

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ESTUDO DE ALOIMUNIZAÇÃO EM PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS
NO AMBULATÓRIO DE TRANSFUSÃO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE

DANIELA MICHELIM RODRIGUEZ SPERANSA

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ESTUDO DE ALOIMUNIZAÇÃO EM PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS
NO AMBULATÓRIO DE TRANSFUSÃO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE

DANIELA MICHELIM RODRIGUEZ SPERANSA

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

PORTO ALEGRE

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Speransa, Daniela Michelim Rodriguez
Estudo de Aloimunização em Pacientes
Politransfundidos no Ambulatório de Transfusão do
Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Daniela
Michelim Rodriguez Speransa. -- 2020.
71 f.
Orientador: Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2020.

1. Aloanticorpos. 2. Antígenos de grupos sanguíneos.
3. Responder. 4. Antígeno HLA. 5. Transfusão
sanguínea. I. Faulhaber, Gustavo Adolpho Moreira,
orient.II. Título.

Epígrafe:

*A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.*

(Arthur Schopenhauer)

Agradeço a minha família e mestres pelo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Gustavo Faulhaber, pela orientação e oportunidade de crescimento científico e profissional.

À Dra. Juliana Franz pela amizade, compreensão, orientação e estímulo profissional. Muitas vezes deixando de lado seu momento de descanso para me ajudar a crescer profissionalmente. Meu muito obrigada é pouco para agradecer o que sempre fez por mim.

Aos colegas e amigos da Unidade de Terapia Transfusional por toda ajuda e compreensão nessa etapa da minha vida.

A equipe do departamento de Imunologia, principalmente à funcionária Ana Arend pela ajuda científica e laboratorial.

À todos os professores, médicos e funcionários do serviço de Hemoterapia pelo acolhimento e compartilhamento do seu conhecimento, principalmente o chefe e amigo Dr. Leo Sekine, por toda ajuda na realização dessa dissertação.

Meu esposo Angelo por me apoiar e incentivar meu crescimento profissional, não deixando desistir nos momentos mais difíceis. Meu filho Adriano que, mesmo sendo pequeno, sempre me ajudou muito nesse projeto pessoal.

Aos meus pais Eva e Vitório, melhores pais do mundo, que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida e que na minha ausência, devido aos estudos e trabalho, nunca mediram esforços para cuidar com muito amor no meu mais preciso tesouro, meu filho Adriano.

À minha irmã Lessandra, a qual me espelho profissionalmente. Que mesmo com a distância, sempre se fez presente na minha vida e sempre fará.

E principalmente a Deus por ter colocados todas essas pessoas especiais na minha vida.

RESUMO

A aloimunização eritrocitária é a formação de um anticorpo à exposição de um antígeno não próprio no indivíduo, podendo ocorrer em uma transfusão de sangue, gestação ou transplante. Essa formação dos anticorpos irregulares pode ser responsável por reações transfusionais hemolíticas graves durante a transfusão de hemocomponentes incompatíveis. Em pacientes politransfundidos, a taxa de aloimunização pode atingir 30% dos indivíduos e, após ser sensibilizado, há chance de 20 a 30 vezes de formar um novo anticorpo, sendo um importante problema naqueles pacientes que recebem suporte de transfusões crônicas. Existem fatores que podem estar envolvidos no aumento dessa taxa, como: o número de transfusões, o grau de imunogenicidade do antígeno, fatores genéticos do paciente e fatores adquiridos relacionados à doença. O objetivo deste trabalho é determinar a prevalência de aloimunização e avaliar fatores predisponentes, a fim de coadunar informações que embasem a mudança do protocolo institucional. Através de um estudo coorte retrospectivo, foram analisados os históricos transfusionais de 287 pacientes que realizaram transfusões de concentrado de hemácias no ambulatório do serviço de Hemoterapia, no período de 2007 a 2017. O critério de inclusão do trabalho foram pacientes com síndrome mielodisplásica, anemias aplásticas, esferocitose hereditária, anemias hemolíticas e hemoglobinopatias (anemia falciforme e talassemia), que receberam pelo menos uma unidade de concentrado de hemácias no período do estudo. Observamos uma prevalência de aloimunização de 26%, sendo mais comuns os anticorpos do sistema Rh (52,6%) e Kell (28,9%). Destes pacientes, 28 (9,8%) desenvolveram múltiplos anticorpos, sendo a combinação mais frequente a dos anticorpos anti-D e anti-C (13,6%). O sistema Rh e Kell estão presente em 97,7% das combinações de anticorpos encontrados. Analisando as variáveis que predispõem a aloimunização, observamos associações estatística significativa entre o fator RhD negativo ($P=0,004$), profilaxia inicial (sistema Rh e Kell) ($P=0,039$) e alelo HLA-DRB1*15 ($P=0,035$). Entretanto, ao analisarmos o número de bolsas transfundidas até adquirir o anticorpo, observamos

aparentemente uma associação inversa. Com o propósito de esclarecer este achado, realizamos uma análise multivariável, com as principais variáveis envolvidas, e observamos que apenas a variável alelo HLA-DRB1*15 manteve sua associação significativa no modelo de regressão final. Esses dados indicam que o risco à aloimunização é ditado não só pelos fator extrínsecos (exposição), mas também por fatores intrínsecos, como fatores genéticos e doença base, sugerindo que existem populações de pacientes com maior benefício de profilaxia estendida.

Palavras Chave: Aloimunização eritrocitária, Imunogenicidade do antígeno, Responder, Sistema HLA, Transfusão de sangue

ABSTRACT

Erythrocyte alloimmunization is the formation of an antibody by the exposure to an antigen that does not belong to the individual, and it may take place in a blood transfusion, pregnancy, or transplantation. Such formation of irregular antibodies may account for severe hemolytic transfusion reactions during the transfusion of incompatible blood components. In polytransfused patients, the rate of alloimmunization can reach 30% of individuals, and, after sensitization, there is a 20-30-fold chance of formation of a new antibody, and this is a major problem in those patients receiving chronic transfusion support. There are factors that may be involved in the increase in this rate such as: number of transfusions, degree of antigen immunogenicity, patient's genetic factors, and disease-related acquired factors. The objective of this paper is to determine alloimmunization prevalence and assess predisposing factors in order to gather information to support an institutional protocol change. By means of a retrospective cohort study, the transfusion history of 287 patients subjected to transfusions of red cell concentrates at an outpatient hemotherapy service from 2007 to 2017 was analyzed. The inclusion criteria of the study were patients presenting with myelodysplastic syndrome, aplastic anemia, hereditary spherocytosis, hemolytic anemia and hemoglobinopathies (sickle cell anemia and thalassemia) who received at least one unit of red cell concentrate in the period under study. We observed an alloimmunization prevalence rate of 26%, with Rh (52.6%) and Kell (28.9%) antibodies being the most common. Of these patients, 28 (9.8%) developed multiple antibodies, and the most frequent combination was that of anti-D and anti-C antibodies (13.6%). The Rh and Kell systems are present in 97.7% of the antibody combinations found. By analyzing the variables predisposing to alloimmunization, statistically significant associations were observed between RhD negative factor ($P=0.004$), initial prophylaxis (Rh and Kell systems) ($P=0.039$) and HLA-DRB1*15 allele ($P=0.035$). However, when the number of transfused bags until an antibody was acquired was analyzed, an apparently inverse association was noted. In order to elucidate this finding, a multivariate analysis was carried out with

the main variables involved, and only the HLA-DRB1*15 allele variable maintained a significant association in the final regression model. These data indicate that the alloimmunization risk is dictated not only by extrinsic factors (exposure), but also by intrinsic factors, as genetic factors and underlying disease, suggesting that there are patient populations who achieve a greater benefit from extended prophylaxis.

Keywords: Erythrocyte alloimmunization, Antigen immunogenicity, Responder, HLA system, Blood transfusion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de Respondedor.....	15
Figura 2 - Estratégias para localizar e selecionar as informações (Prisma 2019).....	18
Figura 3 - Marco Conceitual da Aloimunização	25

LISTA DE FIGURAS ARTIGO

Figure 1 - Specificity frequencies of erythrocyte antibodies found in patients under transfusion support from 2007 to 2017 at the HCPA.	54
Figure 2 - Performance of Initial Prophylaxis	55
Figure 3 - Presence of HLA-DRB1*15 Allele	56

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1 – Population Characteristics	49
Table 2 – Antibody Specificity and Prevalence in the 76 patients with positive alloantibody screening tests	50
Table 3 – Combined antibody specificity found in 44 patients with alloimmunization	51
Table 4 – Outcome frequency in the different factor groups studied, relative risk and P-value of the univariate Cox proportional hazards regression (n = 237 patients).....	52
Table 5 – Exploratory multivariate analysis of the main factors associated with alloimmunization incidence	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA Anemia Aplástica

AABB Associação Americana de Bancos de Sangue (do inglês, *American Association of Blood Banks*)

AF Anemia Falciforme

AH Anemia Hemolítica

CH Concentrado de hemácias

CP Concentrado de plaquetas

EH Esferocitose Hereditária

FDA *Food and Drug Administration*

HLA Antígeno Leucocitário Humano

HCPA Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IQR Interquartil Range

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade (em inglês, *Major Histocompatibility Complex*)

RBC *Red Blood Cell*

SMD Síndrome Mielodisplásica

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCTH Transplante de Células Tronco Hematopoéticas

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 GRAU DE EXPOSIÇÃO E IMUNOGENICIDADE DOS ANTÍGENOS	19
2.2 ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA E FATORES GENÉTICOS	21
2.3 ALOIMUNIZAÇÃO E FATORES ADQUIRIDOS RELACIONADOS À DOENÇA BASE (SISTEMA INFLAMATÓRIO).....	23
2.4 PROFILAXIA À ALOIMUNIZAÇÃO.....	23
3. MARCO CONCEITUAL	25
4. JUSTIFICATIVA	26
5. OBJETIVOS	28
5.1 OBJETIVO GERAL:.....	28
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	28
6. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA:	29
7. ARTIGO ORIGINAL.....	34
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	59
10. ANEXOS:	
Anexo 1 - Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais.....	60
Anexo 2 - Strobe Statement.....	61
Anexo 3 – Normas para Submissão da Revista <i>Vox Sanguinis</i>	66

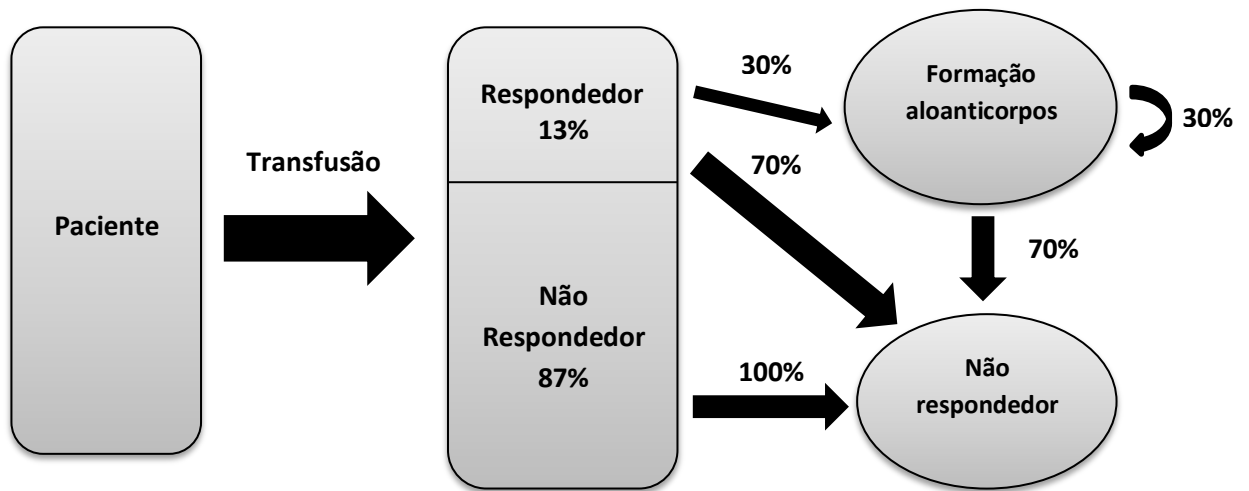
1. INTRODUÇÃO

A aloimunização é caracterizada por uma disparidade genética entre as células do doador e do receptor produzindo uma resposta imunológica, através da formação de anticorpos após a exposição. Esse processo pode ser desencadeado através de uma transfusão sanguínea, transplante ou gestação (1–4). Entre as principais doenças relacionadas à aloimunização estão síndromes mielodisplásicas (SMD), anemias aplásica (AA), anemia hemolítica (AH), esferocitose hereditária (EH) e hemoglobinopatias (anemia falciforme (AF) e talassemia), que são doenças as quais a conduta terapêutica é a transfusão sanguínea crônica de hemácias (CH) e plaquetas (CP) a fim de corrigir a anemia por falha na produção de células hematopoiéticas, profilaxia primária e secundária de eventos cerebrovascular e os fenômenos hemorrágicos em pacientes trombocitopênicos (1,5–8).

