

**Universidade Estadual Paulista – UNESP
Faculdade de Medicina de Botucatu –
Divisão Hemocentro**

CARLA WOELKE CABESTRÉ

**Avaliação da correlação entre Aloimunização à
Antígenos Eritrocitários e Sistema de
Histocompatibilidade (HLA) em pacientes com
Doença Falciforme**

**BOTUCATU
2011**

CARLA WOELKE CABESTRÉ

**Avaliação da correlação entre Aloimunização à
Antígenos Eritrocitários e Sistema de
Histocompatibilidade (HLA) em pacientes com
Doença Falciforme**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientadora: Prof. Dra. Valéria Nogueira Dias Paes Secco

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Fabron Júnior

**BOTUCATU
2011**

Dedico este trabalho e esta conquista aos meus Pais, que tanto me apoiaram e que me deram o suporte que precisava para chegar até aqui. Agradeço a eles pela compreensão nas escolhas feitas por mim e pela formação humana e intelectual. Devo tudo a eles.

Ao meu namorado Douglas, por toda a paciência e compreensão. Dedico meu sucesso a ele.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela presença em minha vida, pela capacidade a mim conferida e por ter me iluminado e inspirado durante todo este trabalho.

À Dra. Valéria pela orientação e por todo conhecimento transmitido a mim durante este estudo. Por ter confiado em meu potencial e por todo apoio e compreensão que me dedicou.

Ao “Dr. Fabron” por ter confiado a mim seus conhecimentos e acreditado em meu trabalho. Agradeço a sua disponibilidade, dedicação em ensinar e pelas oportunidades dadas a mim.

Às amigas eternas que realizei na cidade de Botucatu: Juliane, Luciana e Aline. Sem o apoio e a ajuda dessas grandes amigas não poderia ter chegado até aqui.

À Adaíze e Denise, pessoas maravilhosas, um exemplo de carinho e companheirismo que me ajudaram muito. Nunca irei esquecer tudo o que fizeram por mim.

À Dra. Patrícia e toda a equipe da Agência Transfusional do Hemocentro de Botucatu pelo apoio na realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro de Marília pelo grande apoio e por ter permitido parte da realização técnica deste trabalho.

Aos diretores e à equipe do Laboratório de Imunologia de Marília (LIM), pela prestatividade e por terem me acompanhado na realização da parte técnica deste trabalho. Todos me deram total apoio para o término deste projeto.

Às profissionais do Laboratório de Imunohematologia do Paciente: Maria Inês Paravani e Ercena Inês Dotti pela compreensão e pelo apoio que dedicaram a este trabalho.

À minha tia Sonia Cabestré, pelas dicas, correções e pela força que me dedicou na realização da dissertação. Obrigada pelo carinho e pela dedicação.

Ao Marcelo Ruiz, diretor do Laboratório de Imunologia de Marília, que disponibilizou o Laboratório para a realização desta pesquisa.

À Sheila, minha companheira de trabalho, que me deu muito apoio e muita força nos momentos em que “bateu” o desespero no término do mestrado. Sempre será uma grande amiga!

Ao Dr. Wilson Baleotti Jr. pela amizade e pelos conselhos que sempre me deu para a minha vida profissional. Agradeço a você pelos ensinamentos desde a graduação, e por ter acompanhado a minha evolução profissional. Devo muito a você!

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.
(Chico Xavier)

Doença falciforme (DF) é a denominação usada para caracterizar uma doença causada pela presença de hemoglobina S (HbS) nas hemácias, ocorrido pela troca do aminoácido Valina pelo aminoácido Ácido Glutâmico na estrutura da cadeia β da Hb, originando uma Hb anormal, denominada HbS. Os indivíduos heterozigotos (que possuem uma cópia da HbS e outra HbA normal), geralmente, são assintomáticos. As formas sintomáticas da doença ocorrem em indivíduos homozigotos para a HbS (chamada de Anemia Falciforme) ou em casos de combinação da HbS com anormalidades hereditárias: hemoglobinopatia SC, hemoblobinopatia SD, S/beta-talassemia (S β). A transfusão é um componente vital no tratamento de algumas complicações agudas e crônicas da doença falciforme. No entanto, o uso crônico de transfusões de hemácias pode levar à aloimunização eritrocitária, o que pode dificultar o encontro de hemácias para novas transfusões e aumentar o risco de reações hemolíticas. Situados no braço curto do cromossomo 6, o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) compreende uma região de genes altamente polimórficos. As proteínas resultantes destes *loci* formam as moléculas do complexo HLA que são responsáveis pela apresentação de antígenos aos receptores de linfócitos T e B. Isto posto, o objetivo do estudo foi relacionar o perfil genotípico do sistema HLA de classe II (HLA-DRB1 e HLA-DQB1) com a aloimunização eritrocitária em pacientes com Doença Falciforme. Foram coletadas amostras de 47 pacientes com Doença Falciforme (18 adultos e 29 crianças), com faixa etária entre 1 a 58 anos, que apresentavam, ou não, anticorpos eritrocitários, e que são acompanhados no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA). Os exames imunohematológicos foram realizados no Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro da FAMEMA, através das seguintes técnicas: Tipagem Sanguínea ABO/RhD, Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI), Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI), Fenotipagem eritrocitária e Teste Direto da Antiglobulina. Os procedimentos para a genotipagem HLA Classe II foram realizados no Laboratório de Imunologia de Marília – LIM, utilizando as seguintes técnicas: Extração do DNA, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – SSP: Micro SSP (Single Specific Primer) Generic HLA Class II (DR/DQ), Eletroforese em gel de agarose. Os testes imunohematológicos mostraram uma taxa de aloimunização eritrocitária de 31,91 % (15/47). Vinte e quatro aloanticorpos eritrocitários foram identificados com 12 diferentes especificidades. Anticorpos dirigidos contra antígenos do sistema Rh representaram 54,17 % (13/24). Os resultados observados na genotipagem HLA-DRB1 mostraram que nos pacientes aloimunizados, os alelos mais frequentes (20%) foram DRB1*07 (p= 0,235) e DRB1*11 (p= 0,464). Nos pacientes não-alloimunizados, os alelos mais frequentes (14,06%) foram DRB1*03 (p= 0,298) e DRB1*11 (p= 0,464). Em relação à genotipagem HLA-DQB1, o alelo DQB1*03 foi o mais frequentemente encontrado, tanto nos pacientes aloimunizados (36,66%, p= 0,318) quanto nos pacientes não-alloimunizados (26,56%, p= 0,318). Pacientes aloimunizados apresentaram uma maior frequência (70%) do genótipo HLA-DQB1*03/02 (p= 0,024); já entre os pacientes não-alloimunizados o genótipo HLA-DQB1*03/05 apresentou maior frequência (31,25%). Embora não podemos concluir que haja uma relação do sistema HLA com a aloimunização eritrocitária, considerando a população estudada, o alelo DRB1*07 pode estar associado a uma predisposição à imunização em pacientes com doença falciforme.

Palavras-chave: Doença Falciforme. Aloimunização. MHC. Sistema HLA.

Sickle Cell Disease (SCD) is the denomination used to characterize a disease caused by the presence of hemoglobin S (HbS) in erythrocyte occurred by the exchange of the valine amino acid to acid glutamic amino acid in the structure of chain B of the Hb, originating a different Hb, denominated HbS. Heterozygous people (having a HbS copy and other normal HsA) usually are asymptomatic. The symptomatic forms of the disease occur in homozygous individuals for HbS (called Sickle Cell Anemia) or in cases of conjunction of HbS with hereditary abnormalities: SC hemoglobinopathy, SD hemoglobinopathy, S β -thalassemia. The transfusion is a vital component in the treatment of some acute and chronic complications of sickle cell disease. However, the chronic use of red blood cell (RBC) transfusions may lead to RBC alloimmunization, which can impede the meeting of the RBCs for new blood transfusions and increase the risk of hemolytic reactions. Situated in the short arm of chromosome 6, the genes of Major Histocompatibility Complex (MHC) comprises a region of genes highly polymorphic. The proteins resulting from these loci form the HLA complex molecules of which are responsible for presentation of antigens to T and B lymphocyte receptors. The objective of this study was to relate the profile system genotypic of HLA class II (HLA-DRB1 and HLA-DQB1) with RBC alloimmunization in patients with SCD. Samples were collected from 47 patients with sickle cell disease (18 adults and 29 children), with ages between 1 to 58 years, which presented, or not, erythrocyte antibodies, and which are accompanied by the hemocenter of "Faculdade de Medicina de Marília" (FAMEMA). Immunohematological tests were performed in the immunohematology laboratory of FAMEMA's hemocenter, through the following techniques: ABO/RhD blood typing, irregular antibodies search, identification of the irregular antibodies, RBC phenotyping and antiglobulin direct test. The procedures for HLA typing class II were performed in "Laboratório de Imunologia de Marília - LIM", using the following techniques: DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) - SSP: micro SSP (single specific primer) generic HLA class II (DR/DQ), electrophoresis on agarose gel. Immunohematological tests showed a RBC alloimmunization rate of 31.91% (15/47). Twenty four RBC alloantibodies were identified with 12 different specificities. Antibodies directed against antigens of Rh system represented 54.17% (13/24). The results observed in genotyping HLA-DRB1 showed that in alloimmunized patients, alleles more frequent (20%) were DRB1*07 ($p= 0.235$) and DRB1*11 ($p= 0.464$). In non-alloimmunized patients, the most frequent alleles (14.06%) were DRB1*03 ($p= 0.298$) and DRB1*11 ($p= 0,464$). For genotyping HLA-DQB1, the allele DQB1*03 was the most frequently found, both in alloimmunized patients (36.66%, $p= 0.318$) as in non-alloimmunized patients (26.56%, $p= 0.318$). Alloimmunized patients presented higher frequency (70%) of genotype HLA-DQB1*03/02 ($p= 0.024$); while among non-alloimmunized patients, the genotype HLA-DQB1*03/05 presented higher frequency (31.25%). Although we cannot conclude that there is a relationship between the HLA system with RBC alloimmunization, whereas the population studied, the allele DRB1*07 may be associated with a predisposition to immunization in patients with SCD.

Key-words: Sickle Cell Disease. Alloimmunization. MHC. HLA system.

