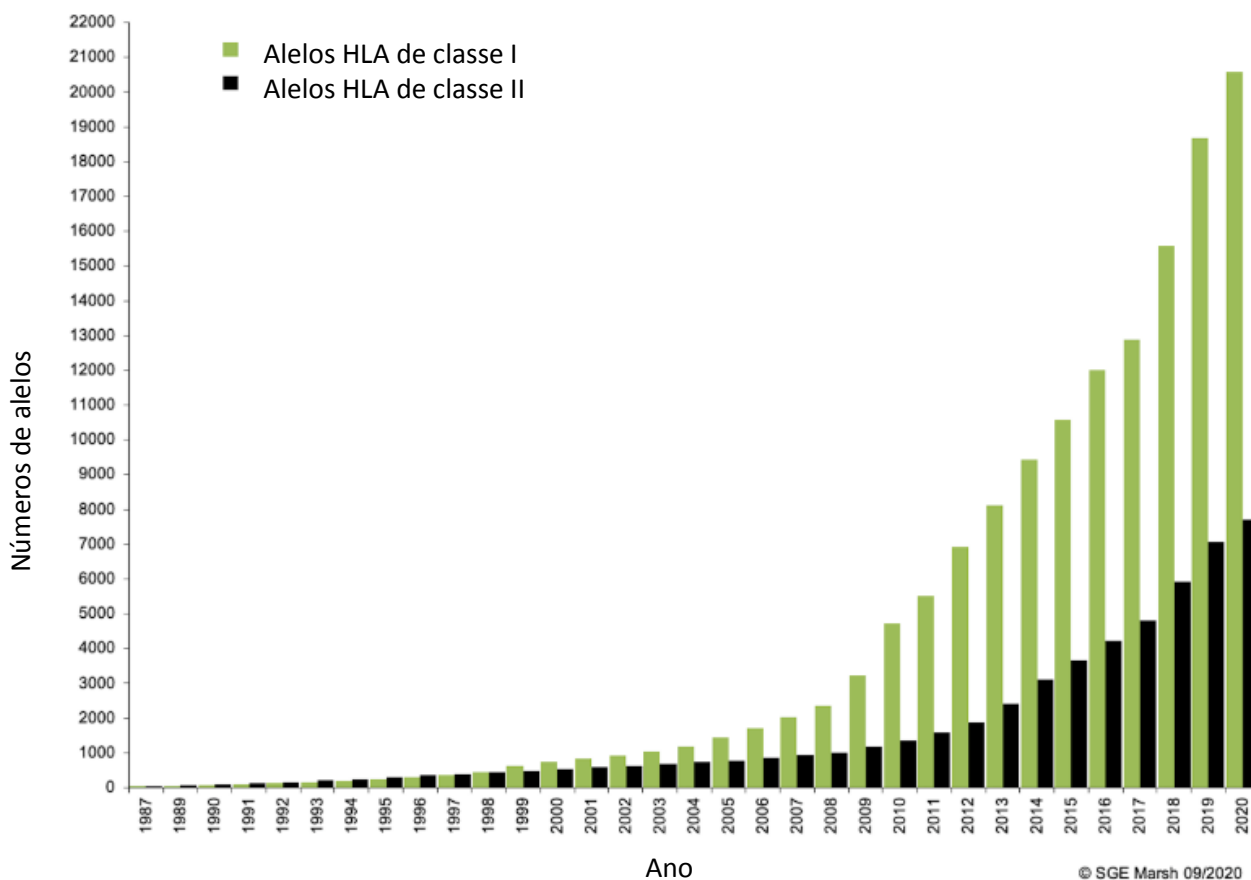
Os genes HLA de classe I e II se diferem de outros genes estruturais do genoma humano por não possuírem um alelo predominante, isso ocorre em razão da presença de variações nucleotídicas entre alelos de um mesmo gene HLA, podem diferir consideravelmente. Conseqüentemente, algumas variantes alélicas HLA são restritas ou ausentes em determinados grupos populacionais enquanto em outras populações se apresentam em grandes proporções (102).

De acordo com Middleton (2000), estudos realizados em diferentes regiões do mundo revelaram as diferenças existentes em relação a distribuição e frequência de alelos HLA. As populações indígenas, por exemplo, apresentam polimorfismo de alelos HLA relativamente baixo quando comparadas com outras populações, refletindo o isolamento geográfico dessas populações (103). A população brasileira sendo extremamente miscigenada, o polimorfismo provavelmente ocorre devido à agregação de alelos de diferentes grupos étnicos (104). Nas populações orientais observam-se também características peculiares em relação aos marcadores de susceptibilidade a doenças, diferentes daqueles observados, por exemplo, em indivíduos caucasianos (105).

A população brasileira apresenta perfil genético bastante variável em decorrência da formação de sua base populacional ser composta por diferentes etnias. No Brasil, a frequência dos alelos HLA pode ainda variar de uma região para outra, pois é influenciada pela etnia predominante de cada região (86).

A figura 4 representa a progressão do número de alelos HLA identificados na população mundial no período entre 1987 a março de 2020.

Figura 10: Representação da progressão do número de alelos HLA identificados na população mundial no período de 1987 até março de 2020.



Fonte: Adaptado de http://hla.alleles.org/inc/images/graph_hires.png.

2.9.5 Relação do HLA associados às doenças humanas

Ao final dos anos 60 iniciaram-se os primeiros estudos sugerindo a relação da variabilidade de genes HLA a doenças humanas com a descoberta da associação entre HLA - B e linfoma de Hodgkin. O locus MHC tem um agrupamento denso de genes imuno relevantes que podem mostrar alto grau de polimorfismo e apresentarem fortes desequilíbrio de ligação; essa complexidade impede a determinação dos genes e alelos exatos responsáveis pelos sinais de associação de doenças na região (106).

A ligação de moléculas HLA a peptídeos derivados de proteínas microbianas e o repertório de células T deve incluir clones que possam ser ativados por tais peptídeos ao HLA, são importantes para uma resposta imune eficiente, e o não cumprimento dessas exigências pode tornar uma pessoa portadora de uma combinação específica de alelos

HLA mais susceptível a uma determinada doença do que outra que tenha uma combinação diferente de alelos (92).

A vulnerabilidade a inúmeras doenças associado ao HLA tem sido utilizado como marcador de risco mediante determinação de seus alelos e haploides num indivíduo ou na população. A hipótese mais aceita para a associação do HLA com doenças é que certas moléculas desse complexo apresentariam peptídeos que levariam à resposta imune danosa por parte de linfócitos T específicos ou por contribuir para o escape imune de corpúsculos patogênicos (7).

Diversos genes do HLA estão sendo associados às doenças inflamatórias e auto-imunes. Os genes HLA não-clássicos, como o HLA-G são associados às regiões regulatórias destes genes de doenças auto-imunes (107). Estudos relatam principalmente o HLA-DRB1 e o HLA-DQB1 com maior associação à susceptibilidade ao lúpus eritematosos sistêmicos (108). Os resultados de uma pesquisa realizada na Síria sobre a associação do HLA com a suscetibilidade a artrite reumatoide indicam que os alelos HLA-DRB1 *01, *04 e *10 estão relacionados à gravidade da doença, enquanto os alelos HLA-DRB1 *11 e *13 teriam capacidade de conferir proteção contra suscetibilidade (109). Indivíduos afetados pela doença celíaca possuem genes de reconhecimento imunológico que codificam o HLA-DQ2.5 e / ou heterodímeros DQ8, que facilitam o reconhecimento das células T CD4 + de peptídeos específicos derivados de glúten (110).

Em regiões endêmicas à malária da África Subsaariana, a tipagem HLA da população revelou maior frequência do HLA- B *53. Presume-se que essas moléculas de HLA liguem-se de maneira eficiente aos peptídeos produzidos em razão do processamento da proteína circunsporozoíta da malária apresentando-os às células T CD8+ e atacando os parasitas em estágio hepático. Outros haplótipos de classe II (HLA-DRB1 *1302 e HLA-DQB1 *0501) também poderiam atuar como fator protetor (111,112).

O HIV é uma das poucas doenças infecciosas que tem estabelecido a associação do HLA de forma clara. Observou-se que em alguns portadores de HIV conseguem manter baixas as cargas virais mantendo-se assintomáticos por mais tempo. O papel dos alelos HLA de classe I na infecção por HIV, onde descobriram que o HLA-B27 e o B57 estavam fortemente associados à progressão, e que uma gama mais ampla de peptídeos de HIV-1 é reconhecida por indivíduos HLA heterozigotos, pois o vírus pode

levar mais tempo para acumular mutações de escape em indivíduos HLA heterozigotos em relação a indivíduos homozigotos (113, 114).

Quanto ao câncer, os pacientes portadores do alelo HLA - A * 02 estão associados a um mau prognóstico em diferentes tipos de câncer, como câncer de ovário, próstata, melanoma e pulmão (115). O haplótipo HLA-B8, DR3 é surpreendentemente notável por sua associação com uma série de doenças autoimunes, como lúpus, diabetes mellitus tipo 1, deficiência de IgA e insuficiência renal (116).

2.9.6 Sistema HLA e a aloimunização eritrocitária

A importância dos estudos do sistema HLA na modulação da resposta imune pode fornecer um melhor entendimento sobre os mecanismos que ocorrem em certos grupos de pacientes politransfundidos serem mais responsivos às transfusões alogênicas que outros (23,24). Podendo, inclusive, auxiliar em uma melhor ação estratégica de transfusão aos pacientes enquadrados como de alto risco, como por exemplo, reservando unidades de concentrado de hemácias com fenótipos compatíveis a estes pacientes (58).

Alguns estudos identificaram uma possível relação entre alelos HLA e a resposta imune a uma variedade de antígenos, incluindo os antígenos de grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy ou Kidd (117). Dados demonstraram taxas elevadas de anti-imunização eritrocitária e anti-HLA e a ocorrência deste evento está associada ao início precoce e ao número elevado de transfusões em idade prematura antes dos 5 anos (63). O complexo o HLA-DRB1 por apresentar variabilidade gênica pode induzir o curso clínico da aloimunização da série de células vermelhas em pacientes com DF (68).

Por mais que não seja garantido que o desencadeamento do processo de aloimunização não seja ativado, o uso de protocolos é indispensável. É um protocolo de segurança transfusional importantíssimo para melhorar o estado de morbidade dos portadores de doença falciforme e a necessidade crônica de transfusões. Compreendendo o padrão variável da incidência da sensibilização eritrocitária, os antígenos e aloanticorpos mais comuns e os vários fatores potencialmente associados ao desenvolvimento dessa complicação, como fatores étnicos e a compatibilidade fenotípica entre doadores e receptores, as políticas transfusionais devem estar baseadas nessas peculiaridades (83, 113).

Portanto, com base no exposto, e por se tratar de um estudo que tem o intuito de abordar a aloimunização eritrocitária, focamos a pesquisa no sistema HLA de classe II, que possui fendas específicas de ligação com o peptídeo que podem influenciar ou não a aloimunização.

2.9.7 Relevância do Estudo

Sabe-se que a aloimunização eritrocitária é um fator de risco comprovado para o desenvolvimento de reações transfusionais hemolíticas agudas, contribuindo para o aumento das comorbidades da doença falciforme. Diferentes estudos tem sido realizados envolvendo as moléculas do complexo de histocompatibilidade HLA, especialmente o alelo HLA-DRB1, os quais sugerem uma forte ligação com a susceptibilidade a aloimunização eritrocitária em pacientes falcêmicos, possivelmente em decorrência da capacidade do sistema HLA em influenciar o processo imunológico mediante diversificação de encaixes para peptídeos e sua consequente apresentação ao sistema imune.

As frequências alélicas do sistema HLA apresentam maior grau de semelhança entre populações de mesma origem geográfica. No entanto, num país com representação étnica bem diversificada, as frequências mudam bastante. O Estado do Amazonas apresenta poucos estudos envolvendo o HLA e até o presente momento não se tem registros sobre publicações anteriores relacionando o sistema leucocitário humano e a doença falciforme.

Assim, ter a chance de poder entender/conhecer melhor o perfil imunogenético dos pacientes falcêmicos atendidos no hemocentro de Manaus, a carência de estudos sobre os alelos HLA na região Norte, a possível identificação de um fator de risco para as imunizações eritrocitárias e o auxílio no planejamento de medidas preventivas favorecendo a diminuição nas taxas de imunizações e a melhora do tratamento da doença são as motivações para o desenvolvimento deste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar a frequência dos antígenos HLA-DRB1 em pacientes portadores de anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHMOAM.

3.2 Específicos

- Descrever os dados demográficos da população estudada (sexo, idade, raça) e o percentual de pacientes aloimunizados identificados na instituição.
- Tipificar por biologia molecular os alelos HLA de classe II (HLA-DRB1) dos pacientes portadores de anemia falciforme;
- Comparar a frequência de alelos HLA-DRB1 em pacientes falcêmicos aloimunizados e não-alloimunizados;
- Investigar uma possível relação entre o alelo HLA-DRB1 e a sensibilização de antígenos eritrocitários como perfil na identificação de fatores de risco para aloimunização.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo transversal descritivo.

4.2 Aspectos Éticos da Pesquisa

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHMOAM, parecer nº 3.331.316/2019 (Anexo I).

Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo, relevância e, sobretudo, a possibilidade de deixar de participar em qualquer tempo sem prejuízo da pesquisa. Posteriormente, cada participante assinou o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo II), de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº466/2012 e termo de Assentimento (Anexo III) pelos pais ou responsáveis quando solicitado aos menores de 18 anos.