Estudos relatam que a taxa de aloimunização de anticorpos clinicamente significativos pode variar entre 2% a 3% em pacientes em geral, entretanto em paciente em com suporte transfusional crônico a taxa varia entre 4% a 36%, dependendo da doença base (4–9). Em pacientes já sensibilizados a taxa pode aumentar de 20 a 30 vezes em adquirir novos anticorpos, o que representa grande problema em pacientes politransfundidos (10–12).

Entretanto, mesmo com a taxa elevada de formação de aloanticorpos em paciente politransfundidos, autores procuram explicações de porque alguns indivíduos, mesmo recebendo múltiplas transfusões, não adquirem anticorpos, ou seja, não são bons respondedores imunes; enquanto para outros, apenas uma transfusão de hemácias pode desencadear resposta imune, formando um ou múltiplos anticorpos, considerados bons respondedores (2,3,13,14). (Figura 1) Acredita-se que essa hipótese esteja relacionada principalmente a alguns fatores, como: grau de exposição do receptor a antígenos estranhos (aloantígeno), o grau de imunogenicidade do antígeno, gênero, idade, marcadores genéticos do paciente e fatores adquiridos relacionados à doença base (1,15–17).

Figura 1: Esquema de Respondedor



Fonte: Higging J & Sloan S, 2008.

Legenda: o retângulo à esquerda demonstra o receptor que recebe transfusão de glóbulos vermelhos; 13% desses pacientes são respondedores e têm 30% de chances de formar anticorpos adicionais. Os outros pacientes não formam anticorpos.

Atualmente, o grande desafio nos laboratórios de imunohematologia é quando os títulos dos anticorpos tornam-se indetectáveis nas técnicas pré-transfusionais sendo o paciente exposto novamente aos aloantígenos para o qual foi sensibilizado na transfusão anterior, devido à memória imunológica, ocorrerá uma resposta imune secundária bem mais rápida do que a anterior, podendo causar uma reação hemolítica grave, além de reduzir o número de bolsas de sangue compatíveis para futuras transfusões (5,9,16,18). Conforme FDA (*Food and Drug Administration*), nos Estados Unidos, a segunda principal causa de morte relacionado à transfusão de sangue são as reações transfusionais hemolíticas causadas por aloanticorpos irregulares eritrocitários (4,18).

Um outro problema para os laboratórios, é quando o paciente com transfusões recentes é sensibilizado por algum anticorpo que não é possível esclarecer através de técnicas acessória, o principal recurso seria realizar a transfusão de concentrados de hemácias com a fenótipo mais próximo ao do paciente. Entretanto,

se o paciente tiver transfundido nos últimos três meses e não tiver sido fenotipado no início do suporte transfusional, não é indicado fenotipa-lo, pois poderá ocorrer interferências nas tipificações antigênicas (19,20). Os principais fatores que podem interferir na identificação dos anticorpos são autoanticorpos ou teste direto da antiglobulina positivos, que sozinho não tem significado clínico, mas podem mascarar a identificação de anticorpos de significado clínico em um painel de identificação, necessitando de técnicas acessórias como adsorção e eluato ácido para identificá-los, podendo causar atraso na transfusão (4,13,19).

Devido aos fatores que podem interferir nas técnicas de identificação de aloanticorpos, como citado anteriormente, grandes centros, além de utilizarem concentrados de hemácias fenotipadas para os antígenos Rh e K em pacientes que requerem transfusões frequentes, estão investindo na utilização de transfusão de concentrado de hemácias com fenótipos estendidos para os sistemas Duffy, Kidd e MNS a fim de aumentar os benefícios clínicos e diminuir custos para o serviço transfusional, o que pode corresponder a 50% dos custos nas provas pré-transfusional, pois evitará pacientes aloimunizados (13). A fenotipagem dos antígenos dos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS tem sido recomendada por vários autores, por serem antígenos eritrocitários clinicamente significativos e causarem reações transfusionais graves (9,13,15,21).

Portanto, o objetivo deste estudo é determinar a prevalência e as especificações dos aloanticorpos em pacientes transfundidos no serviço de Hemoterapia do HCPA nos últimos 10 anos, verificando os possíveis fatores de predisposição, a fim de coadunar informações que embasem a criação de um protocolo institucional de profilaxia à aloimunização eritrocitária para outras doenças, além das hemoglobinopatias, que já seguem as recomendações da legislação nacional.

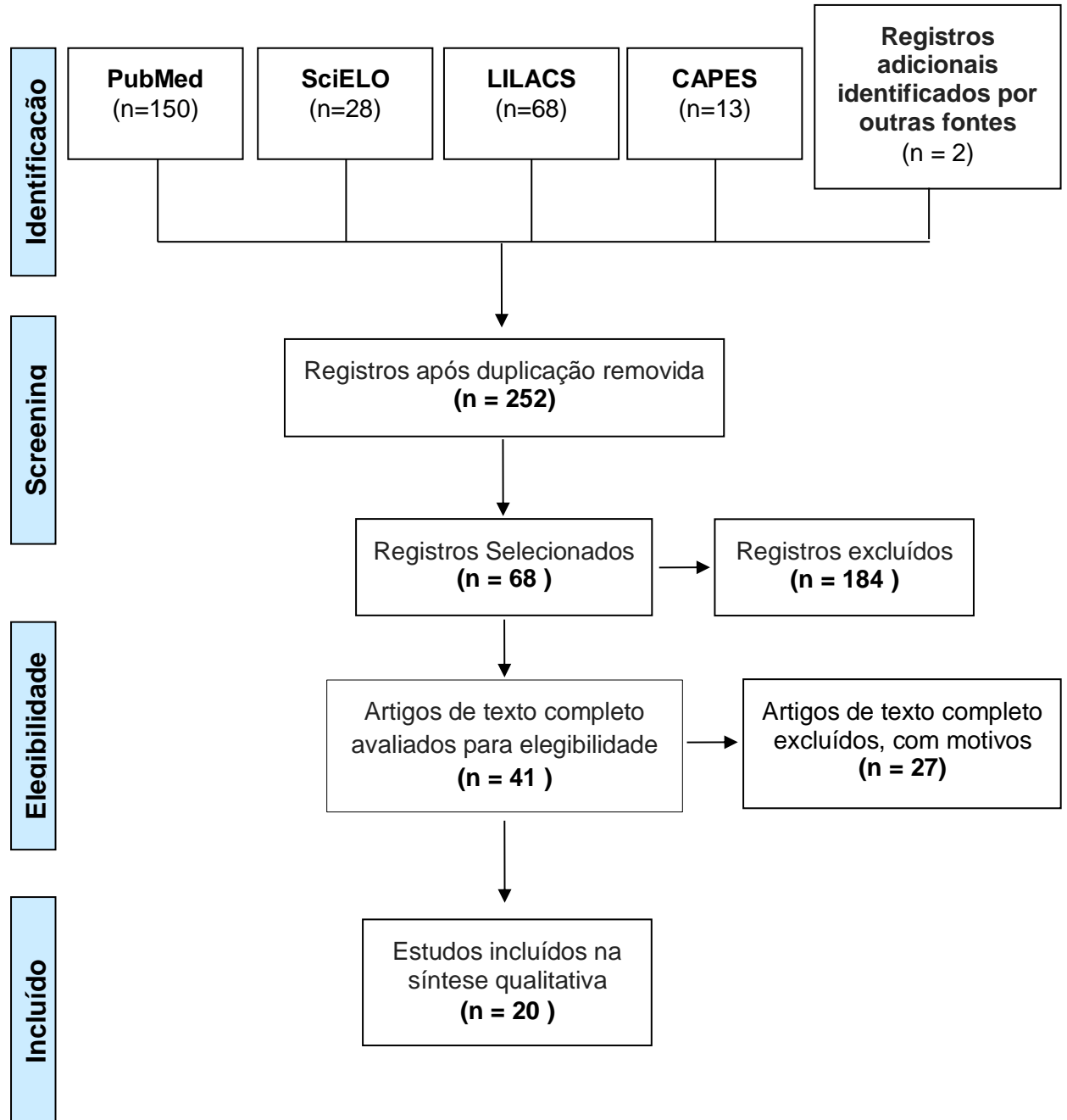
2. REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão da literatura tem como objetivo demonstrar a importância da criação de um protocolo de prevenção a aloimunização eritrocitária de pacientes que transfundem no ambulatório do Serviço de Hemoterapia, para garantir uma menor exposição aos antígenos não próprios em transfusão de sangue, visando à integridade do receptor e a qualidade do hemocomponente a transfundir. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO, PubMed e o banco de teses da CAPES, no período de 1983 a 2019. Foram realizadas buscas através dos termos: Isoanticorpos, aloanticorpos, antígeno, respondedor, sistema HLA, aloimunização, transfusão de sangue, transfusão crônica de sangue.

```
((("isoantibodies"[MeSH Terms] OR ("isoantibodies"[MeSH Terms] OR "isoantibodies"[All Fields] OR "alloantibodies"[All Fields])) OR (("antigens"[MeSH Terms] OR "antigens"[All Fields] OR "antigen"[All Fields]) AND immunogenicity[All Fields])) OR responder[All Fields]) OR (red[All Fields] AND ("blood"[Subheading] OR "blood"[All Fields] OR "blood"[MeSH Terms]) AND alloimmunization[All Fields])) AND (red[All Fields] AND ("blood"[Subheading] OR "blood"[All Fields] OR "blood"[MeSH Terms]) AND chronic[All Fields] AND ("blood transfusion"[MeSH Terms] OR ("blood"[All Fields] AND "transfusion"[All Fields]) OR "blood transfusion"[All Fields] OR "transfusion"[All Fields]))
```

A estratégias para localizar e selecionar as informações serão apresentados através do modelo de diagrama de fluxo, Prisma 2019

**FIGURA 2 - Estratégias para localizar e selecionar as informações
(Prisma 2019)**



Fonte: Elaborado pela autora (Diagrama de Fluxo - PRISMA 2009)

A aloimunização eritrocitária é uma disparidade genética entre as células do doador e receptor desencadeando uma resposta imunológica através da formação de anticorpos (1,3) e é um dos principais efeitos adversos e perigosos em uma transfusão, pois podem causar uma reação hemolítica tardia, além de diminuir a chance de encontrar sangue compatível (1,2,5,9,18). Esse processo pode ser desencadeado através de transfusão de sangue, gestação ou transplante (1–4). A taxa de aloimunização na população em geral varia entre 2 a 3%, entretanto em paciente com suporte transfusional crônico essa taxa eleva-se para 30% dependendo da doença base (4–8). Estudos demonstram que os pacientes já sensibilizados tem uma probabilidade de 20 a 30 vezes de adquirir um segundo anticorpo (12,16). Entre as principais doenças relacionadas a aloimunização estão onco-hematológicas e hematológicas, que são doenças as quais a conduta é a transfusão de hemácias (CH) e plaquetas (CP) a fim de corrigir anemia e/ou evitar intercorrências da doença.

