

Marilia Fernandes Mascarenhas Sirianni

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE
RESPOSTA IMUNE COM A ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA
EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

São Paulo

2022

Marilia Fernandes Mascarenhas Sirianni

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE
RESPOSTA IMUNE COM A ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA
EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Cavaleiro Marti

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Bonet Bub

São Paulo

2022

Sirianni, Marília Fernandes Mascarenhas

Estudo da associação de polimorfismos em genes de resposta imune com a aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de síndromes mielodisplásicas / Marília Fernandes Mascarenhas Sirianni.

-- São Paulo, 2022.

xiii, 59 f., il.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Study of the association between polymorphism in immune response genes and red blood cell alloimmunization in patients with myelodysplastic syndromes.*

1. Síndromes mielodisplásicas. 2. Aloimunização eritrocitária.
3. Polimorfismo genético. 4. Citocinas. 5. Antígenos HLA.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Marilia Fernandes Mascarenhas Sirianni

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE
RESPOSTA IMUNE COM A ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA EM
PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS**

Presidente da banca: Profa. Dra. Luciana Cavalheiro Marti

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Araci Massami Sakashita

Dra. Juliana Aparecida Preto de Godoy

Prof. Dr. Paulo Alberto Otto

Membros suplentes:

Prof. Dr. Welbert de Oliveira Pereira

Prof. Dr. Paulo Vidal Campregher

Profa. Dra. Patricia Severino

Aprovada em: 29/04/2022.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, irmã e madrinha por serem minha base, minha fortaleza e por todo amor incondicional.

À Pink e ao Chico (*in memoriam*) pela companhia nas noites em claro (no meu caso, pois eles sempre dormiam sem peso na consciência!).

Agradeço ao Professor Dr. José Mauro Kutner pela oportunidade.

À Profa. Dra. Carolina Bonet Bub por todo suporte prestado, auxílio, apoio, disponibilidade e paciência em todo o processo do mestrado. Agradeço seus conselhos que contribuíram para meu crescimento profissional e sua leveza mesmo nas cobranças, que fizeram toda diferença na execução de todo o programa.

À Profa. Dra. Luciana Cavaleiro Marti pela orientação, suporte, auxílio e paciência durante este trabalho.

À Maria Giselda Aravechia pela compreensão e suporte durante todo o processo do mestrado e desenvolvimento deste trabalho.

À Emília Ângela Sippert por toda ajuda técnica e conselhos.

À Flavia Ricioli Vaz Gonçalves por toda ajuda e parceria durante o trabalho, adorei tê-la como minha estagiária de iniciação científica. Todo sucesso em seu caminho!!!

Ao Dr. Paulo Alberto Otto pela disponibilidade, paciência, consultoria e todo auxílio e conhecimento compartilhado.

Aos amigos que conquistei e aos professores que conheci durante o curso e que tornaram o processo mais leve, enriquecedor e divertido, eu os carregarei para sempre no coração, em especial Valéria Gonçalves da Cruz Monteiro e Marina Iahn Aun.

Aos amigos e colegas do Serviço de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein em especial ao Setor de Imunohematologia que direta ou indiretamente tornaram esse trabalho possível.

Aos amigos Renato de Mello Ruiz e Márcio Anunciação Menezes pelas risadas e por me ajudarem com as reações de *Real Time*.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, processo número 2018/16451-5.

Sumário

Agradecimentos.....	v
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumo	xii
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Síndromes mielodisplásicas	2
1.2 Aloimunização eritrocitária e transfusão sanguínea em síndrome mielodisplásica ...	4
1.3 Sistema HLA.....	10
1.4 Polimorfismos em genes de citocinas.....	14
2 MÉTODOS	21
2.1 Casuística.....	21
2.1.1 Pacientes portadores de síndrome mielodisplásica.....	21
2.1.2 Aspectos éticos da pesquisa	21
2.2 Materiais	22
2.2.1 Água livre de nuclease	22
2.2.2 Etanol absoluto (CH ₃ CH ₂ OH)	22
2.2.3 Kit de extração de DNA	22
2.2.4 <i>Primers</i>	22
2.2.5 Taq DNA polimerase	23
2.2.6 Desoxinucleotídeos 10Mm	23
2.2.7 Marcador de peso molecular	23
2.2.8 Tampão Tris-EDTA-Borato 10X.....	24
2.2.9 Enzimas de restrição	24
2.2.10 Intercalante de DNA	24
2.2.11 Gel de agarose	24
2.2.12 Plataforma ID CORE ^{XT} BLOODChip	25
2.2.13 Kit Lifecodes HLA-DRB1 SSO Typing	25
2.2.14 Ensaios TaqMan [®] para genotipagem de SNPs em genes de citocinas.....	25
2.2.15 <i>Mastermix</i> de genotipagem Taqman [®]	26
2.3 Metodologia	26

2.3.1 Coleta de amostras	26
2.3.2 Determinação dos anticorpos eritrocitários transfusionais no soro dos pacientes	26
2.3.3 Extração de DNA.....	27
2.3.4 Genotipagem eritrocitária	27
2.3.5 Genotipagem HLA de classe II	29
2.3.6 Análise de polimorfismos em regiões regulatórias e genes de citocinas.....	30
2.3.6.1 Genotipagem dos polimorfismos nos genes <i>IL1</i> , <i>IL4</i> , <i>TNFA</i> , <i>IL6</i> , <i>IL10</i> , <i>IL17</i>	30
2.3.7 Análise dos resultados.....	36
3 RESULTADOS	37
3.1 Características da população estudada	37
3.2 Perfil de aloimunização.....	38
3.3 Perfil genético dos grupos sanguíneos em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica	39
3.4 Genotipagem e frequência dos grupos alélicos HLA de classe II e a associação com a aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de SMD	40
3.5 Genotipagem e frequência dos polimorfismos em genes de citocinas nos grupos de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica	41
4 DISCUSSÃO	48
5 CONCLUSÕES	52
6 REFERÊNCIAS	53
Abstract	
Apêndice	

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura da membrana eritrocitária mostrando a disposição de importantes proteínas integrais e proteínas que formam o citoesqueleto celular.....	4
Figura 2. Inserção dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária	7
Figura 3. Mecanismo de aloimunização eritrocitária.....	8
Figura 4. Complexo gênico HLA presente no cromossomo 6. Esquema da localização dos genes HLA no cromossomo 6, as três regiões e a disposição dos genes de classe I, II e III	11
Figura 5. As moléculas MHC são ancoradas na membrana celular e podem se ligar a receptores de células imunológicas.....	12
Figura 6. Estrutura das moléculas HLA classe I e II. O diagrama da esquerda ilustra as diversas regiões da molécula de classe I, o diagrama da direita ilustra as diversas regiões da molécula de classe II	13
Figura 7. As múltiplas funções das células B e suas implicações	15
Figura 8. O fenótipo e a plasticidade das células Th	16
Figura 9. Géis de eletroforese demonstrando os padrões dos polimorfismos dos genes das interleucinas.....	33
Figura 10. Discriminação alélica do SNP IL10–819T/C obtido por PCR em tempo real	35
Figura 11. Especificidade e frequência dos aloanticorpos eritrocitários desenvolvidos pelos pacientes politransfundidos portadores de SMD.....	39

Lista de tabelas

Tabela 1. Sistemas de grupos sanguíneos	6
Tabela 2. Alelos presentes no ID CoreXT BLOODChip, <i>Blood Group Genotyping</i>	29
Tabela 3. Polimorfismos em genes de citocinas e seus respectivos números rs e localização	30
Tabela 4. Sequência de <i>primers</i> para detecção dos SNPs IL17F(7488A/G), IL17A–197G/A, IL1B–511C/T, IL10–1082A/G, –592A/C, TNFA–308G/A, condições de ciclagem da PCR, produto da PCR, enzima de restrição utilizada e tamanho dos fragmentos obtidos	31
Tabela 5. Características da população estudada com relação ao sexo e idade	38
Tabela 6. Características da população estudada com relação a idade, número de transfusões	38
Tabela 7. Frequências antigênicas deduzidas a partir do genótipo dos portadores de síndrome mielodisplásica	40
Tabela 8. Tipagem HLA-DRB1* identificada por grupo de paciente	41
Tabela 9. Análise das frequências alélicas dos polimorfismos em genes das citocinas	42
Tabela 10. Análise da frequência dos genótipos dos polimorfismos em genes das citocinas	43
Tabela 11. Análise das frequências alélicas dos polimorfismos em genes das citocinas nos pacientes aloimunizados por anticorpos contra antígenos do sistema Rh <i>versus</i> pacientes não aloimunizados	44
Tabela 12. Análise da frequência dos genótipos dos polimorfismos em genes das citocinas nos pacientes aloimunizados por anticorpos contra os antígenos do sistema Rh e pacientes não aloimunizados	45
Tabela 13. Frequências dos diplótipos dos polimorfismos IL17A–197A/G e IL17F(7488A/G) em pacientes aloimunizados e não aloimunizados portadores de síndrome mielodisplásica	47
Tabela 14. Frequências dos diplótipos dos polimorfismos IL4–590C/T (rs2243250) e IL4 íntron 3 VNTR em pacientes aloimunizados e não aloimunizados portadores de síndrome mielodisplásica	47

Lista de abreviaturas

AABB	Associação Americana de Bancos de Sangue
BLOODChip™	Plataforma “ <i>microarray</i> ”
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de ética em Pesquisa
dNTP	Desoxinucleotídeos
DO	Densidade ótica
DT	Dependência de transfusão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IC	Índice de Confiança
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPSS	Sistema Internacional de Pontuação Prognóstica
IT	Independência de transfusão
LISS	Meio de baixa força iônica
mM	Milimolar
ng	Nano grama
NPNA	Não politransfundido, não aloimunizado
ns	Não significativo estatisticamente
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
OS	Sobrevivência global
P.A.	Para análise
PA	Politransfundido aloimunizado
PAI	Pesquisa de anticorpos irregulares
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-AS	Reação em cadeia da polimerase alelo-específica

PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase produtos da reação em cadeia da polimerase
PCR-SSO	Reação em cadeia da polimerase sequência específica de oligonucleotídeos
PCR-SSOr	Reação em cadeia da polimerase sequência específica de oligonucleotídeos reversa
PEG	Polietilenoglicol
PNA	Politransfundido, não aloimunizado
R1r	Fenótipo RhDCcee
RhD-	Fenótipo RhD negativo
RhD+	Fenótipo RhD positivo
RTH	Reação Transfusional Hemolítica Tardia
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real
SAPE	Streptavidina conjugada a Ficoeritrina
SGPP	Sistema Gerenciador de Projetos de Pesquisa
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TEB	Tampão Tris-EDTA-Borato
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF	Fator de necrose tumoral
Tregs	Células T reguladoras
U	Unidade
μ L	Microlitro

Resumo

Introdução: A transfusão sanguínea é uma terapia vital no tratamento e prevenção de algumas complicações das síndromes mielodisplásicas. Apesar de as transfusões de concentrados de hemácias serem seguras e melhorarem significativamente a qualidade de vida dos pacientes portadores de síndrome mielodisplásica, sua utilização pode levar a aloimunização eritrocitária, uma complicação grave que pode resultar em reação transfusional hemolítica tardia. Embora diversos fatores tenham sido associados a aloimunização eritrocitária, diferenças na resposta imunológica de pacientes aloimunizados e não aloimunizados não estão completamente esclarecidas. **Objetivos:** Investigar a associação de polimorfismos em genes de citocinas, e alelos HLA-DRB1 com a aloimunização eritrocitária em pacientes com síndrome mielodisplásica a fim de encontrar marcadores genéticos de risco para aloimunização eritrocitária nesta população. **Métodos:** Participaram do estudo 117 pacientes com diagnóstico de síndrome mielodisplásica, sendo 30 pacientes não politransfundidos e não aloimunizados, 59 pacientes politransfundidos e não aloimunizados e 28 pacientes politransfundidos e aloimunizados. Foram realizadas genotipagem para alelos de grupos sanguíneos eritrocitários pela técnica de *microarray*, para os alelos *HLA-DRB1* pela técnica de PCR-SSO (One Lambda-Luminex) e para os polimorfismos *IL17F* (7488A>G), *IL17A*–197G>A, *IL1B*–511C>T, *IL10*–1082A>G, *IL10*–592A>C, *IL10*–819T>C, *TNFA*–308G>A, *IL6*–174C>T, *IL4*–590C>T, e *IL4* íntron 3 VNTR pelas técnicas de PCR-RFLP, PCR-SSP e *real-time* PCR. Os resultados de frequência alélica foram comparados entre os grupos de pacientes aloimunizados e não aloimunizados. **Resultados:** Em relação ao perfil transfusional e aloimunização, 50,4% dos pacientes eram politransfundidos e não aloimunizados, 25,6% eram politransfundidos e aloimunizados, e 23,9% não politransfundidos e não aloimunizados. Os principais aloanticorpos identificados foram contra antígenos anti-C (35,7%), anti-E (32,1%), anti-K (10,7%) e anti-Dia (10,7%). O polimorfismo *IL17A*–197G/A demonstrou estar associado positivamente com a aloimunização eritrocitária. O alelo A e genótipo AA foram significativamente mais frequentes em pacientes aloimunizados em relação ao grupo de não aloimunizados (alelo A: 27,1% *versus* 46,4%, OR=2,3; p=0,012; genótipo AA: 6,8% *versus* 25%, OR=6,2; p=0,041). Além disso, encontramos uma associação significativa entre aloimunização para antígenos Rh com o alelo *IL17A*–197A e genótipo AA, os quais foram

significativamente mais frequentes em aloimunizados (alelo A: 27,1% *versus* 45%, $p=0,036$; OR=2,5; genótipo AA: 6,8% *versus* 30%, $p=0,042$), a análise haplotípica dos diplótipos C, RP1/C, RP1 e C, RP1/T, RP2 da *IL4* íntron 3 e *IL4*-590 apresentaram diferença significativa entre os pacientes politransfundidos e aloimunizados comparados aos pacientes politransfundidos não aloimunizados (39,29% *versus* 67,8%, OR=0,31; $p=0,013$; IC=95% 0,12-0,78). **Conclusões:** O presente trabalho não encontrou associação entre alelos HLA-DRB1 com o risco ou proteção a aloimunização eritrocitária; entretanto, os SNPs *IL4* -590C>T e *IL17A* -197G>A foram associados ao risco de aloimunização eritrocitária em pacientes brasileiros portadores de síndrome mielodisplásica.

Descritores: Síndromes mielodisplásicas; Aloimunização eritrocitária [não DeCS]; Polimorfismo genético; Citocinas; Antígenos HLA

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndromes mielodisplásicas

A síndrome mielodisplásica (SMD) é uma das cinco principais categorias de neoplasias mielóides de acordo com o sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), atualizada em 2016 para cânceres hematológicos.⁽¹⁾ O nome SMD é etimologicamente derivado do grego que significa anormalidade morfológica da medula óssea.⁽²⁾

As síndromes mielodisplásicas (SMD) correspondem a um grupo heterogêneo de doenças hematológicas clonais relacionadas entre si, mais prevalentes na população idosa. São caracterizadas por baixa contagem de células sanguíneas periféricas, hematopoiese ineficaz e risco aumentado de transformação leucêmica.⁽¹⁾

As SMD são clinicamente caracterizadas por citopenia de uma ou mais linhagens hematopoiéticas. Os sintomas, quando presentes, estão relacionados à insuficiência das linhagens celulares afetadas na medula óssea e, eventualmente, à transformação leucêmica, que ocorre em cerca de um terço dos casos. A maioria dos casos em adultos é classificada como distúrbios de novo, com anormalidades citogenéticas presentes em 40-60% dos pacientes. Uma minoria é secundária e relacionada à exposição a agentes tóxicos, como quimioterapia e radiação ionizante.⁽³⁾

As SMD ocorrem principalmente na população idosa, com prevalência de 5-13/100.000 habitantes/ano na população em geral podendo atingir 50/100.000 habitantes/ano para o grupo acima dos 70 anos de idade. A prevalência aumenta também nos indivíduos expostos a agentes mutagênicos, ocupacionais e/ou ambientais.^(4,5)

Modificações genéticas adquiridas sequencialmente levam ao desenvolvimento de clones anômalos e de células estromais geneticamente instáveis.⁽⁵⁾ A proliferação e maturação de clones anômalos, juntamente com apoptose aumentada são responsáveis pelas citopenias no estágio inicial da doença. A apoptose diminui e a proliferação aumenta à medida que a SMD evolui para uma transformação leucêmica devido à instabilidade genômica e alterações genéticas adicionais.⁽⁶⁾

A patogênese da SMD é o reflexo da heterogeneidade da doença, envolve múltiplos passos, mecanismos e fatores que podem ser endógenos e/ou

exógenos. O clone anormal e geneticamente instável de células hematopoiéticas se desenvolve após sofrer diversas alterações genéticas, citogenéticas e epigenéticas, em um microambiente desregulado gerando mudanças funcionais nas células, e, conseqüentemente, o estabelecimento e/ou evolução da doença.⁽⁷⁾

As opções de manejo das SMD incluem terapias modificadoras de doenças (DMT) e medidas de suporte como transfusões de hemácias e plaquetas, uso de antimicrobianos e fatores de crescimento.^(6,7) O suporte realizado por meio da transfusão sanguínea continua a ser uma estratégia de manejo para a maioria dos pacientes com SMD e até 90% dos pacientes necessitam de transfusão de concentrado de hemácias durante o curso da doença.⁽⁸⁾

A importância prognóstica da anemia e subsequente necessidade transfusional em pacientes com SMD já foi reconhecida: em 2007, Malcovati et al.⁽⁹⁾ propuseram o sistema de pontuação prognóstica baseado na classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) que veio a substituir a categoria de citopenia do Sistema Internacional de Pontuação Prognóstica (IPSS) com dependência de transfusão (DT).⁽⁹⁾

Estudos mostram que a independência de transfusão (IT) em SMD tem um impacto positivo na sobrevivência global (OS).⁽¹⁰⁾ Os pacientes classificados como IT na linha de base mostraram redução de 59% no risco de morte em comparação com pacientes dependentes de transfusão (DT).⁽¹¹⁾

Trinta a oitenta por cento dos pacientes com SMD tornam-se dependentes da transfusão durante o curso da doença e estão em risco de desenvolver aloanticorpos contra antígenos eritrocitários estranhos (aloantígenos), ou seja, antígenos ausentes nas suas hemácias, desencadeando um processo de sensibilização imunológica conhecido como aloimunização eritocitrária que é uma das principais complicações transfusionais.⁽¹²⁾

As taxas de aloimunização em pacientes com SMD foram relatadas como sendo de 15 a 32%,^(12,13) comparáveis às taxas de 20-50% encontradas em pacientes com doença falciforme.^(14,15) A maioria dos aloanticorpos é dirigida contra antígenos de grupos sanguíneos dos sistemas Rh e K. No entanto, as taxas de aloimunização a esses antígenos podem ser diminuídas usando-se uma política transfusional adequada para pacientes com SMD dependentes de transfusão, embora haja necessidade de outros estudos sobre custo-efetividade e consideração cuidadosa da disponibilidade de recursos no contexto local.^(14,16)

A consequência mais grave da aloimunização é o risco de desenvolvimento de Reação Transfusional Hemolítica Tardia (RTH), a qual pode pôr a vida desses pacientes em risco. Em muitos casos de RTH nas SMD, o nível de hemoglobina do paciente cai abaixo dos níveis transfusionais, sugerindo que além da hemólise dos glóbulos vermelhos transfundidos, os glóbulos vermelhos do próprio paciente são hemolisados, uma condição conhecida como hiperhemólise e, neste caso, transfusões adicionais podem exacerbar a hemólise e agravar ainda mais o grau de anemia.⁽¹⁷⁾

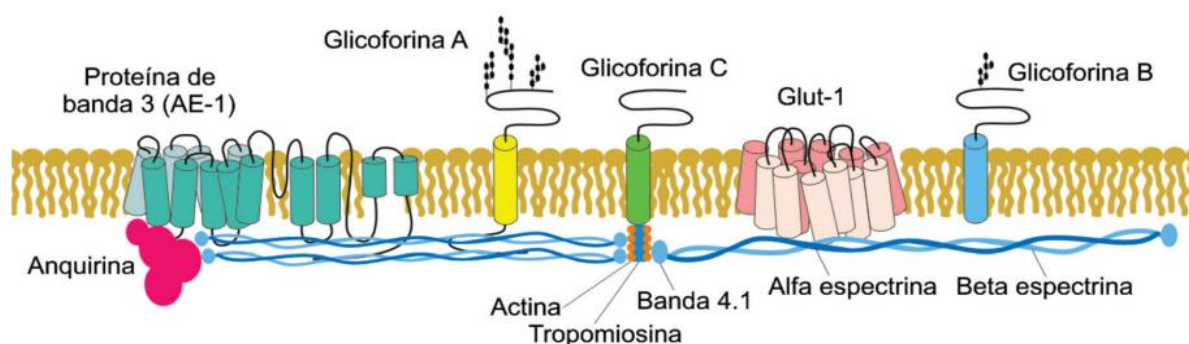
A aloimunização está relacionada a vários fatores como idade, número de transfusões recebidas, diferenças antigênicas entre doadores e receptores, imunogenicidade do antígeno e outros, podendo ainda levar a produção de autoanticorpos e, em casos mais graves, na síndrome de hiperhemólise.⁽¹⁸⁻²⁰⁾ Também pacientes que se tornam aloimunizados estão 20 vezes mais propensos a formar anticorpos adicionais após um ou mais eventos de transfusões.⁽²¹⁾ Sabe-se que as mulheres apresentam uma taxa maior de aloimunização,⁽²²⁾ devido à história de gravidez e aborto.⁽²³⁾ As RTHs são difíceis de serem diagnosticadas porque os sintomas da doença e os dados laboratoriais que geralmente encontram-se alterados nos pacientes com hemólise crônica podem mascarar este diagnóstico.^(24,25)

Enquanto não existe um padrão universal para a seleção apropriada de componentes sanguíneos para os pacientes com SMD, muitos serviços de transfusão fornecem hemácias fenotipicamente compatíveis para os antígenos Rh (C, c, E, e) e K como uma forma de reduzir a aloimunização.^(26,27) No entanto, embora estes programas possam contribuir para a redução da aloimunização, a dificuldade na obtenção de doadores fenotipados associada ao custo da realização do fenótipo tem impedido a aceitação generalizada desta abordagem. Além disso, a relação custo-benefício destes programas ainda é discutida, porque nem todos os pacientes desenvolvem anticorpos e outros, mesmo com esses cuidados, continuam ainda a desenvolver anticorpos contra antígenos de outros sistemas.⁽²⁷⁾ Desta maneira, a identificação precoce de pacientes propensos a desenvolver aloanticorpos torna-se importante e permitiria limitar o uso de hemácias fenotipicamente correspondentes àqueles em maior risco.

