



GLÁUCIA ANDRÉIA SOARES GUELSIN

POLIMORFISMOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS E HLA EM
PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E
SUAS IMPLICAÇÕES NA ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITARIA

CAMPINAS
2014



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

GLÁUCIA ANDRÉIA SOARES GUELSIN

POLIMORFISMOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS E HLA EM PACIENTES
PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E SUAS IMPLICAÇÕES NA
ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITARIA

ORIENTAÇÃO: Prof.^a Dr.^a LILIAN MARIA DE CASTILHO
CO-ORIENTAÇÃO: Prof.^a Dr.^a JEANE ELIETE LAGUILA VISENTAINER

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de
título de Doutora em Clínica Médica na área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
GLÁUCIA ANDRÉIA SOARES GUELSIN E ORIENTADA
PELA PROF.^a DR.^a LILIAN MARIA DE CASTILHO.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G934p Guelsin, Gláucia Andréia Soares, 1985-
Polimorfismos de grupos sanguíneos e HLA em pacientes portadores de
síndrome mielodisplásica e suas implicações na aloimunização eritrocitária /
Gláucia Andréia Soares Guelsin. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Lilian Maria de Castilho.

Coorientador: Jeane Eliete Laguila Visentainer.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Antígenos de grupos sanguíneos. 2. Antígenos HLA. 3. Polimorfismo
genético. 4. Síndrome mielodisplásica. 5. Aloimunização. I. Castilho, Lilian Maria
de. II. Visentainer, Jeane Eliete Laguila. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Blood group and HLA polymorphisms in patients with myelodysplastic
syndrome and their implications in erythrocyte alloimmunization

Palavras-chave em inglês:

Blood group antigens

HLA antigens

Polymorphism, Genetic

Myelodysplastic syndrome

Alloimmunization

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Lilian Maria de Castilho [Orientador]

Ana Maria Sell

Wilson Baleotti Júnior

Marcelo Addas Carvalho

Ângela Cristina Malheiros Luzo

Data de defesa: 26-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

GLÁUCIA ANDRÉIA SOARES GUELSIN

ORIENTADORA: PROF. DR. LILIAN MARIA DE CASTILHO

COORIENTADORA: PROF. DR. JEANE ELIETE LAGUILA VISENTAINER

MEMBROS:

1. PROF. DR. LILIAN MARIA DE CASTILHO



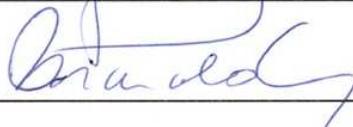
2. PROF. DR. ANA MARIA SELL



3. PROF. DR. WILSON BALEOTTI JÚNIOR



4. PROF. DR. MARCELO ADDAS CARVALHO



5. PROF. DR. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26 de fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pois sem Ele nada seria possível e em especial ao meu esposo, Luiz Fernando, pelo amor, carinho e compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

O trabalho aqui apresentado resultou da colaboração de diversas pessoas e teve o apoio de muitos colegas e amigos a quem devo o meu agradecimento.

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter me dado forças e iluminado meu caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Lilian, pela orientação e por ter conduzido a pesquisa de forma a buscar a sua melhor aplicação na clínica, exemplo que levarei para a minha vida enquanto estudante/pesquisadora. Sem seu sentido crítico e suas valiosas opiniões não teria sido possível dar rumo certo a este trabalho. Agradeço também pelo carinho e generosidade sempre dedicados o que fez que esse período fosse muito agradável.

À Prof.^a Dr.^a Jeane, quem tive o prazer de trabalhar desde os projetos de iniciação científica, durante a graduação em Farmácia, na UEM, pela co-orientação e apoio para realização do trabalho, além da amizade e carinho de sempre.

Aos colegas do Hemocentro-UNICAMP, que compartilharam comigo o seu saber e se disponibilizaram a colaborar na execução dos ensaios e na coleta de amostras para realização deste trabalho. Agradeço a Dr.^a Simone e Dr.^a Fabíola pela colaboração na coleta das amostras dos pacientes e contribuição para o trabalho. Ao Dr. Jordão pelo apoio e disponibilidade para contribuir com valiosas sugestões para a realização do trabalho.

Ao Laboratório de Imunogenética – UEM e aos amigos da “Imuno”, por todo apoio técnico e conhecimento compartilhado, além do carinho e amizade desde que iniciei as minhas atividades de pesquisa. Especialmente, agradeço à mestranda Camila pela colaboração para realização desse trabalho.

A todos os pacientes que colaboraram com este trabalho, que mesmo em um momento de sofrimento, compreenderam a enorme contribuição que poderiam fazer em nome da pesquisa e da ciência.

Ao meu esposo, Luiz Fernando, a quem devo o meu mais especial agradecimento, por tudo que sempre fez por mim com tanto amor e generosidade, que me apoiou desde o começo desta jornada, não deixando que as dificuldades nem o desânimo me fizessem desistir dos meus objetivos e que sonhou junto comigo a conquista dessa importante etapa da minha vida.

À minha mãe, Devanir, que dedicou sua vida para proporcionar a mim e a meu irmão educação, amor e carinho, não medindo esforços na concretização deste ideal e, nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre fez

entender que o futuro, é feito a partir da constante dedicação no presente.

À minha amada família, pelos valores, incentivo, força e encorajamento, que me apoiaram incondicionalmente, que acreditaram em mim e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria.

Às amigas e companheiras de laboratório, Daiane, Kelyan, Ane Caroline, Emília, Daphne, Karina, Débora C. e Débora M., pela amizade sempre presente, capazes de ouvir quando necessário e apoiar sempre que preciso.

Aos amigos do laboratório de Imunologia Plaquetária, Dr. Vagner Castro, Beatriz, Telma, Carolina, Bruna e Tayná que compartilhamos o mesmo espaço físico sempre com muito respeito, carinho e amizade, nos tornando uma grande equipe sempre dispostos a ajudar uns aos outros.

As minhas queridas amigas Amanda e Daniela, que nos conhecemos através da pesquisa e nos tornamos verdadeiras amigas já a longa data, compartilhando no laboratório e na vida experiências e alegrias que me faz crescer e ser melhor. Agradeço por me ouvirem e partilharem comigo os momentos de mais dificuldade e por saber que posso sempre contar com a amizade de vocês.

À FAPESP (Fundação de amparo a pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto, ao INCTs (Instituto de Ciência e Tecnologia do Sangue) pelo apoio financeiro e ao Hemocentro da UNICAMP, pela estrutura adequada para a realização do trabalho.

EPÍGRAFE

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos Eritrocitários do Hemocentro da UNICAMP, com auxílio financeiro da FAPESP Processo nº 2010/06916-9 e do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia do Sangue (INCTs).

RESUMO

A síndrome mieloplásica (SMD) corresponde a um grupo de distúrbios clonais heterogêneos decorrente de um defeito intrínseco das células progenitoras hematopoéticas, resultando em insuficiência da medula óssea, desencadeando anemia com dependência de transfusões sanguíneas e infecções decorrentes da neutropenia. Embora a terapia transfusional seja segura, muitos desses pacientes correm risco de complicações relacionadas à sobrecarga de ferro e à aloimunização contra antígenos de grupos sanguíneos, que muitas vezes dificulta a busca de sangue compatível para esses pacientes, além estar associada a reações hemolíticas transfusionais tardias e formação de auto-anticorpos. A compatibilidade para antígenos Rh e K tem sido utilizada na tentativa de reduzir a formação de anticorpos em pacientes que recebem transfusões crônicas, mas a fenotipagem estendida, incluindo os antígenos Fy^a e JK^a , também tem sido recomendada. Este estudo teve como objetivos avaliar o perfil transfusional dos pacientes com SMD, propor um protocolo de compatibilidade molecular para seleção de sangue fenótipo compatível e avaliar uma possível associação dos alelos HLA com a susceptibilidade ou proteção a aloimunização eritrocitária. Foram analisados 61 pacientes portadores de SMD, sendo 18 pacientes não transfundidos e 43 pacientes submetidos à terapia transfusional com e sem formação de anticorpos. Realizamos genotipagem para os alelos de grupos sanguíneos *RHD*, *RHCE*, *FY*, *DO*, *CO*, *DI*, *SC*, *GYPA*, *GYPB*, *LU*, *KEL*, *JK* e *LW* e para os alelos HLA classe I e classe II nas amostras dos pacientes e comparamos os resultados com grupos- controle. Com relação ao perfil transfusional dos pacientes estudados, a maioria recebe transfusões sanguíneas regulares e 44% encontra-se aloimunizada. Os principais aloanticorpos detectados foram contra antígenos Rh e K. Verificamos que a genotipagem é superior a fenotipagem para determinação dos antígenos de grupos sanguíneos e que a compatibilidade molecular para Rh e K seria suficiente para evitar a aloimunização eritrocitária na maioria dos pacientes. Nossos resultados também mostraram uma associação entre o alelo *HLA-DRB1*13* e a proteção à aloimunização contra antígenos de grupos sanguíneos em pacientes com SMD.

ABSTRACT

The myelodysplastic syndrome (MDS) is a group of heterogeneous clonal disorder caused by an intrinsic stem cell defect with propensity to the bone marrow failure that results in the transfusion dependence and neutropenic infection. Although blood transfusion is generally safe, many of those patients are at risk of transfusion-related complications such as iron overload and RBC alloimmunization that often makes finding compatible RBC products difficult and is also associated with delayed hemolytic transfusion reactions (DHTRs) and autoantibody formation. Matching for Rh and K antigens has been used in an attempt to reduce antibody formation in patients receiving chronic transfusions but an extended phenotyping matching including Fy^a and Jk^a antigens has also been recommended. This study was aimed to identify the transfusion profile of the patients with myelodysplastic syndrome (MDS), an efficient transfusion protocol of genotype matching and a possible association of HLA class alleles with susceptibility or protection to RBC alloimmunization. We evaluated 61 patients with MDS, 18 not transfused and 43 undergoing transfusion therapy with and without antibody formation. We performed genotyping for *RHD*, *RHCE*, *FY*, *DO*, *CO*, *DI*, *SC*, *GYPA*, *GYPB*, *LU*, *KEL*, *JK* e *LW* and for HLA class I and class II alleles in the patient DNA samples and compared the results with a control group. We verified that the majority of patients have regular transfusions and 44% are alloimmunized to RBC antigens. Blood group genotyping was superior to phenotyping to determine the antigen profile in those patients and molecular matching for Rh and K would be enough for most of the patients. Our results also showed a significant association of *HLA-DRB1*13* with protection to RBC alloimmunization in patients with MDS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

	Anemia refratária
AREB	Anemia refratária com excesso de blastos
AREB-T	Anemia refratária com excesso de blastos em transformação
ARSA	Anemia refratária com sideroblastos em anel
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos
DO	Densidade óptica
eMAP	<i>Elongation-mediated multiplex analysis of polymorphisms</i>
FAB	Franco-Americano-Britânico
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HEA BeadChip™	Plataforma “ <i>microarray</i> ”
HLA	Antígeno leucocitário humano
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
IPSS	Sistema Internacional de Escore Prognóstico
ISBT	Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMMC	Leucemia mielomonocítica crônica
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
ng	Nanograma

ns	Não significativo estatisticamente
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-AS	Reação em cadeia da polimerase alelo-específica
PCR-RFLP	Análise dos fragmentos da digestão enzimática dos produtos da reação em cadeia da polimerase
PCR-SSOr	Reação em cadeia da polimerase sequência específica de oligonucleotídeos reversa
R ₁ r	Fenótipo RhDCcee
RhD-	Fenótipo RhD negativo
RhD+	Fenótipo RhD positivo
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
TAD	Teste direto da antiglobulina
µg	Micrograma
µl	Microlitro

LISTA DE TABELAS

	Título	Página
Tabela 1	Sistemas de grupos sanguíneos.	27
Tabela 2	Lista dos <i>primers</i> utilizados nas técnicas de PCR convencional: PCR-AS, PCR-RFLP e PCR-Multilplex.	39
Tabela 3	Lista das enzimas de restrição utilizadas na técnica de PCR-RFLP.	42
Tabela 4	Alelos e SNPs contidos no HEA BeadChip™.	47
Tabela 5	Perfil transfusional dos pacientes com SMD (n=61) e relação entre a aloimunização e a frequência transfusional entre os pacientes politransfundidos.	55
Tabela 6	Aloanticorpos contra antígenos de grupos sanguíneos detectados entre os pacientes com SMD aloimunizados (n=19).	56
Tabela 7	Frequências antigênicas deduzidas a partir do genótipo em 61 pacientes portadores de SMD.	57
Tabela 8	Frequências fenóticas deduzidas a partir do genótipo em 61 pacientes portadores de SMD.	58
Tabela 9	Genótipos <i>RHD</i> fraco em 38 amostras de DNA de pacientes portadores de SMD.	60
Tabela 10	Genótipos <i>RHD</i> parciais observados em 38 amostras de DNA de pacientes portadores de SMD.	60
Tabela 11	Discrepâncias entre o genótipo e a fenotipagem prévia de 17 pacientes com SMD politransfundidos.	61
Tabela 12	Frequências alélica HLA classe I observadas em 61 pacientes com SMD.	62
Tabela 13	Frequências alélicas HLA classe II observadas em 61 pacientes com SMD.	63

Tabela 14	Comparação entre as frequências alélicas do locus <i>HLA-DRB1</i> entre os grupos de pacientes aloimunizados (n=19) e não-alloimunizados (n=24).	64
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

	Título	Página
Figura 1	Inserção dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária.	26
Figura 2	Sistemas de grupos sanguíneos atribuídos aos seus cromossomos.	28
Figura 3	Genes do Sistema HLA.	33
Figura 4	Moléculas HLA Classe I e II.	33
Figura 5	HEA BeadChip™	48
Figura 6	Plataforma Luminex.	51
Figura 7	Distribuição e frequência das especificidades de aloanticorpos eritrocitários (n=28) detectados nos pacientes portadores de SMD aloimunizados.	56

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Síndrome Mielodisplásica	21
1.1.1 Definição	21
1.1.2 Classificação da SMD	22
1.1.3 Incidência da SMD	23
1.1.4 Tratamento da SMD	24
1.1.4.1 Terapia transfusional	25
1.2 Aloimunização eritrocitária	25
1.2.1 Uso da genotipagem de grupos sanguíneos no suporte transfusional	29
1.2.2 Aloimunização eritrocitária e o sistema HLA	32
2 OBJETIVOS	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Materiais	38
3.1.1 Água livre de nuclease	38
3.1.2 Etanol absoluto ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)	38
3.1.3 <i>Primers</i> (iniciadores)	38
3.1.4 Enzimas de restrição	41
3.1.5 Taq DNA Polimerase	41
3.1.6 dNTP 10Mm	42
3.1.7 Marcador de peso molecular	42
3.1.8 Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) 10X	42
3.1.9 Gel de agarose a 2%	43
3.1.10 HEA BeadChip TM	43

3.1.11	LABType® SSO Typing Tests	43
3.2	Métodos	44
3.2.1	Casuística	44
3.2.1.1	Pacientes portadores de SMD	44
3.2.1.2	Grupo-controle	45
3.2.1.2.a	Grupo-controle para estudo de associação com alelos HLA	45
3.2.1.2.b	Grupo-controle para estudo de associação com alelos de grupos sanguíneos	45
3.2.2	Extração de DNA	45
3.2.3	Genotipagem eritrocitária	46
3.2.3.1	Genotipagem em larga escala - HEA BeadChip™	46
3.2.3.2	PCR alelo específico (AS-PCR)	49
3.2.3.3	PCR multiplex (Multiplex-PCR)	49
3.2.3.4	PCR-RFLP	49
3.2.4	Genotipagem HLA	50
3.2.5	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	53
4.1	Perfil dos pacientes portadores de SMD	53
4.2	Perfil transfusional e de aloimunização dos pacientes	53
4.3	Perfil genético dos grupos sanguíneos nos pacientes portadores de SMD	57
4.4	Comparação entre os resultados de genótipos e fenótipos	60
4.5	Genotipagem HLA e estudo de associação entre alelos HLA classe I e classe II e a aloimunização em pacientes portadores de SMD	62
5	DISCUSSÃO	65
5.1	Perfil dos pacientes portadores de SMD	65

5.2	Perfil transfusional e de aloimunização dos pacientes com SMD	65
5.3	Perfil genético dos grupos sanguíneos em pacientes portadores de SMD	67
5.4	Comparação entre os resultados de genótipos e fenótipos	70
5.5	Compatibilidade molecular para seleção de sangue fenótipo compatível	71
5.6.	Genotipagem HLA e estudo de associação entre alelos HLA classe I e classe II e a aloimunização em pacientes portadores de SMD	71
6	CONCLUSÕES	74
7	REFERÊNCIAS	75
8	APÊNDICE	83

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome Mielodisplásica

1.1.1. Definição

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) corresponde a um grupo de neoplasias hematopoiéticas caracterizadas por defeitos na proliferação, diferenciação e maturação das células tronco (*stem cells*), que levam à displasia de uma ou mais linhagens celulares da medula óssea, citopenias periféricas (anemia, leucopenia e plaquetopenia) e instabilidade genética. Essas alterações são, necessariamente, persistentes (4 a 8 semanas), inexplicadas e refratárias. A SMD apresenta alto risco de evolução para leucemia mieloide aguda (LMA), o que ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes portadores dessa doença (1,2,3).

A linhagem celular mais acometida é a mielóide, sendo a anemia a principal manifestação. Os sintomas clínicos comumente encontrados são fadiga, palidez, fraqueza e dispnéia. Infecções também podem ocorrer devido à leucopenia. Outros achados comuns como púrpura e complicações hemorrágicas são resultados da plaquetopenia e disfunção plaquetária presentes na maioria dos indivíduos portadores da doença (4).

A anemia no idoso é comum, multifatorial e apresenta impacto negativo na morbidade, mortalidade e qualidade de vida e, portanto deve ser sempre investigada considerando-se a SMD como parte do diagnóstico diferencial. Devido aos sinais e sintomas da SMD serem inespecíficos, o diagnóstico laboratorial é determinante e, além disso, o seu diagnóstico depende da exclusão de causas não clonais e reversíveis (2,4).

Independente do sexo, o risco para desenvolver as SMD aumenta com o avanço da idade (5). Outros fatores relacionados à doença são a exposição à

quimioterapia ou radioterapia (devido ao tratamento de outro câncer), etnia caucasiana, exposição ocupacional ou ambiental a solventes orgânicos (6).

1.1.2. Classificação da SMD

Dados clínicos e laboratoriais são utilizados para classificar a SMD.

Em 1982, o grupo corporativo FAB (Franco-Americano-Britânico) introduziu um sistema para classificação da SMD baseado, principalmente, em critérios morfológicos, como a contagem de blastos medulares e periféricos (7), caracterizando 5 subgrupos de SMD: anemia refratária (AR), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (8).

Por pelo menos duas décadas essa classificação foi considerada “padrão ouro” para conduta e investigações clínicas em pacientes com SMD, devido a sua excelente reprodutibilidade e sua importância na informação do prognóstico (9,10).