Entretanto, mesmo com a taxa elevada de formação de aloanticorpos em paciente politransfundidos, autores procuram explicações de porque alguns indivíduos, mesmo recebendo múltiplas transfusões, não adquirem anticorpos; enquanto para outros, apenas uma transfusão de hemácias pode desencadear resposta imune, formando um ou múltiplos anticorpos (2,3,13,14). Sugere-se que essa hipótese esteja relacionada principalmente a alguns fatores, como: grau de exposição do receptor a antígenos estranhos (aloantígeno), o grau de imunogenicidade do antígeno, marcadores genéticos do paciente e fatores adquiridos relacionados à doença base (1,5,7,15–17,22).

2.1 GRAU DE EXPOSIÇÃO E IMUNOGENICIDADE DOS ANTÍGENOS

O sistema sanguíneo é composto por 360 antígenos, sendo 322 antígenos distribuídos em 36 sistemas de grupos sanguíneos e os outros 38 antígenos ainda não atribuídos (23). Isso explica a diversidade de aloanticorpos produzidos. Alguns desses antígenos são mais imunogênicos do que os outros, ou seja, tem uma maior capacidade de estimular a produção de anticorpo em um receptor que não possui o

antígeno, como aqueles pertencentes aos sistemas Rh (34%), Kidd (30%), Duffy (14%) e Kell (13%) que, ao reagirem à 37°C, podem causar hemólise após a transfusão de sangue, no feto ou no recém nascidos (2,13,18,24). O sistema do grupo Rh, após o sistema ABO, é considerado o segundo sistema eritrocitário em importância clínica e o primeiro em complexidade (25). O antígeno RhD, devido a sua diversa forma recombinante, é considerado o antígeno mais imunogênico, pois 0,1 ml de hemácias RhD positivas pode estimular a produção de anticorpos em pacientes RhD negativo; isso porque pacientes RhD negativos não possuem a proteína RhD interna, resultando em uma diferença de 32 a 35 aminoácidos (19). A taxa de formação de anticorpos em pacientes RhD negativos ao receber hemácias RhD positivo variam entre 30% à 50%, já os demais antígenos a taxa estaria entre 3% a 10%, mesmo com múltiplas exposições (26). Comparando o grau de imunogenicidade dos antígenos do sistema Rh, os com maior capacidade de formar anticorpos, após o D, seriam c, E, C, e (19).

No estudo de Giblett em 1961, foi calculada a frequência com que os anticorpos são encontrados e o grau de imunogenicidade dos mesmos, e observada a probabilidade relativa de formação de um anticorpo de um grupo sanguíneo não sendo D: $K (0,05) > c (0,0205) > E (0,0169) > Fya (0,0023) > Jka (0,0007)$, comparando com o antígeno K (27,28). No entanto, o estudo de Stack e colaboradores, em 2016, ao reavaliar o cálculo de imunogenicidade, baseado nas frequências de antígeno e anticorpo em pacientes que foram expostos a apenas uma transfusão de hemácias, sugerem que o grau de imunogenicidade do antígeno Jka é mais alta, sendo o terceiro anticorpo mais imunogênico após o antígeno D e antígeno K (28).

Além da imunogenicidade dos antígenos ser um fator determinante para formação de aloanticorpos, artigos relatam a relação do número de transfusões realizadas, ou seja, o número de vezes que o paciente foi exposto a um antígeno não próprio, com o processo de aloimunização (1,8,9,29). Estima-se que 2% a 5% dos pacientes sejam sensibilizados a cada transfusão de hemácias (16,30). Entretanto, mesmo com a taxa elevada de formação de aloanticorpos, recentemente

autores procuram explicações de porque alguns indivíduos, mesmo recebendo múltiplas transfusões, não adquirem anticorpos, ou seja, não são bons respondedores imunes; enquanto para outros, apenas uma transfusão de hemácias pode desencadear resposta imune, formando um ou múltiplos anticorpos, considerados bons respondedores (2,3,13,14). Acredita-se que esse fator tenha envolvimento não apenas com fatores extrínsecos (exposição), mas também com fatores intrínsecos, como fatores genéticos e doença base.

2.2 ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA E FATORES GENÉTICOS

Estudos sobre aloimunização demonstram uma relação entre o polimorfismo do sistema HLA e a pré-disposição na formação de anticorpos eritrocitários (2,3,6,7,13,29). O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*) representa o conjunto de genes responsável por codificar as moléculas de histocompatibilidade em uma determinada espécie e, em humanos, é chamado Sistema HLA (Antígeno Leucocitário Humano). O sistema HLA está localizado no braço curto do cromossomo 6 e contém aproximadamente quatro milhões de bases e seus genes podem ser reunidos em 3 grupos, denominados genes de classe I, II e III, que representa cerca de 0,1% do genoma. Os genes de classe I codificam as moléculas clássicas HLA-A, B e C, e estão presentes em todas as células nucleadas e plaquetas; os de classe II as moléculas clássicas HLA-DR, DQ e DP, estão presentes nos linfócitos B, macrófagos, monócitos, células de Langerhans, células dendríticas, células endoteliais e linfócitos T quando ativados. Os genes de classe III não codificam moléculas de histocompatibilidade (13,31). A função das moléculas HLA Classe II é promover o reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos T, iniciando uma resposta imunológica e desempenhando uma importante função no reconhecimento do antígeno próprio e não próprio do indivíduo (2,3,6,13,17).

Na prática transfusional, as células alogênicas do doador, que expressam as diferenças polimórficas dos alelos HLA, são responsáveis pela sensibilização do

receptor (3). Estudos relatam que 2,6% dos pacientes que recebem transfusões desenvolvem aloanticorpos clinicamente significativos que não haviam sido detectados em teste pré-transfusional. Esse percentual não inclui a aloimunização contra o antígeno RhD, que sozinho tem a capacidade de formar anticorpo irregular em aproximadamente 20% a 30% dos pacientes RhD positivos (13). Acredita-se que o grau de imunogenicidade do antígeno RhD esteja relacionado a sua estrutura protéica, ou seja, o fenótipo RhD negativo corresponde a completa ausência da proteína RhD na superfície, o que contrasta com a maioria dos antígenos eritrocitários que são codificados por alelos e diferem por apenas um ou alguns aminoácidos, como é o caso dos antígenos antitéticos Kidd (Jka e Jkb) que diferem entre si apenas pelo aminoácido ácido aspártico e asparagina (13). Uma hipótese para o alto índice de aloimunização contra o antígeno RhD é que a grande variedade de moléculas HLA de um indivíduo é capaz de fazer a apresentação de pelo menos um epítopo desse antígeno, já o mesmo não acontece com os demais antígenos, onde o antígeno “não-próprio” difere do “próprio” em apenas alguns aminoácidos, pois seu peptídeo pode ligar especialmente no local de ligação a vários peptídeos da molécula HLA e formar o anticorpo, como acontece na maioria dos grupos sanguíneos (13,17).

Autores sugerem que o alelo HLA-DRB1, que corresponde a 90% das moléculas HLA Classe II, está envolvido na indução e especificidade da formação de aloanticorpos eritrocitários (1,3,13,17), como: HLA-DRB1*09:01 com a formação de Anti-E; HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*01:02 e HLA-DRB1*10:01 podem estar associados a formação de anti-Jka; HLA-DRB1*04 com a formação anti-Fya e HLA-DRB1*07 indicando um maior risco de aloimunização contra o Dia (2,17,22,29,32). O alelo HLA-DRB1*15 pode estar associado a formação de múltiplos anticorpos em pacientes bons respondedores e o alelo HLA-A*23 parece estar relacionado à proteção à aloimunização (3,7,14,29).

2.3 ALOIMUNIZAÇÃO E FATORES ADQUIRIDOS RELACIONADOS À DOENÇA BASE (SISTEMA INFLAMATÓRIO)

Conforme citado anteriormente, outro fator que pode predispor à aloimunização é o processo inflamatório da doença base. Há relatos que pacientes com hemoglobinopatias, principalmente com Anemia Falciforme, tem uma maior chance de formar anticorpos irregulares do que em outras doenças (4% a 36%), comparado com Síndrome Mielodisplásica (9% a 17%) e Anemia Aplástica (11% a 15%), dependendo da região (5,20,24,33,34).

Estudos relatam que pacientes com AF apresentam uma probabilidade maior de produzir anticorpos quando estão em crise álgica, ou seja quando esses pacientes estão com o processo inflamatório agudo (síndrome torácica aguda e crises vaso-oclusivas).(5,16) Esse fator está relacionado à liberação de citocinas inflamatória durante a resposta imune, estimulando a apresentação de antígenos na ativação celular (5,10,33,34).

Outro grupo de doenças relacionadas com um o risco maior de desenvolver aloanticorpo são pacientes com tumores sólidos, pois a agressividade do câncer, representada pela presença de metástase e pela histologia diferenciada, está relacionada a níveis mais altos de marcadores inflamatórios e liberação de citocinas (35).

2.4 PROFILAXIA À ALOIMUNIZAÇÃO

Em virtude dos avanços tecnológicos e terapêutico, houve um aumento na sobrevivência dos pacientes politransfundidos e, conseqüentemente, um aumento no número de transfusão de hemácias e a taxa de aloimunização. Devido a esse fator, a legislação nacional vigente em Hemoterapia, sugere que todos os pacientes que poderão necessitar de transfusões crônicas, recebam somente concentrados de hemácias fenótipo compatível para os anticorpos mais imunogênicos (Rh, Kell, Duffy, Kidd) (36).

O manual técnico da AABB (*American Association of Blood Banks*), informa que nas instituições acadêmicas dos Estados Unidos e Canadá, o protocolo mais utilizado em pacientes que realizam transfusões crônicas é a combinação fenotípica com os antígenos do sistema Rh e Kell. Os antígenos Duffy, Kidd e S são frequentemente selecionados para prevenir aloimunização adicional (37).