FIGURAS

Figura 1 - Mapa da região HLA24

Figura 2 - O complexo HLA e a estrutura das moléculas do HLA25

Figura 3 - Ativação dos linfócitos T e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos26

Figura 4 - Perfil de Imunoglobulinas.....39

Figura 5 – Kit *illustra blood genomicPrep Mini Spin*41

Figura 6 - Microplaca PCR-SSP43

Figura 7 - Cuba para Eletroforese44

Figura 8 - Transiluminador45

Figura 9 - Ilustração para interpretação dos resultados obtidos após a eletroforese
em gel de agarose.....46

Figura 10 - Foto do gel após visualização no transiluminador47

QUADRO

Quadro 1 - Termociclagem: PCR-SSP43

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Alelos HLA-DRB1 mais frequentes em uma população sadia.....54

Gráfico 2 - Alelos HLA-DQB1 mais frequentes em uma população sadia.....57

Gráfico 3 - Genótipos HLA-DQB1 de 44 indivíduos em uma população sadia57

Tabela 1 - Composição normal da Hemoglobina em adultos	20
Tabela 2 – Especificidade, número e frequência dos aloanticorpos eritrocitários identificados em 15 pacientes com Doença Falciforme.....	50
Tabela 3 - Resultados da genotipagem HLA-DRB1 em 47 pacientes com Doença Falciforme: aloimunizados e não-alloimunizados para antígenos eritrocitários.....	53
Tabela 4 - Resultados da genotipagem HLA-DQB1 em 47 pacientes com Doença Falciforme: aloimunizados e não-alloimunizados para antígenos eritrocitários.....	55
Tabela 5 - Genótipos HLA-DQB1 mais frequentes em pacientes com Doença Falciforme: aloimunizados e não-alloimunizados a antígenos eritrocitários.....	56

Resumo

Abstract

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

1 Introdução.....	19
2 Objetivos	29
2.1 Gerais.....	30
2.2 Específicos	30
3 Casuística e Método.....	31
3.1 Comitê de Ética em Pesquisa	32
3.2 Amostragem	32
3.3 Análise Estatística	32
3.4 Metodologia.....	33
3.4.1 Técnicas Imunohematológicas	33
3.4.2 Técnicas para genotipagem HLA, Classe II	40
4 Resultados e Discussão	48
5 Conclusões	58
Referências.....	60
Anexos	65
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	66
Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (modelo)	67

Doença falciforme (DF) é a denominação usada para caracterizar um grupo de doenças em cujas hemácias há pelo menos uma molécula de hemoglobina S (HbS) (ANVISA, 2002; CANÇADO, 2007). A hemoglobina (Hb) é constituída de ferro (heme) e quatro cadeias protéicas (globinas). Os tipos de cadeias de globinas determinam os tipos de hemoglobinas (Tabela 1) (ELGHETANY e BANKI, 2007 apud ROSEFF, 2009). A HbS ocorre devido a uma mutação de ponto (GAG->GTG) no gene da globina beta da Hb originando uma hemoglobina anormal, denominada HbS, ao invés da hemoglobina normal denominada hemoglobina A (HbA) (ANVISA, 2002; CANÇADO, 2007).

Tabela 1 - Composição normal da Hemoglobina em adultos – 2009*

Hemoglobina	Composição	Percentual (%)
Hgb A	$\alpha_2\beta_2$	96–98
Hgb A2	$\alpha_2\delta_2$	1.5–3.5
Hgb F	$\alpha_2\gamma_2$	<1

Fonte: Roseff, 2009

* Adaptado pela autora.

A Anemia Falciforme (AF), denominação reservada para a forma da doença que ocorre em homozigotos para a hemoglobina S (Hb SS), é descrita como a primeira “Doença” molecular identificada a partir da troca do aminoácido valina pelo ácido glutâmico na estrutura da cadeia β da hemoglobina (FRENETTE E ATWEH, 2007 apud ROSEFF, 2009) com consequente modificação físico-química na molécula (ANVISA, 2002). Como resultado desta mudança, num ambiente de baixa oxigenação, as hemácias se polimerizam e assumem a forma de "foice". A alteração que ocorre na estrutura das hemácias pode levar à oclusão crônica de vasos sanguíneos, fenômeno conhecido como vaso-oclusão, à redução do fluxo sanguíneo para os órgãos vitais, gerando isquemia e alterações no sistema imunológico. Além disso, as células anormais falciformes são prematuramente retiradas da circulação resultando em anemia hemolítica (VICHINSKY et al., 1990 apud ROSEFF, 2009).

Uma criança pode herdar duas cópias da hemoglobina S (homozigose), uma de ambos os pais, o que é designado como Hb SS, caracterizando a AF. Se uma criança herda uma única cópia de Hb S, por exemplo, da mãe, e uma cópia da

hemoglobina normal, Hb A, do pai, é então designado Hb AS, ou heterozigoto (portador). Os indivíduos heterozigotos, geralmente, são assintomáticos e apenas desenvolvem manifestações clínicas em circunstâncias raras, como hipóxia em altas altitudes (OGEDEGBE, 2002 apud ROSEFF, 2009).

Além disso, o gene da HbS pode combinar-se com outras anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD), beta-talassemia, entre outras, gerando combinações que também são sintomáticas, denominadas, respectivamente, hemoglobinopatia SC, hemoblobinopatia SD, S/beta-talassemia (S β). No conjunto, todas essas formas sintomáticas do gene da HbS, em homozigose ou em combinação, são conhecidas como doenças falciformes. Apesar das particularidades que diferenciam uma das outras e dos diferentes graus de gravidade, todas estas doenças têm um grande significado clínico, hematológico e epidemiológico (ANVISA, 2002; CANÇADO, 2007).

A AF teve sua origem na África e foi trazida às Américas pela imigração forçada dos escravos. No Brasil, sua distribuição abrange quase todos os estados, sendo mais frequente em locais cuja população de descendentes negros é maior (nordeste). Além da África e Américas, é hoje encontrada em toda a Europa e em grandes regiões da Ásia. No Brasil, a doença ocorre predominantemente entre negros e pardos, porém pode também ser encontrada entre os brancos. No sudeste do Brasil, a prevalência média de heterozigotos é de 2%, valor que atinge 6-10% entre os negros. Estimativas, com base na prevalência, permitem estimar a existência de mais de 2 milhões de portadores do gene da HbS no Brasil; mais de 8.000 são afetados com a forma sintomática da doença (HbSS). Estima-se o nascimento de 700 a 1.000 novos casos anuais de anemia falciforme no país, sendo considerada, portanto, um problema de saúde pública no Brasil (ANVISA, 2002; CANÇADO, 2007).

Destaca-se que a transfusão é um componente vital no tratamento de algumas complicações agudas (crise aplástica, síndrome torácica aguda e acidente vascular cerebral) e crônicas (insuficiência cardíaca e na profilaxia de acidente vascular cerebral) da AF (VICHINSKY et al., 1990 apud ROSEFF, 2009). Estima-se que cerca de 20% a 30% dos pacientes com AF são mantidos em regime crônico de transfusão de hemácias (CANÇADO, 2007). No entanto, múltiplas transfusões podem levar à sensibilização dos pacientes que passam a desenvolver anticorpos eritrocitários irregulares (aloanticorpos) contra antígenos de superfície das células

alogênicas (OLIVEIRA e SELL, 2002). Tais anticorpos são chamados de irregulares porque apenas 0,3% a 2,0% da população geral têm testes de triagem positivos em sua detecção (GIRELLO, 2007).

A taxa de aloimunização eritrocitária em pacientes transfundidos cronicamente pode atingir 50%, entretanto, a incidência de anticorpos clinicamente relevantes em pacientes transfundidos, ocasionalmente, não é perfeitamente conhecida. Estima-se que cerca de 1% dos pacientes são sensibilizados a cada unidade de hemácias transfundida (BORDIN, 2007). É importante lembrar que a taxa de aloimunização eritrocitária pode diferir entre regiões ou países, devido as diferenças entre o padrão fenotípico eritrocitário da população de doadores e dos receptores. O risco de aloimunização depende do número (volume) e frequência de transfusões, imunogenicidade do antígeno e da resposta imune do receptor (VICHINSKY et al., 1990, MOREIRA et al., 1996, CAMPBELL-LEE, 2007 apud BORDIN, 2007).

A taxa de aloimunização contra hemácias em pacientes com DF varia entre 3% a 50% e a maioria dos aloanticorpos está relacionada com os sistemas Rh, Kell, Duffy ou Kidd (WAYNE et al., 1993, VICHINSKY, 2001 apud FABRON et al., 2004). No Brasil, dois estudos mostraram uma taxa de aloimunização que variou de 12,9% a 20,8%, sendo a maioria dos aloanticorpos de especificidade anti-Rh e anti-Kell (MOREIRA et al., 1996; FABRON et al., 2004). Quando a fenotipagem eritrocitária não é realizada, a taxa de aloimunização varia entre adultos e crianças, sendo 29 % em crianças e 47 % em adultos com doença falciforme (AYGUN et al., 2002 apud FABRON et al., 2004).

Segundo Moreira *et al.* (1996), o risco de aloimunização por unidade de hemácias transfundida é de 1,15% em pacientes com DF no Brasil. Além disso, essa taxa é similar ou menor do que em outros grupos de pacientes com doenças hematológicas, ou não, que necessitam de múltiplas transfusões sanguíneas (LOSTUMBO, 1966, FLUIT, 1990, MERIANOU, 1987 apud MOREIRA, 1996).

A transfusão de hemácias em pacientes com DF visa, principalmente, melhorar a capacidade de oxigenação e o fluxo sanguíneo microvascular, aumentando o nível do hematócrito e diminuindo a percentagem de hemoglobina S - HbS (WAYNE et al., 1993 apud MOREIRA et al., 1996).

Os tipos sanguíneos são determinados pela presença, ou não, na superfície das hemácias, de antígenos que podem ser de natureza bioquímica variada, como: carboidratos, lipídeos, proteínas ou uma mistura destes compostos. Estes antígenos eritrocitários são independentes dos antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), o qual determina a histocompatibilidade humana, ou a identidade imunológica do indivíduo. O MHC é expresso por um conjunto de proteínas de superfície celular e também pode ser denominado de antígenos leucocitários humanos (HLA). O HLA, juntamente com o complexo de histocompatibilidade secundário, estão diretamente relacionados à resposta imunológica, garantindo a manutenção da integridade dos tecidos. Quando um organismo é exposto a antígenos estranhos ocorre a interação destes com as proteínas do sistema HLA das células apresentadoras de antígenos (CAA). O produto desta interação permite o reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T, CD4 ou CD8 com consequente ativação e produção de mediadores celulares capazes de iniciar toda a resposta imunológica (REISER, 1996 apud LANDI, 1999). Então, a função básica do sistema HLA na resposta imunológica é promover o reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos T (FRAGA e NEUMANN, 1998 apud OLIVEIRA e SELL, 2002).

Situados no braço curto do cromossomo 6, o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) compreende uma região de genes altamente polimórficos que desempenham um papel de grande importância no sistema imunológico humano. As proteínas resultantes destes *loci* são responsáveis pela apresentação de antígenos aos receptores de linfócitos T e B e estão situadas na membrana celular de quase todas as células do sistema imune. Elas formam as moléculas do complexo HLA, que é um dos principais determinantes da histocompatibilidade em transplantes, incluindo os de medula óssea (Centro de Diagnóstico do GACC; OLIVEIRA e SELL, 2002).

A Figura 1, a seguir, ilustra as classes I, II e III do sistema HLA.

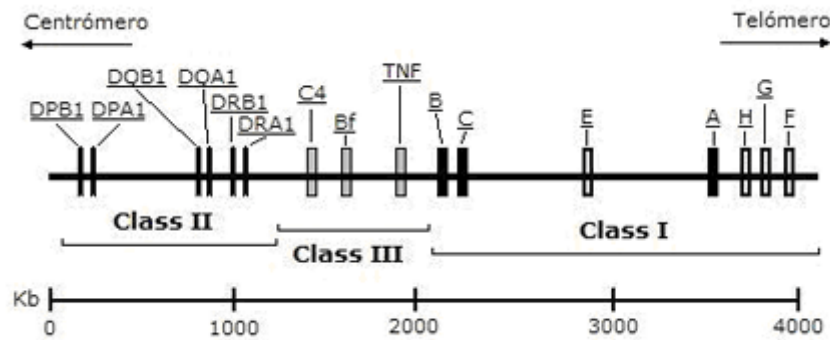


Figura 1 - Mapa da região HLA (banda 6p21.3 do cromossomo 6) Obs.: Os genes e pseudogenes não clássicos classe I estão representados por retângulos não preenchidos
 Fonte: site da Universidade da Madeira, Campus da Penteada, Funchal, Portugal.