Em 1997 um sistema foi introduzido para avaliação do prognóstico de evolução da doença, chamado Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS, do inglês, *International Prognostic Scores System*), que definiu a expectativa de vida e a probabilidade de transformação em LMA, baseando-se em três parâmetros hematológicos: número de citopenias, porcentagem de mieloblastos (medula óssea) e cariótipo. Quatro categorias diferentes de risco foram reconhecidas: baixo, intermediário-1, intermediário-2 e alto, os quais foram associados com o aumento da probabilidade de progressão para LMA e redução da expectativa de vida. Essa classificação prognóstica pode contribuir para a definição de ensaios terapêuticos de pacientes portadores de SMD (11).

Em 2001, após diversos estudos realizados, foi instituída a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), que utilizava dados imunofenotípicos, genéticos, clínicos, citomorfológicos e citoquímicos para categorizar a SMD (9). No ano de 2008, essa classificação foi reformulada, incluindo as novas descobertas de estudos genéticos e moleculares, tornando as tecnologias de ponta fundamentais para a realização do diagnóstico da SMD (4,12,13). No entanto, um marcador biológico capaz de identificar de forma confiável a SMD permanece indefinido (14).

1.1.3. Incidência da SMD

A incidência da SMD aumenta com a idade, acometendo, principalmente, indivíduos entre 65 e 70 anos. Atualmente é considerada a doença onco-hematológica mais comum, superando, em adultos, as leucemias linfóide e mielóide, tanto agudas, quanto crônicas (2).

A incidência mundial da SMD é de 3 a 5 casos a cada 100.000 habitantes/ano e cresce exponencialmente com o avanço da idade, chegando a mais de 20 casos a cada 100.000 habitantes/ano na faixa etária superior a 70 anos (12).

Estudos publicaram que na Europa e EUA a incidência está entre 3 e 12 casos a cada 100.000 habitantes por ano (1). De acordo com Sekeres (6), nos EUA a incidência é de aproximadamente 3,4 casos a cada 100.000 pessoas/ano, com mais de 10.000 novos diagnósticos anuais e uma estimativa de 60.000 pessoas vivendo com a doença. A literatura ainda revela que nesse país a incidência da doença aumenta para 20 a 50 casos a cada 100.000 pessoas a cada ano após os 60 anos de idade (15).

Em crianças e adolescentes a SMD é uma doença pouco comum, correspondendo a menos de 5% de todas as neoplasias hematopoiéticas em pacientes com menos de 14 anos de idade. Na Europa e Canadá estima-se a

ocorrência de 1 a 4 casos por milhão/ano, independente do sexo. Estão comumente associadas a desordens congênitas e a síndromes genéticas que são evidentes em até 50% dos pacientes pediátricos (16).

Variáveis como a exposição a fatores de risco, idade, sensibilidade do diagnóstico e capacidade de captura dos dados, dificultam a correta determinação da incidência da SMD. Até pouco tempo atrás, a SMD teve pouca atenção por parte dos pesquisadores devido à dificuldade da sua quantificação epidemiológica (1). Atualmente, um aumento no número de casos dessa doença vem sendo observado, o que pode ser devido ao advento de novos métodos de diagnóstico laboratorial, como a citometria de fluxo e também às melhorias na assistência médica geriátrica, associados ao aumento da longevidade da população (4).

1.1.4. Tratamento da SMD

O tratamento da SMD é geralmente complicado, principalmente devido à idade avançada dos pacientes ao diagnóstico da doença, pois, muitas vezes, esses pacientes já sofrem de diversas comorbidades e não podem tolerar tratamentos intensivos e também tendem a ser mais vulneráveis aos sintomas da SMD como a anemia severa (17).

A terapia de suporte, uma das primeiras condutas terapêuticas definidas para o tratamento da SMD, continua sendo o principal tratamento utilizado até os dias atuais, incluindo uso de transfusões sanguíneas, fatores de crescimento, antibióticos e agentes quelantes de ferro, com o objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade decorrentes das citopenias (1).

Novos produtos farmacológicos, introduzidos recentemente nos protocolos de tratamento, podem retardar a progressão da doença para LMA e reduzir a necessidade de transfusões sanguíneas. O uso de agentes estimuladores da hematopoese está crescendo e já estão sendo utilizados por mais de 50% dos pacientes (1,6,18).

1.1.4.1. Terapia transfusional

Estudos mostram que 80% a 90% dos pacientes apresentam anemia ao diagnóstico, sendo que 50% a 60% dos pacientes passam por quadro de anemia severa (nível de hemoglobina abaixo de 10g/dL) durante o curso da doença e mais de 40% dos portadores de SMD requerem transfusões sanguíneas regulares (1,17).

Apesar da terapia transfusional ser geralmente segura, complicações relacionadas ao uso frequente de transfusões sanguíneas podem surgir, como sobrecarga de ferro, aloimunização contra antígenos eritrocitários, reação transfusional tardia e formação de autoanticorpos (19,20,21). Além disso, o alto custo do tratamento da SMD está diretamente relacionado à terapia transfusional (1).

1.2. Aloimunização eritrocitária

A aloimunização eritrocitária representa uma das principais complicações transfusionais (22). Ela pode ocorrer quando o indivíduo é exposto a antígenos de grupos sanguíneos “não-próprios” (aloantígenos), ou seja, antígenos ausentes nas suas hemácias, desencadeando um processo de sensibilização imunológica. Isso pode ocorrer devido à transfusão sanguínea fenótipo-incompatível, transplante ou gestação. De acordo com Poole e Daniels (21), a aloimunização causa uma série de transtornos, dentre os quais destacam-se o aumento do risco de reação transfusional hemolítica tardia, se o paciente for exposto ao mesmo aloantígeno durante transfusão subsequente, e a redução do número de bolsas de sangue compatíveis para futuras transfusões.

Atualmente, foram descritos mais de 340 antígenos de grupos sanguíneos de acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea

(ISBT), sendo que 293 encontram-se distribuídos em 34 sistemas (www.isbtweb.org) (**Tabela 1**). Estes números não são estáticos e novos antígenos de grupos sanguíneos são identificados a cada ano (23). Uma representação esquemática da distribuição dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária é mostrada na **Figura 1**.

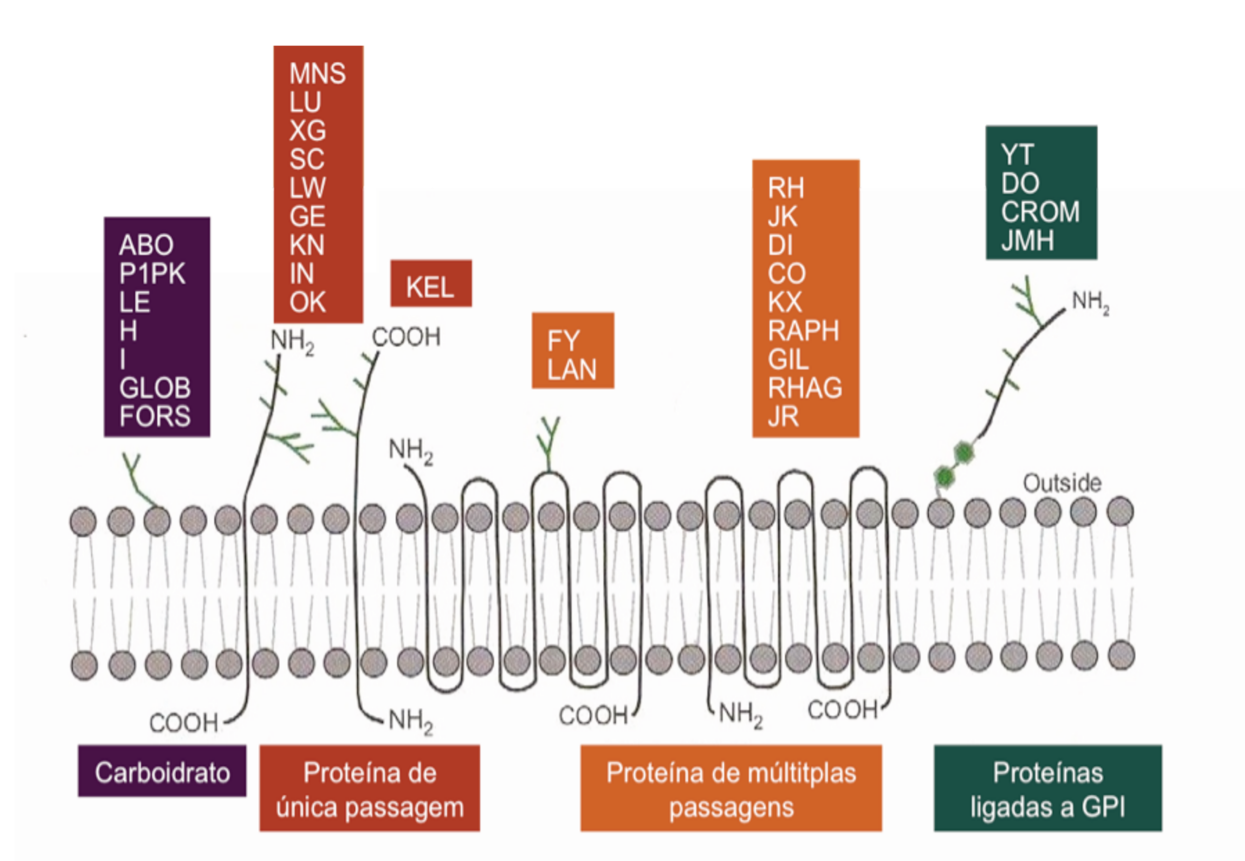


Figura 1. Inserção dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária.

Modelo da membrana eritrocitária e os componentes que carregam os antígenos de grupos sanguíneos. Não está representado o sistema Ch/Rg. Os antígenos Ch/Rg são carregados no C4d, que é adsorvido do plasma sobre os componentes da membrana da hemácia.

Fonte: Figura adaptada de Reid et al. (24).

Tabela 1. Sistemas de grupos sanguíneos.

Nº	Nome	Símbolo do sistema ^a	Nº de antígenos	Nome(s) do(s) gene(s) ^b	Localização cromossômica
001	ABO	ABO	4	<i>ABO</i>	9q34.2
002	MNS	MNS	46	<i>GYPA, GYPB, GYPE</i>	4q31.21
003	P1PK	P1PK	3	<i>P1</i>	22q11.2-qter
004	Rh	RH	54	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11
005	Lutheran	LU	20	<i>BCAM (LU)</i>	19q13.32
006	Kell	KEL	35	<i>KEL</i>	7q34
007	Lewis	LE	6	<i>FUT3</i>	19p13.3
008	Duffy	FY	5	<i>DARC</i>	1q23.2
009	Kidd	JK	3	<i>SLC14A1</i>	18q12.3
010	Diego	DI	22	<i>SLC4A1</i>	17q21.31
011	Yt	YT	2	<i>ACHE</i>	7q22.1
012	Xg	XG	2	<i>XG (PBDX)</i>	Xp22.33
013	Scianna	SC	7	<i>ERMAP</i>	1p34.2
014	Dombrock	DO	8	<i>ART4</i>	12p12.3
015	Colton	CO	4	<i>AQP1</i>	7p14.3
016	Landsteiner-Wiener	LW	3	<i>ICAM4</i>	19p13.2
017	Chido/ Rodgers	CH/RG	7	<i>C4A, C4B</i>	6p21.3
018	H	H	1	<i>FUT1</i>	19q13.33
019	Kx	XK	1	<i>XK</i>	Xp21.1
020	Gerbich	GE	11	<i>GYPC</i>	2q14.3
021	Cromer	CROM	18	<i>CD55</i>	1q32.2
022	Knops	KN	9	<i>CR1</i>	1q32.2
023	Indian	IN	4	<i>CD44 (IN)</i>	11p13
024	Ok	OK	3	<i>BSG</i>	19p13.3
025	Raph	RAPH	1	<i>CD151</i>	11p15.5
026	John Milton Hagen	JMH	6	<i>SEMA7A</i>	15q24.1
027	I	I	1	<i>GCNT2</i>	6p24.2
028	Globosideo	GLOB	1	<i>B3GALT3</i>	3q26.1
029	Gill	GIL	1	<i>AQP3</i>	9p13.3
030	Rh-glicoproteína associada	RHAG	4	<i>RHAG</i>	6p21-qter
031	FORS	FORS	1	<i>GBGT1</i>	9q34.13
032	JR	JR	1	<i>ABCG2</i>	4q22
033	LAN	LAN	1	<i>ABCB6</i>	2q36
034	VEL	VEL	1	<i>SMIM1</i>	1p36.32

^aSegundo Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT)

^bReconhecido por HUGO (*Human Genome Organization*). <http://www.hugo-international.org/>

Os polimorfismos de grupos sanguíneos originam-se predominantemente de mutações de ponto, principalmente os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) mas, recombinações gênicas, deleções e inserções também ocorreram ao longo da evolução dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos (24). A localização dos genes que codificam os grupos sanguíneos está representada na **Figura 2**.

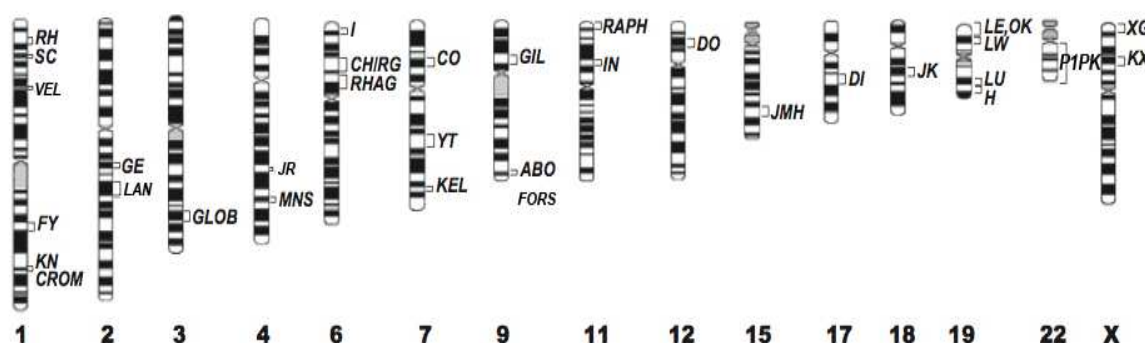


Figura 2. Sistemas de grupos sanguíneos atribuídos aos seus cromossomos. A localização dos genes que codificam os grupos sanguíneos em 15 cromossomos são representados.
Fonte: Modificado de Daniels e Reid (25).

O conhecimento dos antígenos eritrocitários é essencial na prática transfusional, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos contra antígenos de grupos sanguíneos pode se tornar um grande problema na clínica, principalmente em casos onde os pacientes requerem transfusões sanguíneas periódicas e estão mais expostos ao risco de aloimunização eritrocitária (20,23,27).

Os anticorpos mais implicados nas reações transfusionais hemolíticas tardias são os dirigidos contra antígenos dos sistemas Rh (34%), Kidd (30%), Duffy (14%) e Kell (13%) (28,29,30,31). Considerando as frequências gênicas e a incidência dos aloanticorpos eritrocitários em várias populações, Giblett (32) estimou que a probabilidade de um indivíduo produzir um ou mais anticorpos anti-

eritrocitários é de aproximadamente 1% por unidade de concentrado de hemácia transfundida.

O significado clínico dos anticorpos anti-eritrocitários depende da prevalência do antígeno (que pode variar em diferentes origens étnicas), da sua imunogenicidade e de situações clínicas específicas.

Em pacientes portadores de anemia falciforme a taxa de aloimunização eritrocitária pode variar entre 10% a 40%, dependendo de fatores como a idade do paciente, a quantidade de transfusões recebidas, o uso de sangue fenotipado e diferenças raciais entre pacientes e doadores (28,30,33), contudo, existem poucos estudos avaliando os fatores de risco e a frequência de aloimunização em pacientes portadores de SMD (34,35).

Pacientes que se tornam aloimunizados a um antígeno eritrocitário, apresentam maiores chances de desenvolver anticorpos contra outros antígenos de grupos sanguíneos (36) e também de desenvolver autoanticorpos (37).

Os autoanticorpos são heterogêneos e de significado clínico variável. A presença de autoanticorpos pode dificultar a identificação dos aloanticorpos e frequentemente requerem técnicas especiais de adsorção para sua identificação. Embora o resultado do teste direto da antiglobulina (TDA) positivo nem sempre ser clinicamente significativo, autoanticorpos devem ser identificados e acompanhados clinicamente (22,38).

1.2.1. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos no suporte transfusional

Grande parte dos centros de coleta e doação de sangue executam o processo de qualificação de doadores através da pesquisa de um limitado número de antígenos, apenas ABO e RhD (39). Antígenos dos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS e outros apenas são avaliados caso o paciente apresente

aloanticorpos contra estes antígenos. Esta restrição na pesquisa de antígenos se deve principalmente ao alto custo dos reagentes comerciais utilizados na rotina sorológica de Imuno-hematologia, a ausência de bons monoclonais para antígenos raros e à intensidade do trabalho laboratorial (26). No entanto, esta prática introduz um relevante atraso em diversos procedimentos transfusionais, o que pode gerar significativos custos adicionais e ainda causar potenciais situações de emergência clínica.

A utilização de concentrado de hemácias com fenótipo estendido para pacientes que requerem transfusões frequentes pode apresentar benefícios clínicos e redução de custos para o serviço transfusional (40). A compatibilidade para antígenos Rh e K tem sido usada como uma tentativa de reduzir a formação de anticorpos em pacientes que recebem transfusões crônicas, mas a compatibilidade estendida incluindo os antígenos Fy^a, Jk^a e S tem sido amplamente defendida por alguns autores (41,42). A utilização de sangue com fenótipo estendido para um maior número de antígenos eritrocitários clinicamente significativos não apenas poderia diminuir a incidência de reações transfusionais, mas também reduzir a maioria dos procedimentos laboratoriais que são caros e demorados e que podem corresponder até 50% dos custos com testes pré-transfusionais (40).

O método clássico para identificação de antígenos de grupos sanguíneos é a hemaglutinação. Esta técnica é simples, barata e, quando realizada corretamente, apresenta especificidade e sensibilidade adequadas. Entretanto, os testes sorológicos são subjetivos e apresentam algumas limitações. É difícil fenotipar corretamente pacientes que receberam transfusões sanguíneas recentes, devido a presença de hemácias do doador na corrente sanguínea do receptor e pacientes cujas hemácias estão revestidas por anticorpos da classe IgG (TDA positivo). É uma técnica que requer disponibilidade de anti-soros específicos e confiáveis o que dificulta a identificação de antígenos com baixa expressão, antígenos de baixa frequência e de alta frequência populacional. Além disso, por ser uma técnica trabalhosa, um número pequeno de doadores podem ser

fenotipados para um número relativamente pequeno de antígenos ao mesmo tempo, limitando, portanto, o número de estoques de unidades de concentrado de hemácias antígeno-negativo (39,43).