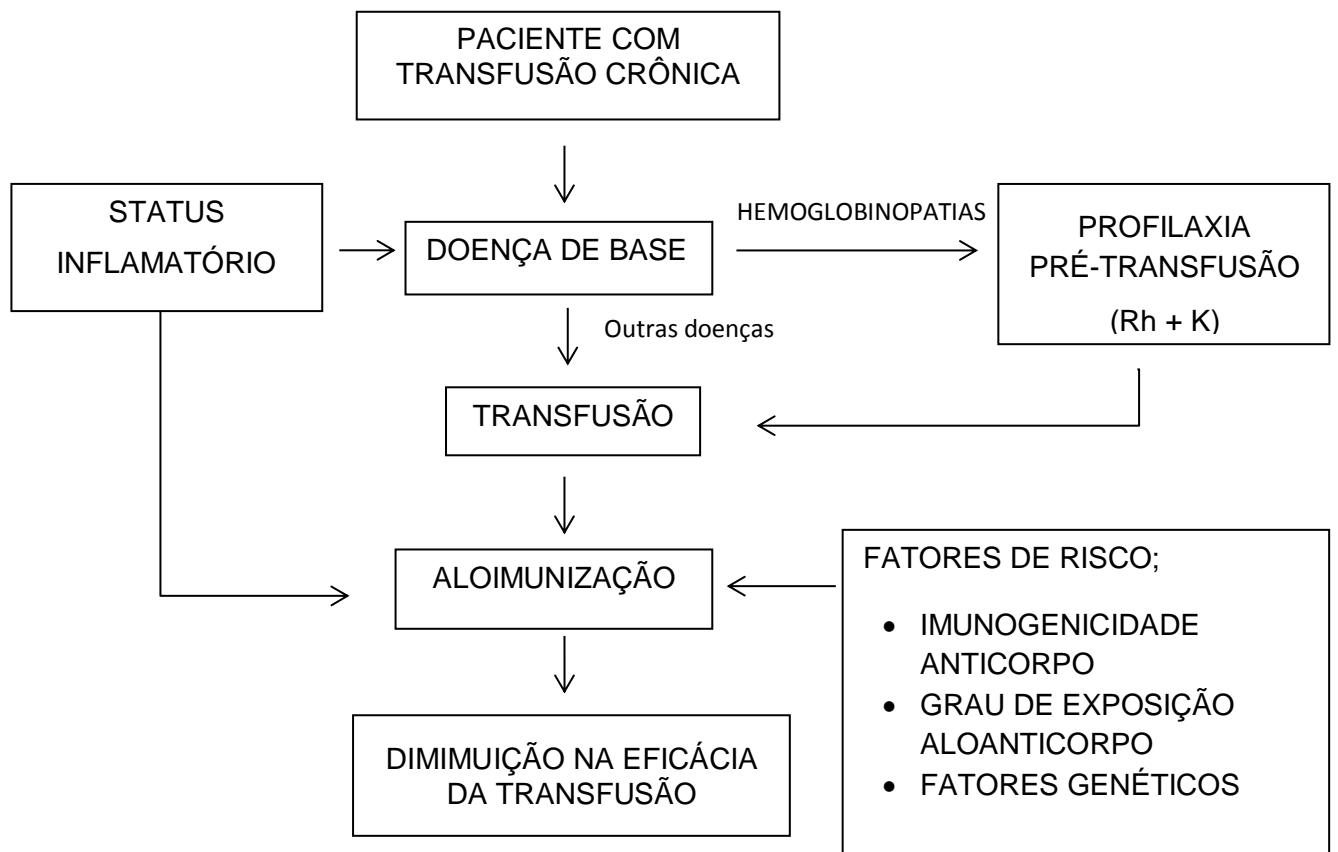
No entanto, pelo elevado custo do teste de fenotipagem para os Serviços de Hemoterapia e poucos estudos relacionados a outras doenças, como SMD, alguns centros de transfusão, priorizam o processo de fenotipagem completa antes de começar a terapia transfusional apenas em pacientes com hemoglobinopatias ou estende a fenotipagem em pacientes que já adquiriram algum anticorpo afim de, evitar um novo anticorpo. Contudo, estudos demonstram a importância de investir também na fenotipagem em pacientes que recebem transfusões crônicas e com doenças agudas, pois a taxa de aloimunização pode aumentar para 13% a 53%, principalmente contra o antígenos Rh e Kell, visto que são os mais imunogênicos (18,22). Fasano e colaboradores, em 2015, após realizar um estudo com pacientes falciforme, apresentaram uma redução ao aplicar a profilaxia para o sistema Rh e Kell de 11% para 2,6%, no entanto, ao acrescentar os antígenos Fya, Jka, Jkb, a taxa reduziu para 0,7%.(38) No estudo de Lin e colaboradores, em 2017, realizado no Canadá, foi observada uma redução de aloimunização em pacientes com SMD que realizam a profilaxia inicial Rh e Kell (11%) comparando com pacientes que não realizavam essa profilaxia inicial (23%), sendo que 87% desses pacientes apresentaram anticorpos para o sistema Rh e Kell (20). O autor também demonstrou uma redução de 22% para 7% na taxa de aloimunização ao analisar apenas o sistema Rh e Kell em pacientes que não recebiam profilaxia (20).

Em vista disso, o trabalho tem como finalidade avaliar a taxa de aloimunização em pacientes hematológicos que receberam transfusão crônica no ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 2007 a 2017, verificando os principais fatores que predispõem a aloimunização, com intuito de elaborar um protocolo de profilaxia para aloimunização. Foi considerado como transfusão crônica os pacientes que receberam pelo menos uma unidade de concentrado de hemácias

no período do estudo. De acordo com a literatura, a profilaxia pode reduzir em 85% a taxa de aloimunização durante o tratamento de transfusão sanguínea.(20,21)

3. MARCO CONCEITUAL

Figura 3 – Marco Conceitual da Aloimunização



Fonte: Elaborado pela autora.

4. JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa de vida dos pacientes, devido aos avanços tecnológicos, o número de pacientes recebendo transfusões crônicas aumentou consideravelmente nos centros de hemoterapia e com isso o elevado número de pacientes aloimunizados.

A aloimunização eritrocitária representa um dos principais riscos transfusionais, à reação hemolítica grave. Conforme relatado pela FDA (*Food and Drug Administration*), nos Estados Unidos a reação transfusional hemolítica causada pelo anticorpo irregular é a segunda principal causa de morte relacionada a transfusão.(4,18)

A taxa de aloimunização de anticorpos clinicamente significativos pode atingir 30% dos pacientes politransfundidos. Já em pacientes previamente sensibilizados a chance de adquirir novos anticorpos pode aumentar até 30 vezes. Estudos indicam que 2 a 3% dos pacientes sejam sensibilizados, a cada transfusão, o que representa um grande problema para pacientes que recebem transfusões crônicas (4,5,16,30).

Entretanto, mesmo com taxas elevadas de pacientes aloimunizados, nem todos os pacientes adquirem anticorpos, mesmo expostos aos antígenos mais imunogênicos (sistema Rh e Kell) em diversas transfusões. Já, outros pacientes, ao receber uma unidade de concentrado de hemácias, adquirem múltiplos anticorpos.(18,22,39,40)

Através desses dados, o presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência e as especificações dos aloanticorpos em pacientes hematológicos que recebem suporte de transfusão crônico no ambulatório de transfusão do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de 2007 a 2017, verificando os possíveis fatores de predisposição, a fim de conciliar informações que embasem a criação de um protocolo institucional de profilaxia eritrocitária à aloimunização para outras doenças,

além das hemoglobinopatias. Com a criação desse protocolo, o intuito é reduzir a taxa de pacientes aloimunizados, aumentando a qualidade e segurança do sangue transfundido, além de diminuir os custos com a realização de técnicas acessórias.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL:

Determinar a prevalência e as especificidades dos anticorpos eritrocitários em pacientes hematológicos que transfundem cronicamente no ambulatório de hemoterapia do HCPA no período de 2007 a 2017, e relacionar com os principais fatores de predisposição a aloimunização.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar o perfil dos anticorpos irregulares detectados em pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásicas. Anemia Aplástica, Esferocitose Hereditária, Anemia Hemolítica e hemoglobinopatias (Anemia Falciforme e Talassemia) no ambulatório do HCPA;

Quantificar os aloanticorpos detectados e analisar se tem especificidade dirigida contra os antígenos dos fenótipos do sistema Rh (C, c, E, e), sistema Kell (K,k), sistema Duffy (Fya, Fyb), sistema Kidd (Jka,Jkb) e do sistema MNSs.

Relacionar os principais fatores de risco com a predisposição à aloimunização: gênero, idade do diagnóstico, realização de transplante, quantidade de transfusões, imunogenicidade do antígeno, fatores genéticos do paciente e fatores adquiridos relacionado à doença base.

Avaliar se o procedimento de fenotipagem eritrocitária dos pacientes antes da primeira transfusão e infusão de sangue com fenótipo compatível está produzindo o efeito profilático de evitar a aloimunização contra os antígenos do fenótipo estendido.

Sugerir um protocolo de profilaxia de fenotipagem eritrocitária.

6. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA:

1. Kim HY, Cho EJ, Chun S, Kim KH, Cho D. Red blood cell alloimmunization in Korean patients with myelodysplastic syndrome and liver cirrhosis. *Ann Lab Med.* 2019;39(2):218–22.
2. Tian L, Hou L, Wang L, Xu H, Xiao J, Ying B. HLA-DRB1*09:01 allele is associated with anti-E immunization in a Chinese population. *Transfusion.* 2018;58(6):1536–9.
3. 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;29:179–84.
4. Obi EI, Pughikumo CO, Oko-Jaja RI. Red blood cell alloimmunization in multi-transfused patients with chronic kidney disease in Port Harcourt, South-South Nigeria. *Afr Health Sci.* 2018;18(4):979–87.
5. Balbuena-Merle R, Hendrickson JE. Red blood cell alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. *Transfus Clin Biol.* 2019;26(2):112–5.
6. 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.
7. Verduin EP, Brand A, van de Watering LMG, Roelen DL, Kanhai HHH, Doxiadis IIN, et al. The HLA-DRB1*15 phenotype is associated with multiple red blood cell and HLA antibody responsiveness. *Transfusion.* 2016;56(7):1849–56.
8. Romphruk A V., Simtong P, Butryojantho C, Pimphumee R, Junta N, Srichai S, et al. The prevalence, alloimmunization risk factors, antigenic exposure, and

- evaluation of antigen-matched red blood cells for thalassemia transfusions: a 10-year experience at a tertiary care hospital. *Transfusion*. 2019;59(1):177–84.
9. Coleman S, Westhoff CM, Friedman DF, Chou ST. Alloimmunization in patients with sickle cell disease and underrecognition of accompanying delayed hemolytic transfusion reactions. *Transfusion*. 2019;59(7):2282–91.
 10. Dinardo CL, Fernandes FLA, Sampaio LR, Sabino EC, Mendrone A. Transfusion of older red blood cell units, cytokine burst and alloimmunization: A case-control study. *Rev Bras Hematol Hemoter*]. 2015;37(5):320–3.
 11. Costa Alves Pinto P, Aparecida Pellegrini Braga J, Miyashiro Nunes dos Santos A. Risk factors for alloimmunization in patients with sickle cell anemia. *Rev Assoc Med Bras*. 2011;57:668–73.
 12. Higgins J, Sloan S. Stochastic modeling of human rbc alloimmunization: evidence for a distinct population of immunological responders. *Blood*. 2008;112(6):2546–2553.
 13. Guelsin GAS. Polimorfismos de grupos sanguíneos e HLA em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica e suas implicações na aloimunização eritrocitária. Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP; 2014.
 14. Gehrie EA, Tormey CA. The influence of clinical and biological factors on transfusion-associated non-ABO antigen alloimmunization: Responders, hyperresponders, and non-responders. *Transfus Med Hemotherapy*. 2014;41:420–9.
 15. Fasano RM, Meyer EK, Branscomb J, White MS, Gibson RW, Eckman JR. Impact of Red Blood Cell Antigen Matching on Alloimmunization and Transfusion Complications in Patients with Sickle Cell Disease: A Systematic Review. *Transfus Med Rev*. 2019;33(1):12–23.
 16. Tormey CA, Hendrickson JE. Transfusion-related red blood cell alloantibodies: Induction and consequences. *Blood*. 2019;133(17):1821–30.