1.2 Aloimunização eritrocitária e transfusão sanguínea em síndrome mielodisplásica

A membrana plasmática é importante para a vida celular, pois, além de englobar e definir seus limites, ela mantém as diferenças essenciais entre os meios intra e extracelular. Podemos definir a membrana plasmática como uma camada muito fina, composta de proteínas e lipídeos que permanecem unidos por interações não covalentes. A composição da membrana plasmática do eritrócito contém 39,5% de proteínas, 35,1% de lipídeos e 5,8% de carboidratos – esses últimos presentes no lado extracelular da bicamada lipídica.⁽²⁸⁾

A maior parte das proteínas da membrana plasmática do eritrócito pode ser dividida em proteínas periféricas e proteínas transmembrana integrais. As proteínas periféricas são proteínas presentes no lado citosólico da bicamada lipídica que não atravessam a membrana plasmática do eritrócito. Como exemplo de proteínas periféricas, podemos citar as espectrinas (alfa e beta). As proteínas transmembrana integrais estão inteiramente embebidas na bicamada lipídica. Elas atravessam a membrana plasmática e são encontradas tanto na porção extracelular quanto na porção intracelular (camada citosólica). As proteínas integrais podem atravessar a membrana uma única vez ou várias vezes. Chamamos domínio transmembranar cada uma das passagens da proteína através da membrana. Como exemplo de proteínas integrais, temos as glicoforinas (Figura 1).⁽²⁹⁾



Fonte: Pinto WJ, de Marialva JE, Cardoso SM, Areas, MA. Topologia das principais proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário. Rev Ciênc Méd Biol. 2013;12(1):106–20. Figura 1. Arquitetura da membrana eritrocitária mostrando a disposição de importantes proteínas integrais e também proteínas que formam o citoesqueleto celular. p. 107.⁽²⁹⁾

Figura 1. Estrutura da membrana eritrocitária mostrando a disposição de importantes proteínas integrais e proteínas que formam o citoesqueleto celular

Convencionou-se denominar antígeno a qualquer substância solúvel, celular ou particulada, que pode ser especificamente ligada aos anticorpos ou receptores de células T (TCR – *T cell receptor*) previamente sensibilizados. Existem dois tipos de antígenos: a) o antígeno completo, que reúne propriedades imunogênicas e antigênicas, ou seja, a capacidade de induzir resposta imune específica (fala-se então de imunógeno e imunogenicidade), bem como a competência para interagir com anticorpos e receptores de linfócitos sensibilizados (antigenicidade); b) o antígeno incompleto, ou hapteno, dotado apenas de antigenicidade, que é a capacidade de interagir com os anticorpos e TCRs que lhe correspondem, mas não é capaz de estimular uma resposta imunológica.⁽²⁹⁻³⁰⁾

Os antígenos de grupos sanguíneos eritrocitários são estruturas macromoleculares localizados na superfície extracelular da membrana dos eritrócitos podendo ser um carboidrato ou uma proteína/glicoproteína.⁽³¹⁾

Esses antígenos variam na sua capacidade de induzir resposta humoral. A imunogenicidade de um antígeno é, em parte, determinada pelo processamento dos antígenos, o número de peptídeos gerados e à medida que estes peptídeos eficientemente estimulam as células T alorreativas.⁽³²⁾

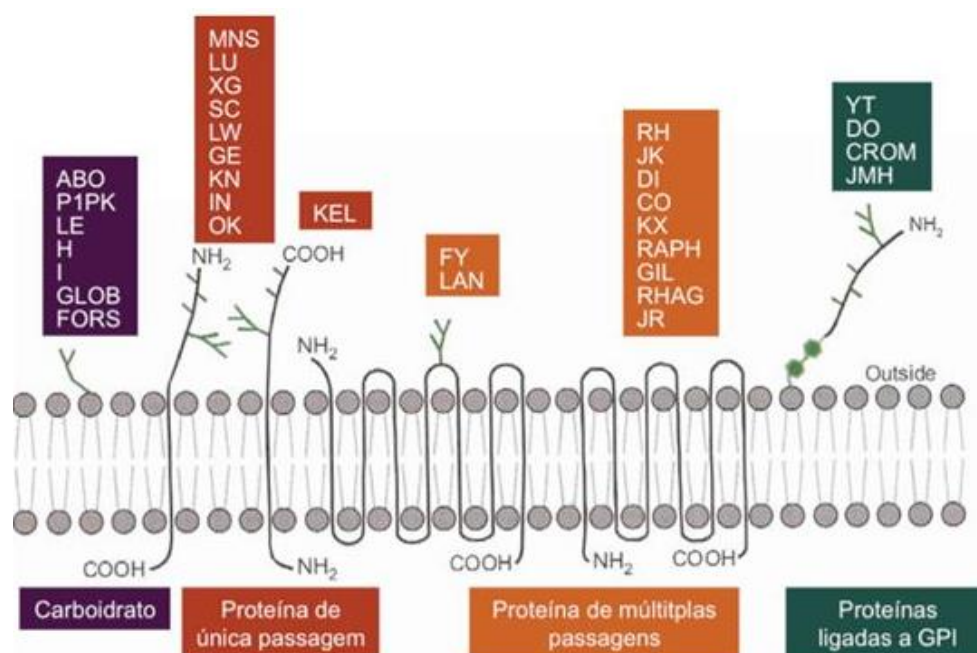
Atualmente, foram descritos 345 antígenos de grupos sanguíneos (junho de 2021) de acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), sendo que 293 encontram-se distribuídos em 43 sistemas determinados geneticamente por 48 genes (www.isbtweb.org) (Tabela 1). Estes números não são estáticos e novos antígenos de grupos sanguíneos são identificados a cada ano. Uma representação esquemática da distribuição dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária é mostrada na figura 2.⁽³³⁻³⁴⁾

Tabela 1. Sistemas de grupos sanguíneos

Nº	Nome	Símbolo do sistema	Número de antígenos	Nome(s) dos gene(s)*	Localização cromossômica
001	ABO	ABO	4	<i>ABO</i>	9q34.2
002	MNS	MNS	50	<i>GYPA, GYP, (GYPE)</i>	4q31.21
003	P1PK	P1PK	3	<i>A4GALT</i>	22q13.2
004	Rh	RH	56	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11
005	Lutheran	LU	27	<i>BCAM</i>	19q13.2
006	Kell	KEL	36	<i>KEL</i>	7q33
007	Lewis	LE	6	<i>FUT3</i>	19p13.3
008	Duffy	FY	5	<i>ACKR1</i>	1q21-q22
009	Kidd	JK	3	<i>SLC14A1</i>	18q11-q12
010	Diego	DI	23	<i>SLC4A1</i>	17q21.31
011	Yt	YT	5	<i>ACHE</i>	7q22
012	Xg	XG	2	<i>XG, CD99</i>	Xp22.32
013	Scianna	SC	9	<i>ERMAP</i>	1p34.2
014	Dombrock	DO	10	<i>ART4</i>	12p13-p12
015	Colton	CO	4	<i>AQP1</i>	7p14
016	Landsteiner-Wiener	LW	3	<i>ICAM4</i>	19p13.2
017	Chido/Rodgers	CH/RG	9	<i>C4A, C4B</i>	6p21.3
018	H	H	1	<i>FUT1; FUT2</i>	19q13.33
019	Kx	XK	1	<i>XK</i>	Xp21.1
020	Gerbich	GE	13	<i>GYPC</i>	2q14-q21
021	Cromer	CROM	20	<i>CD55</i>	1q32
022	Knops	KN	12	<i>CR1</i>	1q32.2
023	Indian	IN	6	<i>CD44</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	8	<i>SEMA7A</i>	15q22.3-q23
027	I	I	1	<i>GCNT2</i>	6p24.2
028	Globosideo	GLOB	2	<i>B3GALNT1</i>	3q25
029	Gill	GIL	1	<i>AQP3</i>	9p13
030	Rh-glicoproteína associada	RHAG	4	<i>RHAG</i>	6p12.3
031	FORS	FORS	1	<i>GBGT1</i>	9q34.13-q34.3
032	JR	JR	1	<i>ABCG2</i>	4q22.1
033	LAN	LAN	1	<i>ABCB6</i>	2q36
034	Vel	VEL	1	<i>SMIM1</i>	1p36.32
035	CD59	CD59	1	<i>CD59</i>	11p13
036	Augustine	AUG	4	<i>SLC29A1</i>	6p21.1
037	Kanno	KANNO	1	<i>PRNP</i>	20p13
038	SID	SID	1	<i>B4GALNT2</i>	17q21.32
039	CTL2	CTL2	2	<i>SLC44A2</i>	19p13.2
040	PEL	PEL	1	<i>ABCC4</i>	13q32.1
041	MAM	MAM	1	<i>EMP3</i>	19q13.33
042	EMM	EMM	1	<i>PIGG</i>	4p16.3
043	ABCC1	ABCC1	1	<i>ABCC1</i>	16p13.11

*Conforme definido pelo Comitê de Nomenclatura Gene HUGO: <http://www.genenames.org/>.

Fonte: Traduzido e adaptado de International Society of Blood Transfusion. Table of blood group systems v10.0 30-JUN-2021. Amsterdam: ISBT; 2021. Available from: encurtador.com.br/esx18.⁽³³⁾



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: Traduzido de Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. The blood group antigens factsbook. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2012. Figure 1.1 – Model of RBC membrane components that carry blood group antigens. Not shown is the Ch/Rg blood group system. Ch/Rg antigens are carried on C4d, which is adsorbed from plasma onto RBC membrane components. p. 6.⁽³⁴⁾

Figura 2. Inserção dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária

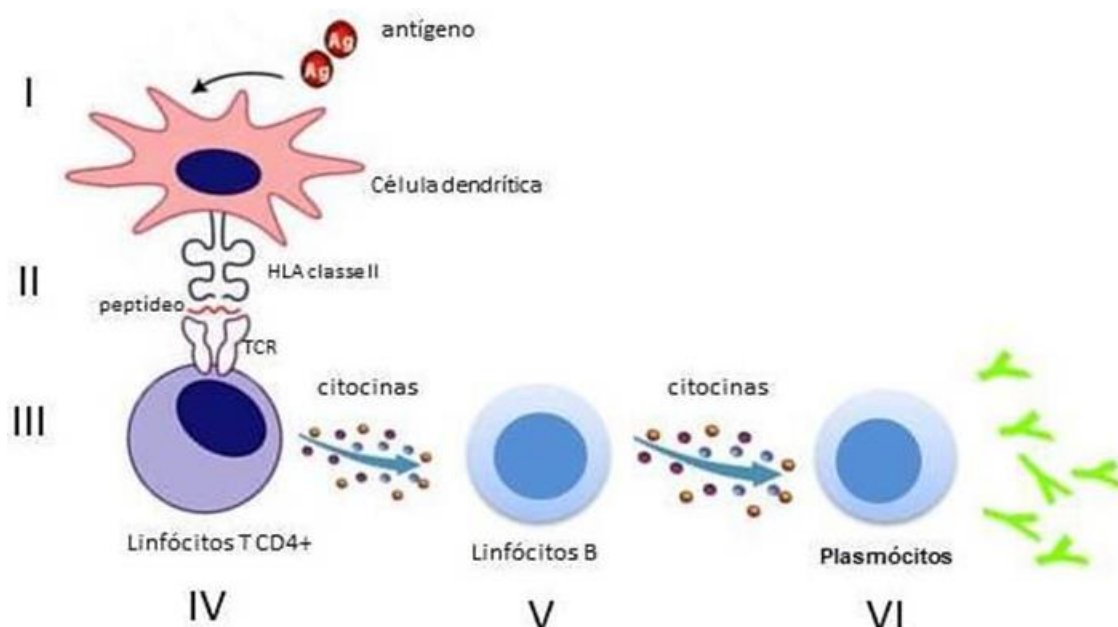
O antígeno D é significativamente mais imunogênico do que os outros antígenos de grupos sanguíneos e também o mais imunogênico dentro do sistema Rh. Em parte, isso ocorre devido às diferenças de aminoácidos entre a proteína D e a proteína RhCE. A proteína RhD difere em cerca de 35 aminoácidos da proteína RhCE e, portanto, a possibilidade de geração de epítomos imunogênicos é muito maior do que para os alelos caracterizados por uma única diferença de aminoácido como por exemplo, os antígenos Fya e Fyb.⁽⁹⁾

Os antígenos K, E, c, Jka e Fya que consistem em apenas um polimorfismo de nucleotídeo único podem não ser tão imunogênicos quanto o antígeno D, mas possuem capacidade de imunizar um número significativo de receptores.⁽³⁵⁾ Os outros antígenos menos imunogênicos possuem uma capacidade de imunização menor que 1%.^(35,36)

Aloimunização é a formação de anticorpos quando há a exposição do indivíduo a antígenos não próprios, como ocorre, por exemplo, na transfusão de sangue incompatível e nas gestantes, cujos fetos expressam em suas células sanguíneas

antígenos de origem paterna.^(34,37)

A aloimunização eritrocitária, decorrente de transfusão de concentrado de hemácias contendo antígenos de grupos sanguíneos ausentes no receptor, envolve várias etapas, tais como: reconhecimento do antígeno alogênico pelas células apresentadoras de antígeno (APCs); o processamento e a apresentação de antígenos através de moléculas HLA de classe II para o receptor de linfócito T (TCR) presentes nos linfócitos T CD4+. Após apresentação de antígeno os linfócitos T são ativados e acontece além da interação entre os linfócitos T e B, a liberação de citocinas, que vão induzir os linfócitos B a se diferenciarem em células produtoras de anticorpos (plasmócitos),⁽³⁸⁾ que por sua vez vão iniciar a secreção de anticorpos específicos para os determinantes antigênicos como representado na figura 3.^(39,40)



I: Reconhecimento do antígeno pelas células dendríticas, II: apresentação do peptídeo pelas moléculas HLA de classe II ao receptor de linfócitos T CD4+ (TCR), III: ativação de linfócitos T CD4+, IV: interação de células T e B e liberação de citocinas, V: Citocinas ativam os linfócitos B a diferenciarem-se em plasmócitos que secretam anticorpos específicos aos determinantes antigênicos.

Fonte: Sippert EA. Associação de polimorfismos genéticos com a aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de anemia falciforme [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2016. Figura 2 – Mecanismo de aloimunização eritrocitária. p. 25.⁽⁴⁰⁾

Figura 3. Mecanismo de aloimunização eritrocitária

Os linfócitos T reconhecem apenas fragmentos de peptídeos derivados do processamento de antígeno. Os fragmentos são então apresentados na superfície de uma célula apresentadora de antígeno através de moléculas MHC, gerando a resposta imunológica adaptativa.⁽⁴⁰⁾

A apresentação de antígenos aos linfócitos T inicia-se com a captura do antígeno, geralmente via fagocitose e o processamento antigênico pelas APCs. O processamento do antígeno ocorre via sua degradação proteolítica a fragmentos menores, transporte e acomodação dos peptídeos antigênicos na fenda das moléculas do MHC e finalmente na transposição do complexo MHC-peptídeo para a superfície celular para reconhecimento pelo TCR dos linfócitos T. Os linfócitos T reconhecem o complexo MHC-peptídeo via TCR, independente do compartimento celular onde esse antígeno foi captado.⁽⁴¹⁾

Normalmente os antígenos exógenos, fagocitados ou endocitados, são acomodados em moléculas de MHC classe II, que interagem com o TCR e o co-receptor CD4+ na superfície celular dos linfócitos T.⁽⁴²⁾

No processamento de antígenos intracelulares, moléculas proteicas do citosol são integradas à proteína ubiquitina e direcionadas para o proteassomo, uma unidade catalítica capaz de converter os antígenos citosólicos em peptídeos. Os peptídeos assim produzidos são conduzidos para o retículo endoplasmático e associados às moléculas de MHC classe I, esses complexos são transportados para a superfície celular para posterior apresentação aos linfócitos T CD8+.⁽⁴³⁾

Para que ocorra a ativação dos linfócitos T, após o reconhecimento do peptídeo pelo TCR, há necessidade de um segundo sinal, que é mediado pela interação de várias outras moléculas co-estimulatórias presentes na superfície do linfócito T e da APC. Por sua importância na regulação da resposta imune, pode-se destacar as moléculas co-estimuladoras participantes da interação: CD28-CD80 e CD28-CD86, que resulta em sinais estimuladores, e da interação CTLA4-CD80 e CTLA4-CD86, que promove sinalização inibitória.^(44,45)

A estimulação de células T CD4+ *helper* requer a interação de peptídeos apresentados por moléculas HLA de classe II e o receptor cognato de célula T (TCR). A ativação da célula T pode ser modulada por células T regulatórias CD4+ (Tregs) que são caracterizadas pela baixa expressão de CD127, alta expressão da molécula CD25+ e do fator nuclear FoxP3. As Tregs atuam diretamente na resposta imune das células T efectoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, sendo assim importantes no controle da resposta imunológica a antígenos próprios e não-próprios.^(46,47)

As Tregs podem participar na regulação da produção de anticorpos a aloantígenos; estudos em camundongos mostram que animais respondedores a

aloantígenos possuem atividade de Tregs reduzida quando comparados a não respondedores. Essas células atuam por diferentes mecanismos, sendo um deles a secreção de citocinas com função anti-inflamatória, como a IL-10 e o TGF- β .^(48,49)

Em um estudo recente, Bao et al.⁽⁵⁰⁾ detectaram altos níveis de IL-10 e baixos níveis de interferon gama (IFN- γ) em pacientes falciformes não aloimunizados, especulando-se que a IL-10 poderia participar na desativação da apresentação de antígenos e/ou na ativação das células T *helper* por aloantígenos transfusionais com a consequente inibição da ativação e síntese de anticorpos pelos linfócitos B. Além disso, TCD4+ estimulados de metade dos pacientes falciformes aloimunizados tinham expressão aumentada de IL-4 em comparação aos pacientes não aloimunizados, sugerindo o direcionamento para a resposta imune humoral por linfócitos T *helper* 2 (Th2) em um subgrupo de pacientes que desenvolveram aloanticorpos.