O sistema HLA é constituído por 224 genes, dos quais 128 são genes funcionais e 96 são pseudogenes. Esse sistema contém aproximadamente quatro milhões de pares de base e seus genes encontram-se fisicamente agrupados dentro de três regiões distintas, denominadas classes I, II e III (MARSH et al., 2000 apud OLIVEIRA e SELL, 2002), de acordo com o demonstrado. A região classe I contém genes que codificam as moléculas clássicas HLA-A, HLA-B e HLA-C. A região classe II apresenta cinco *loci*, denominados DP, DN, DO, DQ e DR (BENDER, 1991 apud OLIVEIRA e SELL, 2002). A região classe III contém genes que codificam as moléculas do sistema complemento, as enzimas 21-hidroxilase (21B, 21A), a proteína do choque térmico (Hsp 70) e os fatores de necrose tumoral TNF α e β (NEPOM, 1998 apud DONADI, 2000). As moléculas classe I estão presentes em todas as células nucleadas e plaquetas. As moléculas classe II apresentam uma distribuição mais restrita, sendo encontradas apenas em linfócitos B, macrófagos, monócitos, células de Langerhans, células dendríticas, células endoteliais e linfócitos T quando ativados (PHELAN, 1999 apud OLIVEIRA e SELL, 2002). Essas moléculas são compostas por 2 cadeias diferentes (heterodímeros) formadas por uma cadeia α e uma β , ambas codificadas por genes situados no MHC, ou seja, no cromossomo 6, contendo 2 domínios α_1/α_2 e β_1/β_2 (conforme Figura 2). Para as moléculas HLA-DQ e HLA-DP, os domínios que apresentam maior polimorfismo são o α_1 e o β_1 , sendo que cada domínio contém cerca de 90 resíduos de aminoácidos. Já para as moléculas HLA-DR, o polimorfismo ocorre no domínio β_1 (FERNANDES et al., 2003).

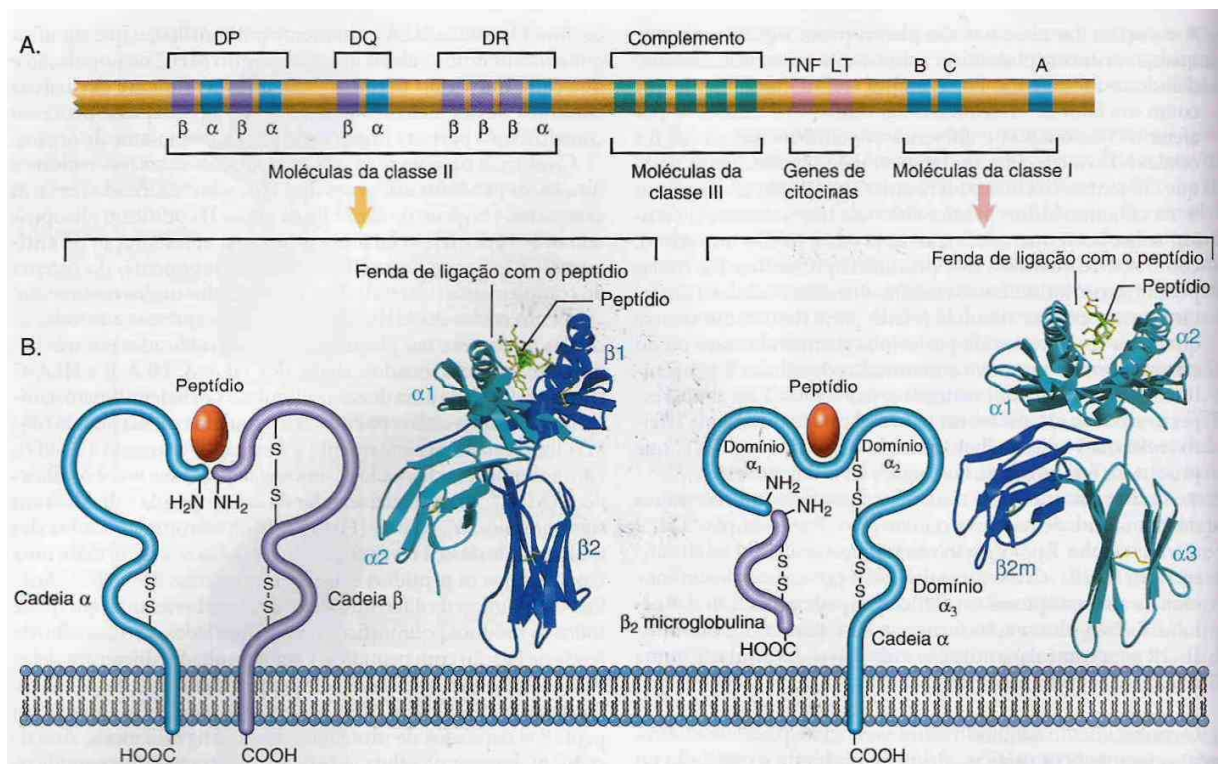


Figura 2 - O complexo HLA e a estrutura das moléculas do HLA, a) Representação da localização dos genes no complexo HLA; b) Diagramas esquemáticos e estruturas cristalinas de moléculas do HLA da classe I e da classe II

Fonte: Robbins & Cotran, Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Ed.7, 2005.

Uma vez que os alelos de classe II apresentam polimorfismo nas cadeias α e β , foram acrescentadas as letras A e B na denominação do alelo. Assim, o gene que codifica a molécula HLA-DR1 (definido pela sorologia) passou a ser denominado genericamente de HLA-DRB1*01, sendo a letra B representativa da cadeia β , altamente polimórfica nos genes HLA-DR (MARSH, 2002 apud ALVES et al., 2005; DONADI, 2000). O HLA classe II constitui no seu conjunto 1198 alelos diferentes já nomeados. O locus HLA-DRB1 possui 368 alelos, já o HLA-DQB1 possui 45 alelos (MARSH et al., 2010).

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

Nas transfusões sanguíneas, as células alogênicas do doador são responsáveis pela sensibilização do receptor. Os linfócitos T CD4 específicos recebem o primeiro sinal de ativação (via receptores de membrana) e outros estímulos complementares que levam à proliferação e à produção de citocinas. As citocinas induzem a expansão de clones de linfócitos T CD8 alorreativos e/ou a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. Os plasmócitos secretam anticorpos específicos para os determinantes antigênicos (Figura 3). Enquanto isso, células de memória, responsáveis pelas respostas anamnásticas, estão sendo formadas (TRINDADE e CAETANO, 2000 apud OLIVEIRA e SELL, 2002).

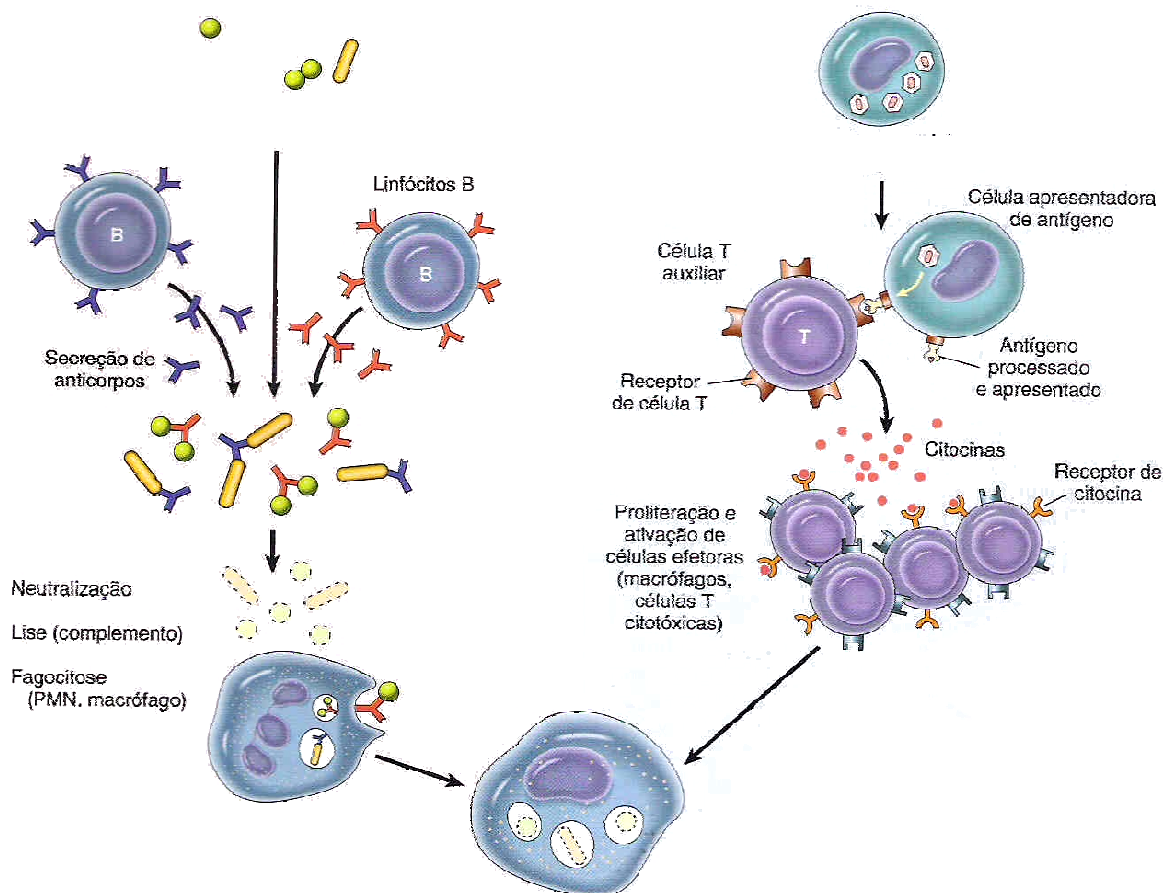


Figura 3 - Ativação dos linfócitos T e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos (secretam anticorpos específicos aos determinantes antigênicos)

Fonte: Robbins & Cotran, Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Ed.7, 2005.

Estudos têm demonstrado que o sistema de histocompatibilidade humano tem importância para a DF devido a sua relação com a predisposição à doenças secundárias (ALVES et al., 2005; HOPPE et al., 2003; STYLES et al., 2000). Segundo Alarif et al. (1986), pacientes com AF e com o genótipo classe I HLA-B35 possuem 6 vezes mais chances de formar aloanticorpos eritrocitários após transfusões sanguíneas do que pacientes sem este genótipo HLA.

O sistema Kidd (Jk) é um dos mais importantes sistemas de grupos sanguíneos na medicina transfusional. O fato de que a imunização não é sempre desenvolvida nos pacientes Jk(a-), que receberam pelo menos uma unidade de hemácia Jk(a+), sugere que a resposta ao antígeno Jk^a pode ser determinada por fatores genéticos individuais. Segundo Reviron et al. (2005), os alelos HLA-DRB1 podem influenciar o processo imunológico através da apresentação de peptídeos selecionados em sua molécula DR. Nesse estudo, o autor observou que a frequência do alelo HLA-DRB1*01 foi significativamente alta nos pacientes com anti-Jk^a, comparado com o grupo controle.

Um estudo comparando a predisposição genética HLA em pacientes imunizados com anti-K, mostrou uma alta frequência do HLA-DRB1*11 e HLA-DRB1*13 nos pacientes imunizados em relação ao grupo controle (CHIARONI et al., 2005).

Em um estudo realizado em 2006, Noizat-Pirenne et al. encontraram uma forte correlação entre o alelo HLA-DRB1*04 e a aloimunização ao antígeno Fy^a. Recentemente, Chu *et al.* (2009) demonstraram uma frequência significativamente alta do HLA-DRB1*0901 em pacientes com anti-Mi^a.