17. Raos M, Zunec R, Mocibob M, Gojceta K, Lukic M, Golubic Cepulic B. Susceptible and protective HLA-DR and HLA-DQ alleles for Fy a alloimmunization in the Croatian population. *Transfusion*. 2019;59(3):1118–24.
18. Alves VM, Martins PRJ, Soares S, Araújo G, Schmidt LC, Costa SS de M, et al. Pesquisa de aloimunização após transfusão de concentrados de hemácias em um estudo prospectivo. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(3):206–11.
19. Harmening DM. *Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão*. 6 ed. Ed. Revinter Ltda. Rio de Janeiro; 2015.
20. 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.
21. Kacker S, Ness PM, Shirey RS, Savage WJ, King KE, Tobian AAR. The future of red blood cell alloimmunization risk reduction. *Transfusion*. 2015;55 (1):222–4.
22. Baía F, Correia F, Alves B, Martinez F, Koch C, Carneiro A, et al. Phenotyping Rh/Kell and risk of alloimmunization in haematological patients. *Transfus Med*. 2016;26(1):34–8.
23. Storry JR, Clausen FB, Castilho L, Chen Q, Daniels G, Denomme G, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. *Vox Sang*. 2019;114(1):95–102.
24. Neto OG do, Alves VM, Pereira G de A, Moraes-Souza H, Martins PRJ. Clinical and epidemiological profile of alloimmunized and autoimmunized multi-transfused patients against red blood cell antigens in a blood center of Minas Gerais. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018;40(2):107–11.
25. Ferreira ARM, Nomura PR, Dias JB, Figueira FD, Favero ME, Venturini D. Identificação de anticorpos anti-eritrocitários de baixa frequência em paciente

- politransfundida com beta-talassemia: relato de caso. *Semin Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina. 2015;36(1):325–32.
26. Zimring JC, Stowell SR, Johnsen JM, Hendrickson JE. Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on alloimmunization to transfused antigens: Current paradigms and future considerations. *Transfus Clin Biol*. 2012;19(3):125–31.
 27. Giblett ER. A critique of theoretical hazard of inter vs. intra-racial transfusion. *Transfusion*. 1961;1:233-8.
 28. Stack G, Tormey CA. Estimating the immunogenicity of blood group antigens: a modified calculation that corrects for transfusion exposures. *Br J Haematol*. 2016;175(1):154–60.
 29. Körmöczi GF, Mayr WR. Responder individuality in red blood cell alloimmunization. *Transfus Med Hemotherapy*. 2014;41(6):446–51.
 30. Pereira A. Red blood cell alloimmunisation: still a major complication of blood transfusion. *Br J Haematol*. 2018;181(5):575–6.
 31. Oliveira EA de, Sell AM. Os antígenos HLA e a hemoterapia. *Acta Sci*. 2002;24(3):731–6.
 32. Baleotti W, Ruiz MO, Fabron A, Castilho L, Giuliatti S, Donadi EA. HLA-DRB1 *07:01 allele is primarily associated with the Diego a alloimmunization in a Brazilian population. *Transfusion*. 2014 Oct;54(10):2468–76.
 33. Tzounakas VL, Valsami SI, Kriebardis AG, Papassideri IS, Seghatchian J, Antonelou MH. Red cell transfusion in paediatric patients with thalassaemia and sickle cell disease: Current status, challenges and perspectives. *Transfus Apher Sci*. 2018;57(3):347–57.
 34. Hendrickson JE, Tormey CA. Red Blood Cell Antibodies in Hematology/Oncology Patients: Interpretation of Immunohematologic Tests and Clinical Significance of Detected Antibodies. *Hematol Oncol Clin North Am*.

- 2016;30:635–51.
35. Dinardo CL, Ito GM, Sampaio LR, Mendrone Júnior A. Study of possible clinical and laboratory predictors of alloimmunization against red blood cell antigens in cancer patients. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;35(6):2011–3.
 36. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação N^o 5, de 28 de Setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. [Internet]. Ministério da Saúde. 2017. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolidacao-n-5-de-28-de-setembro-de-2017.pdf>
 37. Fung, Marki K. Grossman, Benda J.Hillyer, Cristopher D. Westhoff CM. Technical Manual. 18th ed. AABB E, editor. United States; 2014.
 38. Fasano RM, Booth GS, Miles M, Du L, Koyama T, Meier ER, et al. Red blood cell alloimmunization is influenced by recipient inflammatory state at time of transfusion in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2015;168:291–300.
 39. Celli R, Schulz W, Hendrickson JE, Tormey CA. A novel network analysis tool to identify relationships between disease states and risks for red blood cell alloimmunization. *Vox Sang.* 2017;112(5):469–72.
 40. Shah FT, Sayani F, Trompeter S, Drasar E, Piga A. Challenges of blood transfusions in β -thalassemia. *Blood Rev.* 2019;37:1–13.

7. ARTIGO ORIGINAL

EVALUATION OF RISK FACTORS FOR ALLOIMMUNIZATION OF POLYTRANSFUSED PATIENTS AT A TERTIARY HOSPITAL IN THE SOUTH OF BRAZIL

Daniela M. R. Speransa^{1,2} Juliana M. Franz² Leo Sekine^{2,5} Ana C. Arend³ Gustavo A.M. Faulhaber^{4,5}

1 Postgraduation Program on Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

2 Department of Hemotherapy, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

3 Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

4 Professor, Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

5 Professor, Postgraduation Program on Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

***Corresponding Author**

Daniela Michelim Rodriguez Speransa

Department of Hemotherapy, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Bairro Bom Fim. CEP 90035-903

Porto Alegre-RS Brazil. Tel./fax: +55 5133597652

E-mail: dsperansa@hcpa.edu.br

Keywords: Alloimmunization, Antibodies, Red Blood Cell Antigens, Transfusion therapy

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVES: The prevalence of alloimmunization of polytransfused patients is around 30%, and the incidence of erythrocyte antibodies in previously sensitized patients may increase up to 30 times. The objective of the study was to determine the alloimmunization rate by associating it with predisposing variables in order to improve the transfusion protocol.

MATERIALS AND METHODS: Retrospective cohort study, data from 287 patients who underwent transfusions at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre outpatient transfusion clinic from 2007 to 2017 and presented with benign and malignant hematological diseases were analyzed. The patients were characterized and analyzed according to alloimmunization risk factors.

RESULTS: An alloimmunization rate of 26% was observed in 287 patients under study, with predominance of Rh (52.6%) and Kell (28.9%) antibodies. By analyzing potential alloimmunization risk factors, we found associations with RhD-negative factor ($P=0.004$), initial prophylaxis ($P=0.039$) and HLA-DRB1*15 allele ($P=0.035$). However, the number of transfused red cell concentrates showed an inverse association with alloimmunization ($P=0.014$). To better understand this finding, a multivariate analysis was carried out, which was weighted parallelly with initial prophylaxis (Rh and Kell systems) and the HLA-DRB1*15 allele, remaining the last as the only significant associated factor.

CONCLUSION: These data indicate that the alloimmunization risk is dictated not only by extrinsic factors (exposure), but also by intrinsic factors, as genetic factors and underlying disease, suggesting that there are patient populations who achieve a greater benefit from extended prophylaxis.

INTRODUCTION

Erythrocyte alloimmunization is characterized by the genetic disparity between donor and recipient cells, triggering an immune response with antibody formation. This response may be triggered by blood transfusion, pregnancy or transplantation [1-4]. The occurrence of this event in the general population who receives blood transfusions ranges approximately from 2% to 3%; however, in patients using chronic transfusion support, rise to around 30%, depending on the underlying disease [4-9]. Retrospective studies report that, in previously sensitized patients, the rate to acquire new antibodies may increase 20-30 times, which is a concern for major hemotherapy centers, since a patient with multiple antibodies makes it more difficult to find compatible red cell concentrates, in addition to increasing the risk of associated hemolytic reactions [1,5,9–12] The main diseases associated with alloimmunization include myelodysplastic syndrome (MDS), aplastic anemia (AA), hereditary spherocytosis (HS), hemolytic anemia (HA), and hemoglobinopathies (sickle cell anemia (SCA) and thalassemia), conditions for which the therapeutic approach is often the transfusion of red blood cells (RBC) and platelets (CP) to correct chronic anemia due to failure in producing hematopoietic cells and primary and secondary prophylaxis of cerebrovascular events and hemorrhagic phenomena in thrombocytopenic patients [5,13,14].

However, even with a high rate of alloantibody formation in polytransfused patients, little is known about the factors that determine the response to erythrocyte alloantigens and because some individuals, despite receiving multiple transfusions, do not acquire antibodies, that is, they are not good immune responders, while in others, regarded as good responders, a single transfusion of red cells alone can trigger an immune response and form one or multiple antibodies [2,3,15,16]. This hypothesis is believed to be mainly connected with a number of risk factors: degree of recipient exposure to foreign antigens (alloantigen), degree of antigen

immunogenicity, sex, age, patient's genetic markers, such as the HLA-DRB1 allele, and acquired factors related to the underlying disease [1,17–19].

In view of the technological and therapeutic advances, with the increased survival of polytransfused patients and, consequently, with the increase in the number of transfused red blood cells and alloimmunization rate, the current laws on hemotherapy suggest that all patients who may need chronic transfusions receive red cell concentrates with a phenotype compatible with the most immunogenic antibodies (Rh, Kell, Duffy, and Kidd)[20]. Currently, due to the high cost of phenotyping tests and scarce studies on the previously mentioned diseases, hemotherapeutic services invest in full phenotyping before the beginning of transfusion therapy only in patients with hemoglobinopathies or in those who already have any antibody to prevent multiple antibodies [12,17,21,22].

Therefore, the objective of this study is to determine the prevalence and specifications of alloantibodies in patients transfused in the HCPA Hemotherapy Service over the past 10 years, investigating the possible predisposition factors so as to collect information to support the creation of an institutional prophylactic protocol for erythrocyte alloimmunization aiming at diseases other than hemoglobinopathies, which already follow the recommendations of national laws.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Two hundred eighty-seven patients who underwent transfusions at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre outpatient clinic from 2007 to 2017 were analyzed in a retrospective cohort study. The project was approved by the ethics committee of the hospital (CAAE number 84911918.4.0000.5327). All patients diagnosed with MDS, AA, HS, HA, SCA and thalassemia and who received at least one red cell concentrate transfusion in this period were considered to meet the inclusion criteria. Patient data were obtained from electronic medical records and organized by means of an electronic spreadsheet in the Microsoft Excel software.

To analyze if initial prophylaxis (defined as the transfusion of a red cell concentrate with a negative phenotype for the Rh and Kell systems according to the patient's phenotype before the beginning of the transfusion support) served as a protective factor against alloimmunization and the factors that predispose to this immune response, we excluded from the study those patients who had previously shown erythrocyte antibodies (n=28; 9.8%) and also those who, during the study, acquired antibodies from another system that had not been addressed in the initial prophylaxis (n=22; 7.7%), resulting in 237 patients.