4.3 Amostragem

A dimensão amostral não probabilística (por conveniência) foi de 109 amostras, coletadas durante o período entre março a setembro de 2020. Todas as amostras biológicas utilizadas são procedentes de pacientes portadores de anemia falciforme que fazem parte do programa de acompanhamento da doença na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM), localizado na capital do estado, em Manaus, sendo responsável por todos os serviços de hematologia e hemoterapia, além de atender pacientes oriundos de outras regiões da Amazônia brasileira.

4.4 Critérios de Elegibilidade

4.4.1 Critérios de Inclusão

Pacientes portadores de anemia falciforme (perfil homocigótico para HbS), de ambos os sexos, independentes de idade, raça/cor, doenças pré-existentes, profilaxias

medicamentosas, transfusões sanguíneas, aceitação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participar da pesquisa.

4.4.2 Critérios de exclusão

Pacientes portadores de Doença falciforme (perfil heterozigótico: HbSC, HbCC), talassemias e diagnóstico inconclusivo.

Amostras contendo DNA insuficientes ou com baixa concentração sendo inviáveis para análise. Pacientes que se apresentarem clinicamente instáveis impossibilitando a coleta de amostra.

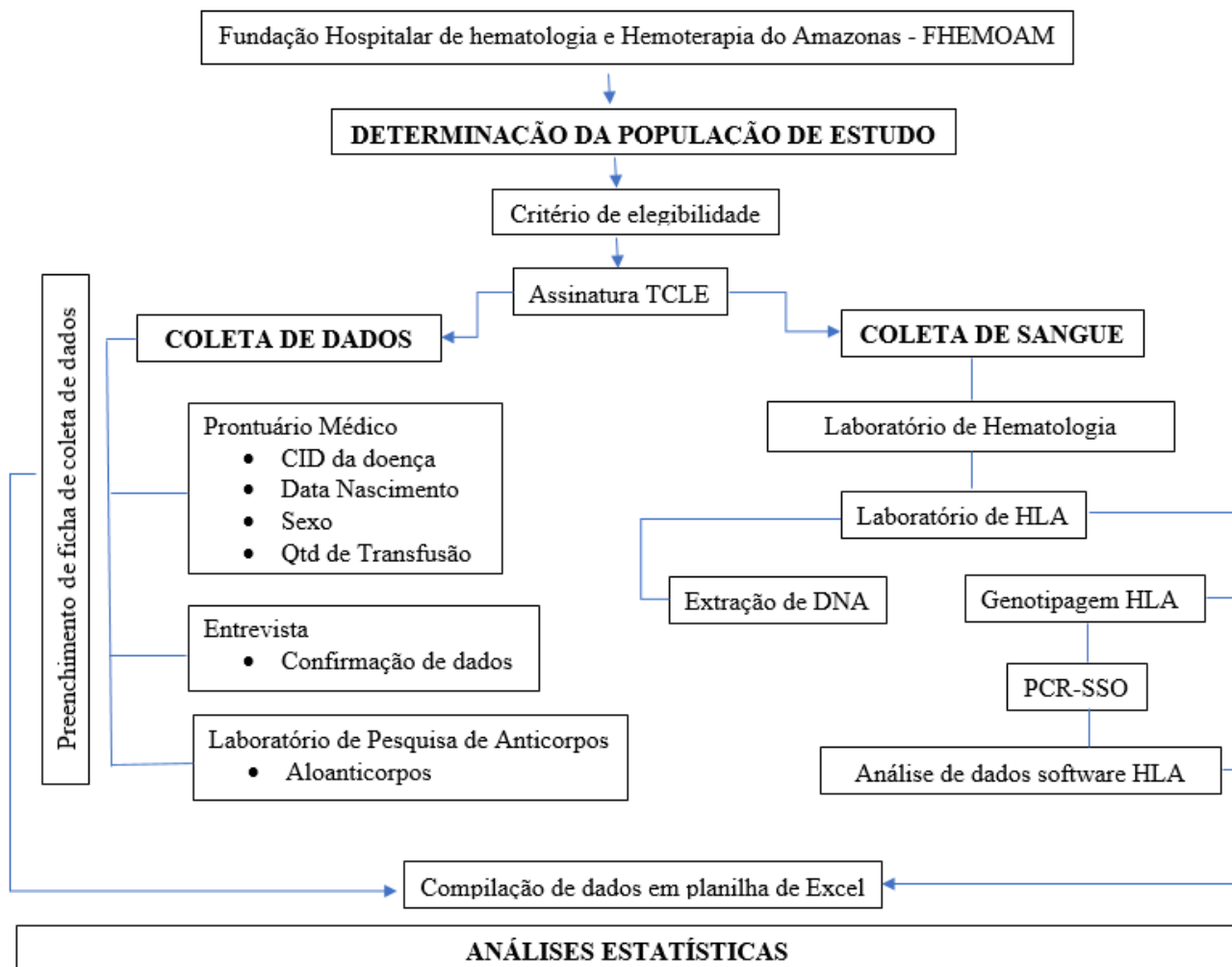
4.5 Coleta de Dados

A coleta de dados sociodemográficos, clínicos e imuno-hematológicos foi realizada mediante a análise dos prontuários físicos e digitais. Com auxílio da equipe do Sistema de Atendimento Médico e Estatístico (SAME), a utilização do sistema IDoctor e a aplicação do inquérito epidemiológico (Apêndice VI) foi possível obter a identificação, idade, gênero, raça/cor e genótipo de hemoglobina dos pacientes. Para a quantidade de transfusões realizadas por cada paciente utilizou-se as informações do banco de dados do sistema Hemosys (Sistema de Atendimento do Doador), o qual foi implantado na fundação no ano de 2016. E, quanto a identificação dos pacientes aloimunizados foi feita a partir dos livros de registros imuno-hematológicos do Laboratório de Pesquisa de Anticorpos da Fundação HEMOAM. Todas as informações foram registradas em planilha de Excel, codificadas e mantidas em sigilo. Um esquema geral da realização da pesquisa e mostrada na figura 5.

4.6 Coleta e Armazenamento de Amostra Biológica

As amostras de sangue foram coletadas em tubos 5mL contendo o anticoagulante ácido etileno de aminotetracético dissódico (EDTA) e armazenadas em geladeira -20°C do Laboratório de HLA da Fundação HEMOAM até o momento da extração (figura 5).

Figura 11: Fluxograma de coleta de dados do estudo.



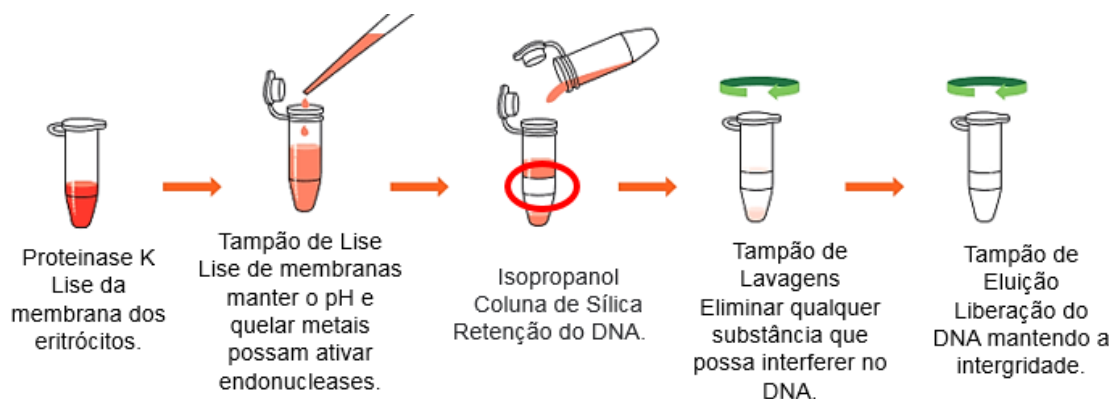
Fonte: Arquivo Pessoal.

4.7 Extração de DNA

Os DNAs foram extraídos a partir dos leucócitos das amostras de sangue periférico utilizando-se o kit comercial da Biometrix (Biopur mini spin plus). O kit utiliza o método de extração por coluna e apresenta os seguintes reagentes: tampão de lise S, tampão de lavagem SI e SII, tampão de eluição S, proteinase K e o tampão de proteinase e os tubos: spin S, coleta e eluição S. O protocolo foi seguido conforme as especificações do próprio fabricante (Anexo V). A técnica consiste: na lise celular através de um sal caotrópica em tampão na presença de Proteinase K; ligação do DNA à coluna de sílica com auxílio da adição de etanol ao lisado; lavagem da membrana com tampão para que proteínas, álcool

e outros contaminantes sejam removidos durante a centrifugação e eluição do DNA genômico puro (Figura 7). Após a extração, a qualidade e a quantidade de DNA foram determinadas pela leitura óptica em equipamento de espectrofotometria NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) para verificação da concentração dos ácidos nucleicos e grau de pureza. Os DNAs foram armazenados em freezer a -20°C .

Figura 12: Extração de DNA



Fonte: Adaptado de [http:// mobiuslife.com.br](http://mobiuslife.com.br).

4.8 Genotipagem HLA de Classe II (-DRB1)

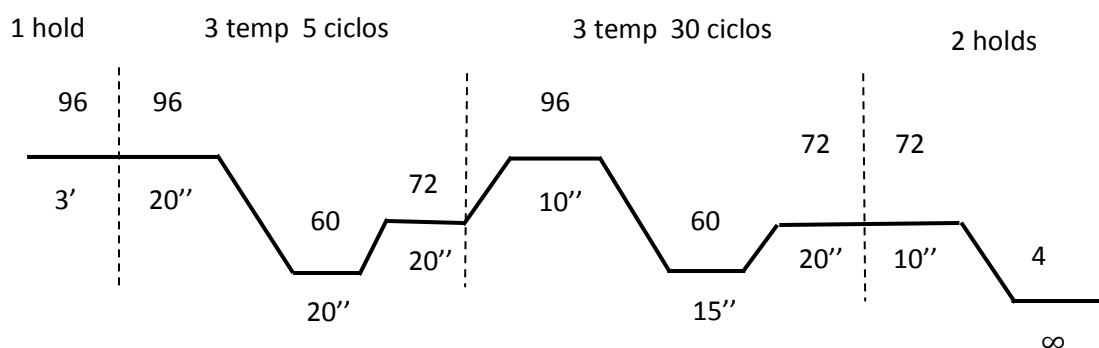
A tipagem HLA de classe II do loci HLA-DRB1 das amostras de DNA dos pacientes portadores de AF foi determinada pela técnica sequência específica de oligonucleotídeos em reação de cadeia da polimerase (PCR-SSO do inglês Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Oligonucleotide) utilizando o Kit LABType™ SSO Classe II DRB1 (One Lambda) com tecnologia Luminex. O kit é composto de reagentes de pré-PCR (solução de primers específico para loci DR e solução de D-mix), reagentes de pós-PCR (tampão de hibridização e de lavagem, solução de desnaturação, tampão de desnaturação, tampão de neutralização e tampão de SAPE).

4.8.1 Amplificação

A reação de amplificação do DNA alvo foi feita utilizando-se $2\mu\text{L}$ de oligonucleotídeos biotinilados (primer) específico para éxon 2 (HLA-DRB1), solução estoque de $6,9\mu\text{L}$ de nucleotídeos (D-mix) e $0,1\mu\text{L}$ da enzima termoestável Taq DNA

polimerase (Invitrogen Platinum® Taq DNA Polymerase) e 1,5µL de DNA por poço. Após a adição dos reagentes, as amostras foram inseridas no termociclador GeneAmp9700-Applied Biosystems na programação PCR-SSO. Ao final dos ciclos as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da realização da eletroforese em gel de agarose. A configuração da termociclagem esteve conforme as orientações preconizadas pelo fabricante do kit (Anexo VI), como pode ser visto na representação esquemática a seguir:

Programação do termociclador GeneAmp9700 – Applied Biosystems.



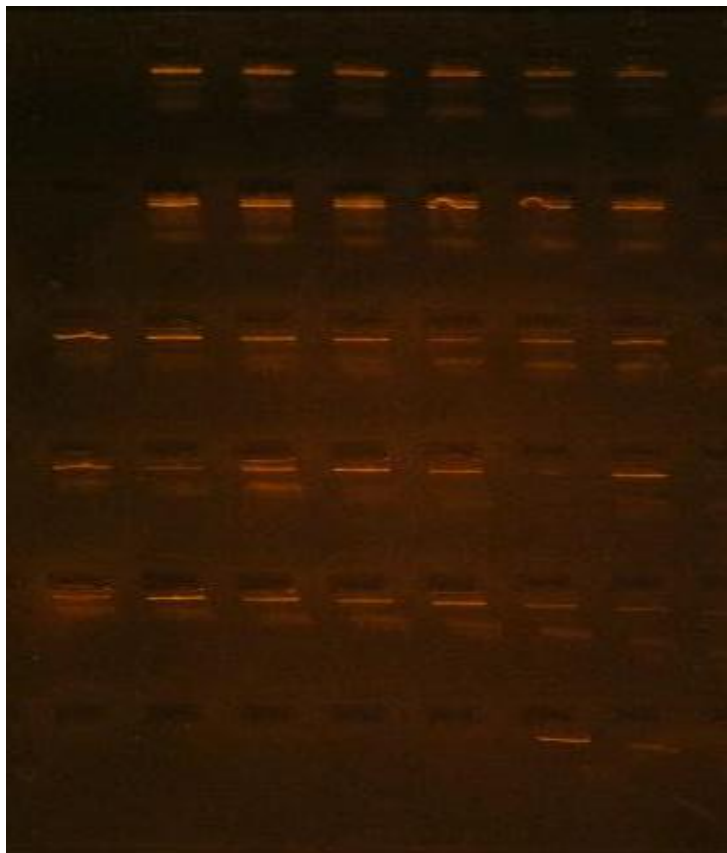
4.8.2 Eletroforese

Seguidamente ao processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (preparada de acordo com o protocolo do Laboratório de HLA da instituição com diluição de 5g de agarose em 220ml de TBE 1X aquecida, adicionou-se 1,5µL de brometo de etídeo, em seguida transferido a uma cubeta por 10 minutos até completa polimerização - Anexo VII), as amostras permaneceram por 10 minutos na corrida eletroforética a 150V para permitir a visualização das bandas quando exposto à luz ultravioleta. A interpretação dos resultados foi baseada na presença ou ausência do fragmento específico de DNA amplificado.