A utilização das ferramentas de biologia molecular tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da Imuno-hematologia, contribuindo para o aumento da segurança e eficácia transfusional de pacientes politransfundidos, como os talassêmicos e portadores de anemia falciforme, pois os procedimentos de genotipagem de grupos sanguíneos suprem as deficiências das técnicas de hemaglutinação (39, 44,45). A progressiva redução dos custos relacionados às técnicas de biologia molecular e a maior acessibilidade à essa tecnologia tem contribuído para inserção dessas técnicas na rotina Imuno-hematológica.

Métodos moleculares, como as plataformas de genotipagem em larga escala, são uma excelente ferramenta, pois permitem a identificação de vários antígenos eritrocitários simultaneamente e também a realização de várias amostras em uma única reação permitindo uma seleção precisa de unidades de concentrado de hemácias de doadores para facilitar a compatibilidade entre o doador e o receptor (46,47,48,49,50).

Esta tecnologia tem apresentado excelentes resultados na seleção de concentrado de hemácias antígeno-negativo para pacientes com anemia falciforme, reduzindo os risco de reações transfusionais, especialmente as reações transfusionais tardias nos casos de aloanticorpos existentes e também para prevenção da aloimunização contra novos antígenos de grupos sanguíneos (49,50). No entanto, ainda são poucos os estudos realizados em pacientes com SMD.

1.2.2. Aloimunização eritrocitária e o sistema HLA

Diversos fatores podem influenciar o sistema imune do receptor a reagir a um aloantígeno, incluindo a imunogenicidade do antígeno e também fatores genéticos ou adquiridos que influenciam a capacidade de resposta imune do receptor (22, 51).

Embora a aloimunização contra antígenos de grupos sanguíneos possa ocorrer em pacientes que recebem componentes sanguíneos incompatíveis, ela não ocorre em todos os casos de incompatibilidade para estes antígenos. Segundo Higgins e Sloan (52), alguns grupos de pacientes são mais respondedores às transfusões alogênicas que outros. As possíveis diferenças entre os indivíduos que se tornam aloimunizados mais facilmente (respondedores) e aqueles menos suscetíveis à aloimunização (não-respondedores) não são conhecidas (51). Uma possível explicação para a resposta seletiva a estes antígenos é a predisposição genética à aloimunização (52).

Estudos prévios identificaram uma possível relação entre alelos HLA e a resposta imune a uma variedade de antígenos, incluindo os antígenos de grupos sanguíneos RhD (53), Jk^a (54,55), Kell (56,57) e Fy^a (57).

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) representa o conjunto de genes responsável por codificar as moléculas de histocompatibilidade em uma determinada espécie e, em humanos é chamado Sistema HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*) e está localizado no braço curto do cromossomo 6. Didaticamente, esses genes podem ser reunidos em 3 grupos, denominados genes de classe I, II e III. Os genes de classe I codificam as moléculas clássicas HLA-A, B e C, os de classe II as moléculas clássicas HLA-DR, DQ e DP. Os genes de classe III não codificam moléculas de histocompatibilidade (58). **Figura 3.**

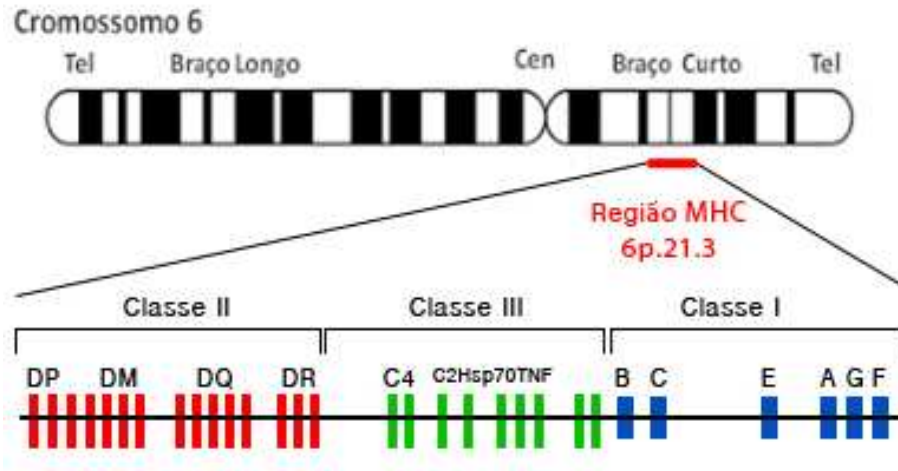


Figura 3. Genes do Sistema HLA. Esquema com a localização dos genes HLA no cromossomo 6, as três regiões e a disposição dos genes de classe I, II e III. Fonte: Adaptado de Abbas et al. (59).

As moléculas de classe I e de classe II são estruturalmente semelhantes e funcionalmente especializadas na apresentação de fragmentos antigênicos a diferentes subpopulações de linfócitos T, iniciando a resposta imunológica e desempenhando importante papel no reconhecimento do “próprio” e “não-próprio”. **Figura 4.**

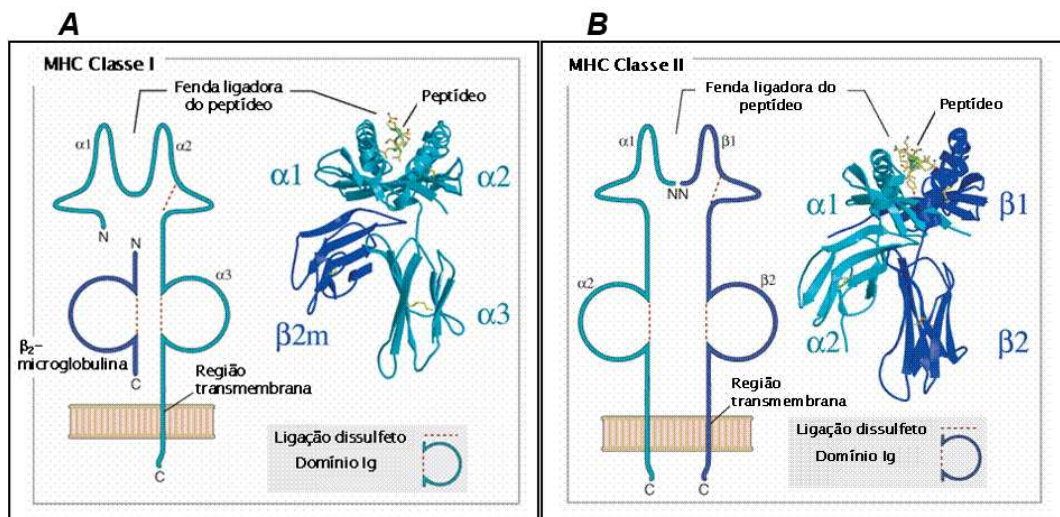


Figura 4. Moléculas HLA Classe I e II. Estrutura de uma molécula HLA classe I (A) e classe II (B). Fonte: Adaptado de Abbas et al. (59).

Tendo em vista as múltiplas diferenças entre os antígenos presentes nas hemácias do doador e do receptor em cada unidade de concentrado de hemácia transfundida, pode-se considerar que a aloimunização eritrocitária é pouco frequente. Estudo realizado por Heddle et al. (61), mostrou que 2,6% dos pacientes que receberam transfusões de concentrado de hemácias desenvolveram aloanticorpos eritrocitários clinicamente significativos que não haviam sido detectados em testes pré-transfusionais. Esse número não inclui a aloimunização contra o antígeno RhD que, de acordo com a literatura, é capaz de causar sozinho aloimunização em aproximadamente 80% dos pacientes RhD negativo transfundidos com unidade de concentrado de hemácias RhD positiva (62).

O alto grau de imunogenicidade do antígeno RhD está diretamente relacionado à sua estrutura protéica. A proteína RhD é composta por 416 aminoácidos e é expressa exclusivamente nos eritrócitos. O antígeno RhD é considerado um mosaico composto de 37 epítomos, onde pelo menos 9 já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais (epD1-epD9) (63). O fenótipo RhD negativo corresponde à completa ausência da proteína RhD na superfície da hemácia, o que contrasta com a maioria dos outros antígenos eritrocitários que são codificados por alelos e diferem por apenas um ou alguns aminoácidos (64, 65) como por exemplo os antígenos antitéticos Jk^a e Jk^b que diferem entre si apenas pelo aminoácido na posição 280, ácido aspártico e asparagina, respectivamente (66).

Cada variante HLA pode apresentar diferentes peptídeos de uma mesma proteína, assim um indivíduo é capaz de apresentar distintas combinações de peptídeos com base no seu perfil de antígenos HLA. Uma hipótese que pode esclarecer o alto índice de aloimunização contra o antígeno RhD é que o repertório de moléculas HLA de um indivíduo é capaz de fazer a apresentação de pelo menos um epítomo desse antígeno. No entanto, o mesmo pode não acontecer quando o antígeno “não-próprio” difere do “próprio” em apenas alguns

aminoácidos, como acontece para a maioria dos demais antígenos de grupos sanguíneos (60).

Dados mais recentes mostram que apenas, aproximadamente, 20% a 30% dos pacientes RhD negativos transfundidos com uma ou mais unidades de concentrado de hemácias RhD positiva produzem anti-D (67,68). Estudo realizado por Gonzalez-Porras et al. (69) mostrou taxa de aloimunização anti-D de 21,4%. Os autores associaram a idade como possível fator relacionado à aloimunização, mas discutiram que o grau de imunossupressão do paciente poderia estar relacionado à aloimunização eritrocitária, uma vez que outros trabalhos que envolveram pacientes imunossuprimidos apresentaram taxas inferiores de aloimunização contra o antígeno RhD, como aqueles realizados com pacientes que receberam transplante de medula óssea, portadores de tumores sólidos e HIV, o que poderia explicar a grande variabilidade da frequência de aloimunização em diferentes estudos.

Estudos com pacientes falciformes mostram taxas de aloimunização muito superiores às descritas em estudos com outros grupos de pacientes (20). O que leva esses pacientes a apresentarem altos índices de aloimunização tem sido bastante discutido e uma das hipóteses é que o processo inflamatório gerado pela doença falciforme poderia estar relacionado com o aumento da predisposição ao desenvolvimento da aloimunização (70,71,72). Estudos utilizando modelos murinos para avaliar se a inflamação poderia estar associada ao aumento da aloimunização eritrocitária foram realizados, entretanto, não apresentaram resultados conclusivos até o momento (73,74,75).

Os mecanismos e os fatores relacionados à resposta imunológica que levam à aloimunização eritrocitária permanecem desconhecidos, contudo, sabe-se que o sistema HLA tem importante papel na modulação da resposta imune, portanto o estudo dos alelos HLA pode contribuir para explicar porque certos grupos de pacientes politransfundidos são mais respondedores às transfusões alogênicas incompatíveis que outros.

O conhecimento de marcadores genéticos da predisposição à produção de anticorpos eritrocitários irregulares pode resultar em implicações clínicas, como o seguimento de gestações incompatíveis com risco de aloimunização eritrocitária, a definição de parâmetros de susceptibilidade implicados na aloimunização eritrocitária pós-transfusional incompatível e a prevenção de complicações pós-transplante de órgãos sólidos e de células progenitoras hematopoéticas decorrentes da aloimunização eritrocitária. Isso poderia auxiliar na escolha de estratégias de transfusão, como reservar unidades de concentrado de hemácias com fenótipos compatíveis à pacientes com alto risco, especialmente nas situações que necessitam de unidades de concentrado de hemácias de grupos sanguíneos raros (51-57).

2. OBJETIVOS

- Avaliar o perfil transfusional dos pacientes portadores de SMD e a ocorrência de aloimunização eritrocitária nesses pacientes.
- Identificar o perfil dos antígenos de grupos sanguíneos em pacientes com SMD utilizando técnicas de biologia molecular.
- Comparar os resultados dos fenótipos deduzidos dos genótipos com os obtidos por fenotipagem.
- Avaliar se alelos HLA podem estar associados à aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de SMD.
- Propor um protocolo de compatibilidade molecular para seleção de sangue fenótipo compatível para esses pacientes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Água livre de nuclease

A água livre de nuclease utilizada neste trabalho foi adquirida da empresa Applied Biosystems® (Foster City, CA, US). Reagente utilizado na etapa final da extração de DNA, na reconstituição dos primers e nas reações de PCR.

3.1.2. Etanol absoluto ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

Etanol absoluto (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Reagente utilizado no protocolo de extração de DNA.

3.1.3. *Primers* (iniciadores)

Os *primers* utilizados nos protocolos de PCR convencional (PCR-AS, PCR-RFLP e PCR-Multiplex) foram confeccionados pela empresa Invitrogen® (Carlsbad, CA, US) e estão descritos na **Tabela 2**.

O *primers* utilizados nas técnicas de microarray BeadChip™ (“HEA”) (BioArray Solutions, Immucor), e PCR-SSOr (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) eram componentes dos respectivos kits comerciais.

Tabela 2. Lista dos *primers* utilizados nas técnicas de PCR convencional: PCR-AS, PCR-RFLP e PCR-Multilplex.

Técnica	Alelo	Nome do <i>primer</i>	Sequência
PCR-AS	Controle interno da PCR-AS (HGH)	HGH-5580	5' TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3'
		HGH-5967	5' CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC 3'
	<i>RHD fraco tipo 2</i>	RHDF2 sense	5' CTCCAAATCTTTTAACATTAAATTATGCATTTA AACAGC 3'
		RHDF2 antisense	5' GTGAAAAATCTTACCTTCCAGAAACTTGGTCA TC 3'
	<i>RHD fraco tipo 3</i>	RHDF3 sense	5' ACAGAGACGGACACAGGATGAGATG 3'
		RHDF3 antisense	5' CTTGATAGGATGCCACGAGCCC 3'
	<i>RHD fraco tipo 4</i>	RHDF4 sense	5' AGACTACCACATGAACATGATGCACA 3'
		RHDF4 antisense	5' CAGACAAACTGGGTATCGTTGCTC 3'
	<i>Caixa Rhesus</i>	Rh-Hyb2-U	5' CAAAACCATTTTTTCCTGAGAC 3'
		Rh-Hyb2-L	5' AATTAATGGCTTTCATTATCGG 3'
PCR-RFLP	<i>RHCE*E/e</i>	CEI4	5' GGCAACAGAGCAAGAGTCCA 3'
		CEX5	5' CTGATCTTCCTTTGGGGGTG 3'
	<i>KEL*1/KEL*2</i>	KELS	5' AAGCTTGGAGGCTGGCGCAT 3'
		KELR	5' CCTCACCTGGATGACTGGTG 3'
	<i>JK*A/JK*B</i>	JKABF	5' CCCACCCTCAGTTTCCTTCC 3'
		JKABR	5' GCGCCATGAACATTGCTCCC 3'
	<i>FY*A/FY*B</i>	FYAB1	5' TCCCCCTCAACTGAGAACTC 3'

	FYAB2	5' AAGGCTGAGCCATACCAGAC 3'
<i>GATA-1</i>	FYN1	5' CAAGGCCAGTGACCCCCATA 3'
	FYN2	5' CATGGCACCGTTTGGTTCAG 3'
<i>DI*A/DI*B</i>	EX18S	5' TGGCGCATGCACTTATTCAC 3'
	EX18R	5' TTCCTGAAGATGAGCGGCAG 3'
<i>Zigozidade RHD</i>	Rh-Rez-7	5' CCTGTCCCCATGATTGAGTTACC 3'
	Rh-Rnb-31	5' CCTTTTTTTGTTTGTTCCTGGCGGTGC 3'
<i>RHD Fraco tipo 1</i>	V270G-F	5' GAGTGTGATGGGTGCCTAGGATGCTGTGCACCT 3'
	RhD-16R	5' CCTGCTGGCCTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG 3'
PCR-MULTIplex	<i>RHD (intron4 e exon7), RHD*ψ, RHCE*C/c</i>	Exon7/for 5' AGCTCCATCATGGGCTACAA 3'
		Exon7/rev 5' ATTGCCGGCTCCGACGGTATC 3'
		Intron3/for1 5' GGGTTGGGCTGGGTAAGCTCT 3'
		Intron 4/rev 5' GAACCTGCTCTGTGAAGTGCT 3'
		C/for 5' CAGGGCCACCACCATTTGAA 3'
		C/rev 5' GAACATGCCACTTCACTCCAG 3'
		c/for 5' TCGGCCAAGATCTGACCG 3'
		c/rev 5' TGATGACCACCTTCCCAGG 3'
		Intron3/for2 5' AACCTGGGAGGCAAATGTT 3'
		Intron 4 insert/rev 5' AATAAAACCCAGTAAGTTCATGTGG 3'
	<i>RHD Parcial</i>	R364 5' TCGGTGCTGATCTCAGTGGA 3'
		R474M 5' ACTGATGACCATCCTCATGT 3'

R496	5' CACATGAACATGATGCACA 3'
R621	5' CAAACTGGGTATCGTTGCTG 3'
R648	5' GTGGATGTTCTGGCCAAGTT 3'
Rex5AD2	5' CACCTTGCTGATCTTACC 3'
R898M	5' GTGGCTGGGCTGATCTACG 3'
Mex6AD3	5' TGTCTAGTTTCTTACCGGCAAGT 3'
R973	5' AGCTCCATCATGGGCTACAA 3'
R1068	5' ATTGCCGGCTCCGACGGTATC 3'
Rex9SD2	5' AACAGGTTTGCTCCTAAATATT 3'
R1219M	5' AAACCTTGGTCATCAAAATATTTAACCT 3'

3.1.4. Enzimas de restrição

As enzimas de restrição New England Biolab®, Beverly MA e MBI Fermentas®, Amherst, NY, USA foram utilizadas na técnica de PCR-RFLP, para digestão enzimática dos produtos de PCR. **Tabela 3.**

3.1.5. Taq DNA Polimerase

A enzima Taq DNA polymerase (Invitrogen®, Carisbad, CA) foi utilizada nas reações de PCR-AS, PCR-RFPL, PCR-multiplex e PCR-SSOr.

Para técnica de microarray BeadChip™ (“HEA”) (BioArray Solutions, Immucor) foi utilizada a enzima Hot Start Taq DNA polimerase (Chattlesworth, CA, EUA).

Tabela 3. Lista das enzimas de restrição utilizadas na técnica de PCR-RFLP.

Genótipo	Polimorfismo	Enzima de restrição
<i>RHCE*E/e</i>	276G>C	<i>MnII</i>
<i>KEL*1/KEL*2</i>	698T>C	<i>Mva1269I (BsmI)</i>
<i>JK*A/JK*B</i>	838G>A	<i>MnII</i>
<i>FY*A/FY*B</i>	125G>A	<i>BanI</i>
<i>GATA-1</i>	-67T>C	<i>Eco130I (StyI)</i>
<i>DI*A/DI*B</i>	2561C>T	<i>MspI</i>
Zigozidade <i>RHD</i>	5275G/A	<i>PstI</i>
<i>RHD Fraco tipo 1</i>	809T>G	<i>Alw 44I (ApaLI)</i>

3.1.6. dNTP 10Mm

As dNTPs (Invitrogen®, (Carisbad, CA) foram utilizadas nas técnicas de PCR-AS, PCR-RFLP e PCR-multiplex na concentração de 10mM.