Antibody Screening

ABO/D typing and an antibody screening test were carried out using the gel micro column hemagglutination technique (Biorad®). Erythrocyte antibodies were detected by means of an indirect antiglobulin test with a low ionic strength solution using a two-cell panel of reagent RBCs(Biorad®). Its specificity was determined by the same technique using a panel of reagent red blood cells with 11 treated and non-treated cells (Biorad®). For patients with a complex antibody mixture, supplementary techniques were employed such as adsorption, chloroquine, direct antiglobulin block, and elution. For antigen identification, the standard tube methodology was used with commercial sera (Lorne®, Fresenius®, and Biorad®). In patients with erythrocyte alloantibodies, compatibility was based on the crossmatch between LISS-enhanced antiglobulin and antigen-negative red cell concentrates.

Initial Prophylaxis

The current institutional policy advocates phenotyping for the Rh, Kell, Duffy, Kidd and MNS systems before transfusion support for patients diagnosed with hemoglobinopathies or for those who had shown previous alloantibodies.

To compare the group of patients who underwent initial prophylaxis and those who did not, we considered all patients who had not acquired antibodies prior to transfusion and whose medical records reported initial prophylaxis (Rh and Kell systems) and antigen-matched red cell concentrates.

All patients received leukoreduced, irradiated red cell concentrates in accordance with the transfusion protocol.

Statistical Analysis

Data analysis was performed with SPSS (Statistical Package for Social Sciences) software version 23.0. The distribution of continuous variables was assessed by the Shapiro-Wilk test and described as means and standard deviation or median and interquartile range for normal or asymmetric distributions, respectively. Categorical variables were described by absolute and relative frequency. The main outcome under study (alloimmunization rate and time to the outcome) was evaluated in relation to multiple potential risk/protection factors using the univariate Cox proportional hazards regression (as continuous variables were also involved). A single final multivariate model was used to test the hypothesis that the genetic factor prevailed over other factors with a statistically significant association. The goodness of fit of the model was assessed using a residual analysis (Schoenfeld, Martingale, Deviance, and Cox-Snell), and the linearity of continuous variables was assessed by the likelihood ratio test using the -2Log L statistic. To illustrate the main qualitative factors, the use of graphs based on the Kaplan-Meier curves was chosen. The significance level was set at 0.05.

RESULTS:

The characteristics of the population under study are described in Table 1. Of the 287 patients studied, the rate of females was 53.7%, with predominance of the Caucasian ethnicity (80.8%). The patients who underwent hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) were 31 (10.8%). The median age at diagnosis for these patients was 52 years old (IQR 19-70). The most prevalent ABO blood group was group A (45.6%), with predominance of RhD positive (90.9%). With respect to diagnoses, most patients presented with MDS (59.9%), followed by AA (19.2%) and SCA (14.6%). For these patients, the frequency of alloimmunization was 26% (n=76).

The median number of total transfused units was 21 (IQR 8-49), and the rate of patients subjected to initial prophylaxis for Rh and Kell alloimmunization was 20.9%.

Among 76 (26%) alloimmunized patients, 137 antibodies were observed, the most frequent being the anti-E (38.3%), anti-K (28.9%), anti-C (25%), anti-D (17.1%), anti-e (7.9%), anti-Dia (7.9%) and anti-Fya (5.3%) antibodies (Figure 1). Table 2 shows antibody specificity and the frequency found, also highlighting the anti-Dia and anti-Fya antibodies, in addition to the Rh and Kell systems. In this study, the anti-Fyb, anti-N and anti-Leb antibodies were not identified in our patients. There were two cases of anti-Jsa, anti-Cps, and anti-Kpa. Multiple antibodies were found in 44 (57.8%) of the 76 alloimmunized patients; 28 patients (63.7%) had two antibodies, 12 patients (27.3%) had three antibodies, and four patients (9.0%) showed four antibodies. The most frequent combinations involve the Rh and Kell systems, accounting for 97.7% of the patients. (Table 3)

The risk factors of the patients were evaluated and showed in table 4. A higher alloimmunization frequency was observed in women (12.1%) compared to men (9.9%); however, this difference was not significant ($P=0.56$). Regarding the Rh system, there was a relation between Rh D-negative patients and antibody formation ($P=0.004$). In our study, no association was observed with ethnicity, performance of HSCT, initial age at diagnosis and underlying disease. Initial prophylaxis was shown to be associated with a lower probability of alloimmunization ($P = 0.039$) (Figure 2). A correlation was also noted between the presence of the HLA-DRB*15 allele with a higher alloimmunization rate, which corroborates previous reports correlating this genotypical profile with the development of multiple antibodies ($P=0.035$) (Figure 3). For the purpose of analyzing the genetic factor as a potential risk factor, the general population under study was included (287 patients with alloimmunization present at the first visit to the HCPA or later), given that the genetic factor has been present since birth regardless of the number of previous transfusions. As for the degree of exposure to the allogeneic antigen, that is, the number of transfused units until the first antibody was acquired, a counterintuitive association was observed as a potential protective factor ($P= 0.014$). In order to elucidate this finding, we performed

a multivariate analysis with the main variables that showed associations with alloantibody formation (Table 5). The results showed that the variables initial prophylaxis and number of blood units until an antibody was acquired became statistically non-significant when compared with HLA-DRB1*15, which maintained a significant association in the final regression model.

DISCUSSION

This retrospective study observed an alloimmunization rate of 26% in 287 polytransfused patients, which corresponds to the findings from other studies showing that the alloimmunization rate can be as high as 30% in patients with multiple transfusions [4,6,8,18]. Of the 137 antibodies found, the most frequent ones belong to the Rh and Kell systems, a result similar to the data found in the literature, Rh (9.52 - 53.4%) and Kell (18.20 - 33.3%)[23], and the most frequent antibodies were anti-E (38.2%) and anti-K (28.9%). These findings correspond to the studies by Netto et al. who investigated, in 24 alloimmunized patients, the most frequent antibodies anti-E and anti-K (21.87%) [23], and in the studies by Romhruk et al., in 71 alloimmunized patients, the rate of anti-E was 39.5% [8]. As for antibody combination, 28 patients (9.8%) developed multiple antibodies, the most frequent combination being that of anti-D and anti-C antibodies in 6/44 (13.6%). Studies suggest that this combination can be related to the formation of the anti-G antibody and not only to anti-D and anti-C, which accounts for anti-D antibody production in Rh-D negative patients who always received Rh-D negative red blood cells. However, it was not possible to differentiate them in this retrospective analysis [6,24].

By analyzing the risk factors involved in alloimmunization, we found that there was no statistically significant association between gender and alloimmunization rate, which, according to the article by Netto et al., can be explained by the fact that women with chronic diseases usually have a lower pregnancy rate compared to women in the general population [23]. Nevertheless, as patient's pregnancy history data were missing from the medical records, we were unable to make this correlation.

In our study, we also did not find an association between patients subjected to HSCT and a factor predisposing to alloimmunization.

By observing the Rh system variable in the patients, a statistically significant association was found between Rh-D negative patients and antibody formation ($P=0.004$). According to the analysis performed by risk factor (OR), an RhD - positive patient have a 76-fold less chance of acquiring an antibody than an Rh D - negative patient. This is in agreement with the alloimmunization rates between 30% and 50% reported by Zimring and Hudson [25,26].

With respect to the diagnosis, we found a higher alloimmunization rate in patients with hemoglobinopathies (16.7%), even if there was no significant difference in relation to other diseases, the higher alloimmunization rate is probably due to the inflammatory component present in most sickle cell anemia patients, especially at the time of transfusion, with studies showing the alloimmunization rate from 4% to 36% [5,23,27]. The alloimmunization rate in MDS (10.8%) is also in agreement with recent studies, in which 86 patients with MDS had an alloimmunization rate of 12.8% [28], 272 patients showed a rate of 15% [29], and 176 patients, 17% [30].

The initial prophylaxis for the Rh and Kell systems produced a protective effect, leading to a mean reduction in the probability of alloimmunization of 68%, compared to patients not subjected to prophylaxis (Figure 2). This finding was also noted in the systematic review on sickle cell anemia patients, in which Ameen et al. reported a reduction in the alloimmunization rate from 65% to 23.6% [31]. In the study on sickle cell anemia patients described by Fasano et al. (2015), the reduction was from 11% to 2.6%; however, when the antigens Fya, Jka, Jkb were added, the rate decreased to 0.7% [31,32]. A study by Lin et al. (2017), conducted in Canada, demonstrated a reduction of alloimmunization in patients who had initial prophylaxis for Rh and Kell (11%), compared to patients who were not subjected to initial prophylaxis (23%), and 87% of these patients showed antibodies to the Rh and Kell systems [30]. The study by Lin et al. (2017) also indicated a reduction from 22% to 7% in the alloimmunization rate only when the Rh and Kell systems were analyzed in patients who did not receive prophylaxis [30].

Regarding genetic factors, we found a statistically significant association between the presence of the HLA-DRB1*15 allele and alloimmunization ($P=0.035$). Patients presenting this allele is 3.5 times higher probability of alloimmunization compared to those who had other alleles. Therefore, patients presenting HLA-DRB1*15 allele can be considered good responders (Figure 3). These results corroborate the data reported in recent articles (3,6,7,21). The frequency of this allele in the Brazilian population, according to Brazilian data from Redome, is 9.74% [33].

One of the associations found was the inverse relation between the number of transfused units until an antibody was acquired and alloimmunization. The median number of transfusion units to acquire an antibody was 9 (IQR 3.75 - 24.75), and patients with higher number of transfusions had lower risk of alloimmunization which is contradictory to literature data. According to Kim et al., the cumulative risk of alloimmunization according to the number of transfused units is 12.4% after the transfusion of 25 red blood cell units to patients with MDS; the author also compares his data with data from Ortis et al., who reported an 8.3% risk of alloimmunization after 25 RBC units [1]. Studies estimate that 2-5% of patients are sensitized in each RBC transfusion, which is in disagreement with the result of our study [18,34].

The hypothesis, after the multivariate regression analysis, is that patients who are good responders undergo alloimmunization in the early stages of their transfusion support, while patients who are less predisposed to it (which is also determined by intrinsic factors) may spend long periods of time under transfusion support without presenting alloantibodies. This inference is in agreement with Higging and Sloan, who report that alloimmunization is connected with strong evidence about a subgroup of patients rather than directly with the number of transfused units [35].

However, there are some limitations in our study. The small number of patients may cause a type II error, implying that the absence of significance in a given association may merely result from a lack of statistical power. As this is a retrospective study, it was not possible to determine the circumstances surrounding

the immunizing event, as, for example, the evaluation of the inflammatory status at the time of transfusion.

Another key factor that should be highlighted is that the alloimmunization risk is governed not only by extrinsic factors (exposure), but also by intrinsic factors (with which we cannot interfere). As we progress in this direction through further study, we may ultimately determine the patient populations who will benefit more from extended prophylaxis, as well as other patient strata for which such care may even be unnecessary, by aggregating these data.