4.8.3 Foto documentação

Após a corrida do DNA em gel de agarose 2,5%, foi utilizado o sistema de fotodocumentação para registro e confirmação da amplificação do DNA.

Figura 13: Imagem fotodocumentada da corrida eletroforética do DNA amplificado de amostras distintas.

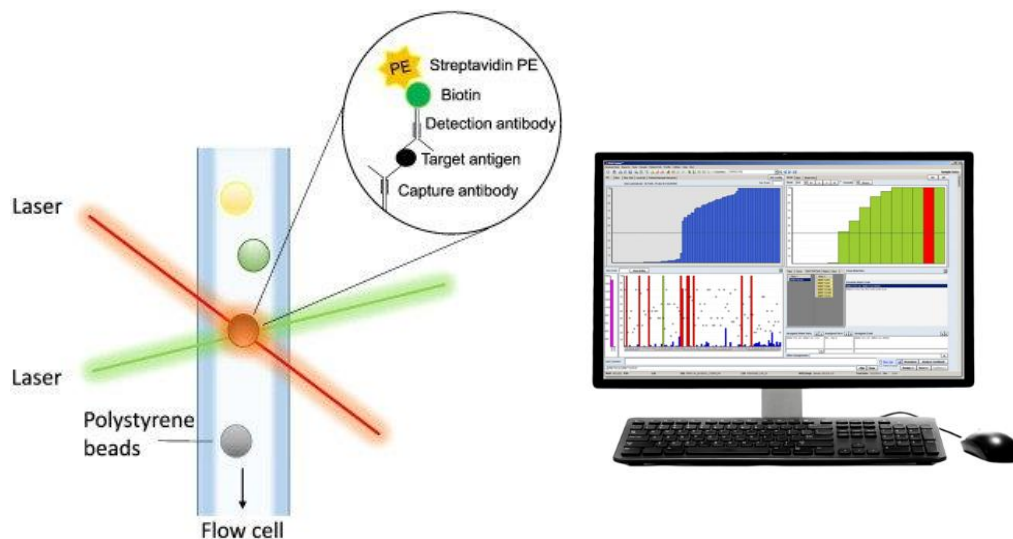


Fonte: Arquivo pessoal.

4.8.4 Hibridização

O produto PCR foi desnaturado e depois hibridizado com sondas de DNA complementares aderidos às beads codificadas por fluorescência. O kit contém uma mistura de sonda codificada por fluorescência e uma solução de diluição necessário para esta etapa de hibridização. Tais sondas já estão pré-conjugadas em microesferas (“pérolas”), de forma que cada microesfera possui um tipo de sonda específico para cada alelo de HLA. O produto hibridizado foi marcado com um produto fluorescente, o SAPE (Streptavidina conjugada com R-Ficoeritrina, do inglês: R-Phycoerythrinconjugated Streptavidin). (Anexo VIII)

Figura 14: Esquema de captura de duas fluorescências pelo analisador de fluxo duo-laser (Luminex).



Fonte: <https://www.lagitre.com/>

Os primers biotinilados fazem com que os produtos da PCR tenham uma biotina incorporada e em associação ao SAPE emita fluorescência quando excitada pelo laser. Outra fluorescência é emitida pelas microesferas ligadas as sondas. O software HLA Fusion utilizado determina reações positivas e negativas com base na combinação de sondas alelo específicas ligadas ao DNA e assim identificar os alelos HLA daquela amostra (Figura 9).

4.8.5 Análise e interpretação da tipagem HLA

A leitura das microesferas marcadas foi realizada em um citômetro de fluxo (Luminex FLEXMAP 3D®) (Figura 10), neste equipamento os lasers com diferentes comprimentos de onda reconhecem as sondas marcadas ou não com o SAPE, identifica a intensidade de fluorescência da PE (ficoeritrina) em cada microesfera. O software de análise HLA Fusion™ auxilia na determinação da tipagem HLA que se baseia no padrão de reação em comparação com os padrões das sequências dos genes HLA publicados.

4.9 Análise Estatística e Descritiva

Os dados foram tabulados e organizados no programa Excel 2016 (Microsoft Office®). Posteriormente, realizou-se toda descrição do banco de dados, onde as variáveis categóricas foram utilizadas para confecção de tabelas e gráficos com frequências absolutas (n) e relativas (%), e as variáveis numéricas foram analisadas através de medidas de posição e dispersão. Todas as análises foram realizadas no software R versão 3.6.1, e os gráficos foram elaborados no Excel.

Figura 15: Luminex do Laboratório de HLA da Fundação HEMOAM.



Fonte: Laboratório de HLA da FHEMOAM.

5 RESULTADOS

5.1 Distribuição das Características Demográficas dos Pacientes com Anemia Falciforme da Fundação HEMOAM

Ao todo foram analisados as amostras e os dados de 109 pacientes portadores de anemia falciforme atendidos na FHMOAM. A Tabela 2, mostra a distribuição dos pacientes quanto ao gênero, faixa etária, raça/cor e naturalidade. É possível notar que grande parte dos pacientes são do gênero feminino (56,9%) e estão na faixa etária entre 11 a 20 anos (37,6%). Quanto a raça e naturalidade, a maioria se declarou pardo (88,1%) e são do Estado do Amazonas (94,5%).

Tabela 2: Distribuição demográfica dos pacientes portadores de anemia falciforme da Fundação HEMOAM.

Variável	n°	%
Gênero		
Feminino	62	56,9%
Masculino	47	43,1%
Faixa etária (anos)		
1 a 10	27	24,8%
11 a 20	41	37,6%
21 a 30	21	19,3%
31 a 40	11	10,1%
41 a 50	5	4,6%
> 50	4	3,7%
Raça		
Branco	8	7,3%
Negro	5	4,6%
Pardo	96	88,1%
Naturalidade		
Amazonas	103	94,5%
Roraima	1	0,9%
Pará	4	3,7%
Estrangeiro (Venezuela)	1	0,9%

Fonte: Banco de dados do sistema iDoctor da FHMOAM.
n = número total de indivíduos (n = 109).

5.2 Quantitativo de Transfusões Catalogadas dos Indivíduos entre os anos de 2016 a 2020 pelo Banco de dados HEMOSYS da FHEMOAM

As transfusões foram contabilizadas a partir da análise do banco de dados do sistema Hemosys da FHEMOAM, desde o início de sua implantação em 2016 até setembro de 2020. A média corresponde em aproximadamente 7 transfusões, com desvio padrão de 7,15, o máximo realizado foi de 35 transfusões e o mínimo de 1 (Tabela 3). Dentro os 109 pacientes, a maioria realizou entre 2 a 5 transfusões (39,4%), como descrito na tabela 4.

Tabela 3: Média das transfusões realizadas.

Variável	Média	DP	Mínimo	Med.	Máximo
Transfusões	7,0	7,15	1,00	5	35

Fonte: Banco de dados do sistema Hemosys da FHEMOAM. *DP = Desvio padrão.

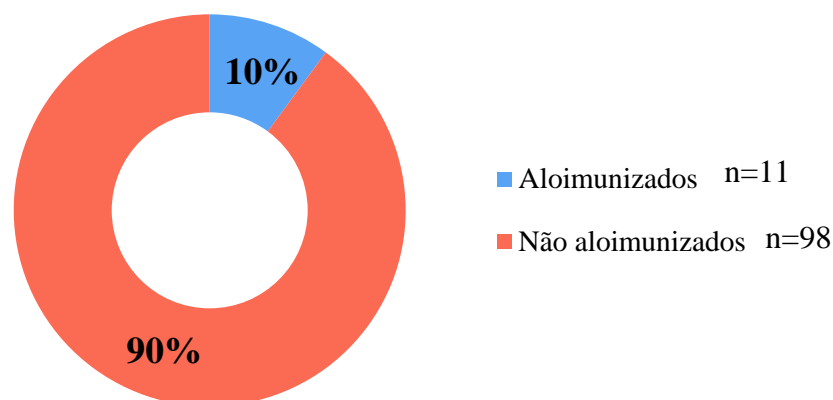
Tabela 4: Frequência de transfusões nos pacientes de anemia falciforme.

Número de transfusões	n	%
0 – 1	20	18,3
2 – 5	43	39,4
6 – 10	24	22,0
11 – 20	15	13,8
21 – 30	6	5,5
35	1	0,9
Total	109	100

Fonte: Banco de dados do sistema Hemosys da FHEMOAM.

5.3 Frequência de Aloimunização Eritrocitária nos Indivíduos Participantes da Pesquisa

Analisando os dados imuno-hematológicos disponíveis no laboratório de Imuno Hematologia da instituição, identificou-se que dos 109 pacientes com anemia falciforme, apenas 11 (10%) pacientes apresentaram aloanticorpos. Esses resultados podem ser vistos no Gráfico 1.

Gráfico 1: Frequência de pacientes aloimunizados e não aloimunizados.

Fonte: Livro de registros imuno-hematológicos da FHEMOAM.

Na tabela 5, estão descritos os pacientes portadores de anemia falciforme aloimunizados contendo os respectivos anticorpos irregulares identificados e o alelo HLA-DRB1 correspondente de cada paciente. Deste total, 8 são do sexo feminino e todas autodeclaradas parda. Os Aloanticorpos identificados correspondem aos sistemas Rh, Kell e Diego. Apenas 2 pacientes não tiveram o aloanticorpo identificado.

Tabela 5: Descrição dos anticorpos irregulares encontrados nos pacientes aloimunizados.

Ordem	P.A.I.	Genotipagem HLA-DRB1	Sexo	Qtd de transfusões	Idade	Cor
1	Anti-C	HLA DRB1*04:11	F	1	18	Parda
2	Anti-Dia	HLA DRB1*04:04	F	2	10	Parda
3	Anti-Dia	HLA DRB1*04:07	F	5	15	Parda
4	Anti-E	HLA DRB1*09:01	M	7	21	Parda
5	Anti-E	HLA DRB1*08:02	F	7	33	Negra
6	Anti-K	HLA DRB1*07:01	F	2	13	Parda
7	Anti-K	HLA DRB1*01:02	F	10	12	Parda
8	Anti-K	HLA DRB1*04:05	F	30	23	Parda
9	Anti-K	HLA DRB1*01:01	M	10	30	Parda
10	Não identificado	HLA DRB1*04:03	F	3	13	Parda
11	Não identificado	HLA DRB1*04:11	M	1	12	Parda

Fonte: Livro de registros imuno-hematológicos da FHEMOAM.

5.4 Frequência das especificidades HLA de Classe II dos Pacientes incluídos na Pesquisa

A tabela 6 descreve os resultados da tipagem HLA dos pacientes portadores de anemia falciforme que participaram da pesquisa. Foram identificadas 13 especificidades para o loci -DRB1 (*01; *03; *04; *07; *08; *09; *10; *11; *12; *13; *14; *15 e *16). Nota-se que o alelo mais frequente foi o HLA DRB1*04 (19,3%), seguidos do HLA DRB1*03 (10,6%) e DRB1*16 (10,1%). Gerando um total de 218 alelos encontrados na população de estudo. A tabela 7, mostra os subtipos presentes na população do estudo. É possível notar, que o subtipo mais frequente é o :01 (39,4%).

Tabela 6: Tipagem dos alelos HLA-DRB1 dos 109 pacientes com anemia falciforme.

Alelo HLA-DRB1	n° de alelos	%
DRB1*01	18	8,3
DRB1*03	23	10,6
DRB1*04	42	19,3
DRB1*07	17	7,8
DRB1*08	19	8,7
DRB1*09	3	1,4
DRB1*10	3	1,4
DRB1*11	20	9,2
DRB1*12	2	0,9
DRB1*13	13	6,0
DRB1*14	16	7,3
DRB1*15	20	9,2
DRB1*16	22	10,1
Total	218	100

Fonte: Laboratório de HLA da FHEMOAM.

Tabela 7: Frequência dos subtipos dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

Subtipos	n°	%
01	43	39,4%
02	21	19,3%
03	12	11,0%
04	10	9,2%
05	6	5,5%
06	1	0,9%
07	6	5,5%
09	1	0,9%
11	7	6,4%
16	1	0,9%
17	1	0,9%
Total	109	100%

Fonte: Laboratório de HLA da FHEMOAM.

5.5 Frequência Genotípica e Fenotípica dos Alelos HLA-DRB1

O Alelo HLA-DRB1*04 foi o que apresentou a maior frequência fenotípica (39%) e genotípica (19%), seguido do alelo HLA-DRB1*03, com 23 alelos correspondendo a 21% da frequência fenotípica e 11% na genotípica. (Tabela 8)

Tabela 8: Frequências fenotípicas e genotípicas dos alelos HLA-DRB1.