Como também todos os pacientes tinham aumento no número de linfócitos Th17 (um terceiro tipo de célula TCD4+) no sangue, foi sugerido que eles se encontravam em estado inflamatório e que teriam exacerbação da resposta imune após as transfusões. Embora com pequena casuística, este estudo apontou para possível alteração imunoregulatória nos pacientes produtores de aloanticorpos e que poderia, se confirmada, auxiliar na futura identificação dos potenciais riscos para a aloimunização.⁽⁵⁰⁾

1.3 Sistema HLA

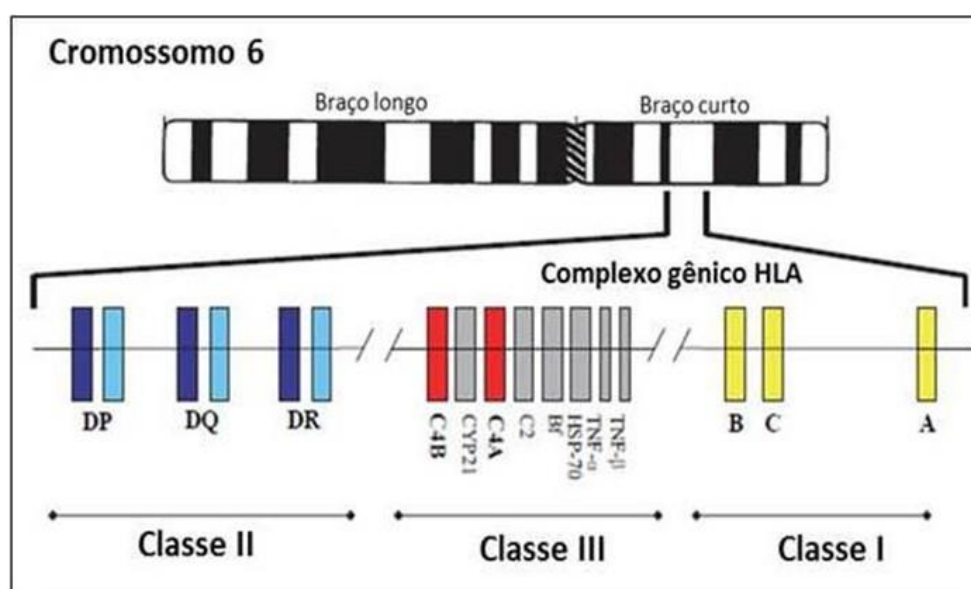
No genoma de mamíferos e, mais especificamente, no genoma humano, a região mais variável é que forma o complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*), que carrega um grande número de diferentes *loci* que codificam genes funcionais. Alguns desses genes também exibem muitas variantes (alelos), caracterizando uma região extremamente polimórfica.⁽⁵¹⁾ Esses genes pertencem ao sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA – *human leukocyte antigen*) e codificam as principais moléculas encarregadas pela apresentação do antígeno aos receptores de linfócitos T e B as quais estão situadas na membrana celular de quase todas as células do sistema imune.⁽⁴²⁾

O sistema HLA foi descrito por J Dausset,⁽⁵²⁾ em 1958, em um trabalho que lhe rendeu o Prêmio Nobel, em 1980.⁽⁵²⁾ Até julho de 2021, um total de 22.436 alelos sequenciados já era conhecido em todo o mundo, todos encontrados nos 45 genes HLA

localizados na região genômica do MHC (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). É importante notar que, embora esses genes sejam conhecidos como HLA, muitos autores usam o símbolo MHC (complexo maior de histocompatibilidade do inglês “*major histocompatibility complex*”) para designar as moléculas resultantes da expressão desses genes.⁽⁵³⁾

Os genes responsáveis pela codificação dos antígenos HLA estão localizados no complexo HLA, que corresponde a um pequeno segmento cromossômico, no braço curto do cromossomo 6, na região p21.3. O complexo contém mais de 220 genes que codificam três classes de moléculas, denominadas classe I, II e III.⁽⁴²⁾

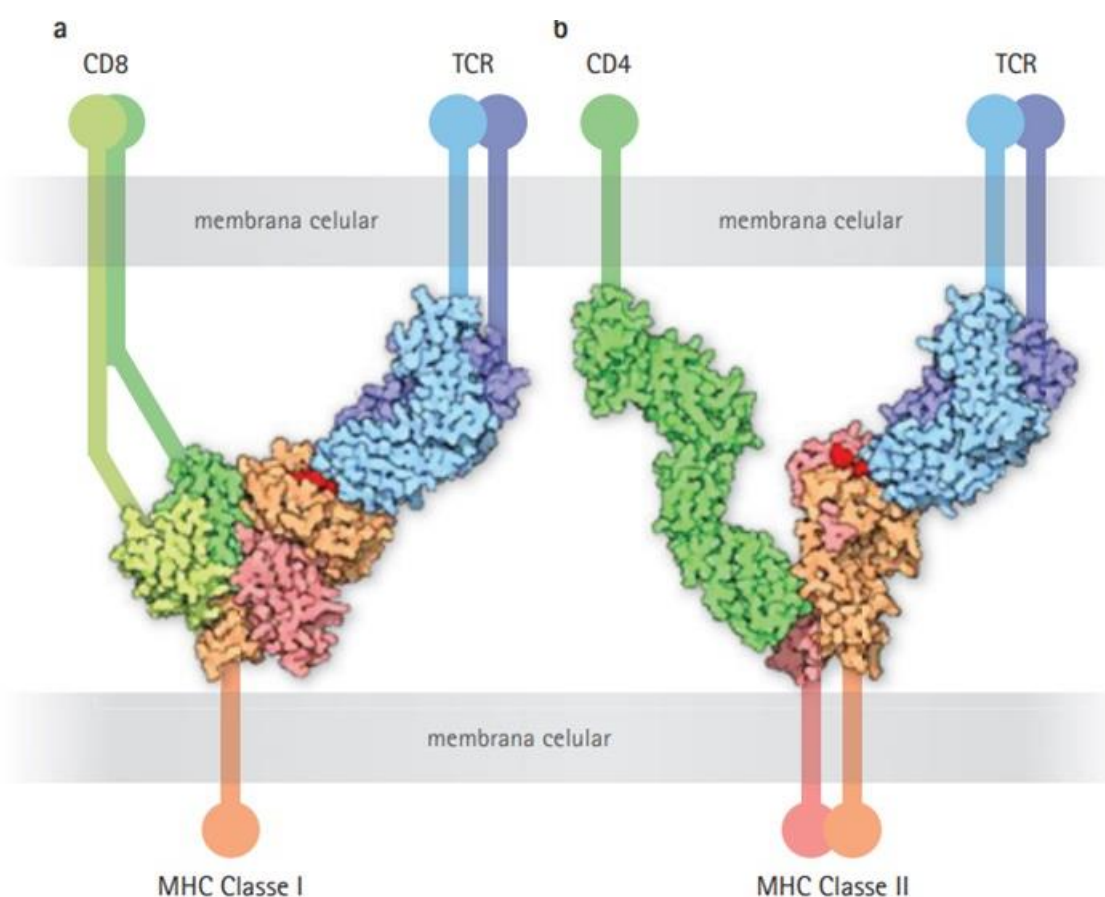
A região classe I (mais telomérica) contém genes que codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA-A, -B e -C. A região de classe II (mais centromérica) contém os genes que codificam as moléculas clássicas HLA -DR, -DQ e -DP e a região de classe III que é telomérica à região classe II e não contém genes que codificam moléculas de histocompatibilidade, e sim outras moléculas, tais como os componentes do complemento (C2, Fator B e C4), 21-hidroxilase, linfotoxina e fator de necrose tumoral- α (TNF- α).^(42,54,55) A localização do complexo gênico HLA está representada na figura 4.⁽⁵⁶⁾



Fonte: Westover JB, Sweeten TL, Benson M, Bray-Ward P, Torres AR. Immune dysfunction in autism spectrum disorder. In: Eapen V, editor. Autism: a neurodevelopmental journey from genes to behaviour. [S.l.]: IntechOpen; 2011. Figure 2 – A simplified map of the HLA region on human chromosome 6. p. 349.⁽⁵⁶⁾
Figura 4. Complexo gênico HLA presente no cromossomo 6. Esquema da localização dos genes HLA no cromossomo 6, as três regiões e a disposição dos genes de classe I, II e III

As moléculas HLA de classe I são expressas constitutivamente em todas as células nucleadas e plaquetas, e são responsáveis pela apresentação de peptídeos endógenos aos linfócitos T CD8+, enquanto que as moléculas de classe II têm uma distribuição mais restrita, sendo encontradas na superfície das APCs (células dendríticas, linfócitos B e macrófagos) com a função de apresentação de peptídeos exógenos aos linfócitos T CD4+.^(42,54)

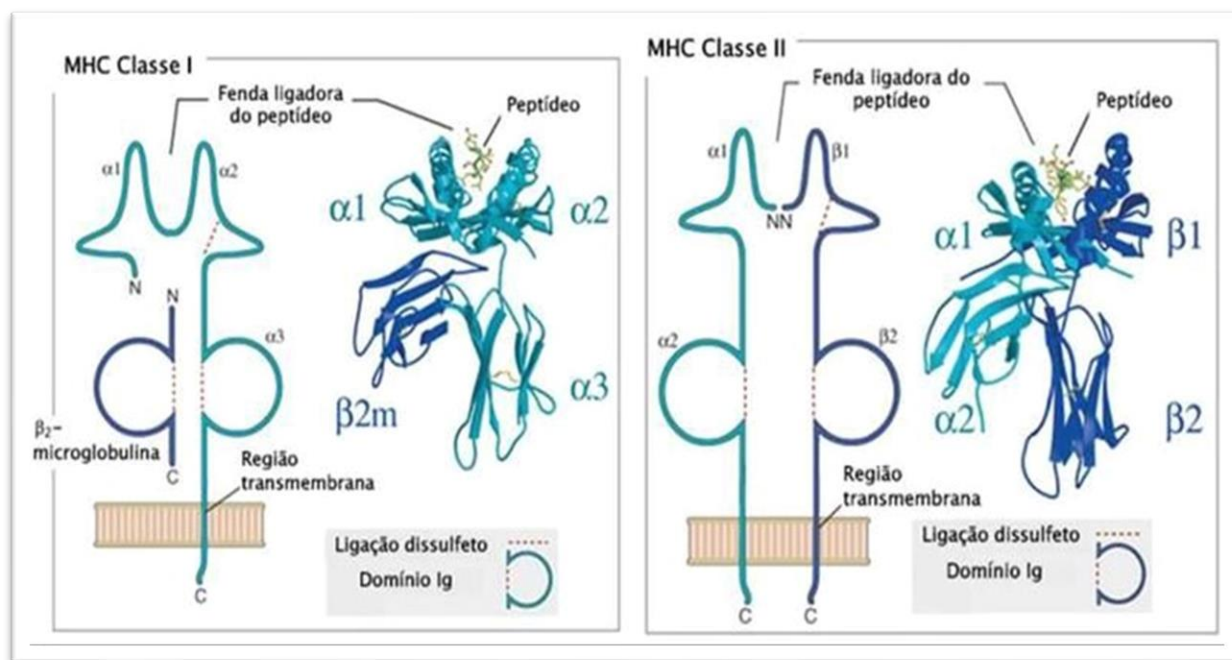
As moléculas de classe I e II são estruturalmente semelhantes (Figura 5).⁽⁵⁷⁾ Os resíduos de aminoácidos polimórficos que caracterizam as diversas moléculas estão localizados nas fendas de ligação com o peptídeo, como pode ser visualizado na figura 5. Na molécula de classe I, o sulco de ligação ao peptídeo é formado pela interação dos segmentos $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e na molécula de classe II, pela interação dos segmentos $\alpha 1$ e $\beta 1$.^(42,54)



Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Tópicos em transplante de células-tronco hematopoéticas. Rio de Janeiro: INCA; 2012. Figura 2 – As moléculas do complexo maior de histocompatibilidade são ancoradas na membrana celular e podem se ligar a receptores de células imunológicas. As de Classe I ligam-se a receptores de células T (TCR) CD8+; as de Classe II ligam-se a TCR CD4+. p. 21.⁽⁵⁷⁾

Figura 5. As moléculas MHC são ancoradas na membrana celular e podem se ligar a receptores de células imunológicas

As moléculas de Classe I ligam-se a receptores de célula T (TCR) CD8+; as de Classe II ligam-se a TCR CD4+. MHC de Classe I – presentes em todas as células nucleadas, ligam-se aos peptídeos para apresentá-los aos linfócitos T CD8+ (Figura 5a). MHC de Classe II – presentes em linfócitos B, macrófagos e células dendríticas (APC), ligam-se aos peptídeos para apresentá-los aos linfócitos T CD4+ (Figura 5b).



Fonte: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 9a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2019. p. 302 e 305. Figura 6.9 e 6.11 – Estrutura de uma molécula de MHC de classe I e Estrutura de uma molécula de MHC de classe II.⁽⁴²⁾

Figura 6. Estrutura das moléculas HLA classe I e II. O diagrama da esquerda ilustra as diversas regiões da molécula de classe I, o diagrama da direita ilustra as diversas regiões da molécula de classe II

Os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da cadeia α estão representados na figura 6. Cadeia polipeptídica $\beta 2$ -microglobulina não codificada pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), ligada não covalentemente à cadeia α . A estrutura da porção extracelular de uma molécula HLA classe I ligada a um peptídeo, é exibida pela cristalografia de raios X. O diagrama da direita mostra a estrutura das moléculas HLA classe II que consistem em duas cadeias peptídicas que dobram-se em dois domínios: $\alpha 1$ e $\alpha 2$ ou $\beta 1$ e $\beta 2$. Ao seu lado direito é exibido pela cristalografia de raios X a estrutura da porção extracelular da molécula ligada a um peptídeo.⁽⁴²⁾

As moléculas de classe II têm papel central na resposta imune-inflamatória por apresentarem fragmentos de antígenos para linfócitos TCD4+.⁽⁵⁸⁾ As

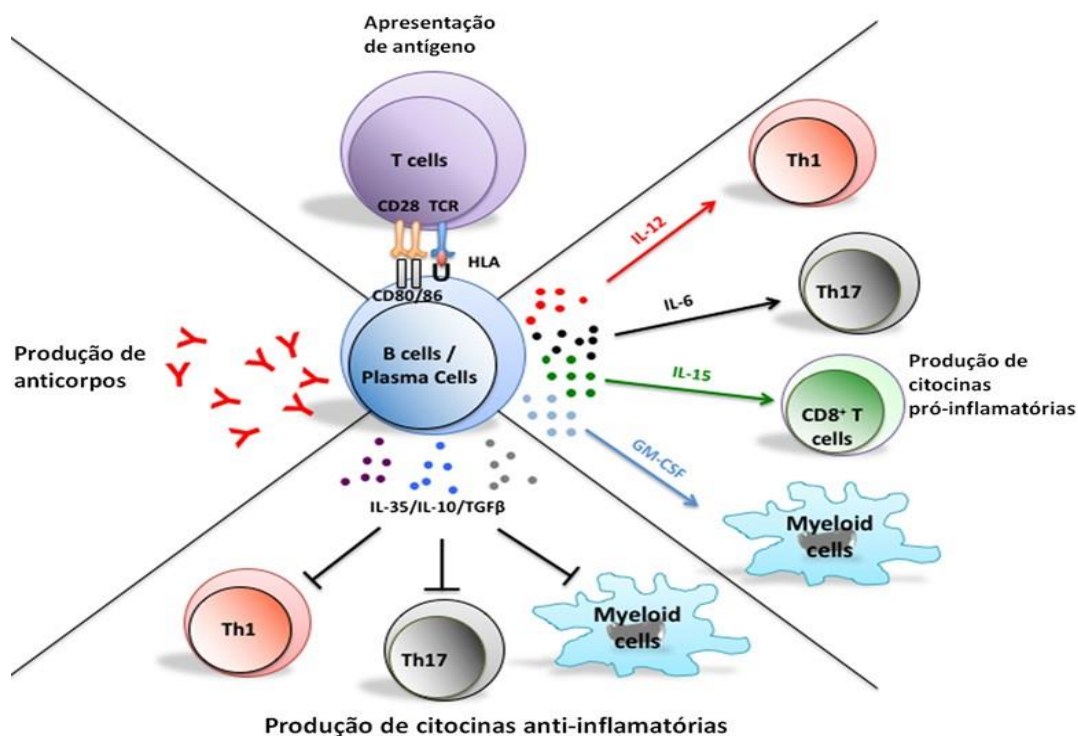
citocinas podem induzir as moléculas de classe II a se expressarem em uma variedade de células, conferindo capacidade de apresentarem antígenos para linfócitos TCD4+. As moléculas de classe II são, portanto, produtos dos genes da resposta imune de um vasto polimorfismo.⁽⁵⁹⁾

Os genes HLA apresentam grande polimorfismo e tem sido utilizado para obtenção de histocompatibilidade entre receptores e doadores de órgãos e tecidos, em estudos que tentam verificar a associação de moléculas HLA com a aloimunização eritrocitária e plaquetária em populações transfundidas e a existência de associações de genes HLA com doenças.⁽⁶⁰⁾

As moléculas HLA são muito importantes no mecanismo de aloimunização eritrocitária, estudos em populações transfundidas têm relatado uma provável relação entre alelos HLA e a resposta imune a uma variedade de antígenos eritrocitários, incluindo os antígenos D,⁽⁶¹⁾ Jka,^(60,62,63) K,^(64,65) Fya,^(62,66,67) Mia⁽⁶⁸⁾ e Dia.^(67,69) No entanto, até o momento não foram demonstradas associações consistentes entre moléculas HLA e o risco de aloimunização em pacientes com SMD.^(70,71)

1.4 Polimorfismos em genes de citocinas

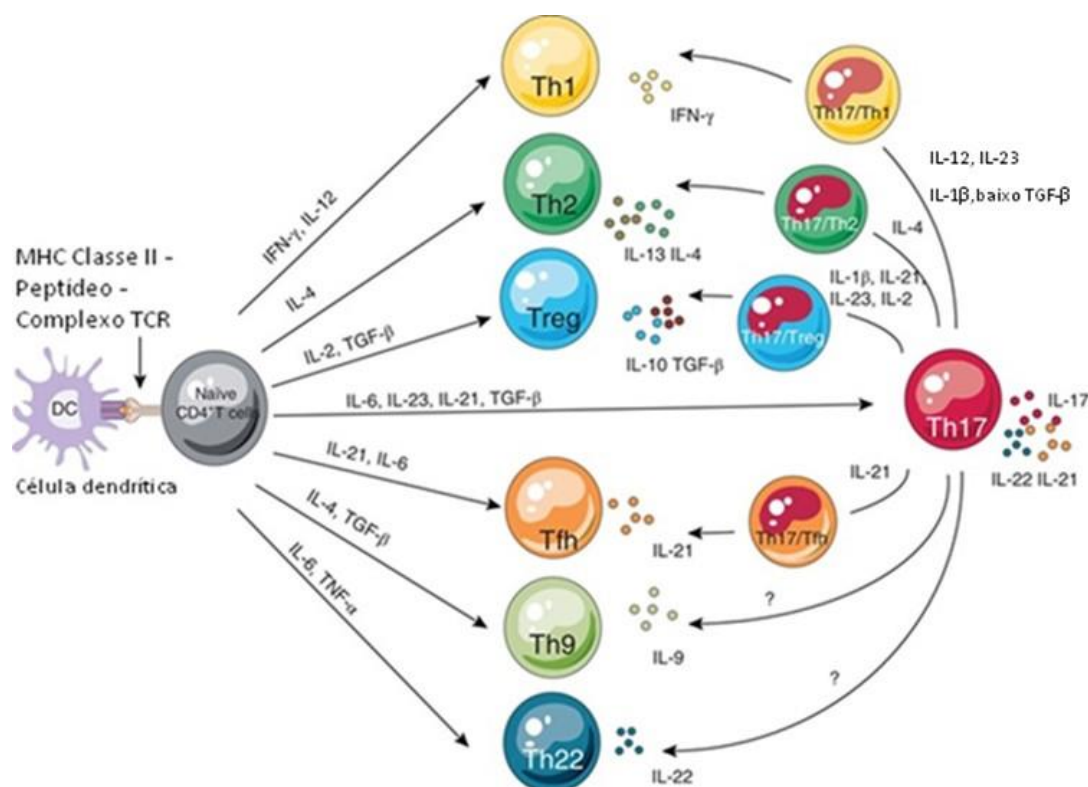
As citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adquirida e participam em muitas de suas funções. Elas são produzidas em resposta a microrganismos, vários antígenos e diferentes estímulos. Além disso, estimulam e regulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação, sendo que, nas fases efetoras da imunidade inata e adquirida, as citocinas ativam diferentes células efetoras para eliminar microrganismos e outros antígenos e na fase de ativação das respostas imunes adquiridas, elas estimulam a proliferação e a diferenciação de linfócitos (Figuras 7 e 8).⁽⁴²⁾



Fonte: Traduzido de Li R, Rezk A, Healy LM, Muirhead G, Prat A, Gommerman JL, et al.; MSSRF Canadian B cells in MS Team. Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. Front Immunol. 2016;6:626. Figure 1 Multifaceted functions of B cells and their implications in the pathogenesis of MS. p. 2.⁽⁷²⁾

Figura 7. As múltiplas funções das células B e suas implicações

Além do potencial de se diferenciar em plasmócitos secretores de anticorpos e células plasmáticas, as células B podem apresentar antígenos para células T, bem como regular para cima ou para baixo as respostas imunes locais por meio da produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias, respectivamente. As células plasmáticas também podem secretar citocinas pró e anti-inflamatórias que podem modular as respostas das células T e mielóides.⁽⁷²⁾



Fonte: Traduzida e adaptada de Yang P, Qian FY, Zhang MF, Xu AL, Wang X, Jiang BP, et al. Th17 cell pathogenicity and plasticity in rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol.* 2019;106(6):1233–40. Figure 1 The phenotype and plasticity of Th cells. p. 1235.⁽⁷³⁾

Figura 8. O fenótipo e a plasticidade das células Th

Impulsionadas pelo ambiente inflamatório, as células T CD4⁺ naive podem ser polarizadas para células Th funcionalmente distintas, como Th1, Th2, Th17, Th folicular e células T reguladoras. As células Th17 são heterogêneas e podem se diferenciar em subconjuntos altamente diversos. Sob influência de diferentes citocinas, as células Th17 capturaram a capacidade de se converter em células Th1, Th2, Tfh, Treg e assim por diante. Além disso, as células Th17 adquirem funções patogênicas ou imunossupressoras pela diferenciação em doenças autoimunes.⁽⁷³⁾

A atividade das citocinas pode ser redundante, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas.⁽⁷⁴⁾ Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Algumas citocinas podem ter ações pró- (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), de acordo com o microambiente

no qual estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF (fator de necrose tumoral). As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FTC- β (fator transformador de crescimento β).^(75,76)

As citocinas participam diretamente na resposta imune mediada por anticorpos e, portanto, têm potencial para serem determinantes da resposta imune.

O gene da interleucina 1 está localizado no cromossomo 2. A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória, fortemente expressa por macrófagos, células dendríticas, teciduais, monócitos, linfócitos B, células epiteliais e células NK.⁽⁷⁷⁾ e afeta quase todos os tipos celulares, é importante na imunidade inata e adaptativa, na patogênese de doenças infecciosas, autoimunes e doenças auto inflamatórias, bem como na mediação de respostas inflamatórias sistêmicas compreendendo febre, proteínas hepáticas de fase aguda, e ativação de leucócitos.^(77,78) A IL-1 β também possui um papel adjuvante na expansão e diferenciação de células T CD4+ e produção de anticorpos.⁽⁷⁹⁾

A interleucina-4 (IL-4) é essencial para a geração de células Th2, e induz a proliferação e diferenciação de células B, estimulando a síntese principalmente de IgE e de IgG1. Os polimorfismos, -590C/T (rs2243250) na região promotora de *IL4* e o polimorfismo *IL4* 70bp-VNTR (número variável de repetições *in tandem*, do inglês variable number of tandem repeats) localizado no terceiro íntron, foram associados com maior produção de IL-4 ou atividade de células T.⁽⁸⁰⁻⁸²⁾ O polimorfismo *IL4* VNTR contém 3 alelos, o alelo RP1, com duas repetições de um fragmento de 70 pares de base, alelo RP2, com três repetições, e alelo RP3, sem repetições. Estes dois polimorfismos no gene *IL4* parecem estar associados com atopia e alergia, e também com determinadas condições autoimunes e inflamatórias.⁽⁸²⁻⁸⁶⁾

O gene da *IL6* está localizado no cromossomo 7. A interleucina-6 (IL-6) está envolvida na resposta inflamatória e na regulação da diferenciação de células B assim como na produção de imunoglobulinas. A IL-6 também inibe completamente a geração de células T reguladoras induzidas pelo TGF- β .⁽⁸⁶⁾ Os polimorfismos *IL6*-174C>T (rs1800795) e *IL6*-572C>G (rs1800796) descritos na região promotora do gene da IL-6 foram investigados por Lin et al.,⁽¹⁶⁾ em uma população transfundida e a produção do anticorpo anti-E foi positivamente associada somente ao alelo *IL6* -572G com alta produção desta citocina.

