



Frequência do alelo HLA-DRB1 em portadores de anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

Frequency of the HLA-DRB1 allele in patients with sickle cell anemia treated at the Foundation Hospital of Hematology e Hemotherapy of Amazonas

Giselle Moreira Sampaio^{1*}, Viviana Maria Araújo de Oliveira², William Sérgio do Sacramento³, Evilásio Cunha Cardoso⁴, Marcos do Nascimento Bentes⁵, Cheila Maria Lins Bentes⁶

1-Graduação em Odontologia, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Hematologia da FHEMOAM/UEA; Orcid ID <https://orcid.org/0000-0001-6494-1940>. E-mail: gisellesampaio@yahoo.com.br.

2-Doutora do Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Bioquímica da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM); OrcidID <https://orcid.org/0000-0002-7502-0984>. E-mail: viviana.araujo@hotmail.com.

3-Biólogo, Mestre em Biociências pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), Responsável técnico do laboratório de HLA da FHEMOAM; Orcid ID <https://orcid.org/0000-0002-7039-5090>. E-mail: sacramentowil@yahoo.com.br.

4-Enfermeiro da FHEMOAM, Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia FHEMOAM/UEA; Orcid ID <https://orcid.org/0000-0002-9608-1428>. E-mail: evilazioam@hotmail.com.

5-Médico da FHEMOAM, Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia FHEMOAM/UEA, Docente do Curso de Medicina da Universidade Nilton Lins (UNL); OrcidID <https://orcid.org/0000-0002-6517-7312>. E-mail: marcosbentesdoc@gmail.com.

6- Enfermeira, Doutora em Enfermagem pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Docente do Curso de Enfermagem da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e da Universidade Nilton Lins (UNL). Orcid ID <https://orcid.org/0000-0002-9694-9581>. E-mail: lbentesdoc@uea.edu.br.

Correspondente/Corresponding:

Nome: Cheila Maria Lins Bentes

Local: UEA/ESA: Av. Carvalho Leal, 1777, Cachoeirinha, Manaus - AM, 69065-001.

Fone: (92) 99135-9932

E-mail: lbentes@uea.edu.br



Resumo

Introdução: A aloimunização é uma das consequências da terapia transfusional tornando difícil a busca por sangue compatível aos portadores de anemia falciforme (AF). Fatores imunológicos como antígeno leucocitário humano (HLA), responsável por codificar proteínas de superfície que reconhecem e apresentam antígenos podem predispor a formação de anticorpos eritrocitários. **Objetivo:** Determinar a frequência dos antígenos HLA-DRB1 em pacientes portadores de anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. **Material e Métodos:** Estudo transversal descritivo realizado com 109 amostras. 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 genotípicas 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. O 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 o alelo HLA-DRB1*04 (19,3%) mais representativo. **Conclusão:** a tipagem HLA dos pacientes corresponde ao encontrado em outras regiões, estando o alelo HLA-DRB1*04 presente em maior percentual naqueles com a formação de aloanticorpos.

Palavras-chave: Anemia Falciforme; Cadeias HLA-DRB1; Antígeno de grupos sanguíneos.

Abstract

Introduction: Alloimmunization is one of the consequences of transfusion therapy making it difficult to find compatible blood for patients with sickle cell anemia (PA). Immunological factors such as human leukocyte antigen (HLA), responsible for encoding surface proteins that recognize and present antigens, may predispose the formation of erythrocyte antibodies. **Objective:** To determine the frequency of HLA-DRB1 antigens in patients with sickle cell anemia treated at the Foundation Hospital of Hematology e Hemotherapy of Amazonas. **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 LAB Type™ 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 chains; Blood Group Antigens.



Introdução

Doença hereditária mais comum no Brasil, a anemia falciforme foi descrita por Herrick, no ano de 1910, originária da África, disseminou-se em nosso país através do comércio de escravos¹.

Marcada pela alteração estrutural da hemoglobina no gene da β -globina, onde ocorre uma mutação genética, substituindo o ácido glutâmico por valina no códon que codifica o sexto aminoácido, desenvolve alteração estrutural tridimensional da hemoglobina com produção de hemoglobina anômala a HbS (*Sickle significa foice*)²⁻⁴. A sobrevivência destas células é extremamente curta, de 16 a 20 dias, ao ser comparadas aos 120 dias do eritrócito normal¹⁻².

A anemia falciforme é uma doença inflamatória crônica marcada pela alteração estrutural dos eritrócitos e 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.