Alelo HLA-DRB1	n° de alelos	ff	ff (%)	fg	fg (%)
DRB1*01	18	0,17	17%	0,08	8%
DRB1*03	23	0,21	21%	0,11	11%
DRB1*04	42	0,39	39%	0,19	19%
DRB1*07	17	0,16	16%	0,08	8%
DRB1*08	19	0,17	17%	0,09	9%
DRB1*09	3	0,03	3%	0,01	1%
DRB1*10	3	0,03	3%	0,01	1%
DRB1*11	20	0,18	18%	0,09	9%
DRB1*12	2	0,02	2%	0,01	0,9%
DRB1*13	13	0,12	12%	0,06	6%
DRB1*14	16	0,15	15%	0,07	7%
DRB1*15	20	0,18	18%	0,09	9%
DRB1*16	22	0,20	20%	0,10	10%

Fonte: Laboratório de HLA da FHEMOAM.

***ff = Frequência fenotípica; *fg = frequência genotípica**

Sobre as frequências fenotípicas e genotípicas distribuídas entre os grupos aloimunizados e não aloimunizados, o HLA-DRB1*04 foi o mais frequente em ambos os grupos. A frequência fenotípica desse alelo no grupo de aloimunizados foi de 6% e genotípica apresentou 3%. No grupo de não aloimunizados, a frequência fenotípica foi de 33% e genotípica de 17% (Tabela 9).

Tabela 9: Frequência fenotípica e genotípica dos alelos HLA-DRB1 em pacientes aloimunizados e não-alloimunizados com anemia falciforme.

Alelos HLA - DRB1	Aloimunizados			Não-alloimunizados		
	Nº de alelos	ff (%)	fg (%)	Nº de alelos	ff (%)	fg (%)
DRB1*01	2	2%	1%	16	15%	7%
DRB1*03	1	1%	0%	22	20%	10%
DRB1*04	6	6%	3%	36	33%	17%
DRB1*07	1	1%	0%	16	15%	7%
DRB1*08	3	3%	1%	16	15%	7%
DRB1*09	1	1%	0%	2	2%	1%
DRB1*10	0	0%	0%	3	3%	1%
DRB1*11	2	2%	1%	18	17%	8%
DRB1*12	0	0%	0%	2	2%	1%
DRB1*13	1	1%	0%	12	11%	6%
DRB1*14	1	1%	0%	15	14%	7%
DRB1*15	3	3%	1%	17	16%	8%
DRB1*16	1	1%	0%	21	19%	10%

Fonte: Laboratório de HLA da FHEMOAM.

*ff = Frequência fenotípica; *fg = frequência genotípica

5.6 Avaliação de Variáveis com os Índices de Aloanticorpos nos Portadores de Anemia Falciforme

Para verificar as frequências de variáveis com a formação de aloanticorpos, os pacientes foram divididos em dois grupos: aloimunizados (n= 11) e não-alloimunizados (n= 98) para uma análise comparativa quanto ao sexo, raça/cor e tipo de HLA de classe II. Em ambos os grupos, o alelo mais frequente foi o HLA DRB1*04, com frequência de 27,3% no grupo de aloimunizados e 18,4% entre os não-alloimunizados (Tabela 9).

Tabela 10: Frequência do alelo HLA-DRB1 nos grupos dos aloimunizados e não-aloinmunizados.

Alelos HLA - DRB1	Aloimunizados		Não-aloinmunizados	
	Nº de alelos	Frequência de alelos	Nº de alelos	Frequência de alelos
DRB1*01	2	9,1	16	8,2
DRB1*03	1	4,5	22	11,2
DRB1*04	6	27,3	36	18,4
DRB1*07	1	4,5	16	8,2
DRB1*08	3	13,6	16	8,2
DRB1*09	1	4,5	2	1,0
DRB1*10		0,0	3	1,5
DRB1*11	2	9,1	18	9,2
DRB1*12		0,0	2	1,0
DRB1*13	1	4,5	12	6,1
DRB1*14	1	4,5	15	7,7
DRB1*15	3	13,6	17	8,7
DRB1*16	1	4,5	21	10,7
Total	22	100%	196	100%

Fonte: Laboratório de HLA da FHEMOAM.

Em relação ao total dos pacientes, 11 foram aloimunizados e 98 não. Em ambos os grupos, a raça parda foi predominante. No grupo dos aloimunizados todos foram declarados como pardo (90,9%) e no grupo dos não tem aloanticorpos esse percentual foi de 87,8%. Quanto ao gênero, o feminino apresentou as maiores frequências também nos dois grupos (Tabela 11).

Tabela 11: Distribuição das variáveis entre os grupos Aloimunizados e Não-Aloimunizados.

Variáveis	Aloimunização				Total
	Aloimunizados		Não aloimunizados		
	n	%	n	%	
Etnia					
Branco	-	-	8	8,2	8
Negro	1	9,1	4	4,1	5
Pardo	10	90,9	86	87,8	96
Gênero					
Feminino	8	72,7	54	55,1	62
Masculino	3	27,3	44	44,9	47
Total	11	100%	98	100%	109

Fonte: Banco de dados do sistema IDoctor e ao livro de registro imunohematológicos da FHEMOAM.

Dos 218 alelos, 16 foram encontrados na raça branca, 10 em negros e 192 em pardos. Na comparação da frequência de alelos por raça, observa-se que entre os brancos prevaleceram os alelos HLA-DRB1 *01 e *11, entre os pardos a frequência foi maior para o alelo HLA-DRB1*04, e quanto a raça negra, maiores valores para os alelos HLA-DRB1*03 e *14. (Tabela 12).

Tabela 12: Distribuição da frequência de alelos por raça.

Alelos HLA-DRB1	Raça						Total Geral
	Branco		Negro		Pardo		
	n	%	n	%	n	%	
HLA DRB1*01	3	18,8	1	10	14	7,3	18
HLA DRB1*03	2	12,5	2	20	19	9,9	23
HLA DRB1*04	2	12,5	-	-	40	20,8	42
HLA DRB1*07	2	12,5	1	10	14	7,3	17
HLA DRB1*08	-	-	1	10	18	9,4	19
HLA DRB1*09	-	-	-	-	3	1,6	3
HLA DRB1*10	-	-	-	-	3	1,6	3
HLA DRB1*11	3	18,8	1	10	16	8,3	20
HLA DRB1*12	-	-	-	-	2	1,0	2
HLA DRB1*13	2	12,5	-	-	11	5,7	13
HLA DRB1*14	1	6,3	2	20	13	6,8	16
HLA DRB1*15	-	-	1	10	19	9,9	20
HLA DRB1*16	1	6,3	1	10	20	10,4	22
Total Geral	16	7,3	10	4,6	192	88,1	218

Fonte: Laboratório de HLA da FHEMOAM.

Em relação a frequência de alelos quanto ao gênero, 63% foram encontrados no gênero Feminino e 37% no Masculino. Ao comparar a frequência de alelos por gênero, nota-se 19,4% apresentaram o alelo HLA-DRB1*04 no gênero feminino e 19,1% no masculino, ou seja, foi o alelo mais frequente em ambos os gêneros (Tabela 13).

Tabela 13: Distribuição da frequência de alelos por gênero.

Alelos HLA-DRB1	Gênero				Total Geral
	Feminino		Masculino		
	n	%	n	%	
HLA DRB1*01	11	8,9	7	7,4	18
HLA DRB1*03	13	10,5	10	10,6	23
HLA DRB1*04	24	19,4	18	19,1	42
HLA DRB1*07	9	7,3	8	8,5	17
HLA DRB1*08	10	8,1	9	9,6	19
HLA DRB1*09	1	0,8	2	2,1	3
HLA DRB1*10	2	1,6	1	1,1	3
HLA DRB1*11	12	9,7	8	8,5	20
HLA DRB1*12	2	1,6	0	0,0	2
HLA DRB1*13	4	3,2	9	9,6	13
HLA DRB1*14	9	7,3	7	7,4	16
HLA DRB1*15	16	12,9	4	4,3	20
HLA DRB1*16	11	8,9	11	11,7	22
Total Geral	124	63%	94	37%	218

Fonte: Laboratório de HLA da FHEMOAM.

6 DISCUSSÃO

Quanto às características demográficas, o presente trabalho constatou maior prevalência do sexo feminino (62/110), correspondendo a 56,9%, estando de acordo com outros estudos quanto ao maior contingente ser composto por mulheres (4,5,7,119). Em estudos internacionais realizados na cidade de Michigan (EUA) (120) e Gana (África) (121) os resultados também mostraram maioria do sexo feminino. A faixa etária do nosso estudo variou entre 01 a 52 anos de idade, estando em equivalência com o estudo desenvolvido no Hemocentro da cidade de Divinópolis, 2017, em que foi relatado a inclusão de pacientes entre 2 a 54 anos (7). Porém, quanto aos outros trabalhos, a não concordância com a faixa etária é justificada pelo critério de exclusão dos mesmos, pois optaram por candidatos acima de 18 anos (4,5, 119). No estudo conduzido por Reeves et al. (120) não foi incluído a variável demográfica idade.

Com relação a etnia, nossos resultados também evidenciaram predomínio por pardos (96/109: 88,1%), seguidos pelos autodeclarados brancos e negros, conforme o estudo de César Purin et al. 2019 (45) e Dos Santos et al (2019). Contudo o perfil étnico de estudos realizados em outras regiões do Brasil (4,5,7,119) e exterior (120) demonstrou predomínio por negros.

No que se refere às porcentagens de pacientes aloimunizados, nossa pesquisa identificou um valor de apenas 10% do total de participantes. Segundo os autores Zheng & Maitta (2016), em seus estudos fizeram comparações entre as taxas de aloimunização dos Estados Unidos com a de outras regiões geográficas, assim os valores descritos mostraram grandes desigualdade, com prevalências de 2,6% na Jamaica a 76,19% no Reino Unido. Segundo os autores, a média de aloiminização de todos os estudos nos EUA foi de 22,33% sendo superior a prevalência de 16,25% de outros países. As taxas dos outros países variaram profusamente. A Arábia Saudita, apresentou taxa de 13,71%, em Kuwait foi para 65,45%, na França era de 30,65%. Nesta revisão três estudos brasileiros foram incluídos com uma média de 14,6% de pacientes aloimunizados, valor que se aproxima do resultado de nosso estudo.

A taxa de aloimunização de hemácias é influenciada pela extensão da correspondência de antígenos de hemácias entre receptores e doadores. Assim, o estudo relata que a DF é maior em negros nos EUA, entretanto, o pool de doadores desse país é predominantemente caucasiano, diferente do encontrado no Brasil, pois a DF é marcada

majoritariamente em grupos multiétnicos bem como o pool de doares também ser etnicamente misto. E com base nessas informações, podendo-se inferir maior compatibilidade entre doadores e receptores no Brasil (69).

Da Cunha et al (2018) em sua revisão sistemática, reuniu artigos dos últimos 12 anos, de diferentes países e suas respectivas taxas de aloimunização: Arábia Saudita (23,9%); Brasil (29,8%); Egito (21,4%); EUA (34,7%); França (24,0%); Holanda (18,0%); Jamaica (2,6%); Reino Unido (76,0%) e Uganda (6,1%), com número amostral variando entre 42 a 6.120 pacientes. Este estudo também revelou maior índice de aloimunização contra antígenos do sistema Rh, seguidos pelos Kell, MNS e menor taxa para o Lewis (83). Dos percentuais descritos nessa extensa revisão literária, apenas os divulgados na Holanda se aproximam do encontrado no presente trabalho.

Ambos autores, Zheng & Maitta (2016) e Da Cunha et al (2018), justificam essa variabilidade nas taxas por diversas razões: diferentes métodos de identificação de anticorpos como, por exemplo, a centrifugação em tubo e gel que aumenta a sensibilidade de detecção e uma menor ocorrência de aloimunização de eritrócitos pode refletir uma maior compatibilidade fenotípica entre doadores e receptores, diferentes critérios de inclusão (maiores de 18 anos e ter realizado pelos menos 3 transfusões), o que acaba por não representar a totalidade de pacientes expostos às transfusões. Por fim, nas regiões brasileiras a literatura cita os seguintes dados quanto as taxas de aloimunização e o anticorpo mais prevalente, respectivamente: Bahia 49,07%/ Anti-E 39,3% (122); São Paulo 22,6%/ Anti-Kell 7,5% (123); Pernambuco 34%/ Anti-C 25% (124).

Atualmente, 322 antígenos eritrocitários são agrupados em 36 sistemas de grupos sanguíneos, conforme publicações da Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT). Continuamente tais antígenos clinicamente significativos são descobertos mediante técnicas sorológicas, por sequenciamento e por tecnologias recombinantes ou genômicas (70). Os anticorpos clinicamente significantes são detectados nos sistemas sanguíneos: ABO, Rh, Kell, Kidd, Duff e MNS e provocam, na maioria das vezes, reação transfusional hemolítica (72). O antígeno D apresenta maior potencial para aloimunizações por ser mais imunogênico (73). Assim, todos os trabalhos, inclusive o nosso, apresentam maiores valores para os sistemas Kell e Rhesus (122, 123, 124), de modo que identificamos para o sistema Kell (4/11), Rhesus (3/11) e Diego (2/11) e apenas 2/11 participantes não tiveram o aloanticorpo identificado.

Fatores de risco como idade, sexo e histórico transfusional estão associados a alta incidência de aloimunização, entretanto, outras covariáveis também estão relacionadas, unidade de glóbulos vermelhos recebidos, processos inflamatórios, presença de um ou mais autoanticorpo, genes da resposta imune que inclui o Antígeno Leucocitário Humano e citocinas (83, 125, 126).