O gene da *IL10* está localizado no cromossomo 1 e é altamente polimórfico. A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina Th2, produzida por macrófagos, linfócitos T (principalmente Tregs) que participa no controle das reações da imunidade

inata e da imunidade mediada por células.⁽⁴²⁾ Possui atividade anti-inflamatória, como inibidor da produção de interferon γ (INF- γ) de células Th1 e apresentação de antígenos pelos macrófagos.⁽⁸⁷⁾ A produção de IL-10 pode ser influenciada por três SNPs localizados na região promotora do gene IL10: -592C/A (rs1800872), -819T/C (rs1800871) e -1082G/A (rs1800896),^(88,89) devido a alteração de sítios específicos de reconhecimento de fatores transcricionais. Polimorfismo no gene *IL10* (posição -1082) tem sido associado com lúpus eritematoso sistêmico⁽⁹⁰⁾ e artrite reumatoide.⁽⁹¹⁾

A interleucina 17 (IL-17) faz parte de uma família de citocinas relativamente nova, sendo uma glicoproteína homodimérica de 155 aminoácidos ligada a um radical dissulfeto, e seu gene está localizado no cromossomo 6. É predominantemente produzida por linfócitos-T-CD4, atuando como um homodímero de 35 kDa em linfócitos T. A IL-17 consiste em 6 membros (IL-17 A-F), e cinco receptores (IL-17 RA-RD e SEF) identificados. A IL-17A e IL-17F são secretadas por células Th17, uma linhagem distinta de linfócitos T CD4⁺ efetores; agem como citocinas pró-inflamatórias induzindo grande influxo de células inflamatórias e de outras citocinas e levando à formação de IL-6 e IL-8 (quimiocina) e da molécula de adesão intercelular em fibroblastos humanos.^(75,76,92-94) Os avanços nas áreas da biologia molecular e de genética permitiram a identificação dos genes que codificam a produção de diferentes citocinas e dos polimorfismos relacionados a estes genes.^(88,95,96)

O gene *TNF* está localizado no cromossomo 6, sendo Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) considerada uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do organismo. Esta citocina é secretada por macrófagos, linfócitos e monócitos, sendo a presença de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos o principal estímulo para que isto ocorra.⁽⁹⁷⁾

Sippert et al.⁽⁹⁸⁾ identificaram uma relação significativa entre a presença de polimorfismos nos genes *TNFA* e *IL1B* das citocinas pró-inflamatórias e o aumento do risco de pacientes com doença falciforme aloimunizarem após transfusões de hemácias. Neste estudo, o genótipo TNFA-308GA parece contribuir para aumentar o estado inflamatório neste grupo de pacientes, através do aumento do nível de TNF- α , uma vez que este estado inflamatório mais elevado predispõe o paciente a um risco maior de aloimunização. O polimorfismo IL1B-511TC tem sido associado a alterações na transcrição genética e na produção de proteína IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel adjuvante na produção de anticorpos. O estudo concluiu que

pacientes com os genótipos concomitantes *TNFA*-308GA/*IL1B*-511TC estão mais suscetíveis à aloimunização eritrocitária.

Estas descobertas trouxeram novos horizontes, permitindo avaliar a participação destes mediadores em diversas condições, inclusive clínicas, na predisposição a aloimunização eritrocitária, como evidenciado pelo estudo de Sippert et al.⁽⁹⁸⁾ realizado em pacientes politransfundidos com anemia falciforme que mostrou a associação de polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias *IL1B* e *TNFA* associados com um maior risco a aloimunização eritrocitária.

Polimorfismos em genes envolvidos na regulação de linfócitos Th1 e Th2 são potenciais marcadores genéticos para estudos de associação para definir os alelos de predisposição.⁽⁹⁶⁾ Estudos mostram que polimorfismos funcionais relevantes nos genes *IL4* e *IL10* têm sido bem caracterizados,^(95,96) e sabe-se que polimorfismos na região promotora *IL4*-590C/T⁽⁹⁹⁾ e *IL10*-1082A/G estão correlacionados com os níveis de produção de IL-4 e IL-10, respectivamente. Desta forma, com a pesquisa destes SNPs é possível verificar se há associação entre o perfil genético de produção dessas citocinas e a aloimunização eritrocitária.^(95,100)

Pacientes com SMD necessitam de transfusões sanguíneas recorrentes, o que pode levar a um risco maior da produção de aloanticorpos eritrocitários, acarretando uma diminuição na disponibilidade de bolsas compatíveis. A identificação de polimorfismos em genes de resposta imune como HLA e citocinas associados com aloimunização eritrocitária em paciente com SMD, pode potencialmente ajudar na identificação de pacientes com maiores riscos de aloimunização. A análise destes polimorfismos por meio de técnicas moleculares de fácil acesso pode contribuir futuramente na seleção dos pacientes respondedores que devem receber concentrado de hemácias com compatibilidade genética estendida, com o objetivo de redução da aloimunização eritrocitária e dos efeitos adversos às transfusões.

Neste trabalho, analisamos alelos HLA-DRB1 e polimorfismos nos genes de citocinas *TNFA*-308G/A, *IL1B*-511C/T, *IL4*-590C/T, *IL4* íntron 3 VNTR, *IL10*-1082A/G, -819T/C, -592A/C, *IL17F*(7488A/G) e *IL-17A*-197G/A em pacientes transfundidos que desenvolveram anticorpos e naqueles que não desenvolveram, para testar possível associação.

1.7 Objetivos

1. Caracterizar os perfis eritrocitários, polimorfismos em genes de citocinas e alelos HLA-DRB1 que possam predispor a aloimunização em pacientes com síndromes mielodisplásicas e que contribuam no desenvolvimento de abordagens imunoterapêuticas para a prevenção de respostas imunes mediadas por transfusão sanguínea;
2. Realizar a imunofenotipagem eritrocitária e pesquisa de anticorpos irregulares eritrocitários nas amostras de pacientes com síndromes mielodisplásicas para a classificação dos pacientes aloimunizados e não aloimunizados;
3. Avaliar o perfil transfusional dos pacientes portadores de síndromes mielodisplásicas e a ocorrência de aloimunização eritrocitária nesses pacientes;
4. Identificar o perfil dos antígenos de grupos sanguíneos em pacientes com SMD utilizando técnicas de biologia molecular;
5. Realizar a genotipagem para HLA-DRB1 e avaliar se alelos HLA podem estar associados à aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de síndromes mielodisplásicas;
6. Determinar as frequências de alelos, genótipos e haplótipos dos polimorfismos *IL1B*-511C/T, *IL4*-590C/T e íntron 3 VNTR, *IL6*-174C/T, *IL10*-1082A/G, -819T/C, -592A/C, *IL17A*-197G/A, *IL17F*(7488A/G), *TNFA*-308G/A e as possíveis associações com a aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de síndromes mielodisplásicas transfundidos aloimunizados e não aloimunizados, e em indivíduos controles;
7. Propor um protocolo para genotipagem de interleucinas de pacientes portadores de síndromes mielodisplásicas para avaliar susceptibilidade a aloimunização.

2 MÉTODOS

2.1 Casuística

2.1.1 Pacientes portadores de síndrome mielodisplásica

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram coletadas amostras de sangue de 117 pacientes com diagnóstico de síndrome mielodisplásica, que apresentaram histórico de transfusão sanguínea de, pelo menos, 2 concentrados de hemácias nos últimos 6 meses antes da data de inclusão e 28 pacientes portadores de SMD que não apresentaram histórico transfusional ou com menos de 2 transfusões de concentrados de hemácias no mesmo período, alocados no grupo controle. Sessenta e um pacientes de ambos os sexos sem limitação de faixa etária foram atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (incluídos 20 pacientes) e 36 pacientes originários da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As amostras foram coletadas nesses dois serviços de origem e enviadas ao Hospital Israelita Albert Einstein onde foram realizados todos os testes laboratoriais e análise de dados. A inclusão foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HIAE conforme emenda realizada sob o número CAAE: 07971819.2.0000.0071 versão 2. O presente trabalho foi executado conforme as normas do CEP com Seres Humanos do Hospital Israelita Albert Einstein, em consonância com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CNS/CONEP).

O tamanho amostral foi calculado considerando-se o nível de confiança de 95% e margem de erro 5%, e considerando a presença de anticorpos eritrocitários em 20% da população com mielodisplasia, segundo casuística observada na rotina do Banco de Sangue do Hospital Israelita Albert Einstein.

2.1.2 Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi aprovado em 2 de janeiro de 2019 pelo CEP do Hospital Israelita Albert Einstein. Parecer nº 3.105.489, conforme previsto na resolução

no 196/96 do CNS. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, previamente aprovado pelo CEP. Além disso, o presente trabalho foi submetido ao Sistema Gerenciador de Projetos de Pesquisa (SGPP), sendo aprovado com o parecer nº 3521-18.

2.2 Materiais

2.2.1 Água livre de nuclease

A água livre de nuclease utilizada neste estudo foi adquirida da empresa Invitrogen® (Vilnius, Lituânia). Reagente utilizado na etapa de reconstituição dos *primers* e nas reações de PCR.

2.2.2 Etanol absoluto (CH₃CH₂OH)

O etanol absoluto (P.A.) utilizado no protocolo de extração de DNA e em preparação de reagentes é proveniente da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2.3 Kit de extração de DNA

O kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit da empresa Qiagen® (Qiagen, Valencia, CA, USA) foi utilizado para a extração do DNA de sangue periférico. Neste kit estão inclusos os reagentes: proteinase K, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, e os consumíveis: colunas de sílica e tubos de lise.

2.2.4 Primers

Para os protocolos de PCR convencional (PCR-AS e PCR-RFLP) os *primers* utilizados na genotipagem dos polimorfismos *TNFA*–308G/A, *IL1B*–511C/T, *IL4*–

590C/T, *IL4* íntron 3 VNTR, *IL10*–1082A/G, –819T/C, –592A/C, *IL17F*(7488A/G) e *IL17A*–197G/A, (descritos na Tabela 2) foram confeccionados pela empresa Invitrogen® (Vilnius, Lituânia) de acordo com as referências Noizat-Pirenne et al.;⁽¹⁷⁾ Singleton et al.;⁽¹⁰¹⁾ Chiu et al.;⁽¹⁰²⁾ Legler et al.;⁽¹⁰³⁾ Hipsky et al.⁽¹⁰⁴⁾ e Cantagrel et al.⁽¹⁰⁵⁾

2.2.5 Taq DNA polimerase

A enzima Taq DNA polimerase (Go Taq® DNA Polymerase, Promega, Madison, WI, USA) foi utilizada nas Reações em Cadeia da Polimerase Alelo Específica (PCR-AS), Análise dos Fragmentos da Digestão Enzimática dos Produtos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-RFPL – *restriction fragment length polymorphism*), e Reação em Cadeia da Polimerase Sequência Específica de Oligonucleotídeos (PCR-SSO – *sequence specific oligonucleotide*). O kit incluía 5 unidades/μL da enzima, 1mL de tampão com corante 5X Green GoTaq® Flexi Buffer e 1,2mL de MgCl₂ 25mM.

Para a técnica de *microarray* em solução líquida BLOODchip (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain) foi utilizada a enzima HotStarTaq® DNA Polymerase Qiagen® (Qiagen, Valencia, CA, USA).

2.2.6 Desoxinucleotídeos 10Mm

Para as técnicas de PCR convencional as desoxinucleotídeos (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) adquiridas da empresa Invitrogen® (Vilnius, Lituânia), foram utilizadas na concentração de 10mM.

2.2.7 Marcador de peso molecular

Para a análise do tamanho dos fragmentos de DNA, foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb Invitrogen® (Vilnius, Lituânia), juntamente com o corante Gel Loading Dye Purple (6X) New England BioLabs® (Beverly, MA, EUA).

2.2.8 Tampão Tris-EDTA-Borato 10X

Tampão (TEB) 10X utilizado no preparo do gel de agarose e na corrida de eletroforese. Este tampão é preparado dissolvendo-se 108g de UltraPure™ Tris (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 55g de ácido bórico (Promega, Madison, WI, USA) e 40mL de UltraPure™ EDTA 0,5M pH 8.0 (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) em quantidade de água destilada (dH₂O) suficiente para 1000mL.

2.2.9 Enzimas de restrição

As enzimas de restrição utilizadas para a digestão dos produtos de PCR deste trabalho foram adquiridas das empresas New England Biolab® (Beverly, MA, EUA), Anza™ Invitrogen® (Vilnius, Lituânia) e Promega (Madison, WI, USA) e foram utilizadas de acordo com o polimorfismo estudado, como podem ser visualizadas na tabela 2.

2.2.10 Intercalante de DNA

O intercalante de ácidos nucleicos (DNA e RNA) para uso em gel utilizado foi o UniSafe Dye 20.000X (Uniscience Corporation), alternativa segura para o brometo de etídio, por não apresentar atividade carcinogênica, mutagênica ou tóxica. Apresentação de 1mL com armazenamento a temperatura ambiente.

2.2.11 Gel de agarose

A solução de agarose foi preparada de acordo com a concentração específica de cada protocolo (2, 3, 4 ou 4,5%), com TEB 1X. Esta solução era aquecida em forno micro-ondas, durante 1 minuto aproximadamente e, após retirada do micro-ondas, é adicionado 3μL de *SafeDye* Invitrogen® (Vilnius, Lituânia), intercalante de ácidos nucleicos.

2.2.12 Plataforma ID CORE^{XT} BLOODChip

O ID Core^{XT} BLOODChip (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Derio, Bizkaia, Espanha) é um kit de genotipagem de grupos sanguíneos eritrocitários, que contém 1 tubo com ID Core^{XT} Beads Master Mix, 1 tubo com ID Core^{XT} PCR Master Mix, 1 tubo SAPE, 1 tubo SAPE Dilution Buffer e um CD informativo. Esse kit permite genotipar para dez sistemas de grupos sanguíneos e seus determinados SNPs, sendo necessário utilizar a plataforma Luminex[®].

2.2.13 Kit Lifecodes HLA-DRB1 SSO Typing

Para genotipagem de grupos alélicos HLA de classe II foi utilizado o kit Lifecodes HLA-DRB1 SSO Typing (Immucor, Dreieich, Germany), tecnologia Luminex xMap (Luminex Corporation, Austin, EUA). Foi utilizado o kit Lifecodes HLA-DRB1 SSO Typing (Immucor, Dreieich, Alemanha) para genotipagem dos alelos HLA do *loci* HLA-DRB1 (-DQB1). O kit era composto por reagentes de pré-PCR: solução única de *primers*, específico para cada *loci* HLA e *mastermix*; e reagentes de pós-PCR (hibridização): mistura de “*beads*” (microesferas ligadas a sondas de oligonucleotídeos específicos para cada alelo), tampão de diluição, tampão de coloração SAPE.

2.2.14 Ensaios TaqMan[®] para genotipagem de SNPs em genes de citocinas

Os ensaios de genotipagem TaqMan[®] que foram utilizados são: rs1800871 (C_1747362_10), rs2243250 (C_16176216_10) e rs1800795 (C_1839697_20), confeccionados e sintetizados pela Applied Biosystems[®]. Cada ensaio possuía um par de iniciadores que flanqueiam o SNP e um par de sondas: uma homóloga ao tipo mutante marcada com 6-carboxifluoresceína (FAM[®]), e outra homóloga ao tipo selvagem, marcadas com VIC[®].

2.2.15 Mastermix de genotipagem Taqman®

Para a genotipagem de polimorfismos por PCR em tempo real foi utilizado o *mastermix* de genotipagem TaqMan® (Applied Biosystems®). Neste mix já estava adicionada a enzima DNA polimerase AmpliTaq Gold® UP (Ultra Pura), tampão otimizado e dNTPs.

2.3 Metodologia

2.3.1 Coleta de amostras

Aproximadamente 5mL de sangue venoso periférico foram coletados em um tubo contendo EDTA e 5mL em tubo seco com gel separador. Uma pequena alíquota de sangue total anticoagulado com EDTA foi utilizada para a imunofenotipagem dos antígenos eritrocitários. O plasma e/ou soro foi utilizado para a pesquisa de anticorpos. O *buffy coat* foi utilizado para a extração de DNA para genotipagem eritrocitária e de polimorfismos de citocinas.

2.3.2 Determinação dos anticorpos eritrocitários transfusionais no soro dos pacientes

Amostras dos pacientes foram submetidas aos testes imunohematológicos segundo o manual de normas técnicas da Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB).

As amostras foram tipadas para antígenos ABO e RhD, incluindo D fraco. Foi utilizada a técnica de hemaglutinação em tubo, com antissoros específicos anti-A, anti-B, anti-AB e anti-D (Immucor, Norcross, GA, EUA; Bio-Rad, Lagoa Santa, Brasil) e gel-centrifugação. Tipagem ABO reversa foi realizada utilizando reagentes eritrocitários comerciais, hemácias A1 e B (Bio-Rad, Lagoa Santa, Brasil).

A investigação foi realizada por meio da técnica de gel-centrifugação e técnica em tubo, com meios potencializadores de reação como LISS (meio de baixa força iônica), enzimas (papaína e bromelina) e PEG (polietilenoglicol) (Immucor,

Norcross, GA, EUA). Nos casos com PAI positiva foi realizado o teste para identificação da especificidade do anticorpo com diferentes meios potencializadores da hemaglutinação, utilizando painéis de hemácias fenotipadas disponíveis comercialmente e painéis para identificação de anticorpos eritrocitários (Progenika Biopharma-Grifols, Bizkaia, Espanha). A investigação foi complementada, quando necessário, utilizando hemácias fenotipadas raras congeladas, realização de eluato pelo método de eluição ácida (DiaCidel, Bio-Rad, Brasil) para teste direto de antiglobulina positivo e em casos específicos foram realizadas adsorções para auxiliar na identificação ou exclusão dos anticorpos. Foram consideradas pesquisas de anticorpos positivas, aquelas que apresentaram positividade para anticorpos clinicamente significantes contra o sistema Rh, Kell, Kidd, Duffy e MNS.

Nos pacientes com anticorpos eritrocitários circulantes identificados na pesquisa descrita acima, foi realizada fenotipagem para o(s) respectivo(s) antígeno(s), utilizando soros comerciais e quando necessário foi realizada também a genotipagem.

2.3.3 Extração de DNA

O DNA foi extraído de *buffy coat* após centrifugação a 3500rpm por 5 minutos ou de sangue total das amostras de sangue homogeneizadas anticoaguladas com EDTA utilizando o kit QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®, CA, EUA) de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante. A concentração e a qualidade de todos os DNAs extraídos foram determinadas pela medida da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro Nanodrop (Applied Biosystems®, USA).

2.3.4 Genotipagem eritrocitária

A genotipagem foi realizada por meio do Kit ID Core^{XT} BLOODChip (Progenika Biopharma-Grifols, Bizkaia, Espanha). Esta plataforma utiliza kit que contém todos os reagentes necessários para a execução da técnica. Esse kit permite genotipar para dez sistemas de grupos sanguíneos e seus determinados SNPs conforme ilustra a tabela 1, sendo necessário utilizar a plataforma Luminex®, equipamento que é um

citômetro de fluxo modificado que faz a leitura das sondas de oligonucleotídeos específicos, fixados a microesferas codificadas por cor, que hibridizam especificamente com os produtos marcados de PCR. Nessa plataforma, as regiões alvo do DNA genômico são amplificadas em uma reação de PCR multiplex, realizada com nucleotídeos biotinilados, seguida da hibridização, utilizando sondas de oligonucleotídeos alelos específicos ligadas a microesferas (*beads*) e marcadas com ficoeritrina e estreptavidina conjugadas e reveladas com SAPE (Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate – Streptavidina conjugada a Ficoeritrina).⁽¹⁰⁶⁾

Nessa técnica, descrita em Bianchi,⁽¹⁰⁶⁾ o DNA (previamente diluído a 20ng/μL) foi amplificado por PCR usando o Master Mix (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Derio, Bizkaia, Espanha) e a Taq Hot Start (Qiagen®, CA, EUA). As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems®), com o seguinte ciclo de PCR: primeira etapa do ciclo à 95°C, durante 15 minutos, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 80 segundos a 72°C, seguido de uma etapa final durante 7 minutos a 72°C e infinito a 4°C.

A hibridização do produto de PCR com as microesferas marcadas foi realizada após a amplificação, pipetando-se 4μL do produto de PCR para 46μL das Beads Master Mix (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Derio, Bizkaia, Espanha). As reações foram feitas no termociclador Veriti (Applied Biosystems®) com a seguinte ciclagem: 95°C durante 2 minutos, seguido por 52°C, durante 30 minutos. Após esses 30 minutos de hibridização, para a revelação da hibridização, a placa foi mantida no termociclador e o selante removido para a adição do SAPE (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Espanha) em todos os poços.