Finally, although alloimmunization in polytransfused patients is ideally prevented by extended phenotyping for Rh, Kell, Duffy and Kidd antigens, in the current situation of transfusion therapy, that is not a reality for all centers due to the high costs of commercial antisera. Nevertheless, in order to promote a safer transfusion medicine of higher quality for the patient, we suggest the initial prophylaxis protocol (Rh and Kell systems) for all patients who will start chronic transfusion support or whose diagnoses are mentioned in this study. Moreover, we suggest that the presence of the HLA-DRB1*15 allele be investigated in patients who already have HLA, and if present, the patient's phenotype should be extended to select the red cell concentrate with the larger number of negative antigens. However, we recommend further studies on this marker for alloimmunization.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Department of Hematology and Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

REFERENCES:

1. Kim HY, Cho EJ, Chun S, et al.: Red blood cell alloimmunization in Korean patients with myelodysplastic syndrome and liver cirrhosis. *Ann Lab Med.* 2019;39(2):218–22.
2. Tian L, Hou L, Wang L, et al.: HLA-DRB1*09:01 allele is associated with anti-E immunization in a Chinese population. *Transfusion.* 2018;58(6):1536–9.
3. Darvishi P, Sharifi Z, Azarkeivan A, et al.: HLA-DRB1*15:03 and HLA-DRB1*11: Useful predictive alleles for alloantibody production in thalassemia patients. *Transfus Med.* 2019;29:179–84.
4. Obi EI, Pughikumo CO, Oko-Jaja RI: Red blood cell alloimmunization in multi-transfused patients with chronic kidney disease in Port Harcourt, South-South Nigeria. *Afr Health Sci.* 2018;18(4):979–87.
5. Balbuena-Merle R, Hendrickson JE: Red blood cell alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. *Transfus Clin Biol.* 2019;26(2):112–5.
6. Maluskova A, Mrazek F, Pauliskova M, 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.
7. Verduin EP, Brand A, van de Watering LMG, et al.: The HLA-DRB1*15 phenotype is associated with multiple red blood cell and HLA antibody responsiveness. *Transfusion.* 2016;56(7):1849–56.
8. Romphruk A V., Simtong P, Butryojantho C, et al.: The prevalence, alloimmunization risk factors, antigenic exposure, and evaluation of antigen-matched red blood cells for thalassemia transfusions: a 10-year experience at a tertiary care hospital. *Transfusion.* 2019;59(1):177–84.
9. Coleman S, Westhoff CM, Friedman DF, et al.: Alloimmunization in patients with sickle cell disease and underrecognition of accompanying delayed hemolytic transfusion reactions. *Transfusion.* 2019;59(7):2282–91.

10. Higgins J, Sloan S: Stochastic modeling of human rbc alloimmunization: evidence for a distinct population of immunological responders. *Blood*. 2008;112(6):2546–2553.
11. Pomper GJ, Simpson MB: The prevention of alloimmunization: A balance of precaution, expectation, and outcome. *Transfusion*. 2009;49(3):406–8.
12. Alves VM, Martins PRJ, Soares S, et al.: Pesquisa de aloimunização após transfusão de concentrados de hemácias em um estudo prospectivo. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(3):206–11.
13. Cohen D, Hartung H, Evans P, et al.: Red blood cell alloimmunization in transfused patients with bone marrow failure syndromes. *Transfusion*. 2016;56(6):1314–9.
14. Celli R, Schulz W, Hendrickson JE, Tormey CA: A novel network analysis tool to identify relationships between disease states and risks for red blood cell alloimmunization. *Vox Sang*. 2017;112(5):469–72.
15. Guelsin GAS: Polimorfismos de grupos sanguíneos e HLA em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica e suas implicações na aloimunização eritrocitária. Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP; 2014.
16. Gehrie EA, Tormey CA: The influence of clinical and biological factors on transfusion-associated non-ABO antigen alloimmunization: Responders, hyper-responders, and non-responders. *Transfus Med Hemotherapy*. 2014;41:420–9.
17. Celli R, Schulz W, Hendrickson JE, Tormey CA: A novel network analysis tool to identify relationships between disease states and risks for red blood cell alloimmunization. *Vox Sang*. 2017;112:469–72.
18. Tormey CA, Hendrickson JE: Transfusion-related red blood cell alloantibodies: Induction and consequences. *Blood*. 2019;133(17):1821–30.
19. Raos M, Zunec R, Mocibob M, et al.: Susceptible and protective HLA-DR and HLA-DQ alleles for Fy a alloimmunization in the Croatian population. *Transfusion*. 2019;59(3):1118–24.

20. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação N^o 5, de 28 de Setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. [Internet]. Ministério da Saúde. 2017. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolidacao-n-5-de-28-de-setembro-de-2017.pdf>
21. Baía F, Correia F, Alves B, et al.: Phenotyping Rh/Kell and risk of alloimmunization in haematological patients. *Transfus Med.* 2016;26(1):34–8.
22. Shah FT, Sayani F, Trompeter S, et al.: Challenges of blood transfusions in β -thalassemia. *Blood.* 2019;37:1–13.
23. Neto OG do, Alves VM, Pereira G de A, et al.: Clinical and epidemiological profile of alloimmunized and autoimmunized multi-transfused patients against red blood cell antigens in a blood center of Minas Gerais. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2018;40(2):107–11.
24. Zimring JC, Stowell SR, Johnsen JM, et al.: Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on alloimmunization to transfused antigens: Current paradigms and future considerations. *Transfus Clin Biol.* 2012;19(3):125–31.
25. Harmening DM: Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 6 ed. Editora Revinter. Rio de Janeiro; 2015.
26. Zimring JC, Hudson KE: Cellular immune responses in red blood cell alloimmunization. *Hematology.* 2016;2016(1):452–6.
27. Dinardo CL, Fernandes FLA, Sampaio LR, et al.: Transfusion of older red blood cell units, cytokine burst and alloimmunization: A case-control study. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2015;37(5):320–3.
28. Chhetri R, Wee LYA, Sinha R, et al.: Red cell autoimmunization and alloimmunization in myelodysplastic syndromes: prevalence, characteristic and significance. *Haematologica.* 2019;104.
29. Singhal D, Kutyna MM, Chhetri R, et al.: Red cell alloimmunization is associated with development of autoantibodies and increased red cell transfusion requirements in myelodysplastic syndrome. *Haematologica.*

- 2017;102(12):2021–9.
30. Lin Y, Saskin A, Wells RA, 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.
 31. Fasano RM, Meyer EK, Branscomb J, et al.: Impact of Red Blood Cell Antigen Matching on Alloimmunization and Transfusion Complications in Patients with Sickle Cell Disease: A Systematic Review. *Transfus Med Rev.* 2019;33(1):12–23.
 32. Fasano RM, Booth GS, Miles M, et al.: Red blood cell alloimmunization is influenced by recipient inflammatory state at time of transfusion in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2015;168:291–300.
 33. Torres L, Bouzas LFS, Almada A, et al.: Distribution of HLA-A, -B and -DRB1 antigenic groups and haplotypes from the Brazilian bone marrow donor registry (REDOME). *Hum Immunol.* 2017;78(10):602–9.
 34. Pereira A: Red blood cell alloimmunisation: still a major complication of blood transfusion. *Br J Haematol.* 2018;181(5):575–6.
 35. Higgins JM, Sloan SR: Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: Evidence for a distinct population of immunologic responders. *Blood.* 2008;112(6):2546–53.

TABLES AND FIGURES:

Table 1. Population Characteristics

Characteristic	Frequency
Female (%)	154 (53.7)
HSC Transplant (%)	31 (10.8)
Blood group (%)	
A	131 (45.6)
B	31 (10.8)
AB	11 (3.8)
O	114 (39.7)
Rh negative (%)	26 (9.1)
Ethnicity (%)	
Caucasian	232 (80.8)
Afrodescendant	45 (15.7)
Indigenous	1 (0.3)
Brown	9 (3.1)
Diagnosis (%)	
Myelodysplastic Syndromes	172 (59.9)
Aplastic anemia	55 (19.2)
Sickle-cell disease	42 (14.6)
Thalassemia	8 (2.8)
Hereditary Spherocytosis	7 (2.4)
Other Hemolytic Anemias	3 (1.0)
Prophylactic antigen (%)	60 (20.9)
Alloimmunization (%)	76 (26.0)
Median age at diagnosis (years, IQR)	52 (19-70)
Median total number of RBC units transfused (IQR)	21 (8-49)

* Total number: 287 patients

IQR, interquartile range

Table 2 - Antibody Specificity and Prevalence in the 76 patients with positive alloantibody screening tests

Antibody specificity	Number*	Frequency, %
Rh system		
D	13	17.1
C	19	25
E	29	38.2
c	5	6.6
e	6	7.9
Cw	2	2.6
Kell system		
K	22	28.9
Kp ^a	1	1.3
Js ^a	2	2.6
Duffy system		
Fy ^a	4	5.3
Kidd system		
Jk ^a	2	2.6
Jk ^b	3	3.9
MNS system		
M	2	2.6
S	2	2.6
S	1	1.3
Diego system		
Di ^a	6	7.9
Lewis system		
Le ^a	1	1.3
Luther system		
Lu ^a	1	1.3
I system		
I	2	2.6
Without system		
Cps	1	1.3
Undeterminate	13	17.1

* Numbers total 137 because some patients were positive for multiple antibodies.

Table 3 – Combined antibody specificity found in 44 patients with alloimmunization

Antibody specificity	Number	Frequency,%
Anti-D,C	6	13.6
Anti-C,e	3	6.8
Anti-C,K	3	6.8
Anti-E,Dia	3	6.8
Anti-E,K	2	4.5
Anti-K,Jkb	2	4.5
Anti-E,c	1	2.3
Anti-D,E	1	2.3
Anti-D,K	1	2.3
Anti-C, Unidentified	1	2.3
Anti-Cw, Unidentified	1	2.3
Anti-E,I	1	2.3
Anti-e,K	1	2.3
Anti-E,Kpa	1	2.3
Anti-Fya,M	1	2.3
Anti-D,C,E	3	6.8
Anti-c,E,Cps	1	2.3
Anti-C,e,Dia	1	2.3
Anti-C,E,s	1	2.3
Anti-c,E,K	1	2.3
Anti-C,e,K	1	2.3
Anti-C,E,s	1	2.3
Anti-E,Cw,K	1	2.3
Anti-E,K,Fya	1	2.3
Anti-E,K,I	1	2.3
Anti-K,Fya,Dia	1	2.3
Anti-c,E,K,Jka	1	2.3
Anti-E,K,Fya,Jka	1	2.3
Anti-E,K,Jkb,S	1	2.3

Table 4 - Outcome frequency in the different factor groups studied, relative risk and P-value of the univariate Cox proportional hazards regression (n = 237 patients) *

Variable	Alloimmunization (%)	Hazard Ratio (95% CI)	P value
Gender			
Male (n=121)	12 (9.9)	1.25 (0.58 - 2.71)	0.568
Female (n=116)	14 (12.1)		
HSC Transplant			
Yes (n=28)	2 (7.1)	0.70 (0.17-2.99)	0.635
No (n=209)	24 (11.5)		
RhD			
D + (n=220)	21 (9.5)	0.24 (0.09-0.64)	0.004
D - (n=17)	5 (29.4)		
Ethnicity			
Caucasian (n=195)	21 (10.8)	0.94 (0.54-1.65)	0.829
Non-Caucasian (n=54)	5 (11.9)		
Diagnosis			
Myelodysplastic Syndromes (n=139)	15 (10.8)	1.01 (0.99-1.03)	0.607
Aplastic anemia (n=53)	4 (7.5)		
Hemoglobinopathies** (n=36)	6 (16.7)		
Other Anemias*** (n=9)	1 (11.1)		
Initial age at diagnosis	49 (12.75 - 76)		0.09
Total transfused RBCs until positive irregular antibody screening			
Positive irregular antibody screening	9 (3.75 - 24.75)	0.98 (0.97-0.99)	0.014
Negative irregular antibody screening	19 (7.0 -35)		
Initial prophylaxis			
Yes (n=48)	4 (8.3)	0.32 (0.11-0.94)	0.039
No (n=189)	22 (11.6)		
HLA Good Responder ****			
HLA-DRB1*15 (n=15)	2 (13.3)	3.5 (1.09-9.20)	0.035
Others (n=55)	6 (10.9)		

*To calculate the risk factor for the population, patients who started transfusion support and already had any antibody (n=28) (9.8%) and patients who acquired any antibody other than from the Rh and Kell system (n=22) (7.7%) were excluded.