As frequências de genes, antígenos e haplótipos são considerados como marcadores populacionais e o levantamento das frequências gera dados importantes de histocompatibilidade tanto para transplantes quanto para estudos de associações entre o HLA e doenças (118).

Estudos anteriores demonstram forte associação do desenvolvimento de aloanticorpos eritrocitários aos antígenos leucocitários humanos (8,9). As moléculas de HLA são capazes de modular a resposta imune, através de uma adequada apresentação de peptídeos e das sequências curtas de aminoácidos lineares oriundas de aloantígenos que contenha o epítipo alvo para serem reconhecidas pelas células TCD4+. O loci HLA de classe II mais envolvido na resposta da produção de aloanticorpos é o HLA-DR (10). De acordo com Hall et al (2005), em seus estudos realizados com camundongos mostraram envolvimento do HLA-DRB1*15 com a formação antígenos anti-D (127) e Urbaniak identificou alta representatividade do alelo HLA-DRB1*15:01 associado aos anticorpos -D (128).

A frequência dos alelos DRB1 na população estudada foi respectivamente maior nos grupos alélicos DRB1*04 (19,3%), DRB1*03 (10,6%), DRB1 *16 (10,1%), DRB1*11 (9,2%) e DRB1*15 (9,2%). Valores próximos foram encontrados em outras regiões do Brasil: em Botucatu (SP), os cinco alelos mais frequentes foram DRB1*11 (15,95%), DRB1*7 (13,82%), DRB1*3 (12,76%), DRB1*13 (9,57%) e DRB1*15 (9,57%) (129); Fortaleza (CE) foram: DRB1*04 (16,9%), DRB1*01 (12,9%), DRB1*08 (12,1%), DRB1*07 (11,3%), e DRB1*11 (11,3%) (130); e na cidade de Campinas (SP) tiveram os alelos DRB1*11 (15,56%), DRB1*04 (12,25%), DRB1*07 (11,59%), DRB1*13 (11,26%) e DRB1*15 (9,93%) maiores percentuais (117).

Os resultados da genotipagem HLA-DRB1 foram também analisados levando em consideração o alelo mais frequente em cada grupo de participantes. Dessa forma, para os portadores de aloanticorpos, os alelos de HLA mais frequentes foram DRB1*04 (27,3%), DRB1*08 (13,6%) e DRB1*15 (13,6%). Nos pacientes não-aloinmunizados, os

alelos DRB1*04, DRB1*03 e DRB1*16 foram os mais frequentes, representando um percentual de 18,4%, 11,2% e 10,7% respectivamente. Quando comparado com outros estudos realizados na população brasileira apresenta resultados concordantes para alguns alelos. No estado de São Paulo, estudo semelhante identificou que para os aloimunizados os alelos mais frequentes foram DRB1*11 (17,69%), DRB1*07 (13,85%), DRB1*15 (13,85%), enquanto que no outro grupo DRB1*04 (15,7%), DRB1*11 (13,95%), DRB1*13 (11,05%) foram os mais representativos (117). Valores próximos ao nosso estudo correspondem apenas para os alelos DRB1*04 e DRB1*15.

Tatari-Calderone et al (2016), ao analisarem uma amostra com 204 pacientes de três grandes centros médicos nos EUA e realizando-se tipagem de baixa/média resolução para HLA DRB1 e HLA DQB1, foi observado que pacientes portadores do alelo HLA-DR*03 eram menos propensos a serem aloimunizados, enquanto aqueles com o alelo HLA-DR*04 tinham maior probabilidade de serem aloimunizados (131)

Raos e colaboradores (2018), utilizando tipagens para os *locus* -DR e -DQ do HLA de classe II, realizada na Croácia com 70 integrantes aloimunizados para o antígeno do grupo sanguíneo Duff (Fy), destacaram o papel dos alelos DRB1*04 e DRB1*15, a atuação dos haplótipos DRB1*04; -DQB1*03:02 e DRB1*15 -DQB1*06:02 como alelos de susceptibilidade e o efeito protetor do alelo DQB1*02, DRB1*03 -DQB1*02:01 e DRB1*07 -DQB1*02:02 contra aloimunização para Fya (132). Embora não tenham incluídos todos pacientes cadastrados na fundação Hemoam, os resultados demonstraram que o -DRB1*04, foi o mais expressivo em ambos os grupos e correspondendo a 54,54% (6/11) no grupo dos aloimunizados para os sistemas Diego (2/6), Kell (1/6) e Rhesus (1/6). Todavia, para 2 pacientes não foram identificados nos registros da instituição os sistemas eritrocitários para os quais se tornaram sensibilizados.

Um estudo realizado na cidade de Maringá, seus resultados confirmaram que algumas moléculas de HLA facilitam a apresentação de peptídeos antigênicos eritrocitários aos linfócitos T, pois encontrou-se forte associação do HLA-DRB1*04 e HLA-DRB1*11 aos Aloanticorpos anti-Fy e anti-k, respectivamente (133).

Sipertt et al (2017), observaram o grupo alélico -DRB1*15 em pacientes aloimunizados contra antígenos Rh quando comparado aos não aloimunizados (9). Na França, outro estudo ratifica a associação do HLA com as imunizações eritrocitárias, porém, é especificamente contra os antígenos Fya, tendo a maior frequência alélica HLA

DRB1*01 nos pacientes sensibilizados para o sistema sanguíneo Kidd (134). Ambos pesquisadores concordam quanto a forte interação do sistema leucocitário humano às reações transfusionais de aloimunizações, contudo, como não foram tipados todos os pacientes respondedores a antígenos, não se pode afirmar ou discordar quanto a correlação dos alelos HLA com especificações de antígenos de hemácias.

Determinados alelos e haplótipos HLA podem influenciar o risco de surgimento de manifestações clínicas, sendo assim, o sistema HLA não apenas está relacionado com a formação de aloanticorpos, como também na predisposição a síndromes respiratórias e osteomielites, dentre outras complicações nos portadores de anemia falciforme. Estudos anteriormente publicados já sugestionavam a possível correlação do haplótipo DRB1*130101 - DQB1*060101 com a suscetibilidade a síndrome torácica aguda (135). Observando os haplótipos HLA de classe II para pacientes com AF que apresentaram osteomielite o DRB1*100101 - DQB1*050101 foi mais prevalente entre os pacientes conferindo susceptibilidade à infecção (136).

Conforme o exposto, é sabido que o curso clínico da anemia falciforme é considerado um enorme desafio tanto para seus portadores quanto para os profissionais de saúde, em decorrência das dificuldades nos processos fisiopatológicos, nas manifestações clínicas e no tratamento. A terapia transfusional é uma prática rotineira na vida dos portadores de AF, entretanto, ao longo do tempo podem surgir complicações, tornando o uso dessa modalidade bastante criteriosa, pelo risco de se tornarem sensibilizados contra antígenos de superfície de células alogênicas causando reações hemolíticas e dificultando a busca por doadores compatíveis (1,2). Assim, o estudo dos antígenos leucocitários humanos pode atuar como marcadores essenciais na identificação do risco para determinadas manifestações clínicas. Auxiliando nas condutas terapêuticas e estabelecendo um prognóstico quanto a evolução da doença (130).

Destacamos ainda que este foi o primeiro estudo no Estado do Amazonas utilizando amostras de pacientes portadores de anemia falciforme para determinação da tipagem dos genes HLA de classe II, o qual contribuirá para a caracterização fenotípica dessa população, além de servir como base para estudos futuros que norteiem a identificação das bases moleculares do sistema HLA entre doadores e receptores, proporcionando o conhecimento sobre essas diferenças, bem como melhor entendimento sobre o risco de formação de aloanticorpos.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, bem como as informações obtidas na literatura, pode-se concluir que:

- Houve prevalência do sexo feminino em 56,9% do total de participantes da pesquisa, o maior percentual se declarou pardo (88,1%), seguido por brancos (7,3%) e pretos (4,6%); o que confirma a não mais exclusividade da doença em afrodescendentes, por ser influenciada pela miscigenação não só no Estado do Amazonas, mas em outros estados brasileiros. A faixa etária foi maior entre os 11 a 20 anos (37,6%).
- O percentual de pacientes aloimunizados foi de 10%, correspondendo a 11/109 dos integrantes, com uma média de 7 transfusões por pacientes.
- Os aloanticorpos encontrados correspondem aos sistemas Rhesus, Kell e Diego. Apenas dois pacientes não tiveram o aloanticorpo identificado.
- Embora a literatura já tenha estabelecido a associação da ocorrência da aloimunização eritrocitária a quantidade de transfusões, sexo e idade, não podemos inferir sobre estas variáveis, pois nosso trabalho teve um número pouco expressivo para que pudéssemos chegar a esta afirmativa.
- Os alelos HLA-DRB1*04 (19,3%), -DRB1*3 (10,6%) e -DRB1*16 (10,1%) foram os mais representativos nos pacientes. De acordo com pesquisas anteriores o alelo HLA-DRB1*04 está presente em muitos dos pacientes com anemia falciforme e associado a um risco maior para aloimunizações.

De maneira geral, nossos dados permitem concluir que apesar de diferenças entre grupos étnicas encontradas no Brasil, a análise da tipagem HLA de uma pequena amostra dos pacientes portadores de anemia falciforme não difere dos valores encontrados em outros estudos, contudo de suma importância para auxílio no tratamento e prognóstico da doença.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade SP, Lemos AJG, Mota MAS, Takahagassi PDS. Hemoterapia: hemácias fenotipadas para pacientes falcêmicos. *Scire Salutis* 2017;7(2):65-73. DOI: <http://doi.org/10.6008/SPC2236-9600.2017.001.0008>.
2. Rodrigues C, Sell AM, Guelsin GAS, Higa TT, Silva SP, Macedo LC et al. HLA polymorphisms and risk of red blood cell alloimmunisation in polytransfused patients with sickle cell anaemia. *Transfusion Medicine* 2017;27(6). PMID: 28881103 DOI: 10.1111 / tme.12459.
3. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:177-82.
4. Felix AA, Souza HM, Ribeiro SB. Epidemiologic and social aspects of sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010 Jun;32(3). <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000072>.
5. Amaral JL, Almeida NA, Santos PS, de Oliveira PP, Lanza FM. Socio-demographic, economic and health profile of adults with sickle-cell disease. *Rev Rene* 2015 maio-jun;16(3):296-305.
6. Da Cunha EG, Machado LAF, de Oliveira LC, Neto JFN. The erythrocyte alloimmunisation in patients with sickle cell anaemia: a systematic review. *Transfus Med* 2019;29(3):149-161. doi:10.1111/tme.12543.
7. Sant'Ana Phelipe Gabriel dos Santos, Araujo Ariane Moreira, Pimenta Cynthia Teixeira, Bezerra Mário Lúcio Pacheco Ker, Borges Junior Sílvio Pereira, Martins Neto Viviana et al. Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2017 Mar; 39(1):40-45. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.09.007>.
8. Hoppe C, Klitz W, Vichinsky E, Styles L. HLA type and risk of alloimmunization in sickle cell disease. *American journal of hematology*.2009;84:462–4.
9. Sippert EÂ, Visentainer JE, Alves HV, et al. Red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease: correlation with HLA and cytokine gene polymorphisms. *Transfusion*. 2017;57(2):379-389. doi:10.1111/trf.13920.
10. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. 560p.
11. Dos Santos EC, Teixeira MM, Solva MF, De Assis JP, Júnior ECS, Proietti ABFC. Stroke in patients with sickle cell anemia. *REAS/EJCH* 2019 Set;32:958. <https://doi.org/10.25248/reas.e958.2019>.
12. Naoum PC, Naoum FA. *Doença das Células Falciformes*. São Paulo: Savier Editora; 2004.

13. Forget BG, Bunn F. Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harb. Perspect Med*, 2013; 3.
14. Naoum PC. Eletroforeses: hemoglobinopatias, proteínas séricas, lipoproteínas, DNA. São Paulo: Santos; 2012. p. 25-34.
15. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 2008; 112 (10): 3927–3938. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-078188>.
16. Weatherall DJ, Provan AB. Red cells I: inherited anaemias. *Lancet*. 2000;355(9210):1169-1175. doi:10.1016/s0140-6736(00)02073-0.
17. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. *Fundamentos em Hematologia*. 4ª. Edição. Porto Alegre: Artmed; 2004. p. 79.
18. Urade BP. Haemoglobin S and β Thal: Their Distribution in Maharashtra. *Int. J. Biomed. Sci.* 2013; 9(2):75-81.
19. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull. World Health Organ.* 2001;79(8).
20. Livingstone FB. Hemoglobin history in west Africa. *Hum Biol.* 1976 Sep; 48(3):487-500.
21. Weatherall DJ, Akimyanju O, Fucharoen S, Olivieri N, Musgrove P. Inherited disorders of hemoglobin. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, et al., editors. *Disease control priorities in developing countries*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2006. p. 663-80.
22. Kreuels B, Kreuzberg C, Kobbe R, Ayim-Akonor M, Apiah-Thompson P, Thompson B, et al. Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth. *Blood*. 2010 Jun;15(2):4551-8. Doi: 10.1182/blood-2009-09-241844.
23. BRASIL. Ministério da Saúde. *Doença Falciforme: A experiência brasileira na África*. Brasília, DF; 2012.
24. BRASIL. Ministério da Saúde. *Doença Falciforme: diretrizes básicas da linha de cuidado*. Brasília, DF; 2015.
25. Andrade RO. À sombra da história. *Pesquisa FAPESP [Publicação web]*; 2016 Ago [acesso em 14 de abril de 2019]; 246(91). Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/a-sombra-da-historia/>
26. Roseff SD. Sickle cell disease: a review. *Imunohematology*. 2009; 25(2): 67-74.