O produto desta reação foi analisado no sistema Luminex 100/200 com *software* xPONENT 3.1 (Luminex®, USA), onde foi possível verificar presença de polimorfismos específicos em cada amostra analisada, através do sinal de fluorescência intrínseca de cada *bead*, com a ausência ou presença de um sinal correspondente à ficoeritrina. Para a análise dos dados o *software* analisa e interpreta os sinais quantificados e produz um banco de dados com os resultados de genótipo para cada um dos SNPs incluídos (Tabela 2). Além disso, o *software* converte os genótipos em fenótipos para os antígenos dos grupos sanguíneos analisados.

Tabela 2. Alelos presentes no ID CoreXT BLOODChip, *Blood Group Genotyping*

Sistema de grupo sanguíneo	Alelos	Antígenos
RhCE	<i>RHCE*ce; RHCE*Ce, RHCE*cE; RHCE*CE, RHCE*CeCW, RHCE*ceCW, RHCE*CECW, RHCE*ceAR, RHCE*CeFV, RHCE*CeVG, RHCE*cEFM, RHCE*ce[712G], RHCE*Ce[733G], RHCE*ce[733G], RHCE*ce[733G,1006T], RHCE*CE-D[5,7]-CE, RHCE*cE[712G,733G], RHD*r's-RHCE*ce[733G,1006T]</i>	C (RH2), E (RH3), c (RH4), e (RH5), CW (RH8), V (RH10), hrS (RH19), VS (RH20) hrB (RH31)
Kell	<i>KEL*K_KPB_JSB, KEL*k_KPB_JSB, KEL*k_KPA_JSB, KEL*k_KPB_JSA</i>	K (KEL1), k (KEL2), Kpa (KEL3), Kpb (KEL4), Jsa (KEL6), Jsb (KEL7)
Kidd	<i>JK*A, JK*B, JK*B_null(871C), JK*A_null(IVSS-1a), JK*B_null(IVS5-1a)</i>	Jka (JK1), Jkb (JK2)
Duffy	<i>FY*A; FY*B, FY*A_GATA, FY*A[265T], FY*B_GATA, FY*B[265T] FY*X</i>	Fya (FY1), Fyb (FY2)
MNS	<i>GYPA*M, GYPA*N, GYPB*s, GYPB*S, GYPB*S_null(230T), GYPB*S_null(IVS5+5t), GYP.Mur, GYPB*deletion</i>	M (MNS1), N (MNS2), S (MNS3), s (MNS4), U (MNS5), Mia (MNS7)
Diego	<i>DI*A, DI*B</i>	Dia (DI1), Dib (DI2)
Dombrock	<i>DO*A, DO*B, DO*B_HY, DO*A_JO</i>	Doa (DO1), Dob (DO2), Hy (DO4), Joa (DO5)
Colton	<i>CO*A, CO*B</i>	Coa (CO1), Cob (CO2)
Cartwright	<i>YT*A, YT*B</i>	Yta (YT1), Ytb (YT2)
Lutheran	<i>LU*A, LU*B</i>	Lua (LU1), Lub (LU2)

2.3.5 Genotipagem HLA de classe II

A tipagem HLA classe II das amostras de DNA de pacientes portadores de SMD foi realizada pela técnica de PCR-SSO (*Sequence Specific Oligonucleotide*) (Immucor, Dreieich, Germany) com tecnologia Luminex®. A reação de

amplificação do DNA foi feita com oligonucleotídeos biotinilados (*primers*) específicos para o éxon 2 (tipificações de HLA-DRB1). Após amplificação, os fragmentos de DNA obtidos foram para a etapa de desnaturação da dupla fita de DNA do produto já amplificado, a neutralização química da fita aberta e posteriormente a hibridização com sondas oligoespecíficas. Estas sondas já estão pré-conjugadas em microesferas (*beads*), de forma que cada microesfera possui um tipo de sonda específico para cada alelo de HLA. O produto hibridizado foi marcado com o SAPE, um produto fluorescente, (Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina, do inglês: *R-Phycoerythrinconjugated Streptavidin*). A leitura das microesferas marcadas foi realizada em citômetro de fluxo (Luminex 200), neste equipamento os *lasers* com diferentes comprimentos de onda reconhecem as sondas marcadas ou não com o SAPE.

Por meio de valores superiores ou inferiores ao valor de *cut-off* (corte) pré-definido para a sonda, o citômetro de fluxo, baseado na percentagem de valores previamente atribuídos faz a leitura. Após essa leitura no citômetro de fluxo, a interpretação dos resultados foi feita pelo *software* MATCH IT!TM DNA (Immucor, Lifecodes, Versão 1.2, Service Pack 4). Este *software* analisa as combinações de sondas nas microesferas detectadas pelo aparelho, consultando um banco de dados interno e definindo quais são os genes ou alelos presentes.

2.3.6 Análise de polimorfismos em regiões regulatórias e genes de citocinas

2.3.6.1 Genotipagem dos polimorfismos nos genes *IL1*, *IL4*, *TNFA*, *IL6*, *IL10*, *IL17*

Os polimorfismos em genes de citocinas com seus respectivos genótipos, polimorfismos e localizações estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Polimorfismos em genes de citocinas e seus respectivos números rs e localização

Gene	Polimorfismo	Número rs	Localização
<i>IL1B</i>	-511C>T	rs16944	Região promotora
<i>IL4</i>	70bp-VNTR	Não disponível	Íntron 3
	-590C>T	rs2243250	Região promotora
<i>IL6</i>	-174C>T	rs1800795	Íntron 1

continua...

...continuação

	-592A>C	rs1800872	Região promotora
<i>IL10</i>	-819T>C	rs1800871	Região promotora
	-1082A>G	rs1800896	Região promotora
<i>IL17A</i>	-197G>A	rs2275913	Região promotora
<i>IL17F</i>	7488A>G	rs763780	Exon 3
<i>TNFA</i>	-308G>A	rs1800629	Região promotora

As reações de PCR para a determinação dos polimorfismos *TNFA*-308G/A, *IL1B*-511C/T, *IL10*-1082A/G, *IL10*-592A/C, *IL17A*-197G/A e *IL17F*(7488A/G) foram compostas de 100ng de DNA, 0,6µM de cada *primer* (10uM) (Invitrogen), 1µL de dNTP (10 mM) (Invitrogen), 1,5U de Go Taq® DNA Polymerase, 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 6µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer e 18µL de água livre de nuclease, em um volume final de 30µL. Os ciclos de amplificação foram realizados no termociclador Veriti (Applied Biosystems®). Após a amplificação, cada produto de PCR foi digerido com a respectiva enzima de restrição para obtenção do genótipo do polimorfismo. Os produtos da digestão enzimática dos polimorfismos *TNFA*-308G/A, *IL1B*-511C/T, *IL10*-1082A/G, *IL10*-592A/C, *IL17A*-197G/A e *IL17F*(7488A/G) foram separados por eletroforese em gel de agarose como exemplificado na figura 9. Na tabela 4 estão descritos a sequência dos *primers* utilizados para detecção dos SNPs, as condições de ciclagem da PCR, o produto da PCR, enzima de restrição utilizada, e o tamanho dos fragmentos obtidos.

Tabela 4. Sequência de *primers* para detecção dos SNPs *IL17F*(7488A/G), *IL17A*-197G/A, *IL1B*-511C/T, *IL10*-1082A/G, -592A/C, *TNFA*-308G/A, condições de ciclagem da PCR, produto da PCR, enzima de restrição utilizada e tamanho dos fragmentos obtidos

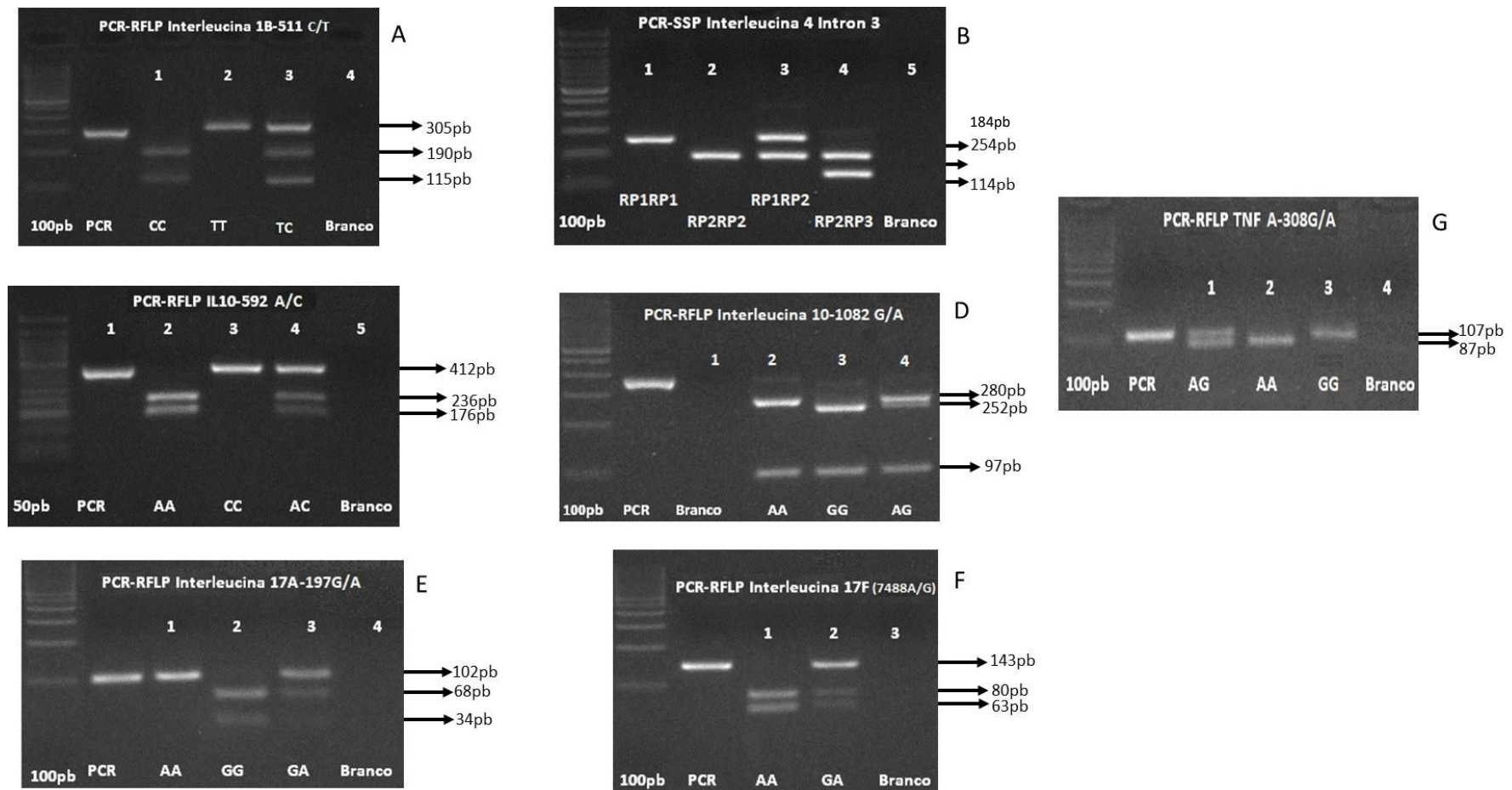
SNP	Sequência de <i>primer</i> e condições de ciclagem da PCR	Produto da PCR	Enzima de restrição e fragmentos obtidos (pb)	Método de referência
<i>IL17F</i> (7488 A/G) (rs763780)	5'-ACCAAGGCTGCTCTGTTTCT-3' 5'-GGTAAGGAGTGGCATTCTA-3' 95°C-15min, 35 ciclos (95°C-1min, 55°C-1min e 72°C-1min), 72°C -7min e 4°C.	143pb	Anza 56 <i>Hin</i> 1II (A) 80+63 (G) 143	Wu et al. ⁽¹⁰⁷⁾
<i>IL17A</i> -197 G/A (rs2275913)	5'-AACAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT-3' 5'-CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC-3' 95°C-15min, 35 ciclos (95°C-1min, 55°C-1min e 72°C- 1min), 72°C- 7min e 4°C.	102pb	Anza <i>XagI</i> (G) 68+34 (A) 102	Wu et al. ⁽¹⁰⁷⁾

continua...

...continuação

<i>IL1B</i> -511 C/T (rs16944)	5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3' 5'- GTTTAGGAATCTTCCCACTT-3' 95°C-15min, 35 ciclos (95°C-1min, 57°C- 1min e 72°C- 1min), 72°C -7min e 4°C.	305pb	Anza 90 <i>Eco88I</i> (C) 190+115 (T) 305	Lopez et al. ⁽¹⁰⁸⁾
<i>IL10</i> -1082 A/G (rs1800896)	5'-CCAAGACAACACTACTAAGGCTCCTTT-3' 5'-GCTTCTTATATGCTAGTCAGGTA-3' 95°C-15min, 35 ciclos (95°C-1min, 57°C-1min e 72°C-1min), 72°C -7min e 4°C.	377pb	Anza <i>XagI</i> (A) 208+97 (G) 252+97+28	Salhi et al. ⁽¹⁰⁹⁾
<i>IL10</i> -592 A/C (rs1800872)	5'-GGTGAGCACTACCTGACTAGC-3' 5'-CCTAGGTCACAGTGACGTGG-3' 95°C-15min, 35 ciclos (95°C-1min, 61°C-1min e 72°C-1min), 72°C -7min e 4°C.	412pb	<i>RsaI</i> (A) 236+176 (C) 412	Yao et al. ⁽¹¹⁰⁾ Scarel- Caminaga et al. ⁽¹¹¹⁾
<i>TNFA</i> -308 G/A (rs1800629)	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3' 95°C-15min, 35 ciclos (95°C-1min, 55°C-1min e 72°C-1min), 72°C -7min e 4°C.	107pb	<i>NcoI</i> (G) 87+20 (A) 170	Lin et al. ⁽¹¹²⁾

Para a determinação do polimorfismo *IL4* íntron 3 VNTR foi realizado um ensaio de PCR com *primers* previamente descritos por Cantagrel et al.⁽¹⁰⁵⁾ A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 30µL contendo 100ng de DNA genômico 0,6µL de cada *primer* (10µM), 0,6µL de dNTP (10mM) Invitrogen® (Vilnius, Lituânia), 2,0µL de MgCl² (50mM), 6µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 18µL de água livre de nuclease e 1,5U GoTaq® DNA Polymerase Promega (Madison, WI, EUA). As condições de ciclagem da PCR foram: desnaturação inicial 95°C por 15min, 35 ciclos de 95°C-1min, 65°C-1min e 72°C-1min e incubação final a 72°C por 7min e 4°C. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose na concentração de 2%. Os fragmentos de DNA obtidos de 254bp (três repetições de 70-pb), 183pb (duas repetições de 70pb) e 114bp (ausência de repetição) foram identificados como alelo 2 (RP2), alelo 1 (RP1) e alelo 3 (RP3) (Figura 9).



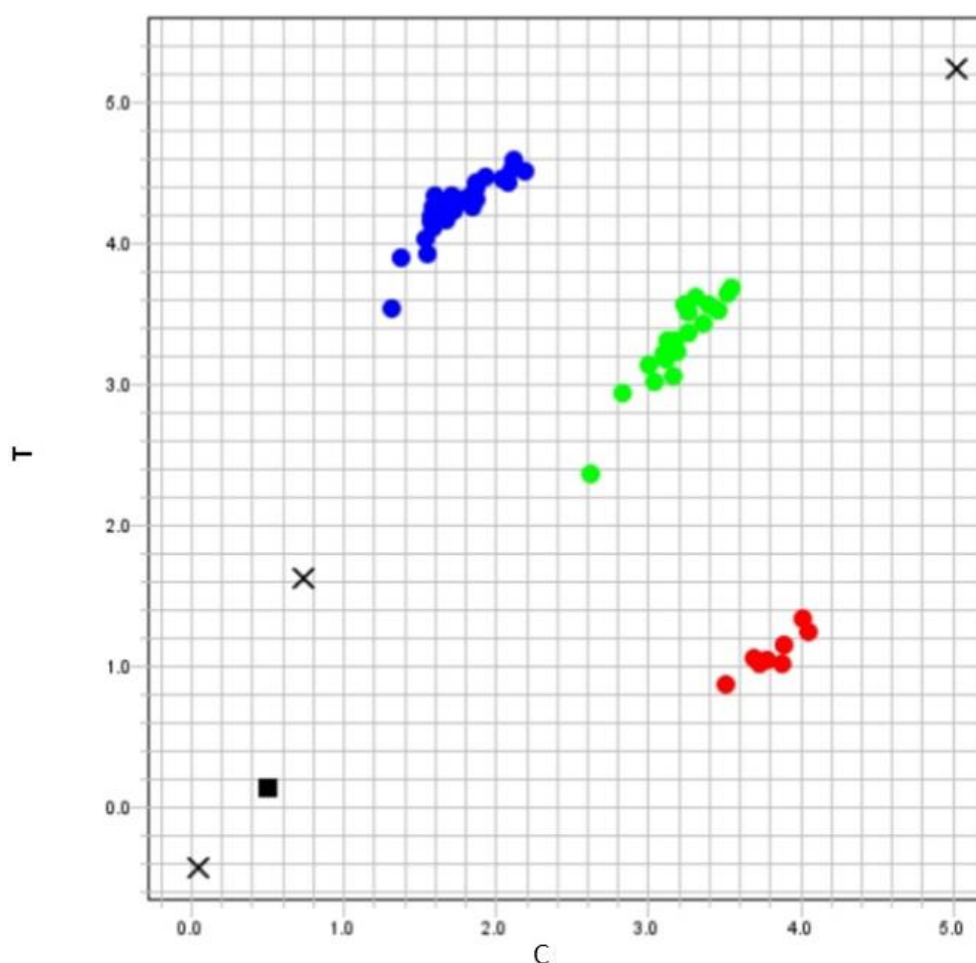
A) *IL1B*-511C/T, B) *IL4* íntron 3 VNTR, C) *IL10*-592A/C, D) *IL10*-1082G/A, E) *IL17A*-197G/A, F) *IL17F*(7488A/G) e G) *TNFA*-308G/A.
Figura 9. Géis de eletroforese demonstrando os padrões dos polimorfismos dos genes das interleucinas

Para a investigação dos SNPs *IL10*–819T/C (rs1800871), *IL4*–590C/T (rs2243250) e *IL6*–174C/T (rs1800795) foram realizadas PCRs em tempo real com a utilização do sistema TaqMan® genotyping Assay (Applied Biosystems®). Sendo utilizados os seguintes ensaios de genotipagem: rs1800871 (C_1747362_10), rs2243250 (C_16176216_10) e rs1800795 (C_1839697_20).

O volume final da reação de amplificação foi de 5µL, contendo 1,25µL de água livre de nuclease, 2,5µL de TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,25µL do mix de *primers* e sondas (20×) e 1µL de DNA (20ng/µL). As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos, seguidos de 50 ciclos de 92°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Para a realização dos ensaios foi utilizado o sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems®). Após a ciclagem, os dados de fluorescência alélica específica de cada amostra foram analisados utilizando o *software* SDS v1.3.1 (Applied Biosystems®, 2005), como mostra a figura 10, gráfico de discriminação alélica utilizado para determinar o genótipo de cada amostra.

Gráfico de Discriminação Alélica



Legenda

- Homozigoto alelo C/alelo C
- Homozigoto alelo T/alelo T
- Heterozigoto alelo C/alelo T
- Controle negativo
- X Indeterminado

Figura 10. Discriminação alélica do SNP IL10–819T/C obtido por PCR em tempo real

No Eixo-y Alelo T e no eixo-x Alelo C. As amostras com fluorescência forte para “VIC” foram consideradas homozigotas para o alelo T e são visualizadas na extremidade superior esquerda do gráfico (pontos azuis), as amostras com fluorescência forte para o comprimento de onda da sonda “FAM” foram consideradas homozigotas para o alelo C, sendo visualizadas na extremidade inferior direita do gráfico (pontos vermelhos), e as com fluorescência similar foram consideradas heterozigotas CT e localizam-se no centro do gráfico (pontos verdes).

2.3.7 Análise dos resultados

As frequências alélicas e genótípicas em cada população (pacientes aloimunizados e não aloimunizados) foram obtidas por contagem direta e foram avaliadas pelo programa computacional SPSS for Windows versão 22.0 (<https://ibm-spss-statistics-base.br.uptodown.com/windows>).

As comparações destas frequências entre o grupo de respondedores e de não respondedores foram realizadas por meio do teste do qui-quadrado com correção de Yates ou pelo Teste Exato de Fisher. O risco de desenvolver anticorpos irregulares foi calculado por meio da determinação de OD (*odds ratio*) e do intervalo de confiança (95%).

As variáveis quantitativas com distribuição aproximadamente normal foram comparadas entre grupos por teste *t* de Student e as com assimetria, ou seja, incompatibilidade com a distribuição normal foram comparadas entre grupos por teste não paramétrico de Mann-Whitney.

As frequências foram descritas de forma absoluta e relativa por grupos. A hipótese nula de equilíbrio foi verificada por testes exatos na presença de dois alelos e por testes de qui-quadrado na presença de três alelos (IL4 íntron 3 70 bp VNTR no grupo politransfundido e não aloimunizado). O nível crítico de significância pré-estabelecido (5%) sofreu uma correção do tipo Bonferroni, uma vez que foram realizados testes estatísticos em pelo menos 30 conjuntos de dados.