3.1.7. Marcador de peso molecular

Marcadores de peso molecular de 50pb e 100pb (Invitrogen®, (Carisbad, CA) foram utilizados durante a eletroforese dos produtos de PCR para análise do tamanho dos fragmentos de DNA.

3.1.8. Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) 10X

Tampão utilizado no preparo do gel de agarose e na corrida de eletroforese. Foi preparado dissolvendo-se 108g de Tris (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, US), 55g de ácido bórico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, US) e 40mL de EDTA 0,5M pH 8.0 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, US) em quantidade de água destilada (dH₂O) suficiente para 1000mL.

3.1.9. Gel de agarose a 2%

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 2g de agarose (Invitrogen®, Carlsbad, CA, US) em 100mL de TEB 1X. Esta solução era aquecida em forno microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, era adicionado 50µL de brometo de etídio (Invitrogen®, Carlsbad, CA, US).

3.1.10. HEA BeadChip™

O HEA BeadChip™ (Human Erythrocyte Antigen), plataforma de “microarray” da empresa BioArray Solutions Ltd., Warren, NJ - USA, Immucor, foi utilizado para a realização da genotipagem eritrocitária

O Kit era composto por lâminas de vidro com chips de DNA impregnados (sondas de oligonucleotídeos específicas) com capacidade para 8 amostras; reagentes de pré-PCR: solução denominada HEA eMAP PCR Mix (contendo sondas de oligonucleotídeos, dNTPs e tampão para a reação de PCR multiplex); e reagentes de pós-PCR: enzima ExoSAP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway), λ exonuclease (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway) e Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia Biotech).

3.1.11. LABType® SSO Typing Tests

O kit LABType® SSO (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), tecnologia Luminex xMap (Luminex Corporation, Austin, USA) foi utilizado para genotipagem de alelos HLA,

Foram utilizado os kits LABType® SSO LT SSO HLA A, LT SSO HLA B, LT SSO HLA C, LT SSO HLA DQA1/DQB1 e LT SSO HLA DRB1 (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) para genotipagem dos alelos HLA dos loci *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* e *-DQA1/-DQB1*, respectivamente.

Para definição dos alelos do grupo *DRB1*13* foi utilizado o kit LABType® High Definition Class II DRB1 - rSSO (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA).

Os kits eram compostos por reagentes de pré-PCR: solução de *primers* (específico para cada *locus* HLA) e solução D-Mix para *primers*; e reagentes de pós-PCR (hibridização): tampão de hibridização, tampão de lavagem, solução de denaturação, tampão de neutralização, tampão de coloração SAPE e mistura de pérolas (microesferas ligadas a oligonucleotídeos específicos para cada alelo).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Casuística

3.2.1.1. Pacientes portadores de SMD

Durante o período de aproximadamente 3 anos (2010 a 2013), após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (parecer CEP nº355/2009), foram coletadas 70 amostras de sangue de pacientes previamente diagnosticados como portadores de SMD ou de leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), de acordo com os critérios estabelecidos pela WHO 2008 (12).

Devido ao diagnóstico da SMD ser um diagnóstico de exclusão, após acompanhamento clínico desses pacientes e reavaliação dos casos, foram excluídos do estudo 9 pacientes que não atenderam aos critérios de SMD e, portanto, o estudo foi realizado com 61 amostras de sangue de pacientes portadores de SMD.

Para realização do estudo, avaliamos dados imuno-hematológicos e transfusionais retrospectivos, a partir do diagnóstico dos pacientes, e também prospectivos, a partir da data do início do trabalho até a conclusão do mesmo.

3.2.1.2. Grupo-controle

3.2.1.2.a. Grupo-controle para estudo de associação com alelos HLA

Foram incluídos neste grupo 427 doadores de sangue e medula óssea que possuíam genotipagem prévia para alelos HLA classe I (*HLA-A*, *-B* e *-C*) e classe II (*HLA-DRB1*). A idade média dos indivíduos incluídos nesse grupo foi de 54 anos.

3.2.1.2.b Grupo-controle para estudo de associação com alelos de grupos sanguíneos

Foi constituído por 151 doadores de sangue que possuíam genotipagem prévia para os alelos de grupos sanguíneos *RHD*, *RHCE*, *FY*, *DO*, *CO*, *DI*, *SC*, *GYPA*, *GYPB*, *LU*, *KEL*, *JK* e *LW*.

3.2.2. Extração de DNA

As amostras de sangue dos pacientes com SMD foram adequadamente classificadas e os respectivos DNAs genômicos foram extraídos a partir de leucócitos do sangue periférico utilizando-se o DNA Blood Mini Kit (QIAamp, Qiagen, Mississauga, Canadá).

Após extração, a qualidade/quantidade do DNA genômico foi avaliada através de leitura óptica da absorbância (DO 260/280nm) e da concentração (em ng/uL) através de um equipamento de espectrofotometria (NanoDrop ND – 1000 Fullspectrum UV/Vis Spectrophotometer, Wilmington, DE 19810 USA). Devido às exigências de qualidade/quantidade do DNA para execução da técnica de *microarray*, as amostras de sangue cuja concentração final do DNA foram inferiores a 20ng/μL ou o valor de DO estavam fora do intervalo 1.7-1.9nm tiveram o DNA extraído novamente.

Os DNAs foram armazenados em freezer -20°C para posterior realização dos testes moleculares.

3.2.3. Genotipagem eritrocitária

3.2.3.1. Genotipagem em larga escala - HEA BeadChip™

Foi realizada a genotipagem eritrocitária nas amostras de DNA dos 61 pacientes portadores de SMD, incluindo os alelos de grupos sanguíneos eritrocitários pertencentes aos sistemas Rh, Kell, Duffy (incluindo *FY-GATA* e *FY265*), Kidd, MNS (incluindo marcadores que permitem a identificação dos fenótipos U-negativo e U-variantes), Lutheran, Dombrock (incluindo *HY* and *JO*), Landsteiner-Wiener, Diego, Colton e Scianna, utilizando a técnica de “micrarray” Human Erythrocyte Antigen BeadChip™ (“HEA”) (BioArray Solutions, Immucor), seguindo as recomendações do fabricante. Na **Tabela 4** estão descritos os alelos e SNPs contidos no HEA BeadChip™. Esta tecnologia foi previamente padronizada para utilização no laboratório (49).

Tabela 4. Alelos e SNPs contidos no HEA BeadChip™.

Sistema de grupo sanguíneo	Alelos	SNPs
Rh	<i>RHCE</i> *C/c	103T>C
	<i>RGCE</i> *E/e	226C>G
Duffy	<i>FY</i> *01/ <i>FY</i> *02	125G>A
	<i>FY</i> *X	265C>T
	<i>GATA</i> -1	-67T>C
Dombrock	<i>DO</i> *01/ <i>DO</i> *02	793A>G
	<i>DO</i> *02.-04	323G>T
	<i>DO</i> *01.-05	350C>T
Kidd	<i>JK</i> *01/ <i>JK</i> *02	838G>A
Kell	<i>KEL</i> *01/ <i>KEL</i> *02	698T>C
	<i>KEL</i> *06/ <i>KEL</i> *07	1790C>T
MNS	<i>GYPA</i> (M/N)	59C>T
	<i>GYPB</i> (S/s)	143T>C
	<i>GYPB</i> (silenciosa)	230G>T
	<i>GYPB</i> (silenciosa)	+5 intron 5 (g>t)
Landstainer-Wiener	<i>LW</i> *A/ <i>LW</i> *B	308 A>G
Lutheran	<i>LU</i> *01/ <i>LU</i> *02	230G>A
Scianna	<i>SC</i> *01/ <i>SC</i> *02	169 G>A
Colton	<i>CO</i> *01/ <i>CO</i> *02	134C>T
Diego	<i>DI</i> *01/ <i>DI</i> *02	2561C>T
Hemoglobina S	<i>HgbS</i>	173A>T

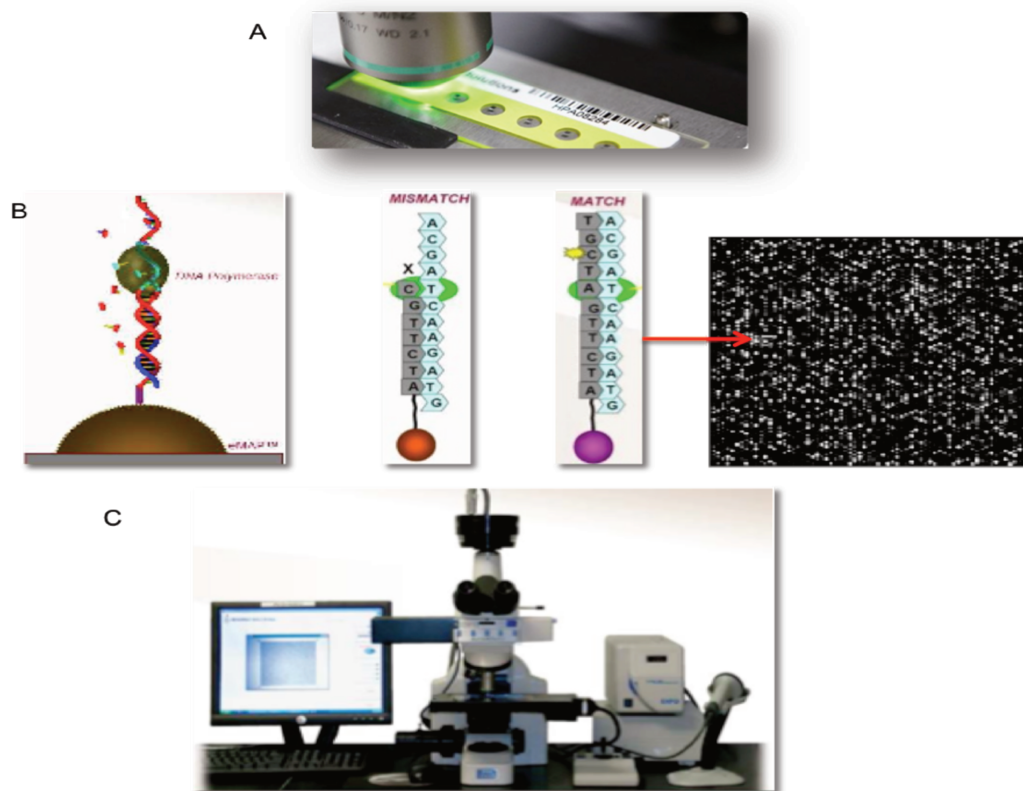


Figura 5. HEA BeadChip™

A. Lâminas contendo os BeadChip™ impregnados com sondas específicas para DNA alvo. **B.** Quando há amplificação de um fragmento de DNA específico (alelo) para as sondas contidas do BeadChip™, há ligação do mesmo à sonda (“match”), com emissão de fluorescência, se não houver compatibilidade (“mismatch”) para hibridização com a sonda não há emissão de fluorescência. **C.** A fluorescência emitida é captada em microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera fotográfica interligada a um software, o wHEA™ (*Web-Based Human Erythrocyte antigen and Hemoglobinopathy analysis – BioArray Solutions, LTDA*), que realiza a identificação e interpretação do alelo hibridizado através da comparação dos valores de fluorescência obtidos com os valores de fluorescência dos polimorfismos depositados no Banco de Dados Basis™ (*BioArray Solutions*).

3.2.3.2. PCR alelo específico (AS-PCR)

A técnica de PCR-AS foi utilizada para caracterização molecular dos antígenos RhD fraco tipos 2, 3 e 4, de acordo com protocolo descrito por Muller et al. (76), e também para pesquisa da presença da Caixa Rhesus Híbrida, utilizada para análise e interpretação da zigosidade do gene *RHD*, de acordo com Wagner e Flegel (77). Os *primers* utilizados estão descritos na **Tabela 02**.

3.2.3.3. PCR multiplex (Multiplex-PCR)

A técnica de PCR multiplex (multiplex-PCR) descrita por Singleton et al. (78), foi utilizada na identificação do gene *RHD* (intron4 e exon7) e do pseudogene *RHD* (*RHD*ψ*). Também foi utilizada para pesquisa de variantes RhD parciais (*RHD-CE-D*) que silenciam ou alteram a expressão do gene *RHD* (79). Os *primers* utilizados estão descritos na **Tabela 02**.

3.2.3.4. PCR-RFLP

As técnicas de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foram utilizadas para identificação dos alelos *RHCE**C/c, *RHCE**E/e, *KEL**1/2, *FY**A/B, *JK**A/B, *DI**A/B (80,81), nas situações em que houve falha de amplificação de algum alelo pela técnica de *microarray* e também para pesquisa e interpretação da zigosidade do gene *RHD* (77) e *RHD* fraco tipo 1 (76). Os *primers* utilizados estão descritos na **Tabela 02** e as enzimas de restrição estão descritas na **Tabela 03**.

3.2.4. Genotipagem HLA

Foram genotipadas 61 amostras de DNA de pacientes portadores de SMD para alelos HLA classe I (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) e HLA classe II (*HLA-DRB1*, *-DQA1* e *-DQB1*) utilizando a técnica de PCR-SSOr (*Reverse Sequence-Specific Oligonucleotide*) (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) utilizando a tecnologia Luminex xMap (Luminex Corporation, Austin, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Para definição dos alelos do grupo *DRB1*13* foi realizada a tipagem de alta definição (High Definition Class II DRB1 T - rSSO; One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Os resultados foram analisados utilizando o *software HLA Fusion™ 2.0*. (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA).

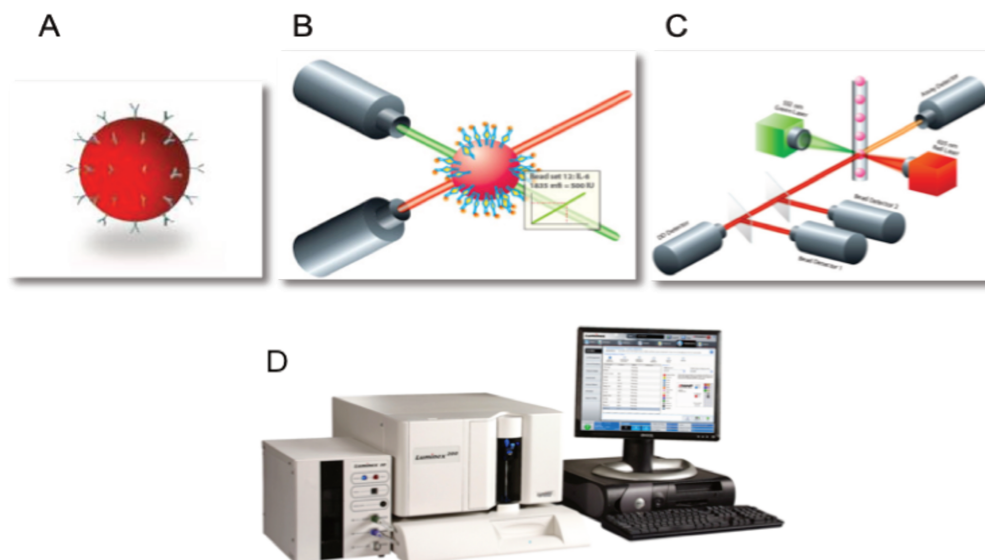


Figura 6. Plataforma Luminex.

A. Bead, microesfera de poliestireno com 5,6 μ de diâmetro com oligonucleotídeos acoplados e marcados com fluoróforo (SAPE – estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina). Quando há amplificação de fragmentos de DNA específicos para os oligonucleotídeos acoplados à bead, eles se ligam a essas sondas, durante um passo de “hibridização”, e há emissão de fluorescência. **B.** A fluorescência é captada por um laser verde em um sistema de citometria de fluxo, LABScan™ (**C**). **D.** Equipamento Luminex® 100/200™.

3.2.5. Análise estatística

As frequências genótípicas e alélicas dos sistemas de grupos sanguíneos e HLA foram obtidas por contagem direta em planilhas do programa Excel (Microsoft Office Excel 2008). Foi realizada a comparação das frequências alélicas dos antígenos HLA classe I e classe II e antígenos de grupos sanguíneos entre o grupo de pacientes e os respectivos grupos-controle. Também foi realizada a comparação das frequências dos alelos HLA classe I e classe II em dois subgrupos de pacientes portadores de SMD, um grupo de pacientes aloimunizados e o outro grupo de pacientes não aloimunizados.

A comparação das frequências foi realizada por meio do Teste do Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando adequado, usando uma tabela de contingência 2x2, utilizando o programa OpenEpi v3.01, disponível no endereço eletrônico: www.openepi.com.

4. RESULTADOS

4.1. Perfil dos pacientes portadores de SMD

Foram estudadas amostras de sangue de 61 pacientes portadores de SMD, sendo 31 pacientes do sexo masculino e 30 do sexo feminino, com idade média de 58 anos (idade mínima: 22 anos, idade máxima: 85 anos).

Com relação à etnia, 79% (n=48/61) dos pacientes eram caucasianos, 20% (n=12/61) afro-descendentes e 1% (n=1/61) oriental.

4.2. Perfil transfusional e de aloimunização dos pacientes

O número de unidades de concentrado de hemácias transfundidas e a frequência transfusional entre os pacientes com SMD foram determinadas para avaliar a importância da terapia transfusional para esse grupo de pacientes.

Com relação ao número de transfusões sanguíneas recebidas, os pacientes com SMD foram classificados como:

- Politransfundidos: aqueles que receberam acima de 5 unidades de sangue.
- Não-politransfundidos: aqueles que receberam até 5 unidades de sangue.

Foi observado que 70% (n=43/61) dos pacientes haviam recebido mais de 5 unidades de sangue e 30% (n=18/61) nunca haviam recebido transfusões sanguíneas ou receberam no máximo 5 unidades de sangue **Tabela 5**. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,0001$; $OR=5,71$; $IC=2,62-12,43$).

Entre os 43 pacientes politransfundidos, 19 foram aloimunizados contra antígenos de grupos sanguíneos, portanto, a taxa de aloimunização eritrocitária no grupo de pacientes com SMD estudado foi de 44%.

A média de unidades de concentrado de hemácias recebida por cada indivíduo foi de 50 unidades de sangue entre os não aloimunizados (mínimo de 5 unidades e máximo de 255 unidades) e de 65 unidades de sangue entre os aloimunizados (mínimo de 6 unidades e máximo de 604 unidades) ($p>0,05$).

Para análise da frequência com que os pacientes portadores de SMD politransfundidos recebiam transfusões sanguíneas em um determinado período de tempo, estabelecemos a seguinte classificação:

- Transfusão sanguínea eventual: menos de 6 unidades de sangue nos últimos 3 meses.

- Transfusão sanguínea regular: 6 ou mais unidades de sangue nos últimos 3 meses.