No Brasil, em um estudo realizado com pacientes aloimunizados com o anticorpo anti-Di^a, os autores encontraram uma frequência alta do alelo HLA-DRB1*07, sugerindo que pode haver uma associação do HLA-DRB1*07 à imunização ao antígeno Di^a (BALEOTTI JR. et al., 2010).

Considerando que a correlação de um genótipo HLA com a aloimunização poderia constituir um primeiro passo na identificação de fatores de risco para aloimunização eritrocitária, como visto por Reviron et al. em 2005, optou-se, neste estudo, pela abordagem de pacientes com DF, relacionando o perfil genotípico do sistema HLA de classe II, através dos locus HLA-DRB1 e HLA-DQB1, e a presença, ou não, de aloimunização eritrocitária.

Dessa maneira, apresentam-se na sequência os objetivos, casuística e método, resultados e discussão e as conclusões do presente estudo.

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Relacionar o perfil genotípico do sistema HLA de classe II (HLA-DRB1 e HLA-DQB1) com a aloimunização eritrocitária em pacientes com Doença Falciforme.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar os pacientes com Doença Falciforme que são atendidos no ambulatório do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA);
- Verificar a presença de aloanticorpos eritrocitários no soro desses pacientes, através da Pesquisa de Anticorpos Irregulares (P.A.I.);
- Identificar as especificidades dos anticorpos eritrocitários detectados, através da Identificação de Anticorpos Irregulares (I.A.I.);
- Verificar a taxa de aloimunização em adultos e crianças com Doença Falciforme;
- Verificar a imunogenicidade dos anticorpos eritrocitários detectados nesses pacientes;
- Realizar a genotipagem HLA-DRB1 e HLA-DQB1 dos pacientes com Doença Falciforme;
- Comparar as frequências dos alelos HLA encontrados com os da população sadia de raça negra (controle).

3.1. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA (protocolo de estudo nº 285/10 – Anexo A). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para esta pesquisa (Anexo B).

3.2. AMOSTRAGEM

Em vista da dificuldade de abordagem dos pacientes, da aceitação dos mesmos na participação da pesquisa, e do tempo para a realização deste estudo, a dimensão da amostra possível foi de 47 pacientes.

Foram, então, coletadas amostras de 47 pacientes com diagnóstico de Doença Falciforme (18 adultos e 29 crianças), com faixa etária entre 1 a 58 anos e que apresentavam, ou não, anticorpos eritrocitários.

Os pacientes selecionados são tratados no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília e a abordagem deu-se nas datas agendadas como retorno para consulta. É importante deixar claro que não houve necessidade de convocar a presença de qualquer paciente: realizou-se a coleta com aqueles que estavam disponíveis no hemocentro e que concordaram em participar da pesquisa.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados deste estudo foi realizada através do Teste Qui-Quadrado para a verificação de associações significativas entre variáveis (software “Epi info versão 6”) e para a comparação das amostras com o padrão (software MiniTab). Considerou-se nível de significância de 5%, que mostra a diferença significativa em resultados associados em tabela 2x2 pelo cálculo do “qui quadrado” com 1 grau de liberdade (X^2_{1gl}). O valor de “p” (probabilidade de a diferença observada ser casual) considera significativo as diferenças que possuem $X^2_{1gl} > 3,841$ e $p \leq 0,05$.

3.4. METODOLOGIA

Na data do retorno agendada dos pacientes participantes da pesquisa foram coletadas amostras de sangue venoso em 3 tubos de 5mL: 2 tubos com anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), e 1 tubo sem adição de anticoagulante, o qual foi centrifugado a 3400rpm por 5 minutos para a separação do soro.

Na sequência estão demonstrados os procedimentos e as técnicas utilizadas.

3.4.1. Técnicas Imunohematológicas

Os exames imunohematológicos foram realizados no Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília, através das seguintes técnicas:

A. Tipagem Sanguínea ABO/Rh:

A tipagem sanguínea ABO/RhD foi realizada em todas as 47 amostras através da técnica de hemaglutinação em tubo.

- **TIPAGEM DIRETA (reagentes DiaMed):**

Anti-A - DiaClon Anti-A

Anti-B - DiaClon Anti-B

Anti-AB – DiaClon Anti-AB

Anti-D - DiaClon Anti-D

CRH - DiaClon Rhesus Control

Anti-D (policlonal) - para amostras com resultado negativo com o reagente Anti-D – DiaClon Anti-D.

Inicialmente realizou-se o processo de lavagem das hemácias: com o auxílio de uma pipeta foram acrescentados solução fisiológica 9% em um tubo com

500µL de papa de hemácias. Foi realizada centrifugação a 3400rpm durante 30 segundos, em seguida o sobrenadante foi desprezado e procedeu-se uma leve homogeneização do material que ficou no tubo. Todo esse processo foi realizado por três sucessivas vezes. Após a última lavagem, fez-se uma suspensão 5% das hemácias lavadas com solução fisiológica 9% (1 mL de solução fisiológica 9% e 50 µL da papa de hemácias lavadas). Os tubos foram identificados para os reagentes Anti-A, Anti-B, Anti-AB, Anti-D, e CRH. Foram pipetados 50µL de cada reagente em seu respectivo tubo; em seguida adicionou-se 50µL da suspensão de hemácias 5% em todos os tubos. Os tubos foram centrifugados por 15 segundos a 3400rpm para que fosse realizada a leitura. A interpretação dos resultados se dá pela presença ou não de aglutinação das hemácias (grumos).

- TIPAGEM REVERSA: foi realizada com o reagente Revercel (Hemácia A e Hemácia B) – Fresenius Kabi.

Identificou-se dois tubos para os reagentes Revercel A e Revercel B. Foram colocados 100µL do soro do paciente em cada tubo. Adicionou-se 50µL de cada reagente em seu respectivo tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 segundos a 3400rpm para que fosse realizada a leitura. A interpretação dos resultados se dá pela presença ou não de aglutinação das hemácias (grumos).

B. Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI):

A PAI foi realizada em todas as 47 amostras, através da técnica de hemaglutinação em tubo com um reagente potencializador: BioPeg (polietileno glicol + LISS) – Fresenius Kabi. As hemácias utilizadas na técnica foram: Triacel I e II (Fresenius Kabi).

Dois tubos foram identificados para os reagentes Triacel I e Triacel II. Foram pipetados 100µL do soro dos pacientes em cada tubo. Adicionou-se 50µL de cada reagente em seu respectivo tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados

por 15 segundos a 3400rpm para a leitura. Após a centrifugação, foram adicionados 100µL do reagente BioPeg em cada tubo; posteriormente, os tubos foram colocados em banho-maria 37°C por 15 minutos. A reação foi lavada 3 vezes com solução fisiológica 9%: com o auxílio de uma pipeta acrescentou-se solução fisiológica 9% nos dois tubos. Foi realizada centrifugação a 3400rpm durante 30 segundos, em seguida o sobrenadante foi desprezado e procedeu-se uma leve homogeneização do material decantado. Todo esse processo foi realizado por três sucessivas vezes.

Por último, foram acrescentados 100µL do reagente Coombs Direto soro anti-humano: soro anti-gama e não gama globulinas humanas (Fresenius Kabi). Novamente os tubos foram centrifugados por 15 segundos a 3400rpm para que fosse realizada a leitura. A interpretação dos resultados se dá pela presença ou não de aglutinação das hemácias (grumos).

C. Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI):

Amostras com resultados positivos na pesquisa de anticorpos irregulares (presença de aglutinação das hemácias) foram processadas para a identificação dos anticorpos irregulares. Foram utilizadas técnicas de gel-centrifugação: ID-DiaPanel (cartão LISS/Coombs) e ID-DiaPanel-P (cartão NaCl, teste enzimático e aglutininas frias) – DiaMed-ID; e em alguns casos o Painel de Hemácias – Fresenius Kabi para a técnica de hemaglutinação em tubo.

• TÉCNICA DE GEL-CENTRIFUGAÇÃO EM MEIO ENZIMÁTICO (ID-DIAPANEL-P):

Os reativos e amostras de sangue foram deixados à temperatura ambiente por 10 minutos, antes do uso. Dois cartões NaCl (DiaMed-ID) foram identificados com o nome/número do paciente e com os números de 1 a 6, 7 a 11, correspondente ao número de hemácias do ID-DiaPanel-P (DiaMed), e AC (autocontrole). Retirou-se a fita selante dos microtubos que foram utilizados e preparada uma suspensão de hemácias do paciente (autocontrole), utilizando 0,5mL

do ID Diluente – 1 DiaMed (Bromelina) e 50µL de sangue total ou 25µL de concentrado de hemácias do paciente, seguida da homogeneização. A suspensão de hemácias do paciente também poderia ter sido realizada com 1mL de ID Diluente – 2 DiaMed (LISS) e 10µL de concentrado de hemácias, adicionando depois ao microtubo 25µL de ID-Papain (DiaMed). Com o próprio conta-gotas do reagente foi colocada 1 gota das hemácias-testes do ID-DiaPanel-P (DiaMed) nos microtubos identificados como 1 a 11, observando a identificação destas hemácias com a numeração do microtubo correspondente. Após a homogeneização, foi pipetado 50µL da suspensão de hemácias do paciente no microtubo identificado como AC. Foi, então, adicionado 25µl do soro ou plasma do paciente em todos os microtubos, e, em seguida, as reações foram incubadas por 15 minutos em Banho-Maria seco a 37°C (ID-Incubator 37 SI DiaMed). Os cartões foram centrifugados na centrífuga ID-Centrifuge 24 S (DiaMed) para que fosse realizada a leitura.

Interpretação dos resultados: POSITIVO = células aglutinadas formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel; NEGATIVO = botão compacto de células no fundo do poço.

- TÉCNICA DE GEL-CENTRIFUGAÇÃO EM LISS/AGH (ID-DIAPANEL):

Os reativos e amostras de sangue foram deixados à temperatura ambiente por 10 minutos, antes do uso. Dois cartões DiaMed-ID LISS/Coombs foram identificados com o nome/número do paciente e com os números de 1 a 6, 7 a 11, correspondente ao número de hemácias do ID-DiaPanel-P (DiaMed), e AC (autocontrole). Foi retirada a fita selante dos microtubos que foram utilizados. Em um tubo devidamente identificado preparou-se uma suspensão, em LISS, de hemácias do paciente (autocontrole), utilizando: 1mL do ID-Diluente 2 DiaMed (LISS) e 10µl de concentrado de hemácias da amostra do paciente. Com o próprio conta-gotas do reagente foi colocada 1 gota das hemácias-testes do ID-DiaPanel (DiaMed) nos microtubos identificados como 1 a 11, observando a identificação destas hemácias com a numeração do microtubo correspondente. Após a homogeneização, foi pipetado 50µL da suspensão de hemácias em LISS no microtubo identificado como AC. Adicionou-se, então, 25µl do soro ou plasma do paciente em todos os

microtubos e, em seguida, as reações foram incubadas por 15 minutos em Banho-Maria seco a 37°C (ID-Incubator 37 SI DiaMed). Os cartões foram centrifugados na centrífuga ID-Centrifuge 24 S (DiaMed) para que fosse realizada a leitura.

Interpretação dos resultados: POSITIVO = células aglutinadas formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel; NEGATIVO = botão compacto de células no fundo do poço.