27. Girello AL, Kuhn TIBB. Fundamentos de imuno-hematologia eritrocitária. 4 ed. São Paulo, SP: Senac Editora; 2016.
28. Da Rocha HHG. Anemia Falciforme. Rio de Janeiro. Rubio Editora; 2004.
29. Castilho L, Junior JP, Reid ME. Fundamentos de Imuno-hematologia. São Paulo: Atheneu Editora; 2015.
30. Maia AO, Gomes KKA, Silva IRL, Almeida MMC. The Importance of The Early Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Journal of Medicine and Health Promotion*. 2017; 2(4): 670-675.
31. Sabath DE. Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies: An ACLPS Critical Review. *Am J Clin Pathol*. 2017; 148(1): 6-15. doi:10.1093/ajcp/aqx047.
32. Fernandes ARC, Mendiburu CF, Bonini-Domingos CR. Utilization of different methodologies for characterization of Hb Hasharon heterozygotes. *Genetics and molecular research* 2006; 5(1): 1-6.
33. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Mar; 4:18010. doi:10.1038/nrdp.2018.10.
34. Elguero E, Délicat-Loembet LM, Rougeron V, et al. Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112:7051-7054.
35. Piel, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat. Commun* 2010; 1: 104.
36. Piel, F. B. et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *The Lancet* 2013 Jan; 381:142–151.
37. Calvo-Gonzalez E. Hemoglobinas Variáveis na Área Médica e no Tema Cotidiano: Um Olhar Sobre a Raça, Nação e Genética no Brasil contemporâneo. *Saúde soc. São Paulo* 2017; 26(1): 75-87.
38. Piel FB, Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ, Williams TN. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. *PLoS Med* 2013; 10(7).
39. Hassell KL. Population estimates of sickle cell disease in the U.S. *Am J Prev Med* 2010; 38(4Suppl): 512-521. doi: 10.1016/j.amepre.2009.12.022.
40. Arlet JB, de Luna G, Khimoud D, Odièvre MH, de Montalembert M, Joseph L et al. Prognosis of patients with sickle cell disease and COVID-19: a French experience. *Lancet Haematol* 2020 Sep; 7(9): 632-634. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30204-0.
41. Lervolino LG, Baldin PE, Picado SM, Calil KB, Viel AA, Campos LA.

Prevalência da doença falciforme e do traço falciforme em estudos nacionais de triagem neonatal. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011; 33(1): 49-54. 10.5581 / 1516-8484.20110015

42. Silva WS, de Oliveira RF, Ribeiro SB, da Silva IB, de Araújo EM, Baptista AF. Rastreamento de variantes estruturais da hemoglobina na Bahia, Brasil. *Int J Environ Res Saúde Pública* 2016 Fev; 13(2): 225. doi: 10.3390 / ijerph13020225. PMID: 26901212; PMCID: PMC4772245.

43. Braga JAP, et al. Guidelines on neonatal screening and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Project guidelines: Associação Médica Brasileira - 2016. *Rev Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2016; 38(2): 147–157.

44. Acordi P. Avaliação das características laboratoriais da aloimunização eritrocitária em pacientes com doença falciforme da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas. Manaus. Dissertação [Mestrado em Hematologia] – Universidade do Estado do Amazonas UEA; 2016.

45. Purin C. Caracterização clínica e demográfica da pacientes com doença falciforme acompanhados na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas. Manaus. Dissertação [Mestrado em Hematologia] – Universidade do Estado do Amazonas UEA; 2017.

46. Cardoso EC. Avaliação da associação entre os níveis de heme e hmgb1 com os marcadores da ativação da coagulação em crises agudas na doença falciforme. Dissertação [Mestrado em Hematologia] – Universidade do Estado do Amazonas UEA; 2019.

47. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde – DATASUS. Informações de saúde, epidemiológicas e Morbidade: banco de dados. Disponível em: <<https://datasus.saude.gov.br/>> Acesso em: 24 jun. 2020.

48. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010 Dec; 376(9757): 2018–31.

49. Branden C, Tooze J. *Introduction to Protein Structure*. 2.ed. Garland Science; 1999.

50. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol* 2019; 14:263-292. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838

51. Noguchi CT, Schechter AN. Sickle haemoglobin polymerization in solution and in cells. *Annu Rev Biophys Chem* 1985; 14: 239–263.

52. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 2017; 376:1561-1573. DOI: 10.1056/NEJMra1510865.

53. Sparkenbaugh E, Pawlinski R. Prothrombotic aspects of sickle cell disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2017 Jul; (15):1307 – 1316.
54. Novelli EM, Gladwin MT. Crises in Sickle Cell Disease. *Chest* 2016; 149(4):1082-1093. doi:10.1016/j.chest.2015.12.016
55. Mendonça R, Silveira AAA, Conran N. Red cell DAMPs and inflammation. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2016; 65: 665 – 78.
56. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Frontiers in pharmacol* 2014 May; 5: 115 – 6.
57. Ferrone FA. Targeting HbS Polymerization. *Seminars in hematology* 2019 April; 55(2): 53 – 59. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.04.012>.
58. Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de Múltiplos órgãos. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 29(3): 207-214.
59. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *Lancet* 2017; 390(10091): 311-323. doi:10.1016/S0140-6736(17)30193-9.
60. Meier ER, Miller JL. Sickle cell disease in children. *Drugs* 2012 May; 72(7): 895-906. doi: 10.2165/11632890-000000000-00000. PMID: 22519940; PMCID: PMC3899685.
61. Paul RN, Castro OL, Aggarwal A, Oneal PA. Acute chest syndrome: sickle cell disease. *Eur J Haematol* 2011 Sep; 87(3):191-207.
62. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Rev.* 2011;25(5):205-213. doi:10.1016/j.blre.2011.04.001.
63. Braga JAP. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes. *Rev Bras de Hematol e Hemoter São Paulo* 2007; 29(3): 233-238.
64. BRASIL. Ministério da Saúde. Anemia Falciforme: Atenção e cuidado. Brasília, DF; 2014.
65. Azar S, Wong TE. Sickle Cell Disease: A Brief Update. *Med Clin North Am* 2017;101(2):375-393. doi:10.1016/j.mcna.2016.09.009.
66. Telen MJ, Malik P, Vercellotti GM. Therapeutic strategies for sickle cell disease: towards a multi-agent approach. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18(2):139-158. doi:10.1038/s41573-018-0003-2.

67. Hsieh MM, Fitzhugh CD, Tisdale JF. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: The time is now. *Blood* 2011;118:1197-1207.
68. Stephens PRS, Ribeiro FC, Silva VL, Marques, MAP. *Hematologia e imunologia aplicadas em imuno-hematologia*. Rio de Janeiro: EPSJV, 2013.
69. Zheng Y, Maitta RW. Alloimmunisation rates of sickle cell disease patients in the United States differ from those in other geographical regions. *Transfus Med* 2016; 26(3):225-30. doi: 10.1111 / tme.12314.
70. Storry JR, Clausen FB, Castilho L, Chen Q, Daniels G, Denomme G, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. *Vox Sanguinis* 2019 Nov; 114: 95–102.
71. Chou ST, Liem RI, Thompson, AA. Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. *British Journal of Haematology*. 2012;159:394–404.
72. Brecher ME (ed). *Technical manual of American Association of Blood Banks*. 15th ed. Copyright 2005 Bethesda, Maryland USA.
73. Tormey CA, Stack G: Immunogenicity of blood group antigens: a mathematical model corrected for antibody evanescence with exclusion of naturally occurring and pregnancy-related antibodies. *Blood* 2009;114:4279-4282.
74. Telen MJ. et al. Alloimmunization in sickle cell disease: changing antibody specificities and association with chronic pain and decreased survival. *Transfusion* 2015 Jun;55(602):1378 – 1387.
75. Campbell-Lee SA, Kittles RA. Red blood cell alloimmunization in sickle cell: listen to your ancestors. *Transfus Med Hemother* 2014;41(6):431-5. <http://dx.doi.org/10.1159/000369513>.
76. Brasil. Ministério da Saúde. *Política Nacional de Saúde Integral da População Negra*. 2º ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
77. Alves VM, Martins PRJ, Soares S, Araújo G, Schmidt LC, Costa SSM, et al. Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(3):206-11. <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20120051>.
78. Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood*. 2012;120(3):528–37.
79. Sakhalkar VS, Roberts K, Hawthorne LM, McCaskill DM, Veillon DM, Caldito GC, et al. Allosensitization in patients receiving multiple blood transfusions. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1054:495–9.

80. Lasalle-Williams M, Nuss R, Le T, Cole L, Hassell K, Murphy JR, et al. Extended red blood cell antigen matching for transfusions in sickle cell disease: a review of a 14-year experience from a single center (CME). *Transfusion* 2011;51(8):1732–9.
81. 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(6):1062–71.
82. Noizat-Pirenne F, Tournamille C. Relevance of RH variants in transfusion of sickle cell patients. *Transfus Clin Biol* 2011;18(5-6):527–35
83. Da Cunha EG, Machado LAF, de Oliveira LC, Neto JFN. The erythrocyte alloimmunisation in patients with sickle cell anaemia: a systematic review. *Transfus Med* 2019;29(3):149-161. doi:10.1111/tme.12543.
84. Fabron JR. Application of noninvasive phagocytic cellular assays using autologous monocytes to assess red cell alloantibodies in sickle cell patients. *Transf. Apher Sci* 2004;91(1):29-35.
85. Moreira JR. Red Blood cell alloimmunization in sickle cell disease: The influence of Racial and Antigenic Pattern Differences between donors and recipients in Brazil. *Am J Hematol* 1996;52:197-200.
86. Neurosci, N. Immunoregulatory networks in sickle cell alloimmunization. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2016;11:457-461.
87. Ameen R, Al Shemmari S, Al-Bashir A. Red blood cell alloimmunization among sickle cell Kuwaiti Arab patients who received red blood cell transfusion. *Transfusion*. 2009;49(8):1649–54.
88. Verduin EP, Brand A, Schonewille H. Is female sex a risk factor for red blood cell alloimmunization after transfusion? A systematic review. *Transfus Med Rev*. 2012;26(4):342–535.
89. Fasano RM, Booth GS, Miles M, Du L, Koyama T, Meier ER, et al. Red blood cell alloimmunization is influenced by recipient inflammatory state at time of transfusion in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol* 2015;168(2):291–300.
90. Hendrickson JE, Chadwick TE, Roback JD, Hillyer CD, Zimring JC. Inflammation enhances consumption and presentation of transfused RBC antigens by dendritic cells. *Blood*. 2007;110(7):2736–43.
91. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. 560p.

92. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *New Engl J Med* 2000; 343: 702-9.
93. Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function – antigen apresentation. Part 1. *Einstein (São Paulo)* 2015;13(1).
94. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JJ. *The Major Histocompatibility Complex. Cellular and molecular immunology.* Philadelphia: W.B. Saunders, 2005.
95. Crouau-Roy B, Amadou C, Bouissou C, Clayton J, Vernet C, Ribouchon M T, Pontarotti P. Localization of the OTF3 Gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping. *Genomics* 1994;21:241-243.
96. *Histocompatibility Testing 1965. Report of a Conference and Workshop Sponsored by the Boerhaave Courses for Postgraduate Medical Education. University of Leiden Aug 15-21, 1965. p.283.*
97. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010;75(4):291-455. doi:10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x.
98. Donadi EA. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina Ribeirão Preto* 2000; 3:7-18.
99. Hanchard NA, Moulds JM, Belmont JW, Chen A. A Genome-Wide Screen for Large-Effect Alloimmunization Susceptibility Loci among Red Blood Cell Transfusion Recipients with Sickle Cell Disease. *Transfus Med hemotherapy* 2014;41(6):453–61.
100. Oliveira EA, Sell AM. Os antígenos HLA e a hemoterapia. *Acta Sci* 2002;24(3):731-36.
101. HLA Nomenclature. Nomenclature for Factors of the HLA System [acesso em 02 jul 2020]. Disponível em: <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>.
102. Messaoudi I, Patino JÁ, Dyall R, Lemaoulte J, Nikolitch-Zugich. Direct link between MHC polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense. *Science* 2002; 298:1787-1800.
103. Midleton D, et al. Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol.* 2000; 61:1048-52.
104. Dausset J. Isso-leuco-anticorps. *Acta haematologica* 1958; 20:156-166.
105. Awata T, Kuzuya T, Matsuda A, Iwamoto Y, Okuyama M, Juji T. High frequency of aspartic acid at position 57 of HLA-DR-chain in Japanese IDDM patients and nondiabetic subjects. *Diabetes* 1990;39:266-269.