Sessenta e três por cento ($n=27/43$) dos pacientes recebiam transfusões regulares e 37% ($n=16/43$) recebiam transfusões eventuais. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,03$; $OR=2,848$; $IC=1,188-6,827$). Tabela 5.

Ao comparar o grupo de pacientes aloimunizados e o grupo de pacientes não aloimunizados que recebiam transfusões regulares e eventuais, observamos que ambos recebiam transfusões sanguíneas com a mesma frequência ($p>0,05$). **Tabela 5.**

Tabela 5. Perfil transfusional dos pacientes com SMD (n=61) e relação entre a aloimunização e a frequência transfusional entre os pacientes politransfundidos.

	n	f	p
Não politransfundidos	18 (18/61)	0,30	<0,0001*
Politransfundidos	43 (43/61)	0,70	
Não-Aloimunizados	24 (24/43)	0,56	
Transusão eventual	9 (9/24)	0,37	<i>ns</i>
Transusão regular	15 (15/24)	0,63	
Aloimunizados	19 (19/43)	0,44	
Transusão Eventual	7 (7/19)	0,37	<i>ns</i>
Transusão Regular	12 (12/19)	0,63	

*OR=5,71; IC=2,62-12,43; n = número de indivíduos;
ns = não significativo estatisticamente.

Os pacientes aloimunizados (n=19) apresentaram anticorpos contra antígenos dos sistemas Rh (anti-c, -e, -E, -C, C^w), Kell (anti-K), Kidd (anti-Jk^a), MNS (anti-S), Diego (anti-Di^a) e Lutheran (anti-Lu^a). Trinta e sete por cento (n=7/19) dos pacientes apresentaram mais de um aloanticorpo e em todos esses casos foi observada associação com pelo menos um anticorpo contra antígenos do sistema Rh. **Tabela 6.**

Tabela 6. Aloanticorpos contra antígenos de grupos sanguíneos detectados entre os pacientes com SMD aloimunizados (n=19).

	Aloanticorpos	n	f
Um aloanticorpo	anti-C	2	0.11
	Anti-E	6	0.32
	Anti-C ^w	1	0.05
	Anti-S	1	0.05
	Anti-Di ^a	1	0.05
	Anti-Lu ^a	1	0.05
	Anti-C, -E	1	0.05
Dois aloanticorpos	Anti-C, -e	1	0.05
	Anti-c, -E	1	0.05
	Anti-c, -Jk ^a	1	0.05
	Anti-E, -K	1	0.05
	Anti-C, -K, -Di ^a	1	0.05
Múltiplos aloanticorpos	Anti-E, -Jk ^a , Di ^a	1	0.05

n= número de indivíduos; f = frequência do aloanticorpo

Dez especificidades de aloanticorpos foram encontradas, as quais ocorreram sozinhas ou em combinação, entre o total de 28 aloanticorpos detectados nos pacientes aloimunizados. A distribuição e frequência podem ser observadas na figura 7.

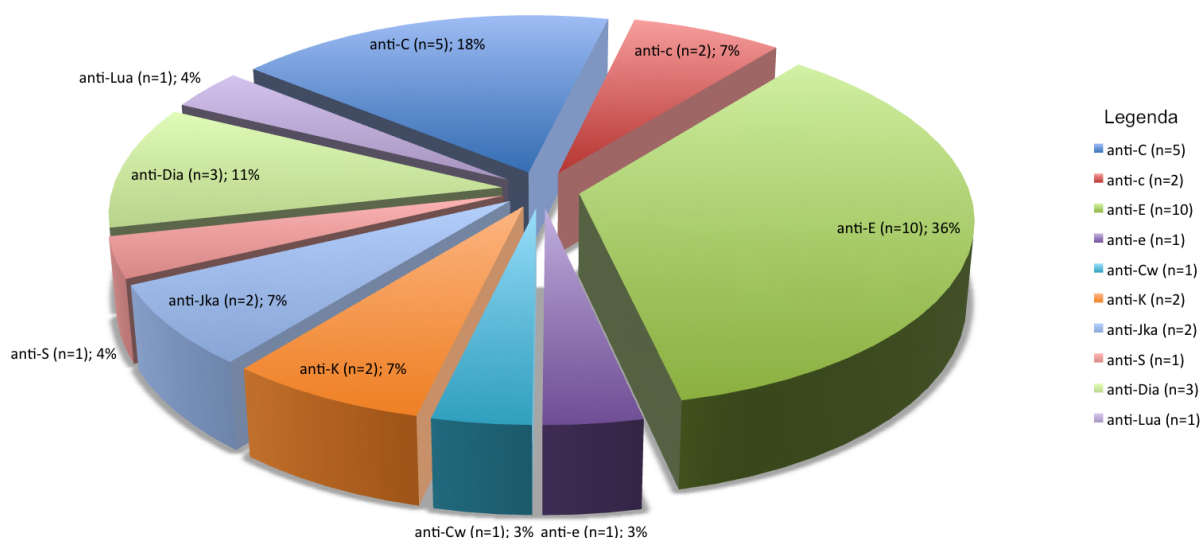


Figura 7. Distribuição e frequência das especificidades de aloanticorpos eritrocitários (n=28) detectados nos pacientes portadores de SMD aloimunizados.

A maioria dos pacientes (n=16/19, f=0,84) desenvolveram aloanticorpos contra antígenos dos sistemas Rh e Kell. Três pacientes que sempre receberam transfusões Rh e K compatíveis apresentaram outras especificidades de anticorpos (1 anti-S, 1 anti-Di^a e 1 anti-Lu^a).

Autoanticorpos foram detectados em 32% dos pacientes aloimunizados (n=6/19) e em 17% dos pacientes não aloimunizados (n=4/24).

4.3. Perfil genético dos grupos sanguíneos nos pacientes portadores de SMD

As frequências antigênicas e fenotípicas para os sistemas de grupos sanguíneos foram pesquisadas e estão descritas nas **Tabelas 7 e 8**, respectivamente.

Tabela 7. Frequências antigênicas deduzidas a partir do genótipo em 61 pacientes portadores de SMD.

Antígeno	n	f	Antígeno	n	f
D	54	0,89	N	44	0,72
c	49	0,80	S	24	0,39
C	37	0,61	s	58	0,95
e	60	0,98	Lu ^a	6	0,10
E	20	0,33	Lu ^b	61	1,00
K	4	0,07	Di ^a	2	0,03
k	61	1,00	Di ^b	61	1,00
Kp ^a	0	0,00	Co ^a	61	1,00
Kp ^b	61	1,00	Co ^b	5	0,08
Js ^a	1	0,02	Do ^a	44	0,72
Js ^b	61	1,00	Do ^b	50	0,82
Jk ^a	48	0,79	Jo ^a	61	1,00
Jk ^b	44	0,72	Hy	61	1,00
Fy ^a	39	0,64	Lw ^a	1	0,02
Fy ^b	41	0,67	Lw ^b	61	1,00
Fy ^{b weak}	1	0,02	Sc1	61	1,00
M	42	0,69	Sc2	0	0,00

n = número de antígenos; f = frequência antigênica.

Tabela 8. Frequências fenotípicas deduzidas a partir do genótipo em 61 pacientes portadores de SMD.

Fenótipo deduzido do genótipo	n	f	Fenótipo deduzido do genótipo	n	f
Sistema Rh			Sistema Duffy		
RhD+	54	0,89	Fy(a+b-)	16	0,26
RhD-	7	0,11	Fy(a+b+)	23	0,38
			Fy(a-b+)	18	0,30
C+c-	12	0,20	Fy(a-b-)	3	0,05
C+c+	25	0,41	Fy(a-b+ ^{weak})	1	0,02
C-c+	24	0,39			
			Sistema Lutheran		
E+e-	1	0,02	Lu(a+b-)	0	0,00
E+e+	19	0,31	Lu(a+b+)	6	0,10
E-e+	41	0,67	Lu(a-b+)	55	0,90
Sistema Kell			Sistema Diego		
K+k-	0	0,00	Di(a+b-)	0	0,00
K+k+	4	0,07	Di(a+b+)	2	0,03
K-k+	57	0,93	Di(a-b+)	59	0,97
Kp(a+b-)	0	0,00	Sistema MNS		
Kp(a+b+)	0	0,00	M+N-	17	0,28
Kp(a-b+)	61	1	M+N+	25	0,41
			M-N+	19	0,31
Js(a+b-)	0	0	S+s-	3	0,05
Js(a+b+)	1	0,02	S+s+	21	0,34
Js(a-b+)	60	0,98	S-s+	37	0,61
Sistema Kidd			Sistema Colton		
Jk(a+b-)	17	0,28	Co(a+b-)	56	0,92
Jk(a+b+)	31	0,51	Co(a+b+)	5	0,08
Jk(a-b+)	13	0,21	Co(a-b+)	0	0,00
Sistema Dombrock			Landsteiner-Wiener		
Do(a+b-)	11	0,18	LW(a+b-)	0	0
Do(a+b+)	33	0,54	LW(a+b+)	1	0,02
Do(a-b+)	17	0,28	LW(a-b+)	60	0,98
Jo(a+)	61	1	Scianna		
Hy(+)	61	1	Sc1,-2	61	1
			Sc1,2	0	0
			Sc-1,2	0	0

n = número de fenótipos; f = frequência fenotípica.

Foram comparadas as frequências dos antígenos de grupos sanguíneos entre os pacientes portadores de SMD e o grupo-controle (doadores de sangue) e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

O fenótipo mais frequente entre os pacientes e o grupo controle de doadores foi: D+C+c+E-e+ (R₁r), K-, Fy(a+b+), Jk(a+b+), M+N+S-s+.

O mecanismo genético responsável pelo fenótipo RhD negativo entre os pacientes estudados foi predominantemente a deleção do gene *RHD*, comum entre caucasianos (58,59). Apenas duas amostras apresentaram o pseudogene *RHD* (*RHD** ψ) em heterozigose com um gene *RHD* normal (genótipo *RHD*/*RHD* ψ), o que significa que estes indivíduos expressam o antígeno RhD nas hemácias.

Com relação ao sistema Duffy, observamos a presença do fenótipo Fy(a-b-) em 2 pacientes, cujo mecanismo molecular responsável pela inibição da expressão do antígeno Fy^b foi a presença da mutação GATA-67C/C (*FY**B/*FY**B GATA-67C/C), genótipo comum em descendentes de africanos (82). Identificamos também 1 paciente com o genótipo *FY**B/*FY**B GATA-67C/C 265T, cujo fenótipo deduzido é Fy(a-b^{weak}).

Foi realizada a pesquisa molecular das variantes do gene *RHD*, RhD fraco tipos 1, 2, 3, 4 e RhD parcial (*RHD*-CE-D), nas amostras dos pacientes portadores de SMD estudados. Foram encontrados 4 pacientes com variantes *RHD* (1 *RHD**fraco tipo 2, 1 *RHD**fraco tipo 4.0, 1 *RHD**DV.1 e 1 *RHD**DVI.1). Os resultados estão apresentados nas **Tabelas 9 e 10**.

Tabela 9. Genótipos *RHD* fraco em 38 amostras de DNA de pacientes portadores de SMD.

	Tipo-1	Tipo-2	Tipo-3	Tipo-4	Tipo-15
n	0	1	0	1	0
f	0	0,03	0	0,03	0

n = número de fenótipos; f = frequência fenotípica.

Tabela 10. Genótipos *RHD* parciais observados em 38 amostras de DNA de pacientes portadores de SMD.

	<i>RHD*DV.1</i>	<i>RHD*DVI.1</i>
n	1	1
f	0,03	0,03

n = número de fenótipos; f = frequência fenotípica.

4.4. Comparação entre os resultados de genótipos e fenótipos

Nos 43 pacientes portadores de SMD politransfundidos, identificamos 17 pacientes que apresentaram discrepâncias entre a fenotipagem eritrocitária prévia e o fenótipo deduzido a partir do genótipo. As principais discrepâncias encontradas estavam relacionadas a antígenos dos sistemas RH, FY, JK e MNS.

Tabela 11.

Foram observadas discrepâncias entre a fenotipagem prévia e o fenótipo deduzido a partir do genótipo em quatro pacientes aloimunizados, cronicamente transfundidos e que não apresentavam bom aproveitamento transfusional.

Tabela 11. Discrepâncias entre o fenótipo deduzido à partir do genótipo e a fenotipagem prévia de 17 pacientes com SMD politransfundidos.

Genótipo	Fenótipo			
Sistema Rh	RhD+	RhD-		
<i>RHD*Parcial</i>	1			
	Rh C+c-	Rh C+c+	Rh c+c+	
<i>RHCE*CC</i>		2		
	Rh E+e-	Rh E+e+	Rh E-e+	
<i>RHCE*EE</i>		1		
<i>RHCE*ee</i>		4		
Sistema MNS	S+s-	S+s+	S-s+	
<i>GYPB*ss</i>		1		
Sistema Kidd	JK(a+b-)	JK(a+b+)	JK(a-b+)	
<i>JK*01/JK*01</i>		2		
<i>JK*01/JK*02</i>	1			
<i>JK*02/JK*02</i>		1		
Sistema Duffy	Fy(a+b-)	Fy(a+b+)	Fy(a-b+)	(Fy(a-b-))
<i>FY*01/FY*01</i>		1		
<i>FY*02/FY*02</i>		2		
<i>FY*02/FY*X (GATA-67T/C)</i>				1

4.5. Genotipagem HLA e estudo de associação entre alelos HLA classe I e classe II e a aloimunização em pacientes portadores de SMD

As frequências alélicas para dos antígenos HLA classe I e classe II das 61 amostras de pacientes com SMD encontram-se nas **Tabelas 12 e 13**, respectivamente.

Tabela 12. Frequências alélicas HLA classe I observadas em 61 pacientes com SMD.

<i>HLA-A</i>	<i>n</i>	<i>f</i>	<i>HLA-B</i>	<i>n</i>	<i>f</i>	<i>HLA-C</i>	<i>n</i>	<i>f</i>
<i>A*01</i>	17	0,14	<i>B*07</i>	11	0,09	<i>C*01</i>	4	0,03
<i>A*02</i>	34	0,28	<i>B*08</i>	10	0,08	<i>C*02</i>	10	0,08
<i>A*03</i>	13	0,11	<i>B*13</i>	1	0,01	<i>C*03</i>	12	0,10
<i>A*11</i>	7	0,06	<i>B*14</i>	6	0,05	<i>C*04</i>	16	0,13
<i>A*23</i>	6	0,05	<i>B*15</i>	17	0,14	<i>C*05</i>	6	0,05
<i>A*24</i>	15	0,12	<i>B*18</i>	7	0,06	<i>C*06</i>	8	0,07
<i>A*26</i>	4	0,03	<i>B*27</i>	1	0,01	<i>C*07</i>	37	0,30
<i>A*29</i>	8	0,07	<i>B*35</i>	10	0,08	<i>C*08</i>	6	0,05
<i>A*30</i>	4	0,03	<i>B*37</i>	2	0,02	<i>C*12</i>	7	0,06
<i>A*31</i>	4	0,03	<i>B*38</i>	2	0,02	<i>C*14</i>	3	0,02
<i>A*32</i>	1	0,01	<i>B*39</i>	8	0,07	<i>C*15</i>	7	0,06
<i>A*33</i>	1	0,01	<i>B*40</i>	4	0,03	<i>C*16</i>	4	0,03
<i>A*66</i>	1	0,01	<i>B*41</i>	1	0,01	<i>C*17</i>	2	0,02
<i>A*68</i>	5	0,04	<i>B*42</i>	1	0,01			
<i>A*74</i>	2	0,02	<i>B*44</i>	12	0,10			
			<i>B*48</i>	2	0,02			
			<i>B*49</i>	5	0,04			
			<i>B*50</i>	3	0,02			
			<i>B*51</i>	6	0,05			
			<i>B*52</i>	2	0,02			
			<i>B*53</i>	2	0,02			
			<i>B*55</i>	2	0,02			
			<i>B*56</i>	1	0,01			
			<i>B*57</i>	4	0,03			
			<i>B*58</i>	1	0,01			
			<i>B*81</i>	1	0,01			

n = número de alelos; f = frequência alélica

Tabela 13. Frequências alélicas HLA classe II observadas em 61 pacientes com SMD.

<i>HLA-DRB1</i>	<i>n</i>	<i>f</i>	<i>HLA-DQA1</i>	<i>n</i>	<i>f</i>	<i>HLA-DQB1</i>	<i>n</i>	<i>f</i>
<i>DRB1*01</i>	7	0,06	<i>DQA1*01</i>	48	0,39	<i>DQB1*02</i>	37	0,30
<i>DRB1*03</i>	11	0,09	<i>DQA1*02</i>	22	0,18	<i>DQB1*03</i>	35	0,29
<i>DRB1*04</i>	13	0,11	<i>DQA1*03</i>	16	0,13	<i>DQB1*04</i>	10	0,08
<i>DRB1*07</i>	22	0,18	<i>DQA1*04</i>	9	0,07	<i>DQB1*05</i>	15	0,12
<i>DRB1*08</i>	7	0,06	<i>DQA1*05</i>	26	0,21	<i>DQB1*06</i>	25	0,20
<i>DRB1*09</i>	4	0,03	<i>DQA1*06</i>	1	0,01			
<i>DRB1*10</i>	2	0,02						
<i>DRB1*11</i>	17	0,14						
<i>DRB1*12</i>	4	0,03						
<i>DRB1*13</i>	10	0,08						
<i>DRB1*14</i>	5	0,04						
<i>DRB1*15</i>	15	0,12						
<i>DRB1*16</i>	5	0,04						

n = número de alelos; *f* = frequência alélica

A distribuição dos grupos alélicos HLA classe I (*HLA-A*, *-B* e *-C*) e classe II (*HLA-DRB1*) foi comparada entre os pacientes portadores de SMD (*n*=61) e o grupo-controle (doadores de sangue e medula óssea, *n*=427) e não foi observada diferença estatisticamente significativa para os grupos alélicos avaliados entre os dois grupos, demonstrando não haver associação entre os grupos alélicos HLA (*HLA-A*, *-B*, *-C* e *-DRB1*) a susceptibilidade/ proteção à SMD.

Também foi realizada a comparação da distribuição dos grupos alélicos HLA classe I (*HLA-A*, *-B* e *-C*) e II (*HLA-DRB1*, *-DQA1* e *-DQB1*) entre os pacientes politransfundidos aloimunizados (*n*=19/43) e os pacientes não-alloimunizados (*n*=24/43) para antígenos de grupos sanguíneos e apenas para o locus *HLA-DRB1* foi observada diferença estatisticamente significativa para o grupo alélico *HLA-DRB1*13* (*p*=0,0137, *OR*=0,16, *IC*=0,02-1,35), que estava em maior frequência entre os pacientes não-alloimunizados (*n*=7/24, *f*=0,15), quando comparado ao grupo de pacientes aloimunizados (*n*=0/19, *f*=0). Na **Tabela 14** estão descritos os resultados da comparação do locus *HLA-DRB1* entre esses

dois grupos.