- TÉCNICA DE HEMAGLUTINAÇÃO EM TUBO:

Inicialmente, 12 tubos de hemólise foram identificados com o nome/número do paciente e com os números de 1 a 10 e cordão, correspondente ao número de hemácias do Painel de Hemácias (Fresenius Kabi) e AC. As hemácias do paciente foram lavadas 3 vezes com solução fisiológica 9%: com o auxílio de uma pipeta acrescentou-se solução fisiológica 9% em um tubo contendo 500µL da papa de hemácias do paciente. Realizou-se centrifugação à 3400rpm durante 30 segundos, em seguida o sobrenadante foi desprezado e procedeu-se uma leve homogeneização do material que restou no tubo. Todo esse processo foi realizado por três sucessivas vezes. Em seguida, foi preparada uma suspensão de hemácias a 5% (1mL de solução fisiológica 9% e 50µL da papa de hemácias lavadas) para autocontrole. Nos tubos previamente identificados foram pipetados 100µL do soro ou plasma do paciente. Adicionou-se 50µL das hemácias do Painel de Hemácias – Fresenius Kabi nos respectivos tubos 1 a 10 e cordão. No tubo AC foram colocados 50µL da suspensão de hemácias já preparada. Os tubos foram centrifugados 15 segundos a 3400rpm para a leitura. Posteriormente, adicionou-se aos tubos 100µL do reagente BioPeg, e esses foram incubados por 15 minutos em banho-maria 37°C.

As reações dos 12 tubos foram lavadas 3 vezes com solução fisiológica 9% (conforme descrito acima). Então, adicionou-se em todos os tubos 100µL do reagente Coombs Direto soro anti-humano: soro anti-gama e não gama globulinas humanas (Fresenius Kabi), e posteriormente estes foram centrifugados por 15 segundos a 3400 rpm para que fosse realizada a leitura.

D. Fenotipagem Eritrocitária:

A fenotipagem do sistema Rh e do antígeno Kell foi realizada em todas as amostras, utilizando a técnica de Gel centrifugação: cartão Rh-subgrupos+C^w+K (anticorpos humanos) C,C^w,c,E,e,K – DiaMed.

Inicialmente, os reagentes foram deixados à temperatura ambiente por 10 minutos. O cartão ID-Subgrupos Rh + C^w + Kell foi identificado com o nome/número do paciente. Um tubo de hemólise foi separado e identificado com nome/número do paciente; nele foi colocado 0,5mL de ID-Diluyente 1 DiaMed (Bromelina) e 25µl da papa de hemácias do paciente. Retirou-se a fita selante do ID cartão, seguiu-se com a pipetagem de 10µl da suspensão de hemácias preparada do paciente em cada microtubo do cartão. O cartão foi deixado 10 minutos à temperatura ambiente para que ocorresse a ação enzimática do ID-Diluyente. Posteriormente, o cartão foi centrifugado por 10 minutos na centrífuga ID-Centrifuge 24S (DiaMed) para que fosse realizada a leitura.

Interpretação dos resultados: POSITIVO = células aglutinadas formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel; NEGATIVO = botão compacto de células no fundo do poço.

As amostras nas quais foram realizadas a IAI foram fenotipadas para o antígeno contra o qual foi produzido o anticorpo.

E. Teste Direto da Antiglobulina (Coombs Direto):

Em todas as amostras foi realizado o teste de Coombs Direto (CD) com a técnica de hemaglutinação em tubo. Utilizou-se o Coombs Direto soro anti-humano: soro anti-gama e não gama globulinas humanas (Fresenius Kabi). Para controle do teste foi utilizada a hemácia Controcel (Fresenius Kabi).

As hemácias do paciente foram lavadas, no mínimo, 3 vezes com solução fisiológica 9%: com o auxílio de uma pipeta foram acrescentados solução fisiológica 9% em um tubo com 500µL de papa de hemácias. Realizou-se a centrifugação à

3.4.2. Técnicas para genotipagem HLA, Classe II

Os procedimentos para a genotipagem HLA - Classe II - dos 47 pacientes foram realizados no Laboratório de Imunologia de Marília – LIM, utilizando as seguintes técnicas:

A. Extração de DNA:

Utilizando o kit *illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit* (Figura 5), a extração de DNA, no método de coluna, foi realizada da seguinte maneira:

- Em um microtubo 1,5mL foram colocados 30µL de proteinase K, 250µL do creme leucocitário da amostra do paciente, e 400µL de tampão de Lise (*Lysis Buffer*). A reação ficou 10 minutos à temperatura ambiente, em seguida toda a reação foi transferida para a coluna. As células do sangue foram lisadas por um sal caotrópico em tampão de Lise na presença de proteinase K.
- O sal caotrópico em tampão de Lise promoveu uma seleção do DNA genômico que ficou retido na membrana de sílica da coluna. As proteínas desnaturadas foram coletadas, passando pela coluna durante a centrifugação (14000rpm por 1 minuto).
- Mais uma lavagem foi realizada com o tampão de Lise (500µL do tampão foi adicionado na coluna); as proteínas, juntamente com outros contaminantes, que estavam ligados à membrana do DNA genômico, foram removidos durante a centrifugação (14000rpm por 1 minuto).
- O tampão de lavagem (*Wash Buffer*), contendo etanol, foi adicionado na coluna (500µL); os resíduos de sal e de outros contaminantes foram removidos durante a centrifugação (14000rpm por 3 minutos).
- Água para injeção à 70°C foi adicionada na coluna, e após a centrifugação (14000 rpm por 1 minuto), o DNA genômico foi eluído.



Figura 5 – Kit *illustra blood genomicPrep Mini Spin*
Fonte: site da empresa GE Healthcare.

B. Reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase):

A metodologia da PCR-SSP está baseada no princípio em que oligonucleotídeos completamente pareados, são eficientemente utilizados na amplificação da sequência alvo com auxílio da enzima *Taq polimerase*. Pares de *primers* são desenhados para apresentar perfeito pareamento somente com a sequência de um alelo ou de um grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares de *primers* perfeitamente pareados amplificam a sequência alvo (isto é, resultado positivo); enquanto que pares de *primers* que não apresentam perfeito pareamento, não amplificam a sequência alvo (isto é, resultado negativo). Após o processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados pela intercalação do brometo de etídeo e, então, expostos à luz ultravioleta.

Antes da realização da técnica de PCR-SSP, a luz ultra Violeta (UV) da cabine de trabalho foi ligada por 15 minutos. Materiais e reagentes que foram separados para a realização da técnica: tampas seladoras para microplaca, “*worksheet*” (planilha de trabalho) SSP referente aos *loci* testados, enzima *Taq Polimerase Platinum* (Invitrogen), D-mix para PCR-SSP (One-Lambda), microplacas PCR do kit SSP Classe II (DR/DQ) (One-Lambda) e água para injeção. O reagente D-mix e as amostras de DNA dos pacientes foram deixados em temperatura

ambiente por 10 minutos, a *Taq Polimerase* foi mantida no gelo e a microplaca SSP no freezer -20°C. A *worksheet* foi preenchida com o nome e número da amostra do paciente, tipo de extração de DNA, posição da amostra na microplaca SSP, lote da *Taq Polimerase*, data e responsável pelo PCR-SSP. A película adesiva ou tampa seladora para microplaca PCR-SSP foi identificada com o número da amostra.

Em cada microplaca SSP foi possível realizar 3 PCR de 3 pacientes, conforme demonstrado na Figura 6. A tampa adesiva da microplaca SSP foi retirada e colada na respectiva *worksheet* o pedaço correspondente. A microplaca foi dividida com uma caneta retroprojeter de ponta grossa para 3 amostras (32 poços para cada amostra, com um controle negativo para cada amostra). Na alíquota de D-mix do kit foi adicionado 19,8µL de água para injeção e 2µL de *Taq Polimerase* (Mix PCR). Em seguida, foi pipetado 10µL do Mix-PCR na posição do Controle Negativo (poço marcado com um ponto vermelho na microplaca). Foi então adicionado 19,8µL de cada amostra de DNA no seu respectivo Mix-PCR (Mix-PCR-Amostra). Posteriormente, foi pipetado 10µL deste Mix-PCR-Amostra nas laterais dos poços da microplaca de PCR, exceto no Controle Negativo. A microplaca de PCR-SSP foi selada com a película adesiva identificada e encaminhada para o Termociclador (seguindo a termociclagem demonstrada no Quadro 1).

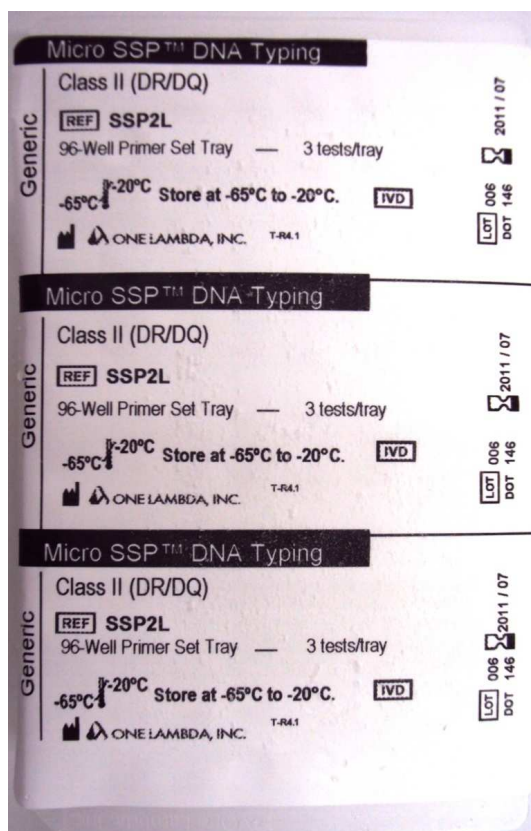


Figura 6 - Microplaca PCR-SSP

TERMOCICLAGEM							FIM
1 ciclo	1 ciclo	9 ciclos		20 ciclos			
96 °C	63 °C	96 °C	63 °C	96 °C	59 °C	72 °C	4 °C
2,10 min	1 min	10 s	1 min	10 s	50 s	30 s	∞

Quadro 1 - Termociclagem: PCR-SSP

Fonte: Folheto Informativo do Produto – One Lambda. Revisão 16, 07/2009.

C. Eletroforese em gel de Agarose:

- Para a preparação do gel de agarose: foi adicionado em um frasco de vidro 1,7 a 2,0 g de agarose e cerca de 100mL de solução de TBE 1X (10 mL da solução de TBE 10X e 90 mL de água destilada). A mistura foi homogeneizada e levada ao microondas (cerca de 1 minuto) até que o líquido ficasse uniforme (líquido

transparente). Em um *becker* de 50mL, foi adicionado 3 gotas de água corrente. Foi pipetado 1 a 1,3 μ L de Brometo de Etídio e colocado no fundo do *becker* com água para homogeneizar. Adicionou-se 40mL do gel líquido no *becker* com Brometo de Etídio; a solução foi homogeneizada, sem formar bolhas, até esfriar o gel para colocá-lo na cuba de eletroforese.

- Para moldar o gel com 96 poços: foram utilizados 12 pentes na cuba de eletroforese, dispostos em sequência.

- Eletroforese: depois de pronto, o gel contendo 96 poços foi colocado na cuba de eletroforese. Foi adicionado tampão TBE 1X até cobrir o gel. A microplaca contendo o produto de PCR foi separado e o volume total das amostras foi pipetado nos respectivos poços. A tampa que está conectada na fonte de eletroforese foi encaixada na cuba (Figura 7). Depois de verificada a voltagem (150 V) e ajustado o tempo de corrida (5 minutos) a eletroforese foi iniciada.