As manifestações clínicas variam de leve a grave, está associada a alta mortalidade⁴. Apresentam dor e falência orgânica, influenciado pelo estado nutricional, idade e comorbidades do indivíduo.³ Atualmente sem tratamento específico, para a cura da doença, utiliza-se o tratamento paliativo farmacológico e não farmacológico^{2,4}.

Adota-se a terapia transfusional como parte do tratamento, pois diminui a vaso-oclusão; aumenta a concentração de hemácias; diminui a hipóxia tecidual por aumentar a oxigenação, previne lesões orgânicas e conseqüentemente, reduzindo o processo de falcização¹⁻⁴. Contudo, ao longo do tempo, podem surgir outros inconvenientes resultantes das múltiplas transfusões, por exemplo, infecções, aloimunização e reações alérgicas, o que torna o uso dessa modalidade terapêutica bastante criteriosa^{1,3}.

As intercorrências advindas das transfusões de hemocomponentes são denominadas reações transfusionais, sendo classificadas em imediatas/agudas e tardias, 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 aloimunização². Uma das medidas de prevenção na formação de anticorpos é o perfil de antígenos eritrocitários do doador e receptor.¹

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 citocinas³. 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 e receptor⁴.

Estudos anteriores evidenciaram a associação do desenvolvimento de aloanticorpos eritrocitários aos antígenos leucocitários humanos⁵. 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 contenham o epítipo alvo para serem reconhecidas pelas células TCD4+. O loci HLA-DR é o mais envolvido na resposta da produção de aloanticorpos⁶.

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 doenças⁷.

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, com o objetivo de conhecer o perfil genotípico do sistema HLA dos pacientes portadores de anemia falciforme atendidos no hemocentro de Manaus.



Material e Métodos

Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo transversal descritivo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM), Parecer nº 3.331.316/2019. Cada participante assinou o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e o termo de Assentimento pelos pais ou responsáveis quando solicitado aos menores de 18 anos.

Amostragem

A dimensão amostral não probalística foi de 109 amostras, coletadas durante o período entre março a setembro de 2020 dos portadores de anemia falciforme inscritos no programa de acompanhamento da doença na Fundação HEMOAM, localizado na capital do estado, em Manaus, sendo responsável por todos os serviços de hematologia e hemoterapia da região.

Critérios de Elegibilidade

Foram incluídos os pacientes portadores de anemia falciforme (HbSS), de ambos os sexos, independentes de idade, raça/cor, doenças pré-existentes, profilaxias medicamentosas e transfusões sanguíneas.

Excluíram-se os pacientes com perfil heterozigótico: HbSC; HbCC; talassemias; diagnóstico inconclusivo, amostras insuficientes de DNA e de etnia indígena.

Coleta de dados

Para coleta de dados sociodemográficos e clínicos utilizaram-se os prontuários físicos e digitais (IDoctor). A quantidade de transfusões realizadas foi contabilizada através do banco de dados do sistema Hemosys. A identificação



dos pacientes aloimunizados foi feita a partir dos livros de registros imunohematológicos do Laboratório de Pesquisa de Anticorpos.

Coleta de Amostra e Extração de DNA

As amostras de sangue foram coletadas em tubos 5mL contendo o anticoagulante ácido etileno de aminotetracéticodissódico (EDTA) e armazenadas a -20°C. Os DNAs foram extraídos a partir das amostras de sangue periférico utilizando-se o kit comercial da Biopur mini *spin plus* (Biometrix), conforme as especificações do fabricante. Após a extração, a concentração e a qualidade de DNA foram determinadas pela leitura óptica em equipamento de espectrofotometria NanoDrop 2000c (*Thermo Fisher Scientific*).

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 sequência específica de oligonucleotídeos em reação de cadeia da polimerase (PCR-SSO do inglês *Polimerase Chain Reaction Sequence-Specific Oligonucleotide*) com tecnologia Luminex.

A reação de amplificação do DNA alvo foi feita utilizando-se 2µL de oligonucleotídeos biotinilados (primer) específico para éxon 2 (HLA-DRB1), solução estoque de 6,9µL de nucleotídeos (D-mix), 0,1µL da enzima termoestável Taq DNA polimerase (Invitrogen Platinum® Taq DNA Polymerase) e 1,5µL de DNA por poço. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose, permanecendo por 10 minutos na corrida eletroforética a 150V para visualização das bandas. A interpretação dos resultados foi baseada na presença ou ausência do fragmento específico de DNA amplificado.

Realizado a hibridização com sondas de DNA complementar aderidos às bases codificadas por fluorescência utilizando o Kit LABType™ SSO Classe II DRB1 (One Lambda) de baixa resolução de acordo com protocolo do fabricante. Os resultados foram lidos em um citômetro de fluxo (Luminex FLEXMAP 3D®),

seguida da análise do software (HLA Fusion™, versão 3.0, One Lambda) auxiliando na determinação da tipagem HLA.