As amostras que apresentaram o grupo alélico *HLA-DRB1*13* foram tipadas em nível alélico. Foram encontrados 3 alelos diferentes: *HLA-DRB1*13:01*, *HLA-DRB1*13:02* e *HLA-DRB1*13:03*. Três pacientes apresentaram o alelos *HLA-DRB1*13:01*, 2 pacientes o alelos *HLA-DRB1*13:02* e outros 2 pacientes o alelos *HLA-DRB1*13:03*.

Tabela 14. Comparação entre as frequências alélicas do locus *HLA-DRB1* entre os grupos de pacientes aloimunizados (n=19) e não-alloimunizados (n=24).

<i>HLA-DRB1</i>	Pacientes aloimunizados (n=19)		Pacientes não- aloimunizados (n=24)		p	OR	IC 95%
	n	f	n	f			
<i>DRB1*01</i>	1	0,03	4	0,08	ns	-	-
<i>DRB1*03</i>	3	0,08	5	0,10	ns	-	-
<i>DRB1*04</i>	7	0,18	4	0,08	ns	-	-
<i>DRB1*07</i>	8	0,21	5	0,10	ns	-	-
<i>DRB1*08</i>	5	0,13	2	0,04	ns	-	-
<i>DRB1*09</i>	2	0,05	2	0,04	ns	-	-
<i>DRB1*10</i>	2	0,05	0	0,00	ns	-	-
<i>DRB1*11</i>	3	0,08	7	0,15	ns	-	-
<i>DRB1*12</i>	1	0,03	2	0,04	ns	-	-
<i>DRB1*13</i>	0	0,00	7	0,15	0,0137	0,1583	0,0186-1,348
<i>DRB1*14</i>	2	0,05	1	0,02	ns	-	-
<i>DRB1*15</i>	2	0,05	6	0,13	ns	-	-
<i>DRB1*16</i>	2	0,05	3	0,06	ns	-	-

n = número de alelos; f = frequência alélica; ns = não significativo estatisticamente.

5. DISCUSSÃO

5.1. Perfil dos pacientes portadores de SMD

O perfil dos pacientes estudados com relação à idade (média de 58 anos) e etnia (maior prevalência de caucasianos $n=48/61$, $f=0,79$) foi semelhante ao encontrado por outros autores (5,6) que também observaram maior incidência de SMD em pacientes caucasianos e com idade avançada.

Foram avaliados pacientes portadores de SMD que não receberam transfusões sanguíneas ($n=18/61$, $f=0,30$) e que receberam transfusões ($n=43/61$, $f=0,70$).

5.2. Perfil transfusional e de aloimunização dos pacientes com SMD

Setenta por cento ($n=43/61$) dos pacientes estudados faziam uso de terapia transfusional e a maioria ($n=27/43$, $f=0,63$) recebiam transfusões regulares (≥ 6 unidades de concentrado de hemácias nos últimos 3 meses) ($p=0,03$; $OR=2,848$; $IC=1,188-6,827$). Estes dados estão de acordo com o encontrado na literatura, onde outros trabalhos relataram que mais de 40% dos portadores de SMD requerem transfusões sanguíneas regulares (1,17,35).

A taxa de aloimunização eritrocitária observada foi de 44% ($n=19/43$) sendo que 32% dos pacientes aloimunizados ($n=6/19$) e 17% dos não aloimunizados ($n=4/24$) possuíam autoanticorpos, sendo todos contra antígenos do sistema RH. Em um estudo realizado no Brasil, por Novaretti et al. (34) com pacientes portadores de SMD, foi observado que 58,6% dos pacientes encontravam-se aloimunizados e que 34,4% possuíam autoanticorpos. Na

Espanha, Sanz et al. (35) observaram 15% de aloimunização entre os pacientes com SMD avaliados e três por cento deles desenvolveram também autoanticorpos. Cabe salientar que 32% dos autoanticorpos encontrados nos pacientes por nós estudados e também os relatados na literatura foram desenvolvidos após a formação dos aloanticorpos.

Os principais aloanticorpos detectados em nosso estudo foram contra antígenos Rh ($n=19/28$, $f=0,68$) e K ($n=2/28$, $f=0,07$), desenvolvidos em transfusões anteriores não compatibilizadas para esses antígenos, demonstrando assim a importância da utilização de concentrado e hemácias fenotipado para os antígenos dos sistemas Rh e Kell nestes pacientes. O anticorpo mais prevalente foi o anti-E ($n=10/28$, $f=0,36$), presente em 53% dos pacientes ($n=10/19$), ocorrendo sozinho ou em combinação com outros anticorpos. Esse dado é consistente com outros trabalhos que também encontraram alta prevalência de anti-E em pacientes com SMD (35,83,84). Em nosso trabalho, 67% dos pacientes estudados apresentaram o fenótipo RhE-e+, o que justifica a alta frequência de anti-E. Sanz et al (35), observaram que o aloanticorpo anti-K correspondeu a 26% e anti-E a 19% do total dos aloanticorpos encontrados.

Apenas 3 pacientes que receberam apenas unidades de concentrado de hemácias compatibilizadas para Rh e K desenvolveram outros anticorpos (1 anti-S, 1 anti-Di^a e 1 anti-Lu^a), sendo que 2 destes anticorpos são dirigidos a antígenos de baixa frequência populacional. Nos demais pacientes que apresentaram outras especificidades de anticorpos, verificamos que as mesmas estavam associadas a anticorpos contra antígenos dos sistemas Rh e Kell. Este resultado pode ser explicado pelo fato desses pacientes terem recebido sangue compatibilizado inicialmente apenas para ABO e RhD e após desenvolverem anticorpos anti-Rh e anti-K passaram a receber concentrados de hemácias Rh e K compatíveis e desenvolveram outros aloanticorpos. Um paciente desenvolveu anti-Jk^a associado a anti-c, um paciente desenvolveu anti-Jk^a e anti-Di^a associado a anti-E e um paciente desenvolveu anti-Di^a associado a anti-K e anti-C.

Alguns autores relataram que o risco de aloimunização aumenta com

um número crescente de transfusões (33,85,86,87). Em nosso trabalho, o número de unidades de sangue transfundidas em pacientes com SMD aloimunizados e não aloimunizados foi semelhante, portanto, aparentemente, nos pacientes estudados o número de unidades transfundidas não afetou a aloimunização contra antígenos de grupos sanguíneos, o que pode ser justificado pelo uso de unidades de sangue compatibilizadas para os antígenos Rh e K pelo nosso serviço transfusional considerando que os anticorpos mais frequentemente encontrados nesses pacientes são dirigidos a esses antígenos.

Da mesma forma, a frequência transfusional (transfusão regular ou eventual) não demonstrou relação com a aloimunização entre os pacientes estudados, pois pacientes aloimunizados e não aloimunizados apresentaram frequências similares de transfusões regulares e eventuais (Tabela 5).

Apesar do alto índice de aloimunização entre os pacientes portadores de SMD, considerada atualmente a doença onco-hematológica mais comum em adultos, superando as leucemias linfóides, e da anemia estar presente em mais de 80% dos casos (2), poucos estudos foram realizados caracterizando fatores de risco relacionados à aloimunização nesse grupo de pacientes (35,83).

5.3. Perfil genético dos grupos sanguíneos em pacientes portadores de SMD

A análise dos resultados obtidos com a genotipagem em larga escala pela técnica HEA BeadChipTM (*microarray*) possibilitou a determinação das frequências antigênicas e fenotípicas de 32 antígenos de grupos sanguíneos em 61 pacientes com SMD e, no grupo controle constituído por 151 doadores de sangue. Não foi observada diferença estatística significativa entre as frequências fenotípicas dos 2 grupos (doadores e pacientes). A região Sudeste do Brasil possui alta densidade populacional e tem continuamente recebido imigrantes de outras regiões. Assim doadores e pacientes desta região constituem uma amostra

representativa de uma população miscigenada, o que poderia talvez explicar esta similaridade de frequências fenotípicas encontradas. Ao compararmos as frequências antigênicas por nós obtidas com as frequências obtidas por Hashmi (88) que utilizaram a mesma tecnologia, verificamos que a população estudada apresenta frequências similares a Caucasianos e Hispânicos. Como foi previamente mencionado, a maioria dos pacientes com SMD estudados são de origem caucasiana.

Em nossas amostras de pacientes e doadores de sangue, o fenótipo mais frequente foi: D+C+c+E-e+ (R₁r), K-, Fy(a+b+), Jk(a+b+), M+N+S-s+. Este fenótipo é predominante de populações caucasianas e reflete, portanto a população estudada. Este resultado talvez possa explicar o baixo índice de aloimunização encontrado para outros antígenos eritrocitários além de Rh e K.

Na análise dos resultados das amostras de DNA dos pacientes estudadas, encontramos 4 fenótipos [1 Lu(a+b+), 1 Co(a+b+), 1 Js(a+b+), 1 Fy(a-b^{weak})] de difícil caracterização sorológica devido a ausência ou dificuldade na obtenção dos antissoros comerciais para identificação dos antígenos. Este resultado demonstra que estes fenótipos podem ser encontrados nestes pacientes utilizando-se um método que possibilite a identificação desses antígenos, como a plataforma de *microarray* aqui empregada.

Atualmente, são conhecidos 3 mecanismos genéticos associados com o fenótipo RhD negativo: deleção do gene *RHD*, predominante em caucasianos, presença do gene *RHD*ψ* e genes híbridos *RHD-CE-D*, predominantes em africanos (78,31). O mecanismo genético predominante responsável pelo fenótipo RhD negativo entre os pacientes estudados foi a deleção do gene *RHD*, comum entre caucasianos (76,77). Duas amostras apresentaram pseudogene *RHD* (*RHD*ψ*) em heterozigose com um gene *RHD* normal (genótipo *RHD/RHDψ*), e, portanto a proteína RhD é normalmente transcrita e expressa na membrana da hemácia. Este resultado caracteriza miscigenação racial, que é muito comum no Brasil.

Na análise das amostras, identificamos três pacientes com o fenótipo Fy(b-) que poderiam receber sangue Fy(b+), pois apresentam a mutação -67T>C no promotor eritróide GATA. Essa mutação frequente em descendentes de Africanos leva a um enfraquecimento da expressão do antígeno Fy^b nas hemácias, mas não em outros tecidos. Nestes casos, o gene *FY*B* é expresso em outros tecidos, como por exemplo, nas células do endotélio dos vasos sanguíneos. Pacientes com genótipo *FY*B* e *GATA* mutado, podem ser transfundidos com hemácias Fy(b+), sem o risco de aloimunização, uma vez que o gene *FY*B* é expresso em outros tecidos (89). Isto significa que a disponibilidade de sangue compatível para estes pacientes pode aumentar consideravelmente (82).

Um outro paciente foi genotipado como *FY*B/FY*B GATA-67C 265T*. Nessa situação o fenótipo deduzido a partir do genótipo foi Fy(a-b^{weak}) e portanto o paciente também pode receber transfusões Fy(b+) (82). Outro fato interessante é a presença de 2 mutações características de etnias diferentes (mutação *GATA-67C* é predominante de afro-descendentes e a mutação 265T é característica de caucasianos) presentes em um mesmo indivíduo, representando mais uma vez a miscigenação racial.

Variantes do antígeno RhD também foram encontradas nos pacientes com SMD estudados. Verificamos a presença de 4 pacientes portadores de variantes *RHD* (1 *RHD*fraco tipo 2*, 1 *RHD*fraco tipo 4.0*, 1 *RHD*DV.1* e 1 *RHD*DVI.1*). Com exceção do paciente portador do antígeno D fraco tipo 2, os outros 3 pacientes podem se aloimunizar se receberem concentrado de hemácias RhD positivo pois estas variantes são classificadas como D parcial (90,91). É importante destacar que essas variantes RhD não seriam identificadas por técnicas sorológicas e a sua correta identificação permite também a diferenciação entre autoanticorpo e aloanticorpo anti-D.

5.4. Comparação entre os resultados de genótipos e fenótipos

Análise molecular de antígenos de grupos sanguíneos em pacientes com SMD mostrou ser muito importante para identificar discrepâncias entre o fenótipo sorológico e o fenótipo deduzido do genótipo, bem como na diferenciação de auto e aloanticorpos.

Identificamos 17 pacientes politransfundidos que apresentaram discrepâncias para os antígenos dos sistemas RH, FY, JK e MNS entre a fenotipagem eritrocitária prévia e o fenótipo deduzido a partir do genótipo. Estas discrepâncias podem ocorrer quando a fenotipagem eritrocitária é realizada em pacientes que receberam transfusões sanguíneas recentes, devido a presença de hemácias do doador na corrente sanguínea do paciente ou nas situações que as hemácias estão revestidas por anticorpos da classe IgG (TAD positivo), pois a maioria dos antissoros usados para fenotipagem são reativos pelo teste da antiglobulina. Portanto, nestas situações, a genotipagem é considerada o teste “padrão ouro” e tem sido recomendado a não utilização da fenotipagem (92). Cabe ressaltar que em nosso estudo discrepâncias entre a fenotipagem prévia e o fenótipo deduzido a partir do genótipo foram observadas em 4 pacientes transfundidos regularmente e que não apresentavam bom aproveitamento transfusional. Todos os pacientes encontravam-se aloimunizados a antígenos do sistema Rh e “aparentemente” possuíam autoanticorpos anti-E. Após a realização da genotipagem, verificamos que esses autoanticorpos eram na realidade aloanticorpos.

A avaliação da aloimunização nos pacientes com SMD que foram transfundidos com concentrados de hemácias fenótipo compatíveis Rh e K a partir dos resultados dos genótipos demonstrou que não ocorreu formação de outras especificidades de aloanticorpos além das já desenvolvidas. Assim, esta conduta transfusional demonstrou que o paciente politransfundido pode se beneficiar pela redução do risco de aloimunização.

5.5. Compatibilidade molecular para seleção de sangue fenótipo compatível

Com a intenção de avaliarmos o risco de aloimunização a outros antígenos de grupos sanguíneos, realizamos a compatibilidade molecular entre pacientes politransfundidos e as unidades compatibilizadas sorologicamente para eles. Embora tenhamos encontrado uma compatibilidade melhor para os pacientes com a genotipagem estendida, apenas a compatibilidade molecular para Rh (D, C, c, E, e) e K poderia ter evitado a formação de anticorpos em pelo menos 68% (n=13/19) dos pacientes aloimunizados. Esta observação é consistente com o que foi encontrado por Sanz et al., 2013, em estudo de aloimunização entre pacientes com SMD transfundidos, nos quais 62% dos pacientes apresentavam anticorpos contra antígenos Rh e K (35).

Levando em consideração a segurança transfusional e os resultados obtidos neste estudo em conjunto com as informações obtidas na literatura, propomos a utilização de um protocolo de compatibilidade molecular para os antígenos Rh (D, C, c, E, e) e K na seleção de concentrado de hemácias fenótipo compatível para pacientes portadores de SMD.

5.6. Genotipagem HLA e estudo de associação entre alelos HLA classe I e classe II e a aloimunização em pacientes portadores de SMD

O alelo *HLA-DRB1*13* foi identificado como um possível fator de proteção contra a aloimunização eritrocitária, pois esse alelo estava presente em 15% dos pacientes com SMD não aloimunizados e em nenhum aloimunizado (p=0,0137). No entanto, a genotipagem em alta resolução revelou que não houve predominância de um alelo *HLA-DRB1*13* específico em pacientes não aloimunizados.

Vários estudos têm associado aloimunização eritrocitária por antígenos específicos com diferentes alelos *HLA-DRB1*. Chiaroni et al. (56) mostraram que o

*HLA-DRB1*11* e *HLA-DRB1*13* foram associados com o risco de aloimunização anti-K. Nosso estudo, em contraste, identificou que o *HLA-DRB1*13*, pode estar associado com a proteção à aloimunização para diferentes antígenos eritrocitários em pacientes com SMD. Outro estudo relacionou numerosas moléculas de *HLA-DRB1* com a aloimunização anti-K, mas não com um alelo específico (57).

Em estudos com pacientes aloimunizados especificamente contra o antígeno Fy^a foi demonstrado maior frequência dos alelos *HLA-DRB1*04* e *HLA-DRB1*15:01* (57, 93). Os alelos *HLA-DRB1*01:01*, *HLA-DRB1*01:02* e *HLA-DRB1*10:01* foram identificados em maior frequência em pacientes aloimunizados contra o antígeno Jk^a (55). Estes dados sugerem que, além da ligação direta entre HLA de classe II e determinada especificidade de antígeno de grupo sanguíneo, alelos HLA também podem modular a aloimunização em um nível antigênico não-específico (94).

O presente trabalho apresentou algumas limitações com relação a associação dos polimorfismos HLA e aloimunização. A principal limitação é o pequeno número de amostras de pacientes avaliados em relação ao alto grau de polimorfismo e variabilidades dos alelos HLA na população. Portanto, estudos com maior número de amostras são necessários para confirmação dos resultados obtidos. Além disto, é importante que os pacientes com SMD portadores do alelo *HLA-DRB1*13* que mostraram-se resistentes à aloimunização eritrocitária nesse estudo sejam acompanhados por um longo período de tempo para verificar se não se tornarão aloimunizados contra antígenos eritrocitários.

6. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos deste trabalho e as condições que ele foi realizado podemos concluir que:

1. A grande maioria dos pacientes portadores de SMD faz uso da terapia transfusional (70%) e a maior parte deles recebe transfusões sanguíneas regulares (63%).

2. Os pacientes com SMD desenvolveram aloanticorpos (44%) não associados diretamente à frequência transfusional e autoanticorpos associados à aloimunização.

3. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os fenótipos eritrocitários de pacientes com SMD e controles, sendo que o fenótipo eritrocitário mais frequente [D+C+c+E-e+ (R₁r), K-, Fy(a+b+), Jk(a+b+), M+N+S-s+] foi associado ao genótipo de caucasianos.

4. A genotipagem de grupos sanguíneos em pacientes com SMD mostrou ser muito importante para identificar discrepâncias entre o fenótipo sorológico e o fenótipo deduzido do genótipo e, para diferenciar auto e aloanticorpos.

5. A compatibilidade molecular pode facilitar a seleção de sangue compatível para pacientes portadores de SMD politransfundidos, contribuindo para a prevenção da aloimunização eritrocitária e para diminuição dos riscos transfusionais

6. Foi observada possível associação entre a presença do alelo *HLA-DRB1*13* e a proteção à aloimunização em pacientes portadores de SMD. No entanto, um estudo com maior número de amostras seria importante para

confirmar a associação do alelo *HLA-DRB1*13* com a proteção à aloimunização em pacientes portadores de SMD.

7. Um protocolo transfusional que inclua a genotipagem Rh e K pode reduzir em até 68% a aloimunização nos pacientes portadores de SMD, apresentando um impacto positivo sobre o custo-benefício.