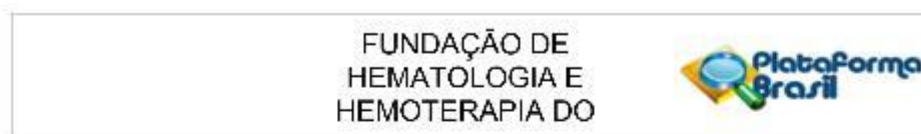
106. Trowsdale, J. & Knight, J. C. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Ann. Rev. Genom. Hum. Genet.* 14, 301–323 (2013).
107. Smith CH, Jabbar-Lopez ZK, Yiu, ZZ, Bale T, Burden AD, Coates LC et al. British Association of Dermatologists guidelines for biologic therapy for psoriasis 2017. *British Journal of Dermatology* 2017;177(3):628–636.
108. Farabosco P, Gorman JD, Cleveland C, Kelly JA, Fisher SA, Ortmann WA, et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2006;7:609–14.
109. Mourad J, Monem F. Associação do alelo HLA-DRB1 com suscetibilidade a artrite reumatoide e gravidade da doença na Síria. *Rev. Brasileira de Reumatologia* 2013 Jan-Fev;53(1):51-56.
110. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:493-525.
111. Hill AVS. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:593-617.
112. López C, Saraiva C, Gomez A, Hoebeke J, Patarroyo MA. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene* 2010; 2:1-12.
113. Kaslow RA, Carrington, Apple R et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996; 2:405-11.
114. Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of HIV disease. *Immunol Rev* 2013; 254: 245-64.
115. Masucci GV, Andersson E, Villabona L et al. Survival of the fittest or best adapted: HLA-dependent tumor development. *J Nucleic Acids Investing* 2010; 1(9): 41-6.
116. Price P, Witt C, Allcock R et al. The genetic basis for the association of the ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev* 1999; 167: 257.
117. Sippert EA. Associação de polimorfismos genéticos com a aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de anemia falciforme. Campinas. Tese [Doutorado em Ciência na área de concentração em Clínica Médica] – Universidade Estadual de Campinas; 2016.

118. Campos, HL. Frequência de antígenos e genes HLA em amostra de população do Ceará. 92f. Tese – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.
119. Dos Santos EC, Teixeira MM, Solva MF, De Assis JP, Júnior ECS, Proietti ABFC. Stroke in patients with sickle cell anemia. *REAS/EJCH* 2019 Set;32:958. <https://doi.org/10.25248/reas.e958.2019>.
120. Reeves SL, Jary HK, Gondhi JP, Kleyn M, Spector-Bagdady K, Dombkowski KJ. Incidence, demographic characteristics, and geographic distribution of sickle cell trait and sickle cell anemia births in Michigan, 1997-2014. *Mol Genet Genomic Med*. 2019 Aug;7(8):e795. doi: 10.1002/mgg3.795. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31210022; PMCID: PMC6687629.
121. Adzika VA, Glozah FN, Ayim-Aboagye D, Ahorlu CS. Socio-demographic characteristics and psychosocial consequences of sickle cell disease: the case of patients in a public hospital in Ghana. *J Health Popul Nutr*. 2017 Jan 31;36(1):4. doi: 10.1186/s41043-017-0081-5. PMID: 28143586; PMCID: PMC5282775.
122. Zanette AMD. et al. Alloimmunization and clinical profile of sickle cell disease patients from Salvador-Brazil. *Ethnicity & Disease* 2010; 20(2): 136-141.
123. Helman R, Cançado, Delfini R, Olivatto C. Incidência de aloimunização na doença falciforme: experiência de um centro de São Paulo. *Einstein (São Paulo)* 2011 Jun; 9 (2): 160-164. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082011ao2003>.
124. Melo WES, Fraga AFC, Torres MCMR, Pires ESF, Esteves FAM. Aloimunização eritrocitária em pacientes com anemia falciforme atendidos no Hemocentro de Caruaru, Pernambuco, Brasil. *Acta Biomedica Brasiliensia* 2018 Apr; 9(1).
125. Tatari-Calderone Z, Tamouza R, Le Bouder GP, et al. The association of CD81 polymorphisms with alloimmunization in sickle cell disease. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:937846.
126. Bao W, Zhong H, Li X, et al. Immune regulation in chronically transfused allo-antibody responder and nonresponder patients with sickle cell disease and b-thalassemia major. *Am J Hematol* 2011;86:1001-6.
127. Hall AM, Cairns LS, Altmann DM, et al. Immune responses and tolerance to the RhD blood group protein in HLAtransgenicmice. *Blood* 2005;105:2175-9.
128. Urbaniak SJ. Alloimmunity to human red blood cell antigens. *Vox Sang* 2002;83:293-7.
129. Cabestre CW. Avaliação da correlação entre Aloimunização à Antígenos Eritrocitários e Sistema de Histocompatibilidade (HLA) em pacientes com Doença Falciforme. Botucatu. Dissertação [Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica] - Universidade Estadual Paulista; 2011.

130. Ponte MF. Associação dos alelos de classe II (DRB1 e DQB1) com as características clínicas e hematológicas na anemia falciforme. Fortaleza. Dissertação [Mestrado em Patologia] – Universidade Federal do Ceará; 2014.
131. Tatari-Calderone Z, Gordish-Dressman H, Fasano R, Riggs M, Fortier C, Campbell AD et al. Protective effect of HLA-DQB1 alleles against alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Hum Immunol* 2016;77(1):35-40. doi:10.1016/j.humimm.2015.10.010.
132. Raos M, Zunec R, Mocibob M, Gojceta K, Lukic M, Cepulic BG. Susceptible and protective HLA-DR and HLA-DQ alleles for Fya alloimmunization in the Croatian population. *Transfusion* 2018;9999:1–7.
133. Rodrigues C. Estudo da associação entre HLA e aloimunização aos antígenos eritrocitários em pacientes politransfundidos com anemia falciforme. Maringá. Dissertação [Mestrado em Biociências e Fisiopatologia] – Universidade Estadual de Maringá; 2013.
134. Reviron D, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, et al. HLA-DRB1 alleles and Jk(a) immunization. *Transfusion*. 2005;45:956–9.
135. Mahdi N, Al-Subaie AM, Al-Ola K, Al-Irhayim AQ, Ali ME, Al-Irhayim Z, Almawi WY. HLA DRB1*130101-DQB1*060101 haplotype is associated with acute chest syndrome in sickle cell anemia patients. *Tissue Antigens*. 2009 Mar;73(3):245-9. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01189.x. PMID: 19254255.
136. Al-Ola K, Mahdi N, Al-Subaie AM, Ali ME, Al-Absi IK, Almawi WY. Evidence for HLA class II susceptible and protective haplotypes for osteomyelitis in pediatric patients with sickle cell anemia. *Tissue Antigens*. 2008 May;71(5):453-7. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01012.x. Epub 2008 Feb 28. PMID: 18312480.

9 ANEXOS E APÊNDICES

9.1 Anexo I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE ALOIMUNIZAÇÃO À ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS E SISTEMA DE HISTOCOMPATIBILIDADE (HLA) EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

Pesquisador: GISELLE MOREIRA SAMPAIO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13261219.1.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.483.526

Apresentação do Projeto:

O estudo propõe coleta de dados e de amostra de sangue periférico de 300 pacientes politransfundido, portadores de doença falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHEMOAM, determinar a frequência dos antígenos HLA-DRB1 nesses pacientes. Participarão da pesquisa os pacientes diagnosticados com doença falciforme e os doadores de sangue voluntários, com idade variando entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos. Espera-se que a realização deste estudo seja capaz de relacionar a presença do alelo HLA-DRB1 em pacientes falcêmicos politransfundidos com aloimunização, sugerindo assim, um marcador de risco para a predisposição às imunizações eritrocitárias.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Determinar a frequência dos antígenos HLA-DRB1 em pacientes politransfundidos portadores de doença falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHEMOAM

Objetivo Secundário: Tipificar por biologia molecular os alelos HLA de classe II (HLA-DRB1) dos pacientes com Doença Falciforme politransfundidos; Determinar a frequência alélica dos pacientes falcêmicos politransfundidos; Comparar a frequência de alelos HLA DRB1 entre o grupo de estudo e o grupo controle (doadores de sangue); Comparar a frequência de alelos HLA DRB1 em pacientes falcêmicos politransfundidos aloimunizados e nãoaloimunizados; Investigar a relação entre o

Endereço: Av. Constantino Nery, 4367, Bl. A, Sala do CEP-ICMOM
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (82)3655-0114 **Fax:** (82)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Qualificação da Pesquisa: 3.453.526

sistema HLA e a sensibilização de antígenos eritrocitários como perfil na identificação de fatores de risco para aloimunização.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em parecer anterior, foi solicitada a correção do item riscos e benefícios para atender a legislação vigente, conforme segue: O proponente da pesquisa descreve os benefícios que poderão ser gerados com o desenvolvimento da pesquisa, no entanto, menciona que não há riscos em decorrência de sua realização. Esclarecemos que, conforme mencionado na Resolução 466/12 do CNS, em seu item V (DOS RISCOS E BENEFÍCIOS), temos: "Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados. Portanto, é necessário que o proponente faça descrição dos riscos no formulário da plataforma Brasil.

RESPOSTA: O pesquisador realizou as adequações, conforme segue:

Os riscos serão mínimos uma vez que as amostras de sangue periférico serão coletadas por profissional devidamente treinado e em caso de acidente, o paciente terá a devida assistência médica na própria instituição.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em parecer anterior foi solicitado as seguintes adequações: No formulário da Plataforma Brasil, o proponente menciona que não haverá coleta de dados secundários em prontuários médicos, no entanto, existe uma contradição na "descrição metodológica" e na "declaração de existência de infraestrutura". Existe a necessidade de correção no formulário da Plataforma Brasil, pois, entende-se que a pesquisadora irá coletar dados secundários.

RESPOSTA: a proponente realizou o solicitado pelo Comitê de Ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão presentes. Em parecer anterior foi solicitada as seguintes adequações: Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados, no entanto, para atender a legislação vigente, existe a necessidade de adequação no TCLE, pois, este documento obrigatoriamente deverá: - mencionar que será elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa. No TCLE apresentado, não existe um local para assinatura do pesquisador responsável. -conter explicitação

Endereço: Av. Constantino Nery, 4367, Bl. A, Sala do CEP/ICMAM
Bairro: Chapada CEP: 69.050-007
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: ceptcmam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Qualificação do Parecer: 3.453.526

de garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa; - explicitação de ressarcimento e como serão cobertas as despesas lidas pelo participante da pesquisa e dela decorrente. Considerando o cálculo do n amostral apresentado, sugerimos que seja revisado, pois, conforme dados do setor responsável, existe risco do n amostral não ser atingido tendo em vista que muitos pacientes cadastrados residem no interior. Faz-se necessária também a correção no tamanho da amostra no formulário da Plataforma Brasil, pois, no item "Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro", foi cadastrado pela pesquisadora, que seriam "300 pacientes falciformes". Sendo assim, existem discordâncias entre o apresentado no projeto e o que foi cadastrado na Plataforma Brasil.

RESPOSTA: a proponente realizou a adequação no cálculo da amostra, excluindo os pacientes residentes no interior do Amazonas; realizou a adequação solicitada no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise ótica do projeto conclui-se que todas as pendências mencionadas foram sanadas pela proponente. Sendo assim, decide-se pela aprovação do protocolo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1286822.pdf	13/06/2019 00:34:51		Aceito
Parecer Anterior	PBPARECERCONSUBSTANCIADOCEP3331316.pdf	13/06/2019 00:24:56	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Outros	INQUERITOEPIDEMIOLOGICO.pdf	13/06/2019 00:22:20	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Outros	termodeanuencia.PDF	13/06/2019 00:13:05	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	13/06/2019 00:12:14	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODEASSENTIMENTO.pdf	13/06/2019 00:11:44	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE.pdf	13/06/2019 00:11:26	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery, 4367, Bl. A, Sala do CEP / ICMCAM
Bairro: Chapada CEP: 69.050-007
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3695-0114 Fax: (92)3695-0112 E-mail: cep@icmcam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Qualificação do Parecer: 3.453.526

Ausência	TCLE.pdf	13/06/2019 00:11:28	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	13/06/2019 00:10:49	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.PDF	13/06/2019 00:10:25	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Outros	TERMORESPONSABILIDADE.pdf	07/05/2019 02:05:56	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Cartaanuenciamaringa.pdf	07/05/2019 02:03:07	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	07/05/2019 02:02:47	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartadeanuenciaGiselle.PDF	07/05/2019 02:02:05	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartadeanuenciaDrWilliam.PDF	07/05/2019 02:01:42	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartadeanuenciaDraViviana.PDF	07/05/2019 02:01:22	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAODEINFRAESTRUTURA. pdf	07/05/2019 02:00:50	GISELLE MOREIRA SAMPAIO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 03 de Agosto de 2019

Assinado por:
Allyson Guimarães da Costa
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Constantino Nery, 4367, Bl. A, Sala do CEP/ICMCM
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@icmcm@gmail.com

9.2 Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

TÍTULO DA PESQUISA: Frequência alélica de HLA de classe II em uma amostra de portadores de anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

Convidamos o (a) Sr (a) para participar desta pesquisa sob a responsabilidade da pesquisadora Giselle Moreira Sampaio. Abaixo seguem os dados para sua informação referentes ao estudo que o Sr (a) está sendo convidado para participar de forma voluntária.