Análise Estatística Descritiva

Os dados foram tabulados e organizados no programa Excel 2016 (Microsoft Office®). 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.

Resultados

Características Demográficas da População Estudada

Dos 109 participantes, 62 (56,9%) eram do sexo feminino e 47(43,1%) do sexo masculino. A faixa etária variou entre 1 a 52 anos, tendo maior representatividade o grupo de participantes entre os 11 a 20 anos (37,6%). Os autodeclarados pardos foram de 88,1% (96); brancos 7,3% (8) e negros 4,6% (5). Quanto a naturalidade, Amazonas (103/ 94,5%); Pará (4/ 3,7%); Roraima (1/ 0,9%) e apenas 1 (0,9%) participante era estrangeiro originário da Venezuela.

Quantitativo de Transfusões

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, sendo identificado o máximo de 35 transfusões e o mínimo de 1. Dentro os 109 pacientes, a maioria realizou entre 2 a 5 transfusões (39,4%).

Quantitativo de Pacientes Aloimunizados

Quanto aos dados imuno-hematológicos, identificou-se apenas 11 pacien-





tes (10%) com aloanticorpos, sendo 8 do sexo feminino e autodeclaradas pardas. Os aloanticorpos identificados correspondem aos sistemas Rh, Kell e Diego. Apenas 2 pacientes não tiveram o aloanticorpo identificado (Tabela 1).

Tabela 1: 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-Di ^a	HLA DRB1*04:04	F	2	10	Parda
3	Anti-Di ^a	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.
Especificidades HLA de classe II dos pacientes

Os resultados da tipagem HLA dos pacientes são descritos na tabela 2. 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%), seguido do HLA-DRB1*03 (10,6%) e DRB1*16 (10,1%). Gerando um total de 218 alelos encontrados na população de estudo.

Frequência Genotípica e Fenotípica dos Alelos HLA-DRB1

O alelo HLA-DRB1*04 foi o que apresentou as maiores frequências fenotípica (39%) e genotípica (19%), seguido do alelo HLA-DRB1*03 correspondendo a 21% da frequência fenotípica e 11% na genotípica (Tabela 3).

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



Tabela 2: Tipagem dos alelos HLA-DRB1 dos 109 pacientes com anemia falciforme.

Alelo HLA-DRB1	nº 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 3: Frequências fenotípicas e genotípicas dos alelos HLA-DRB1.

Alelo HLA-DRB1	nº 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

foi de 6% e a genotípica representou 3%. No grupo de não aloimunizados, a frequência fenotípica foi de 33% e genotípica de 17% para o mesmo alelo (Tabela 4).

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



Tabela 4: Frequência fenotípica e genotípica dos alelos HLA-DRB1 em pacientes aloimunizados e não-aloinmunizados com anemia falciforme.

Alelos HLA - DRB1	Aloimunizados			Não-aloinmunizados		
	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

Para verificar as frequências de variáveis com a formação de aloanticorpos, os pacientes foram divididos em dois grupos: aloimunizados (n= 11) e não-aloinmunizados (n= 98) para uma análise comparativa quanto ao sexo, 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-aloinmunizados (Tabela 5).

Tabela 5: 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 a cor predominou a parda em ambos os grupos, correspondendo a 90,9% (10/11) nos aloimunizados e no grupo não aloimunizado esse percentual foi de 87,8% (86/98). Quanto ao gênero, o feminino apresentou as maiores frequências em ambos grupos sendo 8 aloimunizadas e 54 não.

Dos 218 alelos, 16 foram encontrados em brancos, 10 em negros e 192 em pardos. A 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 cor negra, maiores valores para os alelos HLA-DRB1*03 e *14. 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, o alelo HLA-DRB1*04 foi o mais frequente em ambos os gêneros.

Discussão

Quanto às características demográficas, o presente trabalho constatou maior prevalência do sexo feminino, correspondendo a 56,9%, de acordo com estudo internacional realizado na cidade de Michigan (EUA)⁷ nacionais quanto ao maior contingente ser composto por mulheres.^{2,4,6,8}

A faixa etária do nosso estudo variou entre 01 a 52 anos de idade, similar ao estudo desenvolvido no Hemocentro de Divinópolis, 2017, em que foi relatado a inclusão de pacientes entre 2 a 54 anos.⁴ Em outros trabalhos, a não concordância com a faixa etária é justificada pelo critério de exclusão dos mesmos, ao selecionarem candidatos acima de 18 anos.^{2,6,8} No estudo conduzido por Reeves *et al*⁷ não foi incluído a variável demográfica idade.