7. REFERÊNCIAS

1. Lucioni C, Finelli C, Mazzi S, Oliva ES. Costs and quality of life in patients with myelodysplastic syndromes. *Am J Blood Res*. 2013 Aug;3(3):246-59.
2. Magalhães SMM. Síndromes mielodisplásticas – diagnóstico de exclusão. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28(3):175-7.
3. Hofmann WK & Keffler HP. Myelodysplastic syndrome. *Annu Rev Med*. 2005;56:1-16.
4. Moraes ACR, Licínio MA, Pagnussat L, Del Moral JAG, Santos-Silva MC. Myelodysplastic syndrome: Molecular and laboratorial aspects and the 2008 WHO classification. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(6):463-70.
5. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer*. 2007 Apr;109(8):1536-42.
6. Sekeres MA. Epidemiology, natural history, and practice patterns of patients with myelodysplastic syndromes in 2010. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011 Jan; 9(1):57-63.
7. Barrett AJ, Sloand E. Autoimmune mechanisms in the pathophysiology of myelodysplastic syndromes and their clinical relevance. *Haematologica*. 2009 Apr;94(4):499-51.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982 Jun;51(2):189-99.
9. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol*. 2005 Oct;23:7594-603.
10. Germing U, Aul C, Niemeyer CM, Haas R, Bennett JM. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2008 Sep;87(9):691-9.
11. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997 Mar;89(6):2079-88.

12. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4° ed. 2008, Geneva: WHO Press. 439p.
13. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May;117(19):5019-32.
14. List AF, Vardiman J, Issa JP, DeWitte TM. Myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004;297-317.
15. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes – coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med*. 2005 Feb;10:352(6):536-38.
16. Rau ATK, Shreedhara AK, Kumar S. Myelodysplastic syndromes in children: where are we today? *Oschsner J*. 2012;12(3):216-20.
17. Raptis A1, Duh MS, Wang ST, Dial E, Fanourgiakis I, Fortner B et al. Treatment of transfusional iron overload in patients with myelodysplastic syndrome or severe anemia: data from multicenter clinical practices. *Transfusion*. 2010 Jan;50(1):190-9.
18. Raza A, Reeves JA, Feldman EJ, Dewald GW, Bennett KM, Deeg HJ, et al. Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. *Blood*. 2008 Jan;111(1):86-93.
19. Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion*. 1999 Jul;39(7):763-71.
20. Aygun B, Padmanabhan S, Paley C, Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. *Transfusion*. 2002 Jan;42(1):37-43.
21. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev*. 2007 Jan;21(1):58-71.
22. Zumberg MS, Procter JL, Lottenberg R, Kitchens CS, Klein HG. Autoantibody formation in the alloimmunized red blood cell recipient: clinical and laboratory implications. *Arch Intern Med*. 2001 Jan;161(2):285-90.
23. Storry JR, Castilho L, Daniels G, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood terminology: Berlin report. *Vox Sang*. 2011 Jul;101(1):77-82.
24. Reid ME; Lomas-Francis C, Olsson ML. The Blood Group Antigens Facts Book. 3°Ed, San Diego, CA, Academic Press, 2012. 745p.

25. Daniel G, Reid ME. Blood groups: the past 50 years. *Transfusion*. 2010 Feb;50(2):281-9.
26. Seltsam A, Wagner FF, Slama A, Flegel WA. Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study. *Transfusion*. 2003 Nov;43(11):1563-6.
27. Talano JA, Hillery CA, Gottschall JL, Baylerian DM, Scott JP. Delayed hemolytic transfusion reaction/hyperhemolysis syndrome in children with sickle cell disease. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6Pt1):e661-5.
28. Reisner EG, Kostyu DD, Philips G, Walker C, Dawson DV. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens*. 1987 Oct;30(4):161-6.
29. Charache S. Problems in transfusion therapy [editorial]. *N Engl J Med*. 1990 Jun;322(23):1666-8.
30. Orlina AR, Sosler SD, Koshy M. Problems of chronic transfusion in sickle cell disease. *Clin Apher*. 1991;6(4):234-40.
31. Singer ST, Wu V, Mignacca R, Kuypers FA, Morel P, Vichinsky EP. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. *Blood*. 2000 Nov;96(10):3369-73.
32. Giblett ER. A critique of the theoretical hazard of inter-vs-intra-racial transfusion. *Transfusion*. 1961;1:233-8.
33. Cox JV, Steane E, Cunningham G, Frenkel EP. Risk of alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. *Arch Intern Med*. 1988 Nov;148(11):2485-9.
34. Novaretti MC, Sopenete CR, Velloso ER, Rosa MF, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA. Immunohematological findings in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol*. 2001;105(1):1-6.
35. Sanz C1, Nomdedeu M, Belkaid M, Martinez I, Nomdedeu B, Pereira A. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. *Transfusion*. 2013 Apr; 53(4):710-5.
36. Blumberg N, Peck K, Ross K, Avila E. Immune response to chronic red blood cell transfusion. *Vox Sang*. 1983;44(4):212-7.
37. Garratty G. Autoantibodies induced by blood transfusion. *Transfusion*. 2004 Jan;44(1):5-9.

38. Castellino SM, Combs MR, Zimmerman SA, Issitt PD, Ware RE. Erythrocyte autoantibodies in pediatric patients with sickle cell disease receiving transfusion therapy: Frequency, characteristics and significance. *Br J Haematol.* 1999 Jan;104(1):189-94.
39. Rozman P, Dovc T, Gassner C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion.* 2000 Aug;40(8):936-42.
40. Siegel DL. Phage display-based molecular methods in immunohematology. *Transfusion.* 2007 Jul;47(1 Suppl):89S-94S.
41. Shirey RS, Boyd JS, Parwani AV, Tanz WS, Ness PM, King KE. Prophylactic antigen-matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management. *Transfusion.* 2002 Nov;42(11):1435-41.
42. Castro O, Sandler SG, Houston-Yu P, Rana S. Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. *Transfusion.* 2002 Jun;42(6):684-90.
43. Reid ME. Overview of molecular methods in immunohematology. *Transfusion.* 2007 Jul;47(1 Suppl):10S-6S.
44. Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino JJr, Alberto FL, Saad STO, Costa FF. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion.* 2002 Feb;42(2):232-8.
45. Castilho L, Rios M, Pellegrino JJr, Saad STO, Costa FF. Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(5):216-20.
46. Avent ND. Large scale blood group genotyping. *Transfus Clin Biol.* 2007 May;14(1):10-5.
47. Denomme GA, Johnson ST, Pietz BC. Mass-scale red cell genotyping of blood donors. *Transfus Apher Sci.* 2011 Feb;44(1):93-9.
48. Hashmi G, Shariff T, Zhang Y, et al. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion.* 2007 Apr;47(4):736-47.
49. Ribeiro KR, Guarnieri MH, Costa DC, Costa FF, Pellegrino J Jr, Castilho L. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang.* 2009 Aug;97(2):147-52.

50. Costa DC, Pellegrino JJr, Guelsin GAS, Ribeiro KAR, Gilli SCO, Castilho L. Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(1):35-8.
51. Bao W, Zhong H, Li X, Lee MT, Schwartz J, Sheth S, et al. Immune regulation in chronically transfused allo-antibody responder and nonresponder patients with sickle cell disease and β -thalassemia major. *Am J Hematol*. 2011 Dec;86(12):1001-6.
52. Higgins JM, Sloan SR. Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders. *Blood*. 2008 Sep;112(6):2546-53.
53. Kumar US, Ghosh K, Gupte SS, Gupte SC, Mohanty D. Role of HLA antigens in Rh(D) alloimmunized pregnant women from Mumbai, Maharashtra, India. *J Biosci*. 2002 Mar;27(2):135-41.
54. Ansart-Pirenne H, Zeliszewski D, Lee K, Martin-Blanc S, Rouger P, Noizat-Pirenne F. Identification of immunodominant alloreactive T-cell epitopes on the Jka red blood cell protein inducing either Th1 or Th2 cytokine expression. *Blood*. 2004 Nov;104(10):3409-10.
55. Reviron D, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, et al. HLA-DRB1 alleles and Jka immunization. *Transfusion*. 2005 Jun;45(6):956-9.
56. Chiaroni J, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, et al. HLA-DRB1 polymorphism is associated with Kell immunization. *Br J Haematol*. 2006 Feb;132(3):374-8.
57. Noizat-Pirenne F, Tournamille C, Bierling P, Roudot-Thoraval F, Le Pennec PY, Rouger P, Ansart-Pirenne H. Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion*. 2006 Aug;46(8):1328-33.
58. Ellis SA, Ballingall KT. Cattle MHC: evolution in action? *Immunol Rev*. 1999 Feb;167:159-68.
59. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Tradução da 6ª Ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 2008, 564p.
60. Zimring JC, Hendrickson JE. The role of inflammation in alloimmunization to antigens on transfused red blood cells. *Curr Opin Hematol*. 2008 Nov;15(6):631-5.
61. Heddle NM, Soutar RL, O'Hoski PL, et al. A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization posttransfusion. *Br J Haematol*. 1995 Dec;91(4):1000-5.

62. Cook K, Rush B. Rh(D) immunization after massive transfusion of Rh(D)-positive blood. *Med J Aust.* 1974 Feb;1(6):166-8. *In:* Gonzalez-Porras JR, Graciani IF, Perez-Simon JA, Martin-Sanchez J, Encinas C, Conde MP, et al. Prospective evaluation of a transfusion policy of D+ red blood cells into D- patients. *Transfusion.* 2008 Jul;48(7):1318-24.
63. Lomas C, Tippet P, Thompson KM, Melamed MD, Hughers-Jones NC. Demonstration of seven epitopes on the D antigen using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang.* 1989;57(4):261-4.
64. Chou ST, Westhoff CM. Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009 Jan;178-84.
65. 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 Aug;122(6):1062-71.
66. Lomas-Francis C. The value of DNA analysis for antigens of the Kidd blood group system. *Transfusion.* 2007 Jul;47(1 Suppl):23S-7S.
67. Frohn C, Dümbgen L, Brand JM, Görg S, Luhm J, Kirchner H. Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. *Transfusion.* 2003 Jul;43(7):893-8.
68. Mark H. Yazer, Darrell J. Triulz. Detection of anti-D in D- recipients transfused with D+ red blood cells. *Transfusion.* 2007 Dec;47(12):2197-201.
69. Gonzalez-Porras JR, Graciani IF, Perez-Simon JA, Martin-Sanchez J, Encinas C, Conde MP, et al. Prospective evaluation of a transfusion policy of D+ red blood cells into D- patients. *Transfusion.* 2008 Jul;48(7):1318-24.
70. Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J, Bowlin PR, Kielbik MC, Bischof JC et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood.* 2003 May;101(10):3953-9.
71. Chies JA, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses.* 2001 Jul;57(1):46-50.
72. Hibbert JM, Hsu LL, Bhathena SJ, et al. Proinflammatory cytokines and the hypermetabolism of children with sickle cell disease. *Exp Biol Med.* 2005 Jan;230(1):68-74.
73. Yu J, Heck S, Yazdanbakhsh K. Prevention of red cell alloimmunization by CD25 regulatory T cells in mouse models. *Am J Hematol.* 2007 Aug;82(8):691-6.

74. Hendrickson JE, Desmarets M, Deshpande SS, Chadwick TE, Hillyer CD, Roback JD et al. Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. *Transfusion*. 2006 Sep;46(9):1526–36.
75. Hendrickson J, Roback JD, Hillyer CD, et al. Discrete toll like receptor agonists have differential effects on alloimmunization to red blood cells. *Transfusion*. 2008 Sep;48(9):1869-77.
76. Muller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schönitzer D, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion*. 2001 Jan;41(1):45-52.
77. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 2000 Jun;95:3662-8.
78. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000 Jan;95(1):12-8.
79. Maaskant-Van Wijk PA, Faas BH, De Ruijter JA, Overbeeke MA, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion*. 1998;38(11-12):1015–21.
80. Reid Me, Yazdanbakhsh K. Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusions. *Curr Opin Hematol*. 1998 Mar;5(2):93-102.
81. Reid ME, Rios M. Applications of molecular genotyping to immunohaematology. *Br J Biomed Sci*. 1999;56(2):145-52.
82. Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion* 2000 Mar;40(3):310-20.
83. Stiegler G, Sperr W, Lorber C, Fabrizi V, Höcker P, Panzer S. Red cell antibodies in frequently transfused patients with myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*. 2001 Jun;80(6):330-3.
84. Baby M, Fongoro S, Cissé M, Gakou Y, Bathily M, Dembélé AK et al. Frequency of red blood cell alloimmunization in polytransfused patients at the university teaching hospital of Point G, Bamako, Mali. *Transfus Clin Biol*. 2010 Oct;17(4):218-22.
85. Bauer MP, Wiersum-Osselton J, Schipperus M, Vandenbroucke JP, Briët E. Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion. *Transfusion* 2007 Nov;47(11):2066-71.

86. Murao M, Viana MB. Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res.* 2005 May;38(5):675-82.
87. Zalpuri S, Zwaginga JJ, le Cessie S, Elshuis J, Schonewille H, van der Bom JG. Red-blood-cell alloimmunization and number of red-blood-cell transfusions. *Vox Sanguinis.* 2012 Feb;102(2):144-9.
88. Hashmi G. Red blood cell antigen phenotype by DNA analysis. *Transfusion.* 2007 Jul;47(1Suppl):60S-3S.
89. Castilho L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion.* 2007 Jul;47(1 Suppl):28S-31S.
90. Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin Lab.* 2002;48(1-2):53-9.
91. Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, Li W, Flegel WA. Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion.* 2005 Oct;45(10):1554-60.
92. Wagner, FF. Why do we use serological blood group phenotype determinations in chronically transfuse patients? *Blood Transf.* 2014 Jan;12(1):1-2.
93. Picard C, Frassati C, Basire A, Buhler S, Galicher V, Ferrera V, et al. Positive association of DRB1*04 and DRB1*15 alleles with Fya immunization in a Southern European population. *Transfusion.* 2009 Nov;49:2412-7.
94. Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood.* 2012 Jul; 120(3):528-37.

8. APÊNDICE

Artigo submetido à Blood Transfusion e aceito para publicação em 13/02/2014.

Original article

Title: **Molecular matching for Rh and K reduces red blood cell alloimmunization in patients with myelodysplastic syndrome.**

Authors: Gláucia Andréia Soares Guelsin^a, Camila Rodrigues^b, Jeane Eliete Laguila Visentainer^b, Paula de Melo Campos^a, Fabíola Traina^a, Simone Cristina Olenscki Gilli^a, Sara Terezinha Ollala Saad^a, Lilian Castilho^a

^aHemocentro-UNICAMP, Campinas State University, Carlos Chagas, 480, Barão Geraldo, Campinas, SP, CEP 13081-970, Brazil.

^b Basic Health Sciences Department, Universidade Estadual de Maringa, Parana, Brazil, Av. Colombo, 5790, Maringa, PR, 87020900, Brazil.

Running Title: [RBC alloimmunization in MDS patients]

Keywords: blood group antigen, HLA, molecular matching, myelodysplastic syndrome, RBC alloimmunization.

Corresponding author: Gláucia Andréia Soares Guelsin

Complete postal address: Hemocentro-UNICAMP, Campinas State University. Rua Carlos Chagas, 480, Caixa Postal 6198, CEP 13081-970, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil. Telephone: (55 19) 3521-8749. Fax: (55 19) 3521-8600. e-mail: gguelsin@gmail.com.

Abstract

Background: Matching for Rh and K antigens has been used in an attempt to reduce antibody formation in patients receiving chronic transfusions but an extended phenotype matching including Fy^a and Jk^a antigens has also been recommended. This study was aimed to identify an efficient transfusion protocol of genotype matching for patients with myelodysplastic syndrome (MDS) or chronic myelomonocytic leukemia (CMML). Also, we examined a possible association of HLA class II alleles with RBC alloimmunization. We evaluated 43 patients with MDS undergoing transfusion therapy with and without antibody formation.

Materials and methods: We investigated antigen-matched RBC units for ABO, D, C, c, E, e, K, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Do^a, Do^b and Di^a on the patient samples and on the donor units serologically matched for them based on their ABO, Rh and K phenotypes and presence of antibody (ies). We also determined the frequencies of HLA DRB1 alleles in the alloimmunized and non-alloimmunized patients. **Results:** Seventeen of 43 patients presented discrepancies or mismatches for multiple antigens between their genotype-predicted profile and the blood units antigen

profile serologically matched for them. We verified that 36.8% of patients had more than one RBC alloantibody and 10.5% of patients presented autoantibodies. Although we were able to find a better match for the patients in our extended genotyped/phenotyped units, we verified that matching for Rh and K would be enough for most of the patients. We also observed an over representation of the *HLA-DRB1*13* allele in the non-alloimmunized group of patients with MDS.

Discussion: In our population molecular matching for C, c, E, e, K showed to reduce RBC alloimmunization in MDS patients. An association of *HLA-DRB1*13* and protection from RBC alloimmunization should be confirmed.

Introduction

The myelodysplastic syndromes (MDS), including the chronic myelomonocytic leukemia (CMML), are a group of heterogeneous clonal disorders caused by an intrinsic stem cell defect with a inherent propensity to the bone marrow failure and ultimately transform to acute myeloid leukemia (AML). The bone marrow failure results in the transfusion dependence and neutropenic infection that characterizes the disease¹. Anemia is present in more than 80% of these patients² and treatment is often restricted to lifelong supportive therapy with red blood cell (RBC) transfusions³. Although blood transfusion is generally safe, many of those patients are at risk of transfusion-related complications such as iron overload and RBC alloimmunization. This often makes finding compatible RBC products difficult and

can be associated with delayed hemolytic transfusion reactions (DHTRs) and autoantibody formation⁴⁻⁶. Matching for Rh and K antigens has been used in an attempt to reduce antibody formation in patients receiving chronic transfusions but an extended phenotype matching to include Fy^a, Jk^a and S antigens has also been advocated by some authors^{7,8}. Molecular DNA-based methods, including array-based RBC genotyping platforms, have been provided an excellent tool to perform large-scale testing on numerous antigens simultaneously. This allows for efficient extended phenotype matching of donors and patients⁹⁻¹¹. This technology has been shown to improve transfusion therapy in patients with Sickle Cell Disease (SCD) by decreasing the risk of transfusion reactions, especially delayed transfusion reactions to existing alloantibodies and preventing alloimmunization. However, few studies are being performed in patients with MDS¹²⁻¹⁴.

An interesting data is that not all patients develop alloantibodies following exposure to transfused RBCs¹⁵. A recent mathematical modeling study has supported the hypothesis that alloimmunized patients represent a genetically distinct group with an increased susceptibility to RBC sensitization¹⁶. Knowledge of clinical conditions that predispose to alloimmunization is important because it may influence the management of a patient. If a certain category of patients has a high risk of alloimmunization, the consequence could be more extensive antigen typing and matching¹⁷. Polymorphisms in MHC-type, CD4+, T-cell, B-cell and cytokine can all contribute to the presentation and recognition of foreign antigens resulting in antibody production¹⁸. Studies have identified possible relationships between the HLA-DRB-restriction sites and alloimmunization to RBC antigens. HLA II genotype

of the patient is shown to be a key predictor of an individual's response to RBC antigens and is likely to influence predisposition to the RBC antibody responder status¹⁹⁻²².