As análises foram realizadas com o auxílio dos pacotes R (R Foundation for Statistical Computing. R: A Language and Environment for Statistical Computing.) e genetics (Warnes G. genetics: Population Genetics. 2021. contributions from Gregor Gorjanc and Friedrich Leisch and Michael Man.) e considerando nível de significância 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Características da população estudada

O presente estudo envolveu 117 pacientes com SMD, classificados em 3 grupos: (1) Grupo politransfundido e aloimunizado (PA) com 28 (23,9%) pacientes (pacientes com ≥ 5 transfusões e com anticorpos eritrocitários). (2) Grupo politransfundido e não aloimunizado (PNA) com 59 (50,4%) pacientes (pacientes com ≥ 5 transfusões e sem anticorpos eritrocitários) e (3) Grupo não politransfundido e não aloimunizado (NPNA), sendo 30 (25,6%) pacientes (pacientes < 5 transfusões e sem anticorpos eritrocitários).

Entre os 28 pacientes aloimunizados, 57,14% eram do sexo feminino e a mediana de idade entre eles foi de 77,5 anos (idade mínima: 45 anos, idade máxima: 97 anos). A média de unidades de concentrados de hemácias recebidos por estes pacientes foi de 80 unidades/paciente (mínimo de 4 unidades e máximo de 312 unidades).

No grupo de pacientes não aloimunizados o sexo masculino foi prevalente entre os pacientes (59,62%). A mediana de idade foi de 69 anos (idade mínima: 25 anos, idade máxima: 95 anos) e a média de concentrados de hemácias recebidos por paciente foi de 35 unidades (mínimo de 3 unidades e máximo de 219 unidades).

No grupo de pacientes que não foram aloimunizados e nem politransfundidos o sexo masculino também foi predominante, sendo 60% dos estudados. A mediana de idade foi de 63 anos e meio (idade mínima: 18 anos, idade máxima: 83 anos), a média do número de transfusões recebida foi de 1 concentrado de hemácia por paciente (mínimo ausência de transfusão e máximo de 2 unidades).

Nas tabelas 5 e 6 estão sintetizadas as características de cada grupo, como a distribuição das variáveis: gênero, idade e número de transfusões nos grupos estudados.

Tabela 5. Características da população estudada com relação ao sexo e idade

Variável	Grupo			Total n (%)	Valor-p
	NPNA n (%)	PNA n (%)	PA n (%)		
Sexo					0,150
Feminino	12 (40,0)	24 (40,7)	16 (57,1)	52 (44,4)	
Masculino	18 (60,0)	35(59,3)	12 (42,9)	65 (55,6)	

Tabela 6. Características da população estudada com relação a idade, número de transfusões

Variável	Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	N	Valor-p
Idade (anos)	NPNA	62,17	14,32	63,5	18	83	30	0,027
	PNA	68,19	14,85	69	25	95	59	
	PA	75,36	11,49	77,5	45	97	28	
Nº de transfusões	NPNA	1,17	0,857	1	0	2	18	0,003*
	PNA	35,25	45,76	16	3	219	59	
	PA	79,82	80,80	53	4	312	28	

PA: pacientes politransfundidos e aloimunizados portadores de SMD; PNA: pacientes politransfundidos e não aloimunizados portadores de SMD; NPNA: pacientes não politransfundidos e não aloimunizados portadores de SMD. Teste qui-quadrado; Teste *t* de Student; *Teste Mann-Whitney.

A distribuição por gênero foi semelhante entre os pacientes não politransfundidos e não aloimunizados, politransfundidos não aloimunizados e politransfundidos aloimunizados. Houve diferença significativa em relação à distribuição da idade entre os grupos, sendo os pacientes do grupo politransfundido e aloimmunizado com idade mais avançada ($p=0,02$). Em relação ao número de transfusões, foi observada uma diferença significativa entre os grupos, os pacientes politransfundidos aloimmunizados receberam uma faixa de 4 a 312 (mediana: 53) unidades, enquanto os pacientes politransfundidos e não aloimmunizados receberam uma faixa de 3 a 219 (mediana: 16) unidades ($p=0,003$).

3.2 Perfil de aloimunização

No grupo de pacientes politransfundidos e aloimmunizados, foram alocados 28 pacientes, sendo que 18 (64,3%) desenvolveram um único aloanticorpo e 10 (35,7%) desenvolveram dois ou mais aloanticorpos. Dezesesseis especificidades de anticorpos eritrocitários foram identificadas no soro desses pacientes, sendo que os mais frequentes foram anti-C (35,7%), anti-E (32,1%), anti-K (10,7%) e anti-Dia (10,7%).

Verificou-se também que 17 pacientes (60,71%) apresentaram pelo menos um anticorpo contra antígenos do sistema Rh (D, C, c, E, e, Cw) e que 5 (17,85%) pacientes aloimunizados apresentavam autoanticorpos. Porém, entre os pacientes não aloimunizados apenas 5 (8,47%) apresentaram autoanticorpos. Vinte e um (75%) dos 28 pacientes aloimunizados tinham pelo menos um anticorpo com especificidade para antígenos Rh comuns (D, C, c, E, e). Dados demonstrados na figura 11.

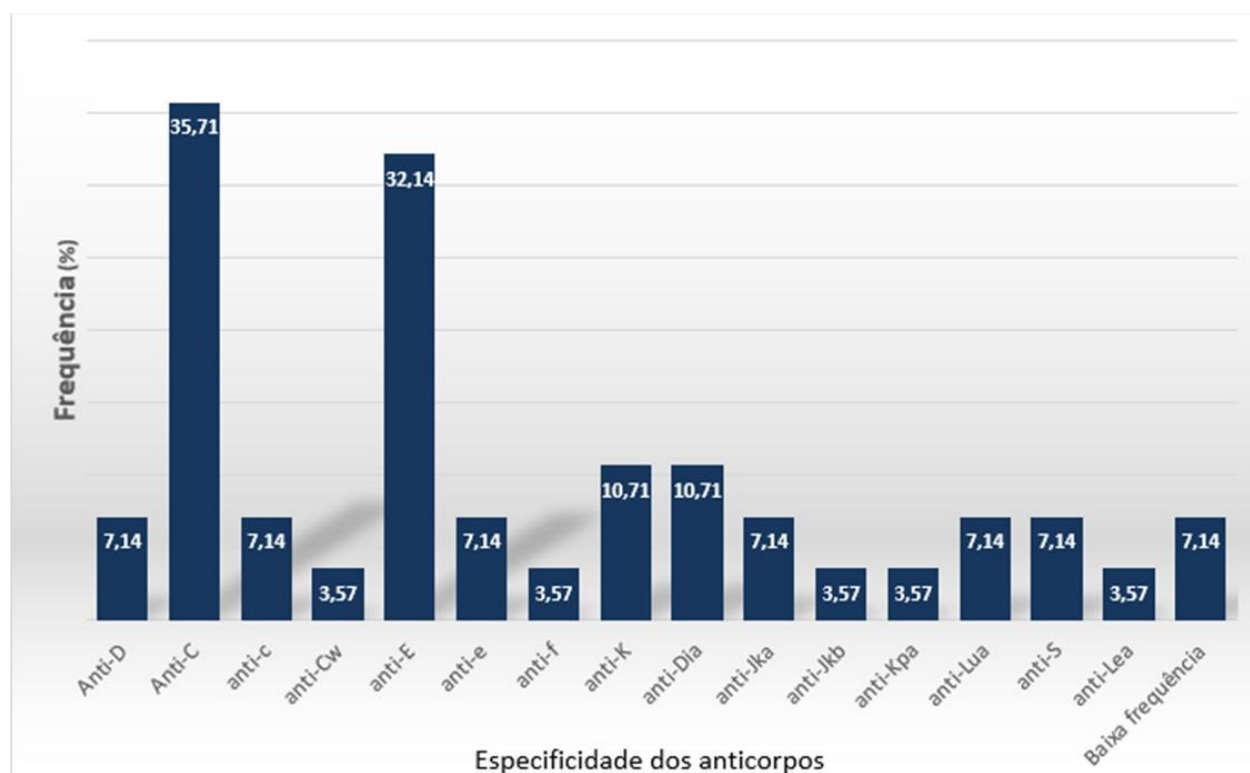


Figura 11. Especificidade e frequência dos aloanticorpos eritrocitários desenvolvidos pelos pacientes politransfundidos portadores de SMD

3.3 Perfil genético dos grupos sanguíneos em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica

A genotipagem estendida dos alelos de grupos sanguíneos pela técnica de *microarray* (ID Core^{XT} BLOODChip) foi realizada em amostras de DNA dos 117 pacientes com SMD. Esta análise possibilitou a determinação das frequências genotípicas e alélicas dos principais genes de grupos sanguíneos na população estudada. Os fenótipos de grupos sanguíneos foram deduzidos a partir do genótipo obtido, e as frequências antigênicas para os sistemas de grupos sanguíneos dos pacientes portadores de SMD estão descritas na tabela 7. O fenótipo deduzido mais

frequente nos pacientes controles e nos pacientes politransfundidos e não aloimunizados foi: D+ C+ c+ E- e+ (R1r), K- k+, Kp(a-b+), Js(a-b+), Jk(a+b+), Fy(a+b+), M+N+S+s+, Lu(a-b+), Di(a-b+), Co(a+b-), Do(a-b+), Joa(a+) Hy+.

Tabela 7. Frequências antigênicas deduzidas a partir do genótipo dos portadores de síndrome mielodisplásica

Antígeno	n (n=117)	f(%)	Antígeno	n (n=117)	f(%)
c	92	79	M	97	83
C	72	62	N	83	71
e	111	95	S	62	53
E	36	31	s	103	88
K	10	9	Lu ^a	13	11
k	117	100	Lu ^b	105	90
Kp ^a	1	1	Di ^a	2	2
Kp ^b	116	99	Di ^b	117	100
Js ^a	1	1	Co ^a	112	96
Js ^b	109	93	Co ^b	38	32
Jk ^a	92	79	Do ^a	75	64
Jk ^b	82	70	Do ^b	96	82
Fy ^a	74	63	Jo ^a	117	100
Fy ^b	97	83	Hy	117	100

n=número de antígenos; f=frequência antigênica.

3.4 Genotipagem e frequência dos grupos alélicos HLA de classe II e a associação com a aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de SMD

A genotipagem HLA-DRB1 foi realizada nas amostras dos 117 pacientes através da técnica PCR-SSOr plataforma Luminex conforme instruções do fabricante. Os resultados laboratoriais por grupo de pacientes estão descritos na tabela 8.

Em todos os grupos analisados a distribuição das frequências genotípicas dos grupos alélicos HLA mostrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$). Com relação ao *locus* HLA-DRB1, a análise das frequências dos grupos alélicos entre os pacientes portadores de SMD não demonstraram diferença estatística significativa. As análises do grupo de pacientes aloimunizados para antígenos Rh comuns (n=20) também não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação aos alelos *HLA-DRB1*.

Tabela 8. Tipagem HLA-DRB1* identificada por grupo de paciente

Características	Total de pacientes incluídos (n=117)			Valor-p
	PA (n=30)	PNA (n=59)	NPNA (n=30)	
<i>DRB1*01</i>				7(12,5)
<i>DRB1*03</i>	5(8,9)	11(9,3)	2(3,3)	0,154*
<i>DRB1*04</i>	5(8,9)	10(8,5)	6(10)	0,945
<i>DRB1*07</i>	10(17,9)	15(12,7)	4(6,7)	0,423
<i>DRB1*08</i>	3(5,4)	15(12,7)	15(25)	0,118
<i>DRB1*09</i>	1(1,8)	3(2,5)	2(3,3)	0,655*
<i>DRB1*10</i>	0	2(1,7)	0	0,408*
<i>DRB1*11</i>	9(16,1)	4(3,4)	0	0,062*
<i>DRB1*12</i>	1(1,8)	22(18,6)	12(20)	0,857
<i>DRB1*13</i>	6(10,7)	5(4,2)	0	0,112
<i>DRB1*14</i>	3(5,4)	10(8,5)	4(6,7)	0,739
<i>DRB1*15</i>	3(5,4)	5(4,2)	4(6,7)	0,787*
<i>DRB1*16</i>	3(5,4)	12(10,2)	10(16,7)	0,139

PA: pacientes politransfundidos e aloimunizados portadores de SMD; PNA: pacientes politransfundidos e não aloimunizados portadores de SMD; NPNA: pacientes não politransfundidos e não aloimunizados portadores de SMD. *Teste qui-quadrado; #Teste da razão de verossimilhanças. Resultados expressos em n (%).

3.5 Genotipagem e frequência dos polimorfismos em genes de citocinas nos grupos de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica

A genotipagem dos polimorfismos em genes de citocinas foi realizada nas amostras dos 117 pacientes através das técnicas PCR-SSP, PCR-RFLP e RT-PCR conforme descrito na metodologia. Os resultados dos testes laboratoriais por grupo de pacientes classificados estão descritos nas tabelas 9 e 10. Em todos os grupos analisados a distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos de citocinas mostrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$) (Apêndice 1).

A análise dos polimorfismos de citocinas mostrou uma correlação significativa entre o SNP *IL17A*–197G/A e a aloimunização eritrocitária como mostram as tabelas 9 a 12. As comparações das frequências alélicas e genotípicas do SNP *IL17A*–197G/A entre pacientes com SMD aloimunizados e não aloimunizados identificaram o alelo A e o genótipo AA significativamente mais frequentes em pacientes aloimunizados (alelo A, 27,1% *versus* 46,4%, OR=2,3; $p=0,012$; IC=95% 1,1-4,9; genótipo AA, 6,8% *versus* 25%, OR=6,2; $p=0,041$; IC=95% 1,3-30,8).

Tabela 9. Análise das frequências alélicas dos polimorfismos em genes das citocinas

Característica	Total de pacientes incluídos (n=117)			Valor-p
	PA n=28	PNA n=59	NPNA n=30	
<i>IL4</i> íntron 3				0,100#
RP1	43(71,7)	102(86,4)	42(75)	
RP2	17(28,3)	15(12,7)	14(25)	
RP3	0	1(0,8)	0	
<i>IL10</i> –592A/C				0,163
A	22(36,7)	51(43,2)	18(32,1)	
C	38(63,3)	67(56,8)	38(67,9)	
<i>IL1B</i> –511C/T				0,403
T	23(38,3)	50(42,4)	20(35,7)	
C	37(61,7)	68(57,6)	36(64,3)	
<i>IL17A</i> –197G/A				0,012
G	47(78,3)	86(72,9)	30(53,6)	
A	13(21,7)	32(27,1)	26(46,4)	
<i>IL17F</i> (7488A/G)				0,566*
G	5(8,3)	9(7,6)	6(10,7)	
A	55(91,7)	109(92,4)	50(89,3)	
<i>IL10</i> –1082A/G				0,393
A	36(60)	70(59,3)	37(66,1)	
G	24(40)	48(40,7)	19(33,9)	
<i>TNFA</i> –308G/A				0,534
A	10(16,7)	19(16,1)	7(12,5)	
G	50(83,3)	99(83,9)	49(87,5)	
<i>IL4</i> –590C/T				0,171
C	44(73,3)	97(82,2)	41(73,2)	
T	16(26,7)	21(17,8)	15(26,8)	
<i>IL6</i> –174C/T				0,142
C	18(30)	38(32,2)	12(21,4)	
T	42(70)	80(67,8)	44(78,6)	
<i>IL10</i> –819T/C				0,553
T	19(31,7)	39(33,1)	16(28,6)	
C	41(68,3)	79(66,9)	40(71,4)	

PA: pacientes politransfundidos e aloimunizados portadores de SMD;
PNA: pacientes politransfundidos e não aloimunizados portadores de SMD;
NPNA: pacientes não politransfundidos e não aloimunizados.
*Teste qui-quadrado; #Teste da razão de verossimilhanças.
Resultados expressos em n (%).

Tabela 10. Análise da frequência dos genótipos dos polimorfismos em genes das citocinas

Característica	Total de pacientes incluídos (n=117)			Valor-p
	PA n=28	PNA n=59	NPNA n=30	
<i>IL4</i> íntron 3				0,009#
RP1/RP1	14 (50)	46 (78)	14(46,7)	
RP1/RP2	14 (50)	10 (16,9)	15(50)	
RP2/RP2	0	2 (3,4)	1(3,3)	
RP2/RP3	0	1 (1,7)	0	
<i>IL10</i> -592A/C				0,388
AA	3 (10,7)	13 (22)	7(23,3)	
AC	12 (42,9)	25(42,4)	8(26,7)	
CC	13 (46,4)	21 (35,6)	15(50)	
<i>IL1B</i> -511C/T				0,516#
TT	4 (14,3)	9(15,3)	3(10)	
TC	12 (42,9)	32(54,2)	17(56,7)	
CC	12 (42,9)	18 (30,5)	10(33,3)	
<i>IL17A</i> -197G/A				0,041#
GG	9 (32,1)	31 (52,5)	18(60)	
GA	12 (42,9)	24(40,7)	11(36,7)	
AA	7 (25)	4(6,8)	1(3,3)	
<i>IL17F</i> (7488A/G)				0,548*
GA	6 (21,4)	9(15,3)	5(16,7)	
AA	22 (78,6)	50(84,7)	25(83,3)	
<i>IL10</i> -1082A/G				0,628*
AA	13 (46,4)	21(35,6)	12(40)	
AG	11 (39,3)	28(47,5)	12(40)	
GG	4 (14,3)	10(16,9)	6(20)	
<i>TNFA</i> -308G/A				0,082*
AA	2 (7,1)	1(1,7)	2(6,7)	
AG	3 (10,7)	17(28,8)	6(20)	
GG	23 (82,1)	41(69,5)	22(73,3)	
<i>IL4</i> -590C/T				0,049#
CC	13 (46,4)	40(67,8)	15(50)	
CT	15 (53,6)	17(28,8)	14(46,7)	
TT	0	2(3,4)	1(3,3)	
<i>IL6</i> -174C/T				0,312#
CC	1 (3,6)	6(10,2)	3(10)	
CT	10 (35,7)	26(44,1)	12(40)	
TT	17 (60,7)	27(45,8)	15(50)	
<i>IL10</i> -819T/C				0,775#
TT	2 (7,1)	7(11,9)	5(16,7)	
TC	12 (42,9)	25(42,4)	9(30)	
CC	14 (50)	27(45,8)	16(53,3)	

PA: pacientes politransfundidos e aloimunizados portadores de SMD; PNA: pacientes politransfundidos e não aloimunizados portadores de SMD; NPNA: pacientes não politransfundidos e não aloimunizados portadores de SMD. Teste qui-quadrado; *Teste exato de Fisher; #Teste da razão de verossimilhanças. Resultados expressos em n (%).

Uma associação significativa de aloimunização para antígenos Rh com a *IL17A*–197A, alelo A e genótipo AA foi identificada nos pacientes com SMD aloimunizados (alelo A, 27,1% *versus* 45%, OR=2,5; p=0,036; IC=95% 1,1-5,7; genótipo AA, 6,8% *versus* 30%, OR=7,9; p=0,042; IC=95% 1,5-42,3). Os dados estão descritos nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Análise das frequências alélicas dos polimorfismos em genes das citocinas nos pacientes aloimunizados por anticorpos contra antígenos do sistema Rh *versus* pacientes não aloimunizados

Característica	Grupos		Valor-p
	PNA n=59	PA n=20	
<i>IL4</i> íntron 3			0,162#
RP1	102(86,4)	30(75)	
RP2	15(12,7)	10(25)	
RP3	1(0,8)	0	
<i>IL10</i> –592A/C			0,526
A	51(43,2)	15(37,5)	
C	67(56,8)	25(62,5)	
<i>IL1B</i> –511C/T			0,793
T	50(42,4)	16(40)	
C	68(57,6)	24(60)	
<i>IL17A</i> –197G/A			0,036
G	86(72,9)	22(55)	
A	32(27,1)	18(45)	
<i>IL17F</i> (7488A/G)			0,347*
G	9(7,6)	5(12,5)	
A	109(92,4)	35(87,5)	
<i>IL10</i> –1082A/G			0,525
A	70(59,3)	26(65)	
G	48(40,7)	14(35)	
<i>TNFA</i> –308G/A			0,869
A	19(16,1)	6(15)	
G	99(83,9)	34(85)	
<i>IL4</i> –590C/T			0,187
C	97(82,2)	29(72,5)	
T	21(17,8)	11(27,5)	
<i>IL6</i> –174C/T			0,246
C	38(32,2)	9(22,5)	
T	80(67,8)	31(77,5)	
<i>IL10</i> –819T/C			0,949
T	39(33,1)	13(32,5)	
C	79(66,9)	27(67,5)	

PNA: pacientes politransfundidos e não aloimunizados portadores de SMD; PA: pacientes politransfundidos e aloimunizados portadores de SMD. Teste qui-quadrado; *Teste exato de Fisher; #Teste da razão de verossimilhanças. Resultados expressos em n (%).

Tabela 12. Análise da frequência dos genótipos dos polimorfismos em genes das citocinas nos pacientes aloimunizados por anticorpos contra os antígenos do sistema Rh e pacientes não aloimunizados

Característica	PNA n=59	PA n=20	Valor-p
<i>IL4</i> íntron 3			0,028#
RP1/RP1	46(78)	10(50)	
RP1/RP2	10(16,9)	10(50)	
RP2/RP2	2(3,4)	0	
RP2/RP3	1(1,7)	0	
<i>IL10</i> –592A/C			0,782#
AA	13(22)	3(15)	
AC	25(42,4)	9(45)	
CC	21(35,6)	8(40)	
<i>IL1B</i> –511C/T			0,544#
TT	9(15,3)	4(20)	
TC	32(54,2)	8(40)	
CC	18(30,5)	8(40)	
<i>IL17A</i> –197G/A			0,042#
GG	31(52,5)	8(40)	
GA	24(40,7)	6(30)	
AA	4(6,8)	6(30)	
<i>IL17F</i> (7488A/G)			0,328*
GA	9(15,3)	5(25)	
AA	50(84,7)	15(75)	
<i>IL10</i> –1082A/G			0,757#
AA	21(35,6)	9(45)	
AG	28(47,5)	8(40)	
GG	10(16,9)	3(15)	
<i>TNFA</i> –308G/A			0,077#
AA	1(1,7)	2(10)	
AG	17(28,8)	2(10)	
GG	41(69,5)	16(80)	
<i>IL4</i> –590C/T			0,077#
CC	40(67,8)	9(45)	
CT	17(28,8)	11(55)	
TT	2(3,4)	0	
<i>IL6</i> –174C/T			0,496#
CC	6(10,2)	1(5)	
CT	26(44,1)	7(35)	
TT	27(45,8)	12(60)	
<i>IL10</i> –819T/C			0,964#
TT	7(11,9)	2(10)	
TC	25(42,4)	9(45)	
CC	27(45,8)	9(45)	

PNA: pacientes politransfundidos e não aloimunizados portadores de SMD; PA: pacientes politransfundidos e aloimunizados portadores de SMD. Teste qui-quadrado; *Teste exato de Fisher; #Teste da razão de verossimilhanças. Resultados expressos em n (%).