Com relação a etnia, houve predomínio por pardos (96/109: 88,1%), seguidos pelos autodeclarados brancos e negros, conforme o estudo de César Purin *et al*⁹ e Santos *et al*.⁸ Contudo o perfil étnico de estudos realizados em outras regiões do Brasil^{2,4,6,8} e exterior⁷ demonstrou predomínio por negros.

No que se refere ao percentual de pacientes aloimunizados, a pesquisa identificou apenas 10% do total de participantes. Segundo Zheng e Maitta¹⁰,



identificaram grandes desigualdades, com prevalências de 2,6% na Jamaica a 76,19% no Reino Unido. As taxas dos outros países variaram profusamente: EUA apresentou taxa de 22,33%; Arábia Saudita 13,71%; em Kuwait 65,45% e França 30,65%. Nesta revisão, três estudos brasileiros foram incluídos com uma média de 14,6% de pacientes aloimunizados, valor próximo do resultado de nosso estudo.

Utilizando quatro bases de dados eletrônicas em sua pesquisa bibliográfica, Cunha *et al.*, 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.³ Dos percentuais descritos nessa extensa revisão literária, apenas os divulgados na Holanda se aproximam do encontrado no presente trabalho.

Em 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%¹¹; São Paulo 22,6%/ Anti-Kell 7,5%¹²; Pernambuco 34%/ Anti-C 25%¹³.

Essa variabilidade nas taxas justifica-se por diversas razões: diferentes métodos de identificação de anticorpos, critérios de inclusão (faixa etária, quantidade de transfusões)^{3,7} e pela extensão da correspondência de antígenos de hemácias entre receptores e doadores. 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, justificando maior compatibilidade entre doadores e receptores no Brasil.¹⁰

Atualmente, 360 antígenos eritrocitários são agrupados em 39 sistemas de grupos sanguíneos, conforme publicações da Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT)¹⁴. Os antígenos clinicamente significantes são detectados nos sistemas sanguíneos: ABO, Rh, Kell, Kidd, Duff e MNS e provocam, na maioria das vezes, reação transfusional hemolítica. O antígeno D apresenta maior potencial para aloimunizações por ser mais imunogênico.¹



Assim, todos os trabalhos, inclusive o nosso, apresentam maiores valores para os sistemas Kell e Rhesus, 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.^{11,13}

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.^{2,3,18}

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 contenham 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-DR⁵.

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*07 (13,82%), DRB1*03 (12,76%), DRB1*13 (9,57%) e DRB1*15 (9,57%);¹⁶ Fortaleza (CE) foram: DRB1*04 (16,9%), DRB1*01 (12,9%), DRB1*08 (12,1%), DRB1*07 (11,3%), e DRB1*11 (11,3%);¹⁷ 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.⁵

Dentre os pacientes com 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 (18,4%), DRB1*03 (11,2%) e DRB1*16 (10,7%). Quando comparado com outros estudos realizados no Brasil, apresentou resultados concordantes para alguns alelos. Em 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.⁵ Valores próximos ao nosso estudo correspondem apenas para os alelos DRB1*04 e DRB1*15.

Ao analisarem amostragem de 204 pacientes de três grandes centros médicos nos EUA e realizando-se tipagem para *locus* -DRB1 e -DQB1, Tatari-Calderone *et al.*, observaram no estudo realizado, 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.¹⁸

Na pesquisa desenvolvida por Raoset *et al.*, utilizando tipagens para os *locus* -DR e -DQ, 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.¹⁵ Embora não tenhamos 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, dois pacientes não tiveram o aloanticorpo identificado.

Os resultados de uma pesquisa realizado em Maringá 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.¹⁹ Sippert *et al.*, observaram o grupo alélico -DRB1*15 em pacientes aloimunizados contra antígenos Rh quando comparado aos não aloimunizados.⁵

Determinados alelos e haplótipos HLA podem também influenciar o risco de surgimento de manifestações clínicas, estudos anteriormente publicados já sugestionavam a possível correlação do haplótipo DRB1*13010-DQB1*060101 com a suscetibilidade a síndrome torácica aguda e o DRB1*100101-DQB1*050101 em pacientes que apresentaram osteomielite.²⁰

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 diversas reações hemolíticas e dificultando a busca por doadores compatíveis.¹ 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.¹⁸

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 contribuirão 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.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se confirmar a não mais exclusividade da doença em afrodescendentes, por ser influenciada pela miscigenação não só no Estado do Amazonas, mas em outros estados brasileiros. Os aloanticorpos encontrados correspondem aos sistemas Rhesus, Kell e Diego por serem imunogênicos. O alelo HLA-DRB1*04 foi o mais representativo nos pacientes e podendo estar associado ao maior risco de formação de aloanticorpos.