Objetivo: Determinar e comparar a frequência de alelos HLA DRB1 em pacientes falcêmicos aloimunizados e não-alloimunizados; investigar a possível relação entre o sistema HLA e a sensibilização de antígenos eritrocitários como perfil na identificação de fatores de risco para aloimunização. **Justificativa:** O presente estudo visa possibilitar a identificação de genes de resposta imune (HLA DRB1) que possam estar associados na formação de aloanticorpos em pacientes falcêmicos politransfundidos atendidos no ambulatório da FHEMOAM. Além de poder contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na produção desses inibidores por alguns pacientes falcêmicos e por outros não, como também sua suscetibilidade ou proteção relacionados ao HLA DRB1 e melhor conhecimento do perfil imunogenético dos mesmos. Sendo, portanto, um estudo pioneiro na região norte. **Metodologia:** Após aprovação do comitê de ética e a assinatura do TCLE, serão coletados sangue periférico de pacientes portadores de anemia falciforme atendidos no HEMOAM para extração do DNA e tipificação do sistema HLA e após análise dos dados, avaliar se o sistema HLA DRB1 pode ou não estar associado aos processos de aloimunizações. **Garantia de manutenção do sigilo e da privacidade do participante:** Asseguramos ao participante da pesquisa confidencialidade, bem como o direito de recusar-se a responder as perguntas que ocasionem constrangimentos de qualquer natureza. Todas as informações geradas pelo presente estudo serão conduzidas no mais absoluto sigilo e os pacientes terão acessos aos dados gerados pelo estudo sempre que desejarem. **Desconfortos, riscos:** Os riscos serão mínimos uma vez que as amostras de sangue periférico serão coletadas por profissional devidamente treinado e em caso de acidente, o paciente terá a devida assistência médica na própria instituição. **Forma de acompanhamento, assistência e garantia de indenização:** No caso de haver algum incidente em decorrência do processo de coleta das amostras sanguíneas, o pesquisador responsável garante assistência médica e indenização adequada, caso seja necessário. **Benefícios:** O projeto terá como benefício a contribuição para o conhecimento científico que podem servir de base para o desenvolvimento de um protocolo de compatibilidade molecular para a seleção de sangue fenótipo compatível com esses pacientes, diminuindo assim, o risco de aloimunizações. **Garantia de plena liberdade ao participante da pesquisa:** Sua participação é voluntária e se dará por meio da assinatura deste termo onde sua participação será oficializada e confirmada. Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa.

O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá

entrar em contato com a pesquisadora Viviana Oliveira, sempre que desejar no endereço Av. Constantino Nery, 4397 - Chapada, Manaus - AM, 69050-002, Manaus - AM, pelo telefone (92) 3655-0100.

Consentimento Pós-Infomação

Eu, _____, discuti com o pesquisador sobre a minha deciso em participar nesse estudo e acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informaoes sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim. Ficaram claros para mim quais sã 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 participao é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituio ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Nome do participante da Pesquisa

Assinatura do participante

Nome do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

Telefone do participante: _____

Data: ____/____/____



Impressão do dedo polegar.

Caso não saiba assinar

9.3 Anexo III

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: **Frequência alélica de HLA de classe II em uma amostra de portadores de anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.**

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Os pacientes que irão participar dessa pesquisa serão portadores de doença falciforme atendidos no HEMOAM. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

Se você quiser participar, será colhida uma amostra de sangue da veia do braço (no máximo 5ml) com seringa e agulha. O objetivo da pesquisa é determinar e comparar a frequência de alelos HLA DRB1 em pacientes falcêmicos aloimunizados e não-alloimunizados; investigar a possível relação entre o sistema HLA e a sensibilização de antígenos eritrocitários como perfil na identificação de fatores de risco para aloimunização. Durante a coleta de sangue você poderá sentir leve dor ou apresentar (pequenas manchas roxas ou hematomas) no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por profissionais bastante treinado.

O sangue periférico será coletado através da utilização de materiais novos, estéreis e descartáveis, por profissionais habilitado e especializado. Não será necessário coletas extras.

Todavia, há coisas boas que podem acontecer se você participar da pesquisa. Caso permita a coleta e sua participação, um grande benefício é a contribuição para o conhecimento científico que podem servir de base para o desenvolvimento de um protocolo de compatibilidade molecular para a seleção de sangue fenótipo compatível com esses pacientes, diminuindo assim, o risco de aloimunizações.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der.

Os resultados da pesquisa serão publicados e também fornecidos as autoridades de saúde da sua cidade e seu estado, mas sem identificar os participantes que participaram da pesquisa.

Se você tiver alguma dúvida é só nos procurar pelos seguintes telefones:

Dra Viviana Oliveira – Coordenador do projeto Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHEMOAM. Fone: (92) 3655-0100.

Giselle M. Sampaio – Pesquisadora do projeto. Fone: (92) 99511-5561. Email: gisellesampaio@yahoo.com.br

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao pesquisador antes de assinar.

Consentimento Pós-Informação

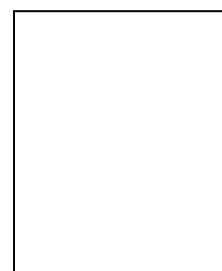
Eu, _____, discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar nesse estudo e acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos 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 de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Local/Data (dia/mês/ano)

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador(a)

Assinatura do Coordenador da pesquisa



Impressão do dedo polegar.

Caso não saiba assinar

9.4 Anexo IV

INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO

TÍTULO DA PESQUISA: FREQUÊNCIA ALÉLICA DE HLA DE CLASSE II EM UMA AMOSTRA DE PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS.

Este inquérito tem por objetivo coletar informações relacionados às características demográficas e histórico transfusional da população de estudo e investigar as possíveis associações à susceptibilidade ao desenvolvimento de aloimunização. Todas as informações aqui coletadas serão mantidas sobre sigilo absoluto sem que haja qualquer situação de constrangimento para o entrevistado conforme determina a resolução 466/2012 do Ministério da Saúde.

	SEXO	IDADE	RAÇA	CLASSIF. DA DF	Nº TRANSFUSÕES	ALOIMUNIZAÇÃO
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						

9.5 Anexo V

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA – BIOPUR

Para cada amostra a ser extraída: 2 unidades de eppendorf, 1 unidade de tubo spin, 2 unidades de tubo de coleta.

1. Adicionar 25µL de proteinase K e 200µL de sangue total.
2. Adicionar 200 µL de tampão de Lise S e homogeneizar vigorosamente em vórtex (20 a 20segundos)

Nota: esta etapa a homogeneização vigorosa é importante para obter um alto rendimento de pureza do DNA.

3. Incubar os microtubos a 56° por 15 minutos.

Nota: o lisado deve se tornar amarronzado durante a incubação. Aumentar o tempo de incubação com a proteinase K (até 30 minutos) e homogeneizar em vórtex uma ou duas vezes vigorosamente durante a incubação se estiver processando amostras antigas ou amostras de sangue como coágulo.

4. Adicionar 210µL de Etanol (96-100%) e homogeneizar em vórtex.
5. Transferir toda a mistura para o Tubo Spin S (coluna). Centrifugar por 1:30 minuto a 14.000 rpm. Se as amostras não passarem completamente pelo tubo-filtro, repetir o passo da centrifugação com uma velocidade maior (até 15.000 rpm). Descartar o tubo de coleta com o filtrado.
6. Colocar o tubo-filtro sob um novo tubo de coleta e adicionar 500µL de Tampão de lavagem SI. Centrifugar por 1:30 minuto a 14.000 rpm. Descartar o tubo de coleta com o filtrado.
7. Colocar o tubo-filtro sob um novo tubo de coleta e adicionar 600µL de Tampão de Lavagem SII. Centrifugar por 1:30 minuto a 14.000 rpm. Descartar somente o filtrado e reutilizar o tubo de coleta. Inverter o tubo de coleta em um papel toalha, retirando o excesso.
8. Colocar o tubo-filtro novamente sob o mesmo tubo de coleta e centrifugar por 4 minutos a 14.000 rpm (o etanol residual é removido durante este passo).
9. Colocar o tubo-filtro em um tubo de eluição S (eppendorf) e adicionar 200µL de Tampão de Eluição S previamente aquecido (56°C). Dispensar o tampão diretamente sobre a membrana de sílica. Incubar por 1 minuto ambiente. Centrifugar a 1:30 minuto a 14.000 rpm.

9.6 Anexo VI

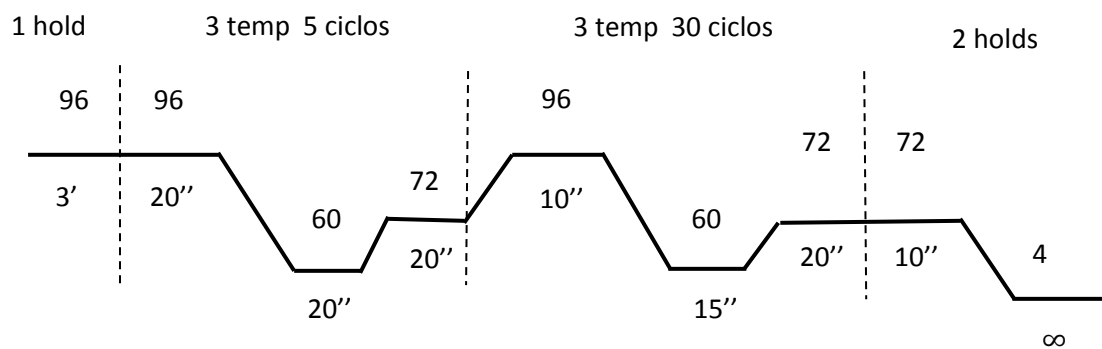
PROTOCOLO RÁPIDO PARA AMPLIFICAÇÃO

1. Verificar se todos os reagentes estão disponíveis e conferir a data de vencimento e a concentração de DNA.
2. Fazer assepsia do local de trabalho com hipoclorito a 0,5%, H₂O e etanol a 70%.
3. Ligar o termociclador, conferir a programação.
4. Organizar na Workstation ou câmara de fluxo laminar.
 - 2 Raques
 - Ponteiras T-400 e T-200
 - Micropipetas
 - Placa de PCR
 - Selador
 - 3 frascos de 1,5mL
 - DNA's – D'mix – Primers (*loci* ABDR)
5. Aguardar o DNA descongelar, em seguida homogeneizar, dar um spin e distribuir 1,5mL.
6. Preparar a quantidade apropriada de D'mix e primer, em seguida, retirar a Taq do freezer e aguardar o descongelamento e assim aplicar a quantidade necessária do teste.

REAGENTES	1 DNA	8 DNA	16 DNA	32 DNA	96 DNA
D-MIX	6,9	55,2	110,4	220,8	662,4
PRIMER	2	16	32	64	192
TAQ POLIMERASE	0,1	0,8	1,6	3,2	9,6
AMP MIX (D-MIX – PRIMER - TAQ)	8,49	-	-	-	-
DNA POR POÇO	1,5	-	-	-	-

Após o término do procedimento, dar um spin na centrífuga e colocar no bloco do termociclador.

Programação do termociclador **GeneAmp9700 – Applied Biosystems.**



Armazenamento dos reagentes (primer, D'mix e Taq) e DNA a -20° C.
 Eletroforeses 10 minutos -150V – 1,5µL DNA por poço.

9.7 Anexo VII

GEL DE AGAROSE

- Agarose 5g
- TBE 1X - 200mL
- Brometo de etídio - 1,5mL

Receita para 5 géis

1. Colocar 5g de agarose em erlenmeyer + 220mL de TBE 1X;
2. Homogeneizar e colocar 2 minutos no micro-ondas;
3. Depois de colocar a solução em um Becker até 40mL pipetar 1,5 μ L de brometo, homogeneizar;
4. Transferir a solução para uma cubeta, posicionar os pentes e guardar por 10 minutos para a polimerização.

DILUIÇÃO DO TBE

- Diluir o TBE em 10X (100mL de TBE em 900mL de água).

CORRIDA ELETROFORÉTICA

PROGRAMA SSO	PROGRAMA SSP
150V	150V
160WA	160WA
30W	30W
Tempo: 11 minutos	Tempo: 5 minutos
1,4 μ L de DNA no poço	10 μ L de DNA no poço

9.8 Anexo VIII

PROTOCOLO RÁPIDO DE HIBRIDIZAÇÃO

1. Pipetar 0,8 μ L de tampão de desnaturação no fundo do poço de uma nova placa;
2. Pipetar 1,7 μ L de DNA na parede da placa;
3. Vórtex: verificar a coloração rosada;
4. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos;
5. Preparar a mistura Beads em tubo eppendorf

Nº DE AMOSTRAS	TAMPÃO DE HIBRIDIZAÇÃO	BEADS
1	11,7	1,34
4	46,9	5,36
6	70,3	8,04
12	140,6	16,1
32	375	43

Homogeneizar as Beads por 1 minuto em vórtex e pipetar o volume correspondente ao seu respectivo tubo.

Agitar a mistura de Beads em vórtex (rapidamente para não formar espuma).

6. Depois de transcorrido os 10 minutos de incubação, pipetar 1,7 μ L de tampão de neutralização em cada poço; verificar a coloração amarelada na parede;
7. Com placa sobre o gelo pipetar 12,6 μ L na parede da respectiva mistura de Beads em cada poço;
8. Vórtex, incubar a placa no termociclador a 60°C por 15 minutos;
9. Transcorrido o tempo de incubação, rapidamente dispensar 30 μ L de wash buffer em cada poço;
10. Centrifugar por 5 minutos;
11. Flicar, passar a placa no vórtex;
12. Adicionar 30 μ L de wash buffer, centrifugar por 5 minutos, flicar e vórtex;
13. Adicionar 30 μ L de wash buffer, centrifugar por 5 minutos, flicar e vórtex;
14. Durante a última centrifugação, preparar o sape em tubo eppendorf;

Agitar a mistura de sape em vórtex (rapidamente para não formar espuma).

15. Pipetar 16 μ L da solução de sape em cada poço;
16. Vórtex, incubar a placa no termociclador a 60°C por 5 minutos;

17. Transcorrido o tempo de incubação, rapidamente dispensar 30 μ L de wash buffer em cada poço;
18. Centrifugar por 5 minutos;
19. Flicar a placa;
20. Adicionar 27,5 μ L de wash buffer + 27,5 μ L sheat fluid em todos os poços (total de 55 μ L);
21. Homogeneizar 8 vezes e transferir para uma placa de Elisa.

Nº DE AMOSTRAS	TAMPÃO DE SAPE	SOLUÇÃO DE SAPE
1	17	0,17
4	68,1	0,7
6	102,2	1,05
12	204,4	2,1
32	545	5,6