In order to identify an efficient transfusion protocol of genotype matching for patients with MDS, we retrospectively analyzed RBC alloantibodies detected and identified in serum from patients with MDS and evaluated the usefulness of blood group antigen genotyping to provide a means to precisely genotype/phenotype match donor blood units to the antigen-negative profile of the patients. We also examined a possible association of HLA class II alleles with susceptibility or protection to RBC alloimmunization in patients with MDS.

Materials and Methods

Patients

We evaluated 43 patients self-identified as Caucasians with MDS undergoing transfusion therapy with and without RBC alloimmunization. The diagnosis was according to the WHO 2008 classification of myeloid neoplasm²³. The patients agreed to participate in this study by signing an Institute Review Board approved informed consent form. All patient DNA samples were genotyped for RBC and HLA genes.

Controls

The control group consisted of 151 DNA samples from blood donors from a blood bank inventory previously genotyped for RBC blood group antigen alleles and 427

blood donors from a bone marrow bank previously genotyped for HLA genes. They were used to determine the genotype frequencies in this population. Control subjects were healthy and randomly selected. There were no significant regional or ethnic differences between the patients and control groups. The donors agreed to participate in this study by signing an Institute Review Board approved informed consent form.

DNA preparation

The genomic DNA was extracted from leucocytes by manual spin column separation (QIAmp, Qiagen, Valencia, CA), according to the manufacturer's instructions and eluted into 100 μ L of buffer. The DNA concentration and purity of each sample was calculated by the measurement of optical density at 260 and 280 nm and an 8 μ L aliquot of 10 ng of gDNA, was transferred for the polymerase chain reaction (PCR).

RBC genotyping

DNA array analysis

RBC genotyping on patient and donor DNA samples were performed by using the Human Erythrocyte Antigen (HEA) BeadChip containing probes directed to polymorphic sites in *RHCE*, *FY* (including *FY-GATA* and *FY265*), *DO* (including *HY* and *JO*), *CO*, *DI*, *SC*, *GYPA*, *GYPB* (including markers permitting the identification of U-negative and U-variant types), *LU*, *KEL*, *JK*, *LW* (BioArray Solutions, Immucor) for all controls, donors, and patients samples. The HEA BeadChipTM assay was performed in accordance to the manufacturer's instructions.

RHD genotyping

All donor and patient samples were analyzed for the presence of *RHD* in both intron 4 and exon 10 as previously reported²⁴. The other assays used were a PCR system using sequence-specific primers (SSP) that detects the common weak D types²⁵ and a multiplex PCR that detects the *RHD* gene hybrid alleles²⁶.

Molecular matching

We performed a molecular matching for D, C, c, E, e, K, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Do^a, Do^b and Di^a on the patient samples and on the donor units serologically matched for them based on their ABO, Rh and K phenotypes and presence of antibody (ies). Matches were first identified by ABO and RhD, then by C, c, E, e, K and then by the other antigens. The non-Rh antigens prioritized were: Fy^a, Jk^a, S and Di^a. An electronic link using a specific software developed in our laboratory between the blood donor units and the patients need was established allowing an automatic identification of the most compatible blood.

HLA genotyping

The HLA Classes I and II allele typing was conducted using the reverse sequence-specific oligonucleotide technique (rSSO; One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) with Luminex x Map technology (Luminex Corporation, Austin, USA). The *DRB1*13* group of alleles were also typed with High Definition Class II DRB1 Typing Test, for definition of alleles (rSSO; One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

The genotypic and allelic frequencies were obtained by direct counting on Excel spreadsheets (Microsoft® Office Excel 2003). A comparison of the genetic and allelic frequencies between patient group and control group was carried out. The comparison was performed using the Chi-square test or Fisher's exact test, where appropriate, using a 2x2 contingency table. Significant p value was corrected by the number of alleles studied in the locus minus one (p_c ; Bonferroni correction). Odds ratio values with 95% confidence interval were also calculated. The Arlequin computer program version 3.1 available at: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/> was used to see if the distributions of genes and alleles were in Hardy-Weinberg equilibrium²⁷.

Results

Patient population

We examined 43 clinical records of patients with MDS undergoing transfusion therapy phenotype matched for ABO, Rh (D, C, E, c, e) and K. Median age was 64 (range, 22–85) years; 23 were females and 20 were males.

Among the patients, 63% (27/43) were chronically transfused and received 6 or more RBC units in the last 3 months, while 37% (16/43) were episodically transfused and received 1 to 6 RBC units in the last 3 months. Nine of the 27 chronic patients and 7 of the 16 episodically transfused patients received at least one transfusion prior to initiation of Rh and K matching.

RBC alloimmunization

Among 43 transfused patients, 12 of 27 chronic (44%) and 7 of 16 episodic (44%) were alloimmunized (Table I). Twenty-four patients (39%) were non alloimmunized. The non alloimmunized patients received a median of 50 RBC units (range: 5-255 units) and the alloimmunized patients received a median of 65 units (range: 4-604 units) ($P>0,05$).

The antibodies identified in the serum of the alloimmunized patients are shown in Table II. There were 10 alloantibodies, occurring alone or in combinations, detected among the 19 alloimmunized patients with MDS. Forty-seven percent of the patients presented one antibody against Rh antigens. Two or more antibodies were found in 37% of patients in association with at least one Rh antibody. Three patients who received Rh and K matched units only, had other antibody specificities (1 anti-S, 1 anti-Di^a and 1 anti-Lu^a). Six (32%) of the alloimmunized patients and 4 (17%) of the non-alloimmunized patients had autoantibodies.

RBC genotyping

The RBC blood group antigen allele frequencies were compared between the 2 groups (MDS patients and donors) and no significant differences were observed. The most common extended phenotype predicted from the genotype found in the patients was D+C+c+E-e+ (R1r), K-, Fy(a+b+), Jk(a+b+), M+N+S-s+.

We found 4 patients with RH variants (1 *RHD*weak D type 2*, 1 *RHD*weak D type 4.0*, 1 *RHD*DV.1* and 1 *RHD*DVI.1*).

Molecular matching

Of the 43 MDS patients studied, 17 presented discrepancies or mismatches for multiple antigens between their genotype profile and the blood units antigen profile serologically matched for them. The main discrepancies or mismatches occurred in RH, FY, JK and MNS systems. We found discrepancies between the previous phenotype and genotype-derived phenotype in 4 alloimmunized patients chronically transfused who were not having a good in vivo RBC survival as assessed by decreases in their hemoglobin levels and increased frequency of transfusions (Table III). The patients who presented discrepancies between the phenotype and genotype had been receiving transfusion more frequently than those who did not present discrepancies, and were the only ones that had received transfusion in the last 3 months or less. We found mismatches for multiple antigens in 13 patients receiving blood units matched for ABO, Rh and K.

HLA genotyping

HLA allele frequencies were compared between the 2 groups (MDS patients and donors) and no significant differences were observed, what means that none HLA allele was associated with the MDS in the studied group.

Besides, we observed that the *HLA-DRB1*13* allele was present in 15% of non-alloimmunized patients and in 0% of alloimmunized ($P=0.0137$; $OR=0.16$; $CI=0.02-1.35$) patients (Table IV). However, the p value lost significance after Bonferroni correction probably due to the small sample size. To determine which *DRB1*13* allele could be associated with a possible protection against immunization, *HLA-*

*DRB1*13* genotype were determined at the allelic level. We found three *HLA-DRB1*13:01*, two *HLA-DRB1*13:02* and two *HLA-DRB1*13:03*.

Discussion

We report here our experience with MDS patients undergoing transfusion therapy phenotype matched for Rh (D, C, c, E, e) and K. Few studies have characterized the alloimmunization in those patients and in our study, 44% of the patients were alloimmunized to RBC antigens. The main alloantibodies detected were against Rh and Kell antigens due to previous transfusions not Rh and K matched or RhD variants. The most prevalent antibody found in those patients was anti-E (32%), what is consistent with other authors who also found a high prevalence of anti-E in patients with MDS^{3,28}. The high prevalence of anti-E in our population of patients is explained by the lack of the E antigen in the majority of patients.

Some authors reported that the alloimmunization risk increases with an increasing number of transfusions^{17,29,30,31}. In this study the number of RCB units transfused in the alloimmunized and non-alloimmunized MDS patients was basically the same, demonstrating that in our patients the number of units transfused did not affect the RBC alloimmunization. Indeed, the *HLA-DRB1*13* allele was identified as a possible protection factor to RBC alloimmunization as this allele was present in 15% of non-alloimmunized MDS patients and in none alloimmunized patient. However, high resolution HLA genotyping revealed that there was not a predominance of a specific *HLA-DRB1*13* allele in the non-alloimmunized patients.

Several studies have associated RBC alloimmunization for specific antigens with different *HLA-DRB1* alleles. Chiaroni and Cols (2006) showed that *HLA-DRB1*11* and *HLA-DRB1*13* were associated with the risk of anti-K alloimmunization³². In contrast, we observed that *HLA-DRB1*13* could be associated with protection of alloimmunization for different RBC antigens in patients with MDS. Another study related numerous HLA-DRB1 molecules with anti-K alloimmunization, but not with a specific allele, demonstrating a high degree of histocompatibility promiscuity, corresponding to the predominant molecules in the Caucasian population²². In patients alloimmunized to Fy^a antigen *HLA-DRB1*04* and *DRB1*1501* were shown to be overrepresented^{22,33} and *HLA-DRB1*0101*, *DRB1*0102*, and *DRB1*1001*, appeared to be overrepresented in Jk^a immunized patients²⁰. These data suggest that beyond the direct link between HLA II and antigen specificity, HLA alleles may also modulate alloimmunization at a non-antigen specific level¹⁸.

A limitation of our study is the very small casuistic and therefore larger studies are necessary to identify possible risk factors to RBC alloimmunization in patients with MDS and to corroborate our findings about association of HLA alleles with alloimmunization.

In this study, we performed Rh and K genotyping instead of RBC phenotyping because many MDS patients have already been transfused when chronic transfusion-dependence was first detected. When we applied the molecular-matching on the 43 MDS patients we found discrepancies or mismatches for multiple antigens between their genotype profile and the blood units antigen profile serologically matched for them. Molecular testing indicated that mistyping by

hemagglutination in recently transfused patients was the source of the discrepancies. We were also being able to identify RH variants that would never being identified by serology in 4 patients and distinguished between alloantibodies from autoantibodies. In fact, 2 patients who were alloimmunized to Rh antigens presented discrepancies between their phenotype and genotype and 2 patients were partial D. Although we were able to find a better match for the patients in our extended genotype-typed units, molecular matching for Rh and K would have prevented antibody formation in 68% of the alloimmunized patients. This observation is consistent with that found by Sanz et al, 2013 on RBC alloimmunization in transfused patients with MDS/CMML, in whom 62% of the alloimmunized patients formed antibodies against Rh and K³⁴.

In conclusion, this study provides data to support the utility of a limited genotype matching (Rh and K) in patients with MDS to prevent RBC alloimmunization.

Acknowledgments

We thank Ane Caroline Gaspardi, Kelyan Beltrani Torres and Debora Machado for technical assistance.

This study was supported in party by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant n^o 2010/06916-9 (GG), 2012/04651-3 (LC) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue.

The Authors declare no conflicts of interest

References

- 1) Barrett AJ, Sloand E. Autoimmune mechanisms in the pathophysiology of myelodysplastic syndromes and their clinical relevance. *Haematologica* 2009; **94**: 499-51.
- 2) Lucioni C, Finelli C, Mazzi S, Oliva ES. Costs and quality of life in patients with myelodysplastic syndromes. *Am J Blood Res* 2013; **3**: 246-59.
- 3) Stiegler G, Sperr W, Lorber C, et al. Red cell antibodies in frequently transfused patients with myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol* 2001; **8**: 330-3.
- 4) Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion* 1999; **39**: 763-71.
- 5) Aygun B, Padmanabhan S, Paley C, Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. *Transfusion* 2002; **42**: 37-43.
- 6) Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev* 2007; **21**: 58-71.
- 7) Shirey RS, Boyd JS, Parwani AV, et al. Prophylactic antigen-matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management. *Transfusion* 2002; **42**: 1435-41.
- 8) Castro O, Sandler SG, Houston-Yu P, Rana S. Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. *Transfusion* 2002; **42**: 684-90.
- 9) Avent ND. Large scale blood group genotyping. *Transfus Clin Biol* 2007; **14**:10-5.
- 10) Denomme GA, Johnson ST, Pietz BC. Mass-scale red cell genotyping of blood donors. *Transfus Apher Sci* 2011; **44**: 93-9.
- 11) Hashmi G, Shariff T, Zhang Y, et al. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion* 2007; **47**: 736-47.
- 12) Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, et al. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang* 2009; **97**: 147-52.

- 13) Castilho L, Rios M, Bianco C, et al. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion* 2002; **42**: 232-8.
- 14) Noizat-Pirenne F, Tournamille C. Relevance of RH variants in transfusion of sickle cell patients. *Transfus Clin Biol* 2011; **18**: 527-35.
- 15) Bao W, Zhong H, Li X, et al. Immune regulation in chronically transfused allo-antibody responder and nonresponder patients with sickle cell disease and β -thalassemia major. *Am J Hematol* 2011; **86**:1001-6.
- 16) Bao W, Yu J, Heck S, Yazdanbakhsh K. Regulatory T-cell status in red cell alloimmunized responder and nonresponder mice. *Blood* 2009; **113**: 5624-27.
- 17) Bauer MP, Wiersum-Osselton J, Schipperus M, et al. Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion. *Transfusion* 2007; **47**: 2066-71.
- 18) Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood* 2012; **120**: 528-37.
- 19) Fu XT, Bono CP, Woulfe SL, et al. Pocket 4 of the HLA-DR(alpha, beta 1*0401) molecule is a major determinant of T cell recognition of peptide. *J. Exp. Med* 1995; **181**: 915-26.
- 20) Reviron D, Dettori I, Ferrera V, et al. HLA-DRB1 alleles and Jka immunization. *Transfusion* 2005; **45**: 956-59.
- 21) Chiaroni J, Dettori I, Ferrera V, et al. HLA-DRB1 polymorphism is associated with Kell immunization. *Br J Haematol.* 2006; **132**: 374-8.
- 22) Noizat-Pirenne F, Tournamille C, Bierling P, et al. Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion* 2006; **46**: 1328-33.
- 23) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th edn. Geneva, WHO Press; 2008.
- 24) Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000; **95**: 12-8.

- 25) Muller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion* 2001; **41**: 45-52.
- 26) Maaskant-Van Wijk PA, Faas BH, De Ruijter JA, et al. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion* 1998; **38**: 1015–21.
- 27) Svejgaard A, Jersild C, Nielsen S, Bodmer WF. HLA and disease. Statistical genetic consideration. *Tissue Antigens* 1974; **4**: 95-105.
- 28) Baby M, Fongoro S, Cissé M, et al. Frequency of red cell alloimmunization in polytransfused patients at the university teaching hospital of Point G, Bamako, Mali. *Transfus Clin Biol* 2010; **17**: 218-22.
- 29) Murao M, Viana MB. Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(5):675-82.
- 30) Cox JV, Steane E, Cunningham G, Frenkel EP. Risk of alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. *Arch Intern Med* 1988;**148**:2485-9.
- 31) Zalpuri S, Zwaginga JJ, le Cessie S, et al. Red-blood-cell alloimmunization and number of red-blood-cell transfusions. *Vox Sanguinis* 2012;**102**:144-9.
- 32) Chiaroni J, Dettori I, Ferrera V, et al. HLA-DRB1 polymorphism is associated with Kell immunization. *Br J Haematol* 2006;**132**:374–8.
- 33) Picard C, Frassati C, Basire A, et al. Positive association of DRB1*04 and DRB1*15 alleles with Fya immunization in a Southern European population. *Transfusion* 2009; **49**: 2412-7.
- 34) Sanz C, Nomdedeu M, Belkaid M, et al. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leucemia. *Transfusion* 2013; **53**: 710-5.

Tables

Table I: Chronic and episodic transfusions among 43 MDS patients.

	Chronic transfusion	Episodic transfusion	<i>P</i>	Median
	n (f)	n (f)		RBC units
Alloimmunized	12 (0.44)	7 (0.44)	ns	65
Non Alloimmunized	15 (0.56)	9 (0.56)	ns	50
	27	16		

n= number of patients; f= frequency; ns= not significant.

Table II: Alloantibodies present in 19 multi-transfused MDS patients.

	Alloantibody	n	f
One antibody	anti-C	2	0.11
	Anti-E	6	0.32
	Anti-C ^w	1	0.05
	Anti-S	1	0.05
	Anti-Di ^a	1	0.05
	Anti-Lu ^a	1	0.05
Two antibodies	Anti-C, -E	1	0.05
	Anti-C, -e	1	0.05
	Anti-c, -E	1	0.05
	Anti-c, -Jk ^a	1	0.05
	Anti-E, -K	1	0.05
Multiple antibodies	Anti-C, -K, -Di ^a	1	0.05
	Anti-E, -Jk ^a , Di ^a	1	0.05
	Total	19	1

n= number of patients; f= frequency

Table III: Phenotype and genotype discrepancies results found on samples from 4 patients

GENOTYPE	PHENOTYPE			ANTIBODY
	RhE+e-	RhE+e+	RhE-e+	
<i>RHCE*Ee</i>	0	0	2	Anti-E
<i>JK*B/JK*B</i>	Jk(a+b-)	Jk(a+b+)	Jk(a-b+)	Anti-Jk ^a
	0	1	0	
<i>GYPB*ss</i>	S+s-	S+s+	S-s+	Anti-S
	0	1	0	

Table IV: Comparison of *HLA-DRB1* allele frequencies in alloimmunized and non-alloimmunized MDS patients.

<i>HLA-DRB1</i> alleles	Alloimmunized patients (n=19)		Non-Alloimmunized patients (n=24)		<i>P</i> value	OR	95% IC
	Number of alleles	f	Number of alleles	f			
<i>DRB1*01</i>	1	0.03	4	0.08	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*03</i>	3	0.08	5	0.10	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*04</i>	7	0.18	4	0.08	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*07</i>	8	0.21	5	0.10	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*08</i>	5	0.13	2	0.04	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*09</i>	2	0.05	2	0.04	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*10</i>	2	0.05	0	0.00	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*11</i>	3	0.08	7	0.15	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*12</i>	1	0.03	2	0.04	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*13</i>	0	0.00	7	0.15	0.0137	0.1583	0.01859-1.348
<i>DRB1*14</i>	2	0.05	1	0.02	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*15</i>	2	0.05	6	0.13	<i>ns</i>	-	-
<i>DRB1*16</i>	2	0.05	3	0.06	<i>ns</i>	-	-
Total	38	1	48	1			

n= number of alleles; f= allele frequency; OR=Odds Ratio; IC= Interval Confidence 95%; ns= not significant.