Figura 7 - Cuba para Eletroforese

- Visualização das bandas: após o término da corrida, a tampa foi retirada da cuba e o gel foi colocado no transiluminador (Figura 8). Com foto documentador ligado, a câmera foi posicionada para que a luz UV fosse ligada. Uma imagem do gel foi obtida. Para analisar a eletroforese, foi verificada na foto, primeiramente, a posição 1H, que é equivalente ao controle negativo. Verificou-se

também as posições onde não houve presença de banda e as posições que apresentaram duas bandas.



Figura 8 - Transiluminador

D. Interpretação dos resultados:

A interpretação dos resultados do PCR-SSP foi baseada na presença ou na ausência de um fragmento de DNA amplificado específico. Um par de *primer*, para controle interno estava incluído em cada reação de PCR. Este amplifica uma região conservada do gene da beta globina humana, o qual está presente em todas as amostras de DNA e é utilizado para verificar a integridade da reação de PCR. Na presença de uma banda positiva (amplificação específica do alelo HLA), o produto do par de *primer* do controle interno pode estar fraco ou ausente devido às diferenças na concentração e temperatura de ligação entre o par de *primer* específico e o par de *primer* do controle interno. Os fragmentos de DNA amplificados por um par de *primer* HLA específicos são menores do que o produto amplificado do controle interno, mas maiores do que a banda de *primer* não incorporado e difuso.

Deste modo, a reação positiva para o alelo ou grupo de alelos específicos foi visualizado no gel como um fragmento amplificado de DNA entre a banda do controle interno e a banda do *primer* não incorporado (Figuras 9 e 10).

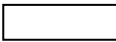
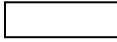
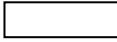


	Reação Pos.	Reação Neg.	Não amplificado
Poço			
Banda Controle Interno			
Banda de tipagem positiva			
Banda do <i>primer</i>			

Figura 9 - Ilustração para interpretação dos resultados obtidos após a eletroforese em gel de agarose; Obs.: A banda de controle interno e a banda do *primer* atuam como marcadores de tamanho, qualquer banda visível entre os dois marcadores de tamanho deverá ser considerada como banda de tipagem positiva

Fonte: Folheto Informativo do Produto – One Lambda. Revisão 16, 07/2009.

E. Análise dos resultados no software HLA Fusion:

A análise da foto do gel de agarose (Figura 10) foi realizada no software HLA-Fusion: com o programa HLA-Fusion aberto selecionou-se o catálogo para a análise, de acordo com o descrito na tampa adesiva da microplaca de PCR, que foi colada no verso da *worksheet*, contendo todas as informações sobre o kit impressos pela empresa *One Lambda*. Feito isso, o número ou nome de identificação da amostra do paciente foi incluído em *Sample ID*. Na figura do gel, no Programa HLA-Fusion, foram informadas todas as posições que não apresentaram banda de genotipagem positiva e todas as posições que apresentaram banda positiva. O controle negativo também foi informado. O tamanho da banda foi confirmado por comparação com as demais e com a informação gerada no HLA-Fusion, para verificação de artefato (falsa banda) do kit. O resultado foi verificado no campo

Possible Allele Code. Todas as informações foram anotadas, a foto foi impressa e colada na *worksheet*.

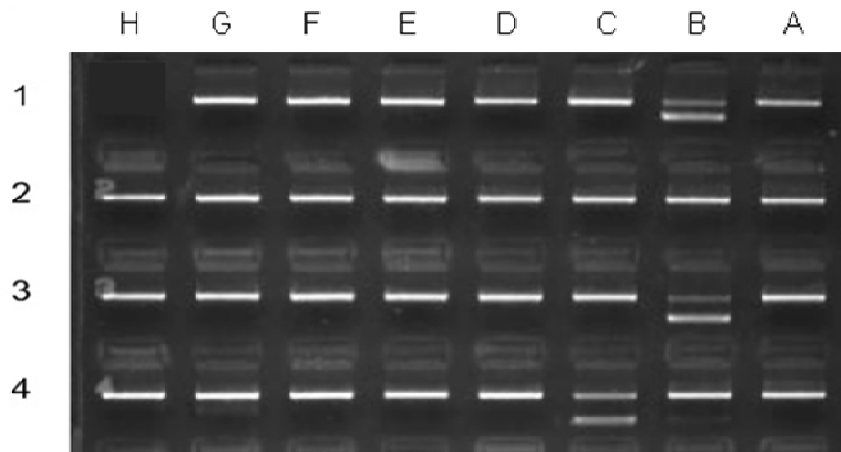


Figura 10 - Foto do gel após visualização no transiluminador.

Foram estudados 47 pacientes com Doença Falciforme cujo diagnóstico foi baseado na eletroforese de Hb dos pacientes e genitores, e que estão em tratamento no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília. Pretendeu-se verificar uma possível relação do sistema de histocompatibilidade (HLA) com a formação de aloanticorpos eritrocitários.

Os testes imunohematológicos realizados nas amostras de sangue de 47 pacientes com DF mostraram uma taxa de aloimunização eritrocitária de 31,91 % (15/47). A taxa de aloimunização encontrada em nosso estudo está dentro do esperado para pacientes com DF, como mostrado em uma coletânea de estudos norte-americanos, onde a taxa de aloimunização eritrocitária variou entre 3 e 50% em pacientes com DF (COLES, 1981, ORLINA, 1978, DAVIES, 1986, COX, 1988 apud MOREIRA, 1996; WAYNE, 1993, VICHINSKY, 2001 apud FABRON et al., 2004).

Mais recentemente, no Brasil, Fabron et al. (2004), encontraram uma taxa de aloimunização eritrocitária de 20,8% em pacientes com Anemia Falciforme. É importante salientar que a taxa de aloimunização pode diferir entre determinadas regiões ou países e é influenciada pelo tempo, número de transfusões e, principalmente, pelo perfil fenotípico eritrocitário de pacientes e doadores (VICHINSKY, 1990 apud BORDIN, 2007; MOREIRA et al., 1996).

Quando analisamos a taxa de aloimunização por faixa etária, verificamos que 20,7% dos pacientes pediátricos e 50% dos adultos eram aloimunizados para algum antígeno eritrocitário. Em 2002, Aygun et al. (apud FABRON et al., 2004), estudando retrospectivamente a aloimunização na DF, apresentaram uma taxa de aloimunização semelhante a encontrada em nosso estudo, que foi de 29% em pacientes pediátricos e 47% em adultos.

A utilização de painéis de identificação de anticorpos nas amostras de soro de 15 pacientes aloimunizados do nosso estudo mostrou a presença de 24 aloanticorpos eritrocitários com 12 diferentes especificidades (Tabela 2). Aproximadamente 54% (13/24) dos aloanticorpos detectados eram dirigidos contra antígenos do sistema Rh. Nossos achados estão em concordância com vários estudos da Literatura, como os citados abaixo.

Fabron *et al.* (2004), em um estudo realizado com pacientes falciformes, relatou que 65,8% dos anticorpos detectados eram do sistema Rh, principalmente com especificidade anti-E, o que vem ao encontro dos resultados do nosso estudo.

No artigo publicado por Moreira *et al.* (1996), 66,66% dos anticorpos detectados eram do sistema Rh; e 80% eram do sistema Rh e Kell.

Wayne,1993; Vichinsky 2001 (apud FABRON *et al.*, 2004), reportaram uma taxa de aloimunização eritrocitária em pacientes com DF entre 3 a 50% destacando que a maioria dos aloanticorpos estavam relacionados com os sistemas Rh, Kell, Duffy ou Kidd.

Tabela 2 - Especificidade, número e frequência dos aloanticorpos eritrocitários identificados em 15 pacientes com Doença Falciforme

Especificidade do aloanticorpo	Nº de aloanticorpos detectados	Frequência dos aloanticorpos (%)
D	01	4,17
E	06	25,00
C	03	12,50
C	02	8,33
C^w	01	4,17
K	04	16,67
Le^a	01	4,17
Fy^b	01	4,17
Jk^a	01	4,17
Di^a	02	8,33
M	01	4,17
S	01	4,17
Total	24	100,02

Conforme resultados encontrados em nosso estudo e nos citados acima, a maior frequência de anticorpos eritrocitários são dirigidos contra antígenos do sistema Rh. Estes antígenos são altamente imunogênicos, sendo o antígeno D o mais potente (HARMENING, 2006), por isso é considerado o segundo grupo

sanguíneo mais importante, depois do grupo ABO (GIRELLO, 2007). A imunogenicidade dos antígenos do sistema Rh mais frequentemente encontrados é assim descrita: D > c > E > C > e (HARMENING, 2006).

Quando da avaliação da aloimunização eritrocitária, também foram observados alguns pacientes com auto-anticorpos. Dos quinze pacientes em que foram identificados aloanticorpos, 7 apresentavam também auto-anticorpos: 2 anti-e, 3 anti-I, 2 anti-IH. É importante enfatizar que auto-anticorpos podem mascarar a presença de aloanticorpos em pacientes com DF, dificultando a identificação destes. Isso pode, como consequência, provocar reações hemolíticas em uma transfusão.

Existem relatos na Literatura sugerindo uma associação da aloimunização eritrocitária à antígenos específicos e o sistema de histocompatibilidade (HLA), como visto por Reviron et al. (2005), que mostraram a relação dos alelos HLA-DRB1 e a imunização ao antígeno Jk^a, onde a frequência do HLA-DRB1*01 foi mais alta em pacientes (55%) do que no grupo controle (17%). Já Chiaroni et al. (2005) apontaram uma frequência do HLA-DRB1*11 significativamente alta em pacientes (57%), quando comparado com o grupo controle (28%). Os autores também sugerem que os alelos HLA-DRB1 podem influenciar no processo imunológico de apresentação do antígeno na molécula DR. Para Noizat-Pirenne et al. (2006) 58,62% dos pacientes que tinham o anticorpo anti-Fy^a apresentaram o alelo HLA-DRB1*04. Picard et al. (2009) concluíram que os alelos HLA-DRB1*04 e DRB1*1501 estão representados em pacientes imunizados com anti-Fy^a.

No Brasil, em um recente estudo, os autores sugerem uma possível associação do HLA-DRB1*07 com a imunização ao antígeno Di^a (BALEOTTI JR. et al., 2010).

Estudos também apontam uma relação do sistema HLA com a predisposição ou à proteção a algumas doenças, como: AIDS, Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Linfoma de Hodgkin etc. (ALVES, 2005). Uma relação bastante estudada é a do HLA-B27 e a Espondilite Anquilosante (SAMPAIO-BARROS, 2007). Em relação à DF, existem relatos de uma possível relação do HLA com doenças secundárias, como o Acidente Vascular Cerebral em pequenos ou grandes vasos (HOPPE et al., 2003; STYLES et al., 2000).

Como descrito acima, embora haja relatos sugerindo a associação do sistema HLA com a aloimunização a alguns antígenos específicos de glóbulos vermelhos, não há relatos na literatura que relacionam a predisposição à formação de aloanticorpos em pacientes com DF e o sistema HLA.

Para estudar as possíveis relações de pré-disposição à formação de anticorpos, os pacientes diagnosticados com DF foram divididos em dois grupos: aloimunizados e não-alloimunizados, para estudo comparativo de frequência do HLA Classe II.

Os resultados da genotipagem HLA-DRB1 foram analisados levando em consideração o alelo mais frequente no grupo de pacientes aloimunizados e não-alloimunizados (Tabela 3). Nos pacientes aloimunizados, os alelos mais frequentes foram DRB1*07 e DRB1*11, representando, cada um, 20% (6/30) dos alelos observados. Nos pacientes não-alloimunizados, os alelos DRB1*03 e DRB1*11 foram os mais frequentes, representando, cada um, 14,06 % (9/64).