Ao avaliar os pacientes aloimunizados a antígenos Rh, o genótipo heterozigoto RP1/RP2 do polimorfismo da *IL4* íntron 3 VNTR apresentou um valor significativo no grupo PA (16,9% *versus* 50%, $p=0,009$; OR=4,97; IC=95% 1,6-15,5), porém nem o alelo RP1, nem o alelo RP2 foi significativamente correlacionado com a aloimunização eritrocitária nas análises de frequência alélica. A frequência alélica e genotípica dos polimorfismos de *IL17F*(7488A>G), *IL17A*–197G>A, *IL1B*–511C>T, *IL10*–1082A>G, *IL10*–592A>C, *IL10*–819T>C, *TNFA*–308G>A, *IL6*–174C>T, *IL4*–590C>T, e *IL4* íntron 3 VNTR estão descritas nas tabelas 13 e 14.

O genótipo heterozigoto RP1/RP2 do polimorfismo da *IL4* íntron 3 VNTR foi representado no grupo politransfundidos, aloimunizados (PA) (16,9% *versus* 50%, OR=4,97; $p=0,009$; IC=95% 1,6-15,5), no entanto, nem o alelo RP1, nem o alelo RP2 foram significativamente correlacionados à aloimunização eritrocitária nas análises de frequência alélica. Da mesma forma, o genótipo heterozigoto CT da *IL4*–590C/T foi mais prevalente no grupo PA (28,8% *versus* 53,6%, OR=3,3; $p=0,049$; IC=95% 1,2-9,3), no entanto, nem o alelo C nem o alelo T foram significativamente correlacionados à aloimunização eritrocitária nas análises de frequência alélica. Porém ao realizar a análise haplotípica desses polimorfismos, os diplótipos C, RP1/C, RP1 e C, RP1/T, RP2 apresentaram diferença significativa entre os pacientes politransfundidos e aloimunizados comparados aos pacientes politransfundidos não aloimunizados (39,29% *versus* 67,8%, OR=0,31; $p=0,013$; IC=95% 0,12-0,78) como mostrado na tabela 14.

Tabela 13. Frequências dos diplótipos dos polimorfismos IL17A-197A/G e IL17F(7488A/G) em pacientes aloimunizados e não aloimunizados portadores de síndrome mielodisplásica

Diplótipos	NPNA n=30	PNA n=59	PA n=28	Pacientes totais n=117	Análises estatísticas								
					PA versus PNA			PA versus NPNA			Paciente versus NPNA		
					OR	IC (95%)	Valor-p	OR	IC (95%)	Valor-p	OR	IC (95%)	Valor-p
AA/AA	1(3,33)	4(6,78)	6(21,42)	11(9,40)	3,75	0,96 (14,59)	0,056		ns			ns	
AG/AA	0(0,00)	0(0,00)	1(3,57)	1(0,85)		ns			ns			ns	
GA/AA	9(30,00)	21(35,6)	11(39,29)	41(35,04)		ns			ns			ns	
GA/GA	15(50,00)	25(42,37)	4(17,86)	44(37,61)	0,23	0,07 (0,74)	0,014	0,17	0,05 (0,60)	0,006		ns	
GG/AA	2(6,67)	3(5,08)	1(3,57)	6(5,13)		ns			ns			ns	
GG/GA	3(10,00)	6(10,17)	5(14,29)	14(11,97)		ns			ns			ns	

PA: pacientes aloimunizados portadores de SMD; PNA: pacientes não aloimunizados portadores de SMD; Pacientes Totais: pacientes aloimunizados + não aloimunizados; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de 95% de confiança; ns: não significativo. Resultados expressos em n(%).

Tabela 14. Frequências dos diplótipos dos polimorfismos IL4-590C/T (rs2243250) e IL4 íntron 3 VNTR em pacientes aloimunizados e não aloimunizados portadores de síndrome mielodisplásica

Diplótipos	NPNA n=3	PNA n=5	PA n=28	Pacientes totais n=117	Análises estatísticas								
					PA versus PNA			PA versus NPNA			Paciente versus NPNA		
					OR	IC (95%)	Valor-p	OR	IC (95%)	Valor-p	OR	IC (95%)	Valor-p
C, RP1/C, RP1	13(43,33)	40(67,8)	11(39,29)	64(54,70)	0,31	0,12 (0,78)	0,013		ns			ns	
C, RP1/C, RP2	2(6,68)	0(0,00)	2(7,14)	4(3,42)		ns			ns			ns	
C, RP1/T, RP1	1(3,33)	6(10,17)	3(10,71)	10(8,55)		ns			ns			ns	
C, RP1/T, RP2	13(43,33)	10(16,95)	12(42,86)	35(29,91)	3,68	1,34 (10,10)	0,012		ns			ns	
C, RP2/C, RP3	0(0,00)	1(1,69)	0(0,00)	1(0,85)		ns			ns			ns	
T, RP2/T, RP2	1(3,33)	2(3,39)	0(0,00)	3(2,56)		ns			ns			ns	

PA: pacientes politransfundidos aloimunizados portadores de SMD; PNA: pacientes politransfundidos, não aloimunizados portadores de SMD; Pacientes Totais: pacientes aloimunizados + não aloimunizados; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de 95% de confiança; ns: não significativo. Resultados expressos em n(%).

4 DISCUSSÃO

O perfil dos pacientes estudados, em relação a idade diferiram estatisticamente, porém não em relação ao sexo entre os pacientes aloimunizados, pacientes não aloimunizados e pacientes controles, demonstrando que houve homogeneidade entre os grupos em relação ao gênero.

De acordo com o número de transfusões a média de unidades de concentrado de hemácias transfundidas foi maior em paciente aloimunizados, apresentando diferença estatisticamente significativa.

As transfusões de hemácias são um dos componentes importantes do tratamento de suporte a pacientes com SMD. No entanto, dados sugerem dependência de transfusão, mesmo em doses relativamente baixas (3 unidades de hemácias a cada quatro meses)⁽¹¹³⁾ como um indicador de sobrevida livre de progressão inferior. As taxas de aloimunização para pacientes com dependência transfusional de portadores de SMD podem variar entre 22-32%.^(11,13,114) Essas taxas podem cair em torno de 7-11% se transfusões compatíveis com antígenos profiláticos forem implementadas.⁽¹¹⁵⁾

As características dos dois grupos de pacientes analisados em nossa coorte retrospectiva mostraram diferença entre o número de transfusões anteriores e a idade. Os pacientes politransfundidos e aloimunizados eram mais velhos e receberam mais transfusões do que o grupo de pacientes politransfundidos e não aloimunizados. Essas características podem ser um viés na nossa análise, uma vez que os fatores clínicos e biológicos são conhecidos por influenciar a formação de anticorpos associados à transfusão.^(116,117) Foram realizadas análises estatísticas com modelo de regressão logística controlado por idade e número de transfusões sanguíneas que pudessem minimizar esse viés.

Entre os pacientes estudados 74,36% faziam uso de terapia transfusional e recebiam transfusões regulares, sendo maior ou igual a 3 unidades de concentrado de hemácias, dado este corroborado por outros trabalhos,^(118,119) que relatam uma taxa maior que 40% de dependência transfusional por portadores de SMD.

Em nosso estudo, a taxa de aloimunização eritrocitária encontrada foi de 32,2% usando transfusões compatíveis com antígenos Rh e K, que está dentro da faixa de 15-36% relatada em estudos anteriores com pacientes portadores de SMD.^(64,120) O perfil fenotípico, deduzido da genotipagem eritrocitária deste estudo mostrou-se em

acordo com o trabalho de Guelsin et al.⁽²⁶⁾ Nesta coorte, os principais aloanticorpos detectados foram contra Rh e antígenos K devido a transfusões anteriores não compatíveis a esses antígenos. Embora o protocolo de correspondência de antígeno seja recomendado em nossas instituições para pacientes com SMD, alguns pacientes de nossa coorte foram transfundidos antes que o diagnóstico fosse estabelecido devido à anemia grave.

Nosso estudo encontrou uma associação positiva entre o SNP *IL17A*–197G>A e a aloimunização eritrocitária. O alelo A e o genótipo AA foram significativamente mais frequentes no grupo politransfundidos, aloimunizados (PA) do que no grupo politransfundidos, não aloimunizados (PNA). Essa associação significativa também foi identificada em pacientes aloimunizados para antígenos Rh, nos quais o alelo A e o genótipo AA foram associados ao risco de aloimunização Rh. O alelo *IL17A*–197A tem sido relacionado à alta produção de IL-17 e à produção mais eficiente dessa citocina quando comparado ao *IL17A*–197G.⁽¹²¹⁾ Esse polimorfismo tem sido associado a um risco aumentado para o desenvolvimento e gravidade de doenças inflamatórias, como doença do enxerto contra hospedeiro,⁽⁶⁹⁾ colite ulcerativa⁽¹¹⁴⁾ e câncer gástrico.⁽⁷¹⁾

As citocinas IL-17A e IL-17F são secretadas por células Th17, que são geradas a partir da diferenciação de células CD4+ efetoras. Mitsdoerffer, et al.⁽¹¹⁵⁾ demonstraram que as células T *helper* tipo 17 (Th17) são células T efetoras altamente pró-inflamatórias que são caracterizadas pela produção de grandes quantidades de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, e IL-17. As citocinas IL-21 e IL-17A tem papel importante na formação dos centros germinativos, e levam os linfócitos B a mudança de classe de IgM para IgG e a *IL17A* leva principalmente a mudança de classe para os subtipos IgG2 e IgG3.

Em experimento, Mitsdoerffer, et al.⁽¹¹⁵⁾ a IL-21 induziu a mudança de classe para IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, em contraste, IL-17 desencadeou uma forte mudança de classe para IgG2a e IgG3, recombinação de mudança de classe muito baixa para IgG2b e nenhuma para IgG1. Portanto, apenas células B cultivadas na presença de IL-21 mostraram uma forte indução de IgG1 e IgG2b, enquanto IL-17 não teve efeito na mudança de classe para IgG1 e pouco para IgG2b. Contudo, a mudança de classe observada para IgG1 e IgG2b *in vivo* é provavelmente induzida por IL-21, enquanto IL-17 e IL-21 podem mediar a mudança de classe para IgG2a e IgG3. Os dados de Mitsdoerffer, et al.⁽¹¹⁵⁾ sugerem que as células Th17 atuam como excelentes auxiliares de células B, mediando a formação de centros germinativos e a troca de classes de

isotipos. Contudo, Mitsdoerffer, et al.⁽¹¹⁵⁾ sugerem que a IL-17 desempenha um papel importante na geração de uma resposta imune humoral, pois a IL-17 por si só conduz a formação de centros germinativos e a recombinação de troca de classe. Portanto, a inibição de células Th17 ou da citocina IL-17 pode ser um alvo importante não apenas em doenças órgão-específicas, mas também em doenças autoimunes sistêmicas.

Além da associação com IL-17, encontrou-se também neste estudo a associação com IL-4, que é uma citocina relacionada à resposta imunológica tipo Th2. A resposta imune Th2 tem como principal componente os linfócitos T, estes linfócitos estão relacionados com a imunidade humoral pela produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13,^(5,6) enquanto a IL-4 também é produzida por mastócitos e basófilos.⁽¹¹⁸⁾ A IL-4 está envolvida em muitas funções de modulação imunológica em uma variedade de tipos celulares, como a ativação e diferenciação de células B T-dependentes e troca de isotipo de anticorpo IgM/IgG para IgE e está relacionada com o a diferenciação dos linfócitos Th2 que regula a imunidade humoral e a produção de imunoglobulina. Em células B ativadas, IL-4 estimula a síntese principalmente de IgE e IgG1 e seu efeito é antagonizado por IFN- γ .

O polimorfismo de número variável de repetições (VNTR) de 70pb no íntron 3 do gene *IL4* e polimorfismo *IL4*-590C/T, descrito na região promotora do gene da *IL4*, podem afetar a atividade transcricional da proteína IL-4.⁽¹¹⁶⁾ Tanto o alelo T na posição -590 quanto o alelo RP1 do polimorfismo do íntron 3 da *IL4* VNTR foram associados com o aumento da produção de IL-4 e com certas condições autoimunes^(119,120) ou inflamatórias.^(120,121) Foi proposto que uma maior responsividade do alelo RP1 à ativação transcricional pode levar à superexpressão de IL-4.^(116,117,121) Em nosso estudo, o genótipo RP1/RP2 do polimorfismo da *IL4* íntron 3 e o genótipo *IL4* -590CT foram prevalentes no grupo PA quando comparado com o grupo PNA. Na avaliação de pacientes aloimunizados a antígenos Rh, o genótipo RP1/RP2 do polimorfismo da *IL4* íntron 3 VNTR também foi mais frequente no grupo PA.

Diferentes estudos encontraram associação positiva de outros polimorfismos de genes de citocinas com a aloimunização de eritrócitos em diferentes populações. Por exemplo, o genótipo *IL6* -572GG positivo foi significativamente associado a um risco relativo de aloimunização anti-E, enquanto *TNFA* -308A e *IL1B* -511T foram associados à suscetibilidade a aloanticorpos em pacientes com doença falciforme.⁽⁹⁸⁾ Nosso estudo com pacientes portadores de SMD indicou que os polimorfismos dos genes *IL17A* e *IL4* podem ser potencialmente usados como

marcadores para a aloimunização de hemácias, podendo ser implementada a genotipagem para essas citocinas em pacientes com SMD, além de genotipar para Rh e Kell. No entanto, novos estudos avaliando os níveis de produção dessas citocinas são importantes para confirmar nossos achados, pois o conhecimento do perfil genotípico para essas citocinas e os perfis Rh e Kell desses pacientes são importantes para a consistência transfusional compatível. Sendo essa uma estratégia equilibrada para que pacientes susceptíveis a aloimunização recebam transfusões com genótipo compatíveis.

Várias moléculas de HLA foram associadas à aloimunização de hemácias em portadores de SMD e em outras populações de pacientes. Esses dados podem ser úteis nos testes pré-transfusionais e podem determinar a resposta dos pacientes e melhorar a segurança transfusional. Guelsin et al.⁽²⁶⁾ observaram uma maior frequência do alelo *HLA-DRB1*13* no grupo não aloimunizado de pacientes com SMD, sugerindo uma possível associação desse alelo e proteção da aloimunização de hemácias.⁽¹¹⁸⁾ Em pacientes com talassemia,⁽²⁶⁾ presença de *HLA-DRB1*15:03* e as frequências dos alelos *HLA-DRB1*11* foram significativamente diferentes entre os grupos de pacientes aloimunizados e não aloimunizados. Chiaroni et al.⁽⁶⁴⁾ encontraram uma alta frequência de alelos *HLA-DRB1*11* ou *HLA-DRB1*13* em pacientes aloimunizados com o antígeno K, o que poderia ser devido à apresentação do peptídeo K específico por moléculas HLA-DRB1, e Balleoti et al.⁽⁶⁹⁾ identificaram que os indivíduos portadores do alelo *HLA-DRB1*07:01* apresentaram um risco aumentado de aloimunização contra o antígeno Dia. Outro estudo encontrou uma associação de *HLA-DRB1*15* com a formação de anticorpos eritrocitário e associações a HLA-Classe II para três combinações de anticorpos eritrocitário mais frequentes (anti-C + D, anti-E + ce anti-E + Cw) em populações tchecas.⁽¹¹⁴⁾

Ao contrário de estudos anteriores,^(116,122) nossos resultados não mostraram associação dos alelos *HLA-DRB1* e aloimunização eritrocitária. Assim, especulamos que nossos achados podem ser afetados pelo pequeno número de nossa população de coorte para análise dos alelos *HLA-DRB1*, que é altamente polimórfica. No entanto, outros estudos em outras coortes maiores e prospectivas de pacientes com SMD podem esclarecer esses achados e elucidar melhor esse mecanismo.

5 CONCLUSÕES

1. Os pacientes portadores de síndrome mielodisplásica, em sua maioria, são dependentes de terapias transfusionais, porém nem todos desenvolveram aloanticorpos;

2. O fenótipo eritrocitário mais frequente entre os pacientes foi: R1r (D+C+c+E–e+), K–, Fy(a+b+), Jk(a+b+), M+N+S–s+;

3. A frequência de aloanticorpos eritrocitários em pacientes portadores de SMD foi de 64,3% para os que desenvolveram um único aloanticorpo e de 35,7% que desenvolveram dois ou mais aloanticorpos. Os principais aloanticorpos identificados foram contra antígenos anti-C (35,7%), anti-E (32,1%), anti-K (10,7%) e anti-Dia (10,7%);

4. Houve uma ausência de associação entre a presença de alelos *HLA-DRB1* específicos associados a aloimunização ou a proteção ao desenvolvimento de aloanticorpos eritrocitários em pacientes portadores de SMD, como o *HLA-DRB1* é altamente polimórfico;

5. A presença de genótipos específicos de *IL4*–590C/T e *IL17A*–197G/A podem promover proteção a aloimunização e outros genótipos podem ser fator de susceptibilidade ao desenvolvimento de aloanticorpos;

6. Para sugerir um protocolo de genotipagem para polimorfismos de interleucinas, como *IL4* e *IL17A*, será necessário ampliar os estudos, para assim, estabelecer melhor um perfil de interleucinas que podem conferir fator de proteção e fator de propensão a aloimunização eritrocitária, com o intuito de impactar de forma positiva nos pacientes politransfundidos e no manejo mais eficiente do estoque de hemácias com perfis raros gerando uma relação positivamente benéfica para o paciente e para o serviço transfusional, sugerimos, assim, realizar novas pesquisas com uma população de coorte maior e prospectiva.

6 REFERÊNCIAS

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–405.
2. Gadji M, Pozzo AR. From cellular morphology to molecular and epigenetic anomalies of myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(7):474–83.
3. Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008;111(10):4841–51.
4. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer*. 2007;109(8):1536–42.
5. Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JC, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):118–29.
6. Steensma DP. The spectrum of molecular aberrations in myelodysplastic syndromes: in the shadow of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007;92(6):723–7.
7. Fenaux P, Adès L. How we treat lower-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;121(21):4280–6.
8. Hellström-Lindberg E. Management of anemia associated with myelodysplastic syndrome. *Semin Hematol*. 2005;42(2 Suppl 1):S10–3.
9. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007;25(23):3503–10.
10. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454–65.
11. Harnan S, Ren S, Gomersall T, Everson-Hock ES, Sutton A, Dhanasiri S, et al. Association between Transfusion Status and Overall Survival in Patients with Myelodysplastic Syndromes: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Acta Haematol*. 2016;136(1):23–42.
12. McQuilten ZK, Polizzotto MN, Wood EM, Sundararajan V. Myelodysplastic syndrome incidence, transfusion dependence, health care use, and complications: an Australian population-based study 1998 to 2008. *Transfusion*. 2013;53(8):1714–21.
13. Gupta R, Abdalla SH, Bain BJ. Thrombocytosis with sideroblastic erythropoiesis: a mixed myeloproliferative myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*. 1999;34(5-6):615–9.
14. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, Castro O, Dosik H, Moohr J, et al.; The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. *Blood*. 1990;76(7):1431–7.
15. Vichinsky EP, Luban NL, Wright E, Olivieri N, Driscoll C, Pegelow CH, et al.; Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia. Prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. *Transfusion*. 2001;41(9):1086–92.
16. Lin Y, Saskin A, Wells RA, Lenis M, Mamedov A, Callum J, et al. Prophylactic RhCE and Kell antigen matching: impact on alloimmunization in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes. *Vox Sang*. 2017;112(1):79–86.
17. Noizat-Pirenne F, Bachir D, Chadebech P, Michel M, Plonquet A, Lecron JC, et al. Rituximab for prevention of delayed hemolytic transfusion reaction in sickle cell disease. *Haematologica*. 2007;92(12):e132–5.