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, contudo mais estudos são de suma importância para auxílio no tratamento e prognóstico da doença.

Referências

1. Andrade SP, Lemos AJG, Mota MSA *et al.* Hemoterapia: hemácias fenotipadas para pacientes falcêmicos. *Scire Salutis* 2017;7(2):65-73. doi: <https://doi.org/10.6008/SPC2236-9600.2017.002.0008>.
2. FelixAA, SouzaHM, RibeiroSB. Epidemiologic and social aspects of sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010 Jun;32(3):203-8. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000072>.
3. Cunha EG, Machado LAF, Oliveira LC *et al.* The erythrocyte alloimmunisation in patients with sickle cell anaemia: a systematic review. *Transfus Med* 2019 Jun;29(3):149-61. doi: <https://doi.org/10.1111/tme.12543>.
4. Sant'Ana PGS, Araujo AM, Pimenta CT *et al.* Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2017Mar;39(1):40-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.09.007>.
5. 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 feb;57(2):379-89. doi: <https://doi.org/10.1111/trf.13920>.
6. Amaral JL, Almeida NA, Santos PS *et al.* Socio-demographic, economic and health profile of adults with sickle-cell disease. *Rev Rene* 2015 maio-jun;16(3):296-305. doi: <https://doi.org/10.15253/2175-6783.2015000300002>.
7. Reeves SL, Jary HK, Gondhi JP *et al.* 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: <https://doi.org/10.1002/mgg3.795>.
8. Santos EC, Teixeira MM, Solva MF *et al.* Acidente vascular cerebral em pacientes portadores de anemia falciforme. *REAS/EJCH* 2019 Set;32:e958. doi: <https://doi.org/10.25248/reas.e958.2019>.
9. Cesar P, Dhyani A, Schwade LA *et al.* Epidemiological, clinical, and severity characterization of sickle cell disease in a population from the Brazilian Amazon. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2019 Dec;12(4):204-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2019.04.002>.
10. ZhengY, Maitta RW. Alloimmunisation rates of sickle cell disease patients in the United States differ from those in other geographical regions. *TransfusMed*2016;26(3):225-30. doi: <https://doi.org/10.1111/tme.12314>.
11. Zanette AMD, Gonçalves MS, Schettini LV *et al.* Alloimmunization and clinical profile of sickle cell disease patients from Salvador-Brazil. *Ethn Dis* 2010;20(2):136-41. doi: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9043>.





12. Helman R, Cançado RD, Olivato C. Incidência de aloimunização na doença falciforme: experiência de um centro de São Paulo. *Einstein (São Paulo)* 2011 Jun;9(2):160-164. doi: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082011AO2003>.
13. Melo WES, Fraga AFC, Torres MCMR *et al.* Aloimunização eritrocitária em pacientes com anemia falciforme atendidos no Hemocentro de Caruaru, Pernambuco, Brasil. *Acta Biomed Bras* 2018 Apr;9(1):122-9. doi: <https://doi.org/10.18571/acbm.160>.
14. Storry JR, Clausen FB, Castilho L *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 Sang* 2019 Jan;114(1):95-102. doi: <https://doi.org/10.1111/vox.12717>.
15. Raos M, Zunec R, Mocibob M *et al.* Susceptible and protective HLA-DR and HLA-DQ alleles for Fya alloimmunization in the Croatian population. *Transfusion* 2019 Mar;59(3):1118-1124. doi: <https://doi.org/10.1111/trf.15087>.
16. Cabestre CW. Avaliação da correlação entre Aloimunização à Antígenos Eritrocitários e Sistema de Histocompatibilidade (HLA) em pacientes com doença falciforme [Dissertação]. Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista, Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica; 2011.
17. Ponte MF. Associação dos alelos de classe II (DRB1 e DQB1) com as características clínicas e hematológicas na anemia falciforme [Dissertação]. Fortaleza, CE: Universidade Federal do Ceará, Mestrado em Patologia; 2014.
18. Tatari-Calderone Z, Gordish-Dressman H, Fasano R *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](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.10.010).
19. Rodrigues C. Estudo da associação entre HLA e aloimunização aos antígenos eritrocitários em pacientes politransfundidos com anemia falciforme [Dissertação]. Maringá, PR: Universidade Estadual de Maringá, Mestrado em Biociências e Fisiopatologia; 2013.
20. Mahdi N, Al-Subaie AM, Al-Ola K *et al.* 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](https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01189.x).