Comparando os resultados dos dois grupos, o alelo DRB1*07 apresentou uma frequência de apenas 11% no grupo dos pacientes não-alloimunizados, ou seja, frequência menor do que a apresentada no grupo dos pacientes aloimunizados (20%; $p= 0,235$); o alelo DRB1*03 apresentou uma frequência de cerca de 7% no grupo dos pacientes aloimunizados, enquanto no grupo dos pacientes não-alloimunizados a frequência apresentada foi maior (14%; $p= 0,298$); já o alelo DRB1*11 apresentou alta frequência nos dois grupos estudados ($p= 0,464$).

Tabela 3 - Resultados da genotipagem HLA-DRB1 em 47 pacientes com Doença Falciforme: aloimunizados e não-alloimunizados para antígenos eritrocitários

Alelo HLA-DRB1	Aloimunizados (n = 15)		Não-alloimunizados (n = 32)	
	Número de alelos	Frequência do alelo (%)	Número de alelos	Frequência do alelo (%)
01	2	6,66	5	7,81
03	2	6,66	9	14,06
04	5	16,66	3	4,68
07	6	20	7	10,94
08	2	6,66	7	10,94
09	0	0	2	3,12
10	1	3,33	2	3,12
11	6	20	9	14,06
12	0	0	3	4,68
13	1	3,33	8	12,5
14	0	0	3	4,68
15	4	13,33	5	7,81
16	1	3,33	1	1,56
Total	30	99,96	64	99,96

Para o grupo controle selecionou-se 1000 indivíduos sadios, da raça negra, da população de Doadores Voluntários de Medula Óssea (DVMO) da região centro-oeste do estado de São Paulo (dados do Laboratório de Imunologia de Marília (LIM); resultados não publicados).

Os alelos mais frequentes encontrados foram DRB1*03 e DRB1*13 (cerca de 13%), como demonstrado no Gráfico 1.

Comparando os resultados das 3 populações (grupo controle, pacientes aloimunizados e pacientes não-alloimunizados), pode ser observado que o alelo DRB1*07 é mais frequente nos pacientes aloimunizados ($p > 0,05$ em relação ao grupo controle), indicando que este alelo pode estar associado como fator de predisposição genética à aloimunização eritrocitária.

Nos pacientes não-aloimunizados, o alelo mais presente foi o DRB1*03, encontrado muito frequentemente na população controle. O mesmo ocorre com o alelo DRB1*11, encontrado nos dois grupos de pacientes.

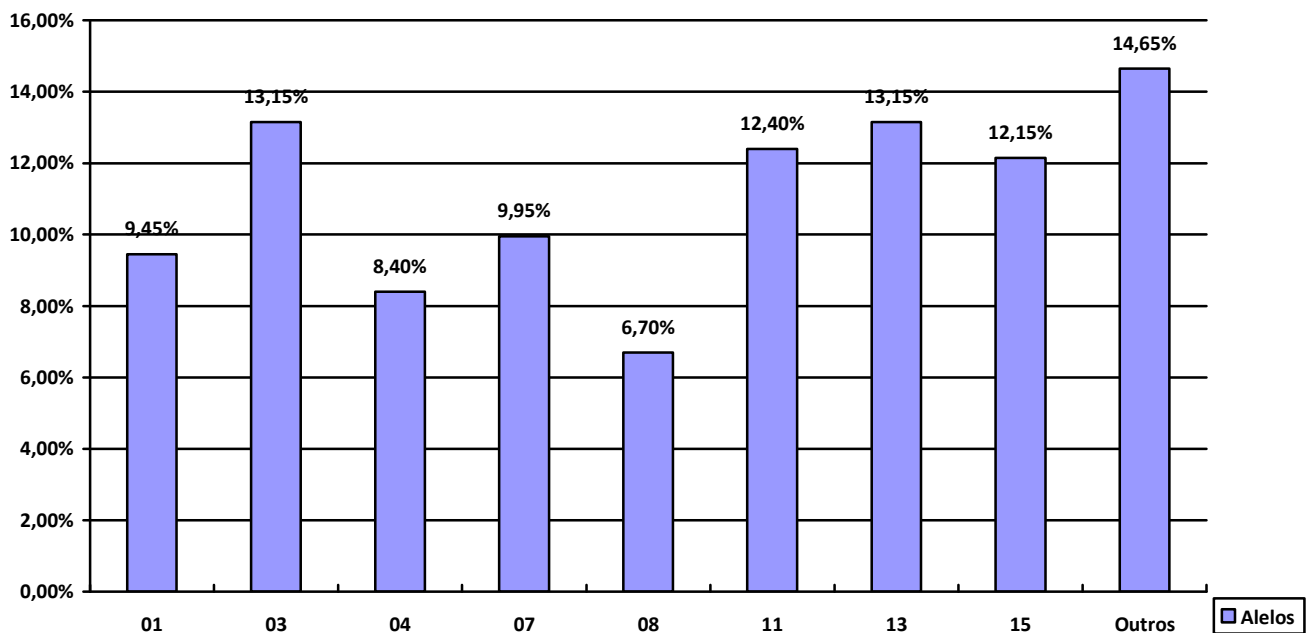


Gráfico 1: Alelos HLA-DRB1 mais frequentes em uma população sadia
Fonte: Banco de dados do Laboratório de Imunologia de Marília - LIM

Os resultados da genotipagem HLA-DQB1 também foram analisados levando em consideração o alelo mais frequente no grupo de pacientes aloimunizados e não-aloimunizados (Tabela 4). O alelo DQB1*03 foi o mais frequentemente encontrado, tanto nos pacientes aloimunizados quanto nos não-aloimunizados, representando, respectivamente, 36,66% (11/30) e 26,56% (17/64). Não houve diferença estatística significativa para os resultados encontrados ($p=0,318$).

Tabela 4 - Resultados da genotipagem HLA-DQB1 em 47 pacientes com Doença Falciforme: aloimunizados e não-alloimunizados para antígenos eritrocitários

Alelo HLA-DQB1	Aloimunizados (n = 15)		Não-alloimunizados (n = 32)	
	Número de alelos	Frequência do alelo (%)	Número de alelos	Frequência do alelo (%)
02	8	26,66	15	23,44
03	11	36,66	17	26,56
04	1	3,33	5	7,81
05	4	13,33	14	21,87
06	6	20	13	20,31
Total	30	99,98	64	99,99

Os alelos DQB1*03 foram encontrados em 10 pacientes aloimunizados (somando 11 alelos) e 16 pacientes não-alloimunizados (somando 17 alelos). Sabendo-se que cada indivíduo possui 2 alelos de cada gene, separamos esses 10 pacientes para que fosse verificada a frequência dos genótipos DQB1*03.

A Tabela 5 mostra a associação do HLA-DQB1*03 com outros alelos. O genótipo HLA-DQB1*03/02 apareceu com maior frequência nos pacientes aloimunizados (7/10), sendo este resultado significativo do ponto de vista estatístico, em relação ao grupo de pacientes não-alloimunizados ($p= 0,024$). Sendo assim, é possível sugerir que haja uma relação do genótipo DQB1*03/02 com a aloimunização eritrocitária.

No grupo dos pacientes não-alloimunizados, o HLA-DQB1*03/05 foi o genótipo mais frequente (31,25%; $p= 0,211$), podendo estar relacionado com uma proteção para a formação de aloanticorpos em pacientes com DF.

Tabela 5 – Genótipos HLA-DQB1 mais frequentes em pacientes com Doença Falciforme: aloimunizados e não-alloimunizados a antígenos eritrocitários

Associação do DQB1*03 com outros alelos	Aloimunizados (n = 10)		Não-alloimunizados (n = 16)	
	Número de genótipos	Frequência do genótipo (%)	Número de genótipos	Frequência do genótipo (%)
03/02	7	70	4	25
03/03	1	10	1	6,25
03/04	0	0	2	12,5
03/05	1	10	5	31,25
03/06	1	10	4	25

Para o grupo controle HLA-DQB1 foram selecionados 95 indivíduos saudáveis, da raça negra, DVMO, da região centro-oeste do estado de São Paulo (dados do LIM; resultados não publicados).

O Gráfico 2 mostra as frequências alélicas HLA-DQB1 obtidas da população controle, sendo os alelos mais frequentes DQB1*06 (30%) e DQB1*03 (cerca de 27%).

Comparando os resultados das 3 populações, pode ser observado que o alelo DQB1*03 é encontrado com frequência nos dois grupos de pacientes e na população controle ($p > 0,05$).

O Gráfico 3 mostra a associação do HLA-DQB1*03 com outros alelos de 44 indivíduos do grupo controle. Comparando o resultado do grupo de pacientes aloimunizados com a população controle, pode ser observado que a frequência do genótipo HLA-DQB1*03/02 é maior nos pacientes, indicando novamente que pode haver uma correlação com a aloimunização eritrocitária.

O teste de aderência (Qui-Quadrado) realizado para os dois grupos de pacientes em relação ao grupo controle indica que não é possível afirmar que as amostras diferiram do padrão ($p > 0,05$). Isso pode ser justificado pelo pequeno número de amostras utilizadas neste estudo.

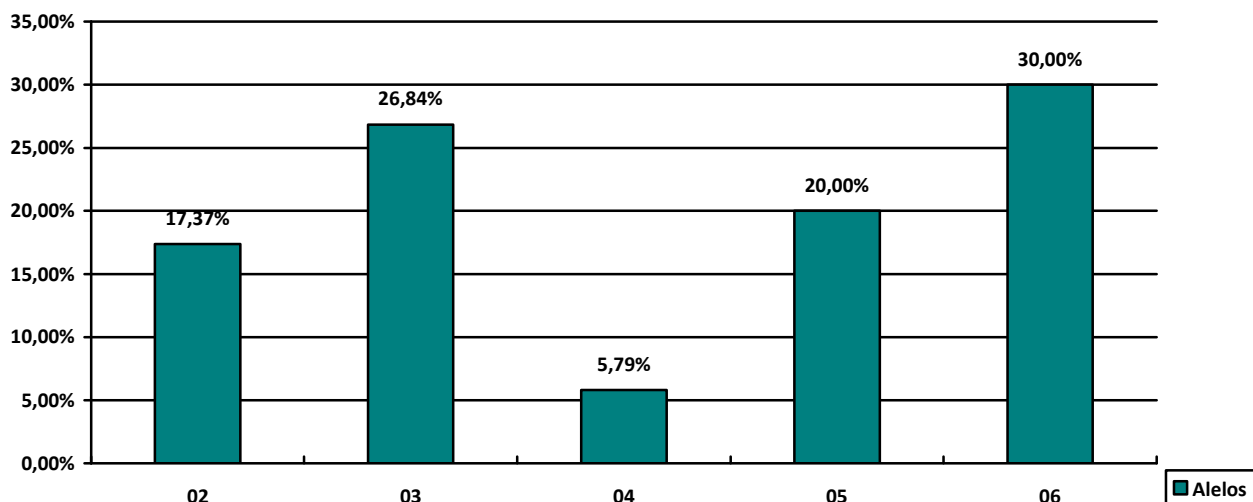


Gráfico 2 - Alelos HLA-DQB1 mais frequentes em uma população sadia
 Fonte: Banco de dados do Laboratório de Imunologia de Marília - LIM