18. Vichinsky EP, Earles A, Johnson RA, Hoag MS, Williams A, Lubin B. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. *N Engl J Med*. 1990;322(23):1617–21.
19. Garratty G. Autoantibodies induced by blood transfusion. *Transfusion*. 2004;44(1):5–9.
20. Win N, New H, Lee E, de la Fuente J. Hyperhemolysis syndrome in sickle cell disease: case report (recurrent episode) and literature review. *Transfusion*. 2008;48(6):1231–8.
21. Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion*. 1999;39(7):763–71.
22. Murao M, Viana MB. Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(5):675–82.
23. Schonewille H, van de Watering LM, Brand A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: is it time to take precautionary measures? *Transfusion*. 2006;46(4):630–5.
24. King KE, Shirey RS, Lankiewicz MW, Young-Ramsaran J, Ness PM. Delayed hemolytic transfusion reactions in sickle cell disease: simultaneous destruction of recipients' red cells. *Transfusion*. 1997;37(4):376–81.
25. Petz LD, Calhoun L, Shulman IA, Johnson C, Herron RM. The sickle cell hemolytic transfusion reaction syndrome. *Transfusion*. 1997;37(4):382–92.
26. Guelsin GA, Rodrigues C, Visentainer JE, De Melo Campos P, Traina F, Gilli SC, et al. Molecular matching for Rh and K reduces red blood cell alloimmunisation in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood Transfus*. 2015;13(1):53–8.
27. Frytak JR, Henk HJ, De Castro CM, Halpern R, Nelson M. Estimation of economic costs associated with transfusion dependence in adults with MDS. *Curr Med Res Opin*. 2009;25(8):1941–51.
28. Vassallo J, Magalhaes SM. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas /mieloproliferativas. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(4):267-72.
29. Pinto WJ, de Marialva JE, Cardoso SM, Areas, MA. Topologia das principais proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário. *Rev Ciênc Méd Biol*. 2013;12(1):106–20. Figura 1. Arquitetura da membrana eritrocitária mostrando a disposição de importantes proteínas integrais e também proteínas que formam o citoesqueleto celular. p. 107.
30. Oliveira MB, Ribeiro FC, Vizzoni AG, organizadores. Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia. Rio de Janeiro: EPSJV; 2013.
31. Urbaniak SJ. Alloimmunity to RhD in humans. *Transfus Clin Biol*. 2006;13(1-2):19–22.
32. Daniels G. Human blood groups. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science; 2002.
33. International Society of Blood Transfusion. Table of blood group systems v10.0 30-JUN-2021. Amsterdam: ISBT; 2021. Available from: encurtador.com.br/esxl8
34. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. The blood group antigens factsbook. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2012.
35. Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel WA, Garratty G, Francis CL, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: berlin report. *Vox Sang*. 2011;101(1):77–82.
36. Prigent A, Maillard N, Absi L, Aloui C, Cognasse F, Laradi S, et al. From Donor to Recipient: Current Questions Relating to Humoral Alloimmunization. *Antibodies (Basel)*. 2014;3(1):130–52.
37. Baiochi E, Nardozza LM. Aloimunização. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(6):311–9.

38. Schonewille H, Brand A. Alloimmunization to red blood cell antigens after universal leucodepletion. A regional multicentre retrospective study. *Br J Haematol.* 2005;129(1):151–6.
39. Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood.* 2012;120(3):528–37.
40. Sippert EA. Associação de polimorfismos genéticos com a aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de anemia falciforme [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2016. Figura 2 – Mecanismo de aloimunização eritrocitária. p. 25.
41. Granucci F, Zanoni I, Ricciardi-Castagnoli P. Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(11):1683–97.
42. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular.* 9a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2019.
43. Cruz PD Jr, Bergstresser PR. Antigen processing and presentation by epidermal Langerhans cells. Induction of immunity or unresponsiveness. *Dermatol Clin.* 1990;8(4):633–47.
44. Shortman K, Wu L, Süß G, Kronin V, Winkel K, Saunders D, et al. Dendritic cells and T lymphocytes: developmental and functional interactions. *Ciba Found Symp.* 1997;204:130–8.
45. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767–811.
46. Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(4):305–10.
47. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology.* 2008;124(1):13–22.
48. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917–20.
49. Petz LD, Calhoun L, Shulman IA, Johnson C, Herron RM. The sickle cell hemolytic transfusion reaction syndrome. *Transfusion.* 1997;37(4):382–92.
50. Bao W, Yu J, Heck S, Yazdanbakhsh K. Regulatory T-cell status in red cell alloimmunized responder and nonresponder mice. *Blood.* 2009;113(22):5624–7.
51. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature.* 1999;401(6756):921–3.
52. Dausset J. The birth of MAC. *Vox Sang.* 1984;46(4):235–7.
53. Goldberg AC, Rizzo LV. Estrutura do MHC e função – apresentação de antígenos. Parte 1. *einstein (Sao Paulo).* 2015;13(1):153–6.
54. Murphy K. *Imunobiologia de Janeway.* 8a ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.
55. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(10):702–9.
56. Westover JB, Sweeten TL, Benson M, Bray-Ward P, Torres AR. Immune dysfunction in autism spectrum disorder. In: Eapen V, editor. *Autism: a neurodevelopmental journey from genes to behaviour.* [S.l.]: IntechOpen; 2011.
57. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Tópicos em transplante de células-tronco hematopoéticas. Rio de Janeiro: INCA; 2012. Figura 2 – As moléculas do complexo maior de histocompatibilidade são ancoradas na membrana celular e podem se ligar a receptores de células imunológicas. As de Classe I ligam-se a receptores de células T (TCR) CD8⁺; as de Classe II ligam-se a TCR CD4⁺. p. 21.

58. Zaleski MB. Cell-surface molecules in the regulation of immune responsiveness. *Immunol Invest.* 1991;20(2):103–31.
59. Janeway CA, Travers P. *Immunobiology*. New York: Garland Publishing Inc; 1994.
60. Reviron D, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, et al. HLA-DRB1 alleles and Jk(a) immunization. *Transfusion.* 2005;45(6):956–9.
61. Brain P, Hammond MG. Association between histocompatibility type and the ability to make anti-Rh antibodies. *Eur J Immunol.* 1974;4(3):223–5.
62. Souza CP. Associação entre os alelos HLA-DRB1 e a aloimunização eritrocitária [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2019.
63. 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;104(10):3409–10.
64. Chiaroni J, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, et al. HLA-DRB1 polymorphism is associated with Kell immunisation. *Br J Haematol.* 2006;132(3):374–8.
65. Noizat-Pirenne F, Tournamille C, Bierling P, Roudot-Thoraval F, Le Pennec PY, Rouger P, et al. Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion.* 2006;46(8):1328–33.
66. 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;49(11):2412–7.
67. Santos FL. Aloimunização eritrocitária e HLA em doença falciforme [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2020.
68. Chu CC, Ho HT, Lee HL, Chan YS, Chang FJ, Wang CL, et al. Anti-“Mi(a)” immunization is associated with HLA-DRB1*0901. *Transfusion.* 2009;49(3):472–8.
69. Baleotti W Jr, Ruiz MO, Fabron A Jr, Castilho L, Giuliatti S, Donadi EA. HLA-DRB1*07:01 allele is primarily associated with the Diego a aloimmunization in a Brazilian population. *Transfusion.* 2014;54(10):2468–76.
70. Alarif L, Castro O, Ofosu M, Dunston G, Scott RB. HLA-B35 is associated with red cell alloimmunization in sickle cell disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1986;38(2):178–83.
71. Hoppe C, Klitz W, Vichinsky E, Styles L. HLA type and risk of alloimmunization in sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2009;84(7):462–4.
72. Li R, Rezk A, Healy LM, Muirhead G, Prat A, Gommerman JL, et al.; MSSRF Canadian B cells in MS Team. Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2016;6:626. Figure 1 Multifaceted functions of B cells and their implications in the pathogenesis of MS. p. 2.
73. Yang P, Qian FY, Zhang MF, Xu AL, Wang X, Jiang BP, et al. Th17 cell pathogenicity and plasticity in rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol.* 2019;106(6):1233–40. Figure 1 The phenotype and plasticity of Th cells. p. 1235.
74. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27–37.
75. Sommer C, White F. Cytokines, chemokines, and pain. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson A, editors. *Pharmacology of pain*. Seattle: IASP Press; 2010. p. 279–302.
76. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):742–80.
77. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011;117(14):3720–32.

78. Contassot E, Beer HD, French LE. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13590.
79. Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I, et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(17):7119–24.
80. Wu MC, Huang CM, Tsai JJ, Chen HY, Tsai FJ. Polymorphisms of the interleukin-4 gene in chinese patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Lupus*. 2003;12(1):21–5.
81. Nakashima H, Miyake K, Inoue Y, Shimizu S, Akahoshi M, Tanaka Y, et al. Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. *Genes Immun*. 2002;3(2):107–9.
82. Cabantous S, Ranque S, Poudiougou B, Traore A, Berbaché S, Vitte J, et al. Genotype combinations of two IL4 polymorphisms influencing IL-4 plasma levels are associated with different risks of severe malaria in the Malian population. *Immunogenetics*. 2015;67(5-6):283–8.
83. Maksymowych WP, Suarez-Almazor ME, Buenviaje H, Cooper BL, Degeus C, Thompson M, et al. HLA and cytokine gene polymorphisms in relation to occurrence of palindromic rheumatism and its progression to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002;29(11):2319–26.
84. Mahmoudi M, Tahghighi F, Ziaee V, Harsini S, Rezaei A, Soltani S, et al. Interleukin-4 single nucleotide polymorphisms in juvenile systemic lupus erythematosus. *Int J Immunogenet*. 2014;41(6):512–7.
85. Mishra A, Jha AN, van Tong H, Singh VK, Gomes CE, Singh L, et al. Analysis of genetic variants in the IL4 promoter and VNTR loci in Indian patients with Visceral Leishmaniasis. *Hum Immunol*. 2014;75(12):1177–81.
86. Birbian N, Singh J, Jindal SK, Sobti RC. High risk association of IL-4 VNTR polymorphism with asthma in a North Indian population. *Cytokine*. 2014;66(1):87–94.
87. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1390–7.
88. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683–765.
89. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997;24(1):1–8.
90. Suárez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutiérrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation*. 2003;75(5):711–7.
91. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, et al. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1997;24(12):2314–7.
92. Hajeer AH, Lazarus M, Turner D, Mageed RA, Vencovsky J, Sinnott P, et al. IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 1998;27(2):142–5.
93. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004;21(4):467–76.
94. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(6):1265–73.
95. D'Alfonso S, Rampi M, Rolando V, Giordano M, Momigliano-Richiardi P. New polymorphisms in the IL-10 promoter region. *Genes Immun*. 2000;1(3):231–3.

96. Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, et al. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor gene polymorphisms in inflammatory bowel diseases. *Genes Immun.* 2001;2(5):287-9.
97. Vitale RF, Ribeiro FA. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007;73(1):123-7.
98. Sippert EA, Visentainer JE, Alves HV, Rodrigues C, Gilli SC, Addas-Carvalho M, et al. Red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease: correlation with HLA and cytokine gene polymorphisms. *Transfusion.* 2017;57(2):379–89.
99. Nakashima H, Miyake K, Inoue Y, Shimizu S, Akahoshi M, Tanaka Y, et al. Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. *Genes Immun.* 2002;3(2):107–9.
100. Castellino SM, Combs MR, Zimmerman SA, Issitt PD, Ware RE. Erythrocyte autoantibodies in paediatric patients with sickle cell disease receiving transfusion therapy: frequency, characteristics and significance. *Br J Haematol.* 1999;104(1):189–94.
101. 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;95(1):12–8.
102. Chiu RW, Murphy MF, Fidler C, Zee BC, Wainscoat JS, Lo YM. Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin Chem.* 2001;47(4):667–72.
103. Legler TJ, Eber SW, Lakomek M, Lynen R, Maas JH, Pekrun A, et al. Application of RHD and RHCE genotyping for correct blood group determination in chronically transfused patients. *Transfusion.* 1999;39(8):852–5.
104. Hipsky CH, Lomas-Francis C, Fuchisawa A, Reid ME, Moulds M, Christensen J, et al. RHCE*ceCF encodes partial c and partial e but not CELO, an antigen antithetical to Crawford. *Transfusion.* 2011;51(1):25–31.
105. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulié P, Nourhashemi F, Enault G, Abbai M, et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42(6):1093–100.
106. Bianchi JV. Genotipagem de grupos sanguíneos por meio de microarranjos líquidos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2016.
107. Wu X, Zeng Z, Chen B, Yu J, Xue L, Hao Y, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. *Int J Cancer.* 2010;127(1):86–92.
108. López NJ, Jara L, Valenzuela CY. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *J Periodontol.* 2005;76(2):234–43.
109. Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol.* 2008;180(9):6139–48.
110. Yao CJ, Du W, Chen HB, Xiao S, Wang CH, Fan ZL. Associations of IL-10 gene polymorphisms with acute myeloid leukemia in Hunan, China. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(4):2439–42.
111. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004;31(6):443–8.

112. Lin HJ, Tsai FJ, Chen WC, Shi YR, Hsu Y, Tsai SW. Association of tumour necrosis factor alpha -308 gene polymorphism with primary open-angle glaucoma in Chinese. *Eye (Lond)*. 2003;17(1):31–4.
113. Mishra A, Jha AN, van Tong H, Singh VK, Gomes CE, Singh L, et al. Analysis of genetic variants in the IL4 promoter and VNTR loci in Indian patients with Visceral Leishmaniasis. *Hum Immunol*. 2014;75(12):1177–81.
114. Maluskova A, Mrazek F, Pauliskova M, Kovarova P, Koristka M, Jindra P, et al. Association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 with red-blood-cell alloimmunization in the Czech population. *Vox Sang*. 2017;112(2):156–62.
115. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim HJ, Korn T, Kolls JK, et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(32):14292–7.
116. Chen X, Xu J, Chen Z, Zhou Z, Feng X, Zhou Y, et al. Interferon-gamma +874A/T and interleukin-4 intron3 VNTR gene polymorphisms in Chinese patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2007;79(3):191–7.
117. Vukmanovic-Stejić M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood*. 2000;95(1):231–40.
118. Clark O, Faleiros EJ. Cost of the treatment of myelodysplastic syndrome in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(1):31–4.
119. Lucioni C, Finelli C, Mazzi S, Oliva EN. Costs and quality of life in patients with myelodysplastic syndromes. *Am J Blood Res*. 2013;3(3):246–59.
120. Normanton M, Marti LC. Dados recentes em IL-17 e Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. *einstein (São Paulo)*. 2013;11(2):237–46.
121. Sato TA, Widmer MB, Finkelman FD, Madani H, Jacobs CA, Grabstein KH, et al. Recombinant soluble murine IL-4 receptor can inhibit or enhance IgE responses in vivo. *J Immunol*. 1993;150(7):2717–23.
122. Darvishi P, Sharifi Z, Azarkeivan A, Akbari A, Pourfathollah AA. HLA-DRB1*15:03 and HLA-DRB1*11: useful predictive alleles for alloantibody production in thalassemia patients. *Transfus Med*. 2019;29(3):179–84.

Abstract

Introduction: Blood transfusion is a vital therapy in the treatment and prevention of some complications of myelodysplastic syndromes. However, although red blood cell transfusions improve the quality of life in this patient population, their use is limited due to the frequency of occurrence of alloimmunization, a serious complication in myelodysplastic syndromes patients that can result in Delayed Hemolytic Transfusion Reactions. Although several factors have been associated with erythrocyte alloimmunization, differences in the immune response of alloimmunized and non-alloimmunized patients are not completely clear. **Purpose:** This study aimed to investigate the association of polymorphisms in regulatory regions and in cytokine genes, and HLA-DRB1 alleles with erythrocyte alloimmunization in myelodysplastic syndromes patients in order to find genetic markers of risk for erythrocytic alloimmunization in this population. **Methods:** 117 patients diagnosed with MDS participated in the study, being 30 non-polytransfused and non-alloimmunized patients, 59 polytransfused and non-alloimmunized patients, and 28 polytransfused and alloimmunized patients. Genotyping was performed for erythrocyte blood group alleles by the Microarray technique, for the HLA DRB1 alleles by the PCR-SSO technique (One Lambda-Luminex) and for the polymorphisms *IL17F*(7488A>G), *IL17A*–197G>A, *IL1B*–511C>T, *IL10*–1082A>G, *IL10*–592A>C, *IL10*–819T>C, *TNFA*–308G>A, *IL6*–174C>T, *IL4*–590C>T, and *IL4* intron 3 VNTR by PCR- RFLP, PCR-SSP and real-time PCR. Allelic frequency results were compared between alloimmunized and non-alloimmunized patient groups. **Results:** Regarding the transfusion profile and alloimmunization, 50.4% of the patients were polytransfused and not alloimmunized, 25.6% were polytransfused and alloimmunized, and 23.9% were not polytransfused and not alloimmunized. The main alloantibodies identified were against anti-C (35.7%), anti-E (32.1%), anti-K (10.7%) and anti-Dia (10.7%) antigens. The *IL17A*–197G/A polymorphism was shown to be positively associated with erythrocyte alloimmunization. The A allele and AA genotype were significantly more frequent in alloimmunized patients compared to the non-alloimmunized group (A allele: 27.1% versus 46.4%, OR=2.3; p=0.012; AA genotype: 6.8 versus 25%, OR=6.2; p=0.041). Furthermore, we found a significant association between alloimmunization for Rh antigens with the *IL17A*–197A allele and AA genotype, which were significantly more frequent in alloimmunized (A allele: 27.1% versus 45%, p=0.036;

OR=2.5; AA genotype: 6.8% versus 30%, $p=0.042$), the haplotype analysis of C, RP1/C, RP1 and C, RP1/T, RP2 of *IL4* intron 3 and *IL4*-590 diplotypes showed a significant difference between polytransfused and alloimmunized patients compared to non-alloimmunized polytransfused patients (39.29% versus 67.8%, OR=0.31; $p=0.013$; CI=95% 0.12-0.78). **Conclusions:** The present work showed no association between HLA-DRB1 alleles with risk or protection to erythrocyte alloimmunization; however, the *IL4*-590C>T and *IL17A*-197G>A SNP was associated with the risk of erythrocyte alloimmunization in Brazilian patients with MDS.

Keywords: Myelodysplastic syndromes; Erythrocyte alloimmunization [not in DeCS]; Polymorphism, genetic; Cytokines; HLA antigens

Apêndice

Tabela 1. Avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos três grupos de interesse

	NPNA (n=30)	Valor-p	PNA (n=59)	Valor-p	PA (n=28)	Valor-p
<i>IL4 íntron3</i>						
RP1/RP1	14 (46,7)	a 0,414	46 (78,0)	a 0,116	14 (50,0)	a 0,072
RP1/RP2	15 (50,0)	b 0,374	10 (16,9)	b 0,068	14 (50,0)	b 0,208
RP2/(RP2+RP3)	1 (3,3)	c 0,278	3 (5,1)	c 0,026	0 (0,0)	c 0,141
<i>IL10-592A/C</i>						
A/A	7 (23,3)	a 0,052	13 (22,0)	a 0,433	3 (10,7)	a 0,734
A/C	8 (26,7)	b 0,046	25 (42,4)	b 0,426	12 (42,9)	b >0,999
C/C	15 (50,0)	c 0,014	21 (35,6)	c 0,284	13 (46,4)	c 0,813
<i>IL1B-511C/T</i>						
C/C	10 (33,3)	a 0,483	18 (30,5)	a 0,560	12 (42,9)	a 0,953
T/C	17 (56,7)	b 0,442	32 (54,2)	b 0,435	12 (42,9)	b >0,999
T/T	3 (10,0)	c 0,331	9 (15,3)	c 0,436	4 (14,3)	c 0,678
<i>IL17A-197G/A</i>						
A/A	1 (3,3)	a 0,921	4 (6,8)	a 0,915	7 (25,0)	a 0,724
G/A	11 (36,7)	b >0,999	24 (40,7)	b >0,999	12 (42,9)	b 0,705
G/G	18 (60,0)	c 0,801	31 (52,5)	c 0,838	9 (32,1)	c 0,411
<i>IL17F(7488A/G)</i>						
A/A	25 (83,3)	a 0,486	50 (84,7)	a 0,772	22 (78,6)	a 0,724
G/A	5 (16,7)	b >0,999	9 (15,3)	b >0,999	6 (21,4)	b >0,999
G/G	0 (0,0)	c 0,607	0 (0,0)	c 0,602	0 (0,0)	c 0,603
<i>IL10-1082A/G</i>						
A/A	12 (40,0)	a 0,594	21 (35,6)	a 0,887	13 (46,4)	a 0,815
A/G	12 (40,0)	b 0,458	28 (47,5)	b >0,999	11 (39,3)	b 0,677
G/G	6 (20,0)	c 0,308	10 (16,9)	c 0,862	4 (14,3)	c 0,417
<i>TNFA-308G/A</i>						
A/A	2 (6,7)	a 0,381	1 (1,7)	a 0,977	2 (7,1)	a 0,066
A/G	6 (20,0)	b 0,155	17 (28,8)	b >0,999	3 (10,7)	b 0,045
G/G	22 (73,3)	c 0,185	41 (69,5)	c 0,787	23 (82,1)	c 0,011
<i>IL4-590C/T</i>						
C/C	15 (50,0)	a 0,554	40 (67,8)	a 0,743	13 (46,4)	a 0,146
C/T	14 (46,7)	b 0,391	17 (28,8)	b >0,999	15 (53,6)	b 0,075
T/T	1 (3,3)	c 0,400	2 (3,4)	c 0,760	0 (0,0)	c 0,070
<i>IL6-174C/T</i>						
C/C	3 (10,0)	a 0,862	6 (10,2)	a 0,820	1 (3,6)	a 0,810
C/T	12 (40,0)	b >0,999	26 (44,1)	b >0,999	10 (35,7)	b >0,999
T/T	15 (50,0)	c 0,730	27 (45,8)	c 0,889	17 (60,7)	c 0,783
<i>IL10-819T/C</i>						
C/C	16 (53,3)	a 0,208	27 (45,8)	a 0,974	14 (50,0)	a 0,843
C/T	9 (30,0)	b 0,115	25 (42,4)	b 0,775	12 (42,9)	b >0,999
T/T	5 (16,7)	c 0,074	7 (11,9)	c 0,687	2 (7,1)	c 0,835

Nível de significância corrigido por Bonferroni: $0.05/10 = 0.005$. a: valor-p obtido por teste de qui-quadrado c/corr. de Yates; b: valor-p obtido por teste exato de Fisher; c: valor-p "exato" obtido por simulações *bootstrap*.