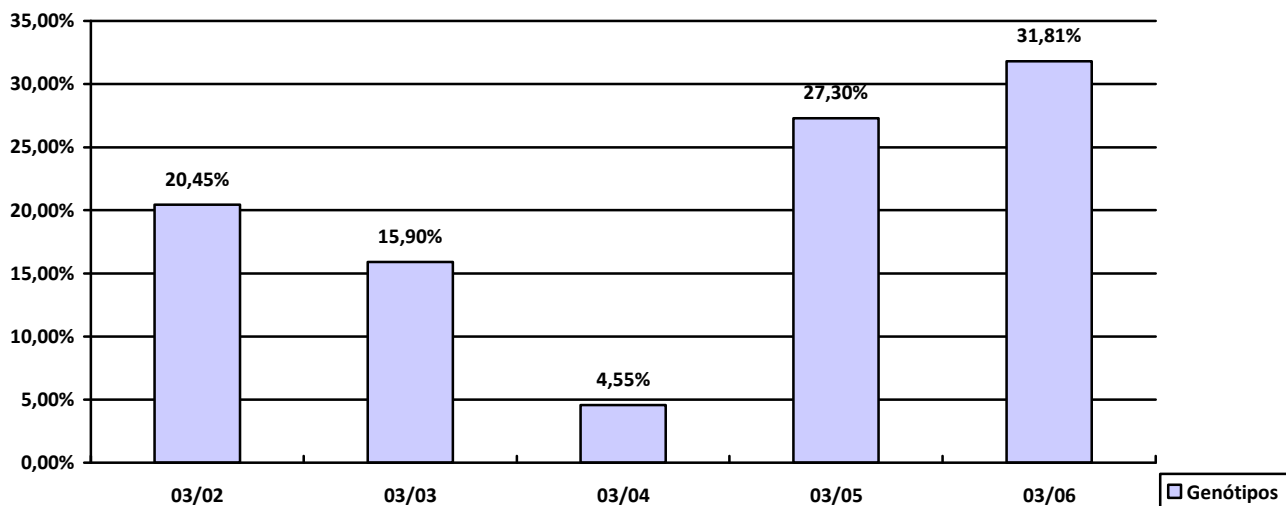


Gráfico 3 - Genótipos HLA-DQB1 de 44 indivíduos em uma população sadia
 Fonte: Banco de dados do Laboratório de Imunologia de Marília - LIM

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, bem como nas informações oriundas da literatura, foi possível propor as conclusões abaixo:

Quanto às especificidades dos aloanticorpos eritrocitários, os que apresentaram uma maior frequência foram: Anti-E (25 %) e Anti-K (16,67 %). Anticorpos do sistema Rh representaram 54,17% (13/24) dos anticorpos identificados, sendo esses os mais imunogênicos.

A taxa de aloimunização foi de 31,91%, e se mostrou maior em adultos (50%) do que em crianças (20,7%).

A alta frequência dos alelos DRB1*11 e DRB1*03 coincidem com a encontrada na população controle (raça negra), ou seja, os dois alelos citados também são frequentes na população sadia.

A frequência do alelo DRB1*07, observado nos pacientes aloimunizados, foi maior do que a encontrada na população sadia da raça negra, podendo estar relacionado com a predisposição à aloimunização eritrocitária nos pacientes com DF.

O alelo HLA-DQB1*03 foi o mais frequente nos dois grupos de pacientes estudados. Quando associado a outros alelos, observamos que o genótipo DQB1*03/02 é muito frequente nos pacientes aloimunizados, indicando uma possível associação com a formação de anticorpos eritrocitários.

No grupo dos pacientes não-alloimunizados, o HLA-DQB1*03/05 foi o genótipo mais frequente (31,25%; $p= 0,211$), podendo estar relacionado com uma proteção para a formação de aloanticorpos em pacientes com DF.

Ainda não podemos concluir, com certeza, que existe uma relação do sistema HLA com a aloimunização eritrocitária. No entanto, os resultados apresentados neste estudo podem sugerir uma possível associação. Mais estudos são necessários para concluir definitivamente se há realmente uma associação e se estes testes poderiam ser aplicados na rotina laboratorial, na tentativa de minimizar o risco de aloimunização eritrocitária.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília: ANVISA, 2002.

ALARIF, L. et al. HLA-B35 is associated with red cell alloimmunization in sickle cell disease. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.38, n.2, p.178-183, 1986.

ALVES, C. et al. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. **Pediatria**, v.27, n.4, p. 274-286, 2005.

BALEOTTI JR., W. et al. Association of HLA DRB1*07 Allele with Di^a Alloimmunization in a Brazilian Population. **Transfusion**, v.50, p.17A, 2010. (Abstract Supplement).

BORDIN, J.O. Aloimunização após transfusão de concentrado de hemácias em pacientes atendidos em um serviço de emergência. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.29, n.4, p.1-3, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-84842007000400001&script=sci_arttext. Acesso em: 15 out. 2010.

CANÇADO, R.D. Doenças Falciformes. **Prát. Hosp.**, v.9, n.50, p.61-64, 2007. Disponível em: <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2050/pdfs/mat%2008-50.pdf>. Acesso em: 25 out. 2010.

CENTRO DE DIAGNÓSTICO DO GACC. **Laboratório de Imunogenética e Transplantes (HISTOCOMPATIBILIDADE)**. Disponível em: <http://www.cdg.org.br/site_CDG/lab_imunologia.asp>. Acesso em: 24 jul. 2010.

CHIARONI, J. et al. HLA-DRB1 polymorphism is associated with Kell immunization. **B. J. Haematol.**, v.132, p.374-378, 2005.

CHU, C.C. et al. Anti-“Mi^a” immunization is associated with HLA-DRB1*0901. **Transfusion**, v.49, p.472-478, 2009.

DIAMED: A DIVISION OF BIO-RAD. **Teste de Coombs Direto (AGH), ID-DC Screening I (IgG-IgA-IgM-C3c-C3d-ctl)**. Disponível em: <http://www.diamed.com.br/cmi/Pagina.aspx?265>. Acesso em: 25 nov. 2010.

DONADI, E.A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.33, p.7-18, 2000.

FABRON JR., A. et al. Application of noninvasive phagocytic cellular assays using autologous monocytes to assess red cell alloantibodies in sickle cell patients. **Transf. Apher. Sci.**, v.31, n.1, p.29-35, 2004.

FERNANDES, A.P.M. et al. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.47, n.5, p.601-611, 2003.

GE HEALTHCARE. **illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit**. Disponível em: http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/sample_preparation~product_selection_category~genomic_dna_purification~blood_genomicprep_mini_spin_kit?OpenDocument&moduleid=166870. Acesso em: 28 nov. 2010.

GIRELLO, A.L.; KUHN, T.I.B.B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. 2.ed. São Paulo: Senac, 2007. 253p.

HARMENING, D.M. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. 594p.

HOPPE, C. et al. Distinct HLA associations by stroke subtype in children with sickle cell anemia. **Blood**, v.101, n.7, p.2865-2869, 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592p.

LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA DE MARÍLIA – LIM. **Banco de dados da genotipagem HLA-DRB1 e HLA-DQB1**. Marília: [s.n.], 2010.

LANDI, E.P.; OLIVEIRA, J.S.R. Doença do enxerto contra hospedeiro pós-transfusional - guia para irradiação gama de hemocomponentes. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.45, n.3, p.261-272, 1999.

MARSH, S.G.E. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. **Tissue Antigens**, v.75, p.291-455, 2010.

MOREIRA JR., G. et al. Red Blood Cell Alloimmunization in Sickle Cell Disease: The influence of Racial and Antigenic Pattern Differences Between Donors and Recipients in Brazil. **Am. J. Hematol.**, v.52, p.197-200, 1996.

NOIZAT-PIRENNE, F. et al. Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. **Transfusion**, v.46, p. 1328-1333, 2006.

OLIVEIRA, E.A.; SELL, A.M. Os antígenos HLA e a hemoterapia. **Acta Sci**, v.24, n.3, p.731-736, 2002.

ONE LAMBDA: ADVANCING TRANSPLANT DIAGNOSTICS. **Folheto Informativo do Produto**. Disponível em: <http://216.65.66.131/product-attachment.aspx?c1=molecular&c2=micro-ssp-&c3=generic-tray&c4=6&c6=20>, "Product Insert". Acesso em: 21 nov. 2010.

PICARD, C. et al. Positive association of DRB1 04 e DRB1 15 alleles with Fya immunization in a Southern European population. **Transfusion**, v.49, n.11, p.2412-2417, 2009.

REVIRON, D. et al. HLA-DRB1 alleles and Jk^a Immunization. **Transfusion**, v.45, p.956-959, 2005.

ROSEFF, S.D. Sickle cell disease: a review. **Immunohematology**, v.25, n.2, p.67-74, 2009.

SAMPAIO-BARROS, P.D. et al. Consenso Brasileiro de Espondiloartropatias: Espondilite Anquilosante e Artrite Psoriásica: Diagnóstico e Tratamento – Primeira Revisão. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 47, n.4, p. 233-242, 2007.

STYLES, L.A. et al. Evidence for HLA-related susceptibility for stroke in children with sickle cell disease. **Blood**, v.95, n.11, p.3562-3567, 2000.

UNIVERSIDADE DA MADEIRA, Campus da Penteada, Funchal, Portugal.
Disponível em: <http://www3.uma.pt/lgh/investigacao_hlas.html> Acesso em: 28 set. 2010.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA
Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos – CEP/FAMEMA

Marília, 21 de Julho de 2010

Ilmo(ª) Sr.(ª)
Carla Woelke Cabestre
Marília/SP

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Marília, recebeu o protocolo de estudo nº 285/10, intitulado: "Avaliação da Correlação entre Aloimunização à Antígenos Eritrocitários e Sistema de Histocompatibilidade (HLA) em Pacientes com Doença Falciforme", foi considerado **APROVADO "Ad Referendum"** após responder as pendências apontadas em Reunião Ordinária – 31/05/10, de acordo com a Resolução 196/96 e suas Complementares do Conselho Nacional de Saúde, podendo ser iniciado

Sendo só para o momento, reiteramos protestos de consideração e apreço.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Valdeir Fagundes de Queiroz
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Modelo)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Título da Pesquisa: Avaliação da correlação entre Aloimunização à Antígenos Eritrocitários e Sistema de Histocompatibilidade (HLA) em pacientes com Doença Falciforme.

Pesquisador Responsável: Carla Woelke Cabestré

A pesquisa a que se refere irá estudar os pacientes com Doença Falciforme e avaliar a correlação entre a Aloimunização à Antígenos Eritrocitários, o que acontece após o recebimento de transfusões sanguíneas, e o Sistema de Histocompatibilidade (HLA), que possui uma grande importância no sistema imunológico. O principal objetivo deste trabalho é comparar os resultados obtidos com a tipagem HLA e a identificação dos anticorpos irregulares nestes pacientes, observando a relação de algum antígeno HLA com os anticorpos eritrocitários identificados. O estudo da correlação entre o sistema HLA e a aloimunização eritrocitária poderá contribuir para uma maior segurança, quando da transfusão de hemácias em pacientes portadores de doença falciforme, prevenindo reações transfusionais.

Para a realização deste trabalho, precisamos coletar um tubo de sangue de cada paciente, para a realizações de exames, como consta do projeto, no momento em que este paciente estiver no Hemocentro de Marília para o acompanhamento ambulatorial.

Durante o curso da pesquisa, os pacientes poderão entrar em contato conosco para o esclarecimento de quaisquer dúvidas que venham a ter. Todos os envolvidos têm a garantia do sigilo que assegura a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

O paciente tem a liberdade de se recusar a participar desta pesquisa, assim como retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Marília, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do Participante
ou responsável legal
Nome:

Carla Woelke Cabestré – CRBM 13159
carlacabestre@gmail.com
Fone: (14) 97013907