** Sickle-cell disease and Thalassemia

*** Hereditary spherocytosis and other hemolytic anemias

**** For analysis of HLA good responder, the total population under study was taken into account (n=287)

TABLE 5: Exploratory multivariate analysis of the main factors associated with alloimmunization incidence.

Variable	RR	P value
Total transfused RBC	0.987 (0.97 - 1.004)	0.130
Initial prophylaxis	0.732 (0.153 - 3.397)	0.680
HLA Good Responder	3.28 (1.015 - 9.029)	0.047

RR – relative risk.

Figure 1: Specificity frequencies of erythrocyte antibodies found in patients under transfusion support from 2007 to 2017 at the HCPA

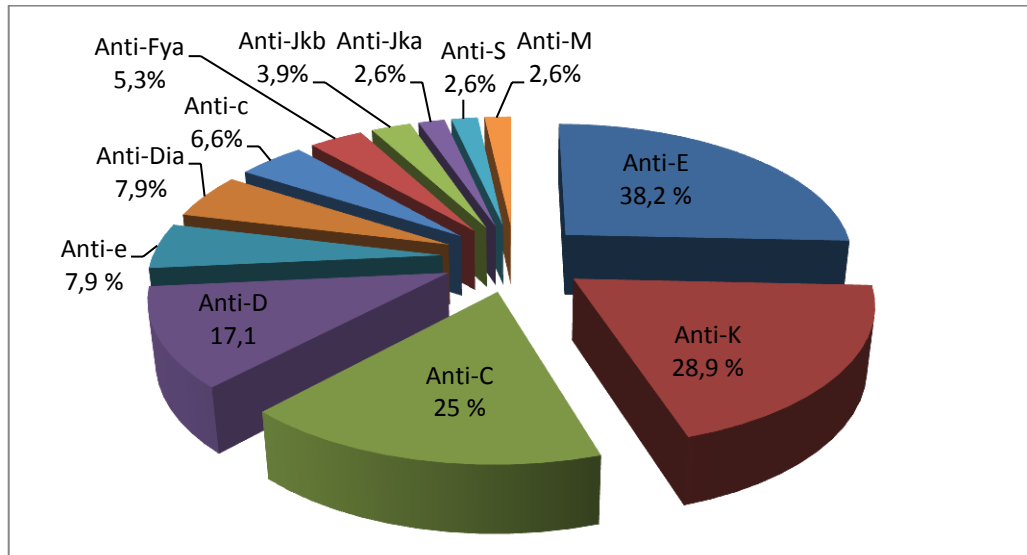


Figure 2 - Performance of Initial Prophylaxis

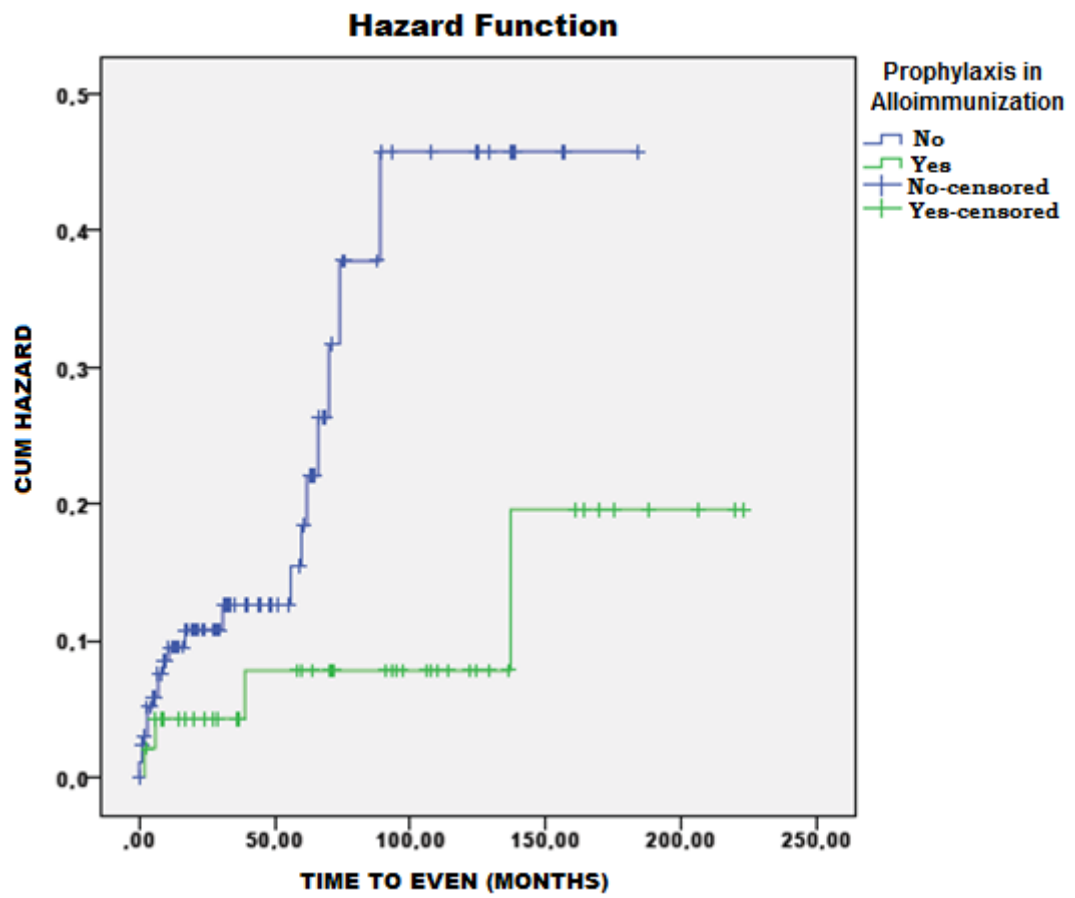


Figure 2: Survival analysis, patients who receive initial prophylaxis show a lower alloimmunization rate than patients who do not.

Figure 3 - Presence of HLA-DRB1*15 allele

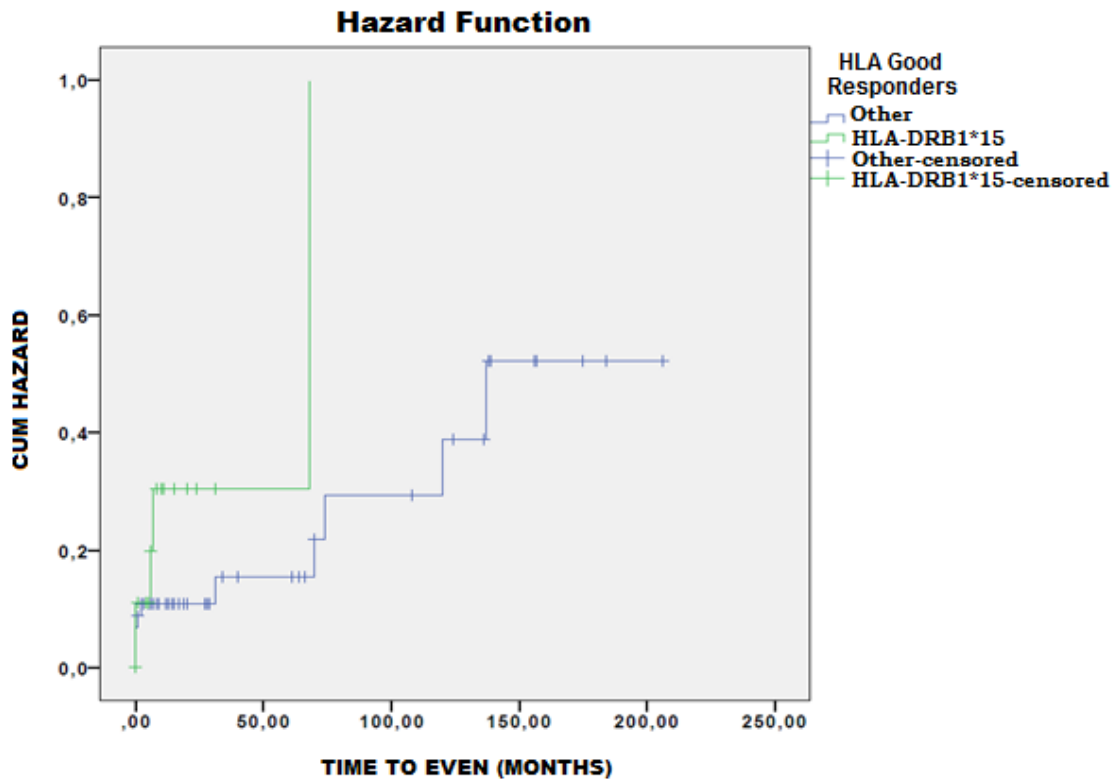


Figure 3: Survival analysis, patients who have the HLA-DRB1*15 allele are considered good responders regarding antibody formation.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou uma taxa de aloimunização de 26% nos pacientes politransfundidos, com preponderância dos anticorpos do sistema Rh (52,6%) e Kell (28,9%). Dos pacientes aloimunizados, 57,8% adquiriram múltiplos anticorpos, sendo que 97,7% das combinações envolviam anticorpos do sistema Rh e Kell. Ao analisarmos as variáveis com a predisposição à aloimunização, verificamos associação estatisticamente significativa com o fator RhD negativos e o marcador genético alelo HLA-DRB1*15, demonstrando que quem apresenta esse fator tem uma probabilidade maior de formar anticorpos, de 65% a 76%, comparado aos pacientes que não tem. Ao verificar a relação da profilaxia inicial (sistema Rh e Kell), observamos uma taxa de proteção de 68% comparado a pacientes que não submeteram a profilaxia. Entretanto, o número de unidades de concentrado de hemácias transfundidas até adquirir o anticorpo, apresentou uma associação inversa com os demais estudos. Através da análise multivariável, comparando essa variável com profilaxia inicial e o marcador genético, observamos a preponderância da variável alelo HLA-DRB1*15 frente às demais variáveis, sugerindo como hipótese que pacientes bons respondedores adquirem aloanticorpos em fase precoces de seu suporte transfusional, enquanto que pacientes não respondedores, podem passar longos períodos em suporte transfusional sem apresentar aloanticorpos.

Portanto, embora a prevenção de aloanticorpos em pacientes politransfundidos seja idealmente com a fenotipagem estendida para os antígenos dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd, no cenário da terapia atual, isso não é realidade para todos os centros devido aos custos elevados dos antissoros comerciais. Entretanto, com o objetivo de promover uma medicina transfusional com maior qualidade e segurança para os pacientes, sugerimos o protocolo de profilaxia inicial (sistema Rh e Kell) para todos os pacientes que iniciarão o suporte transfusional crônico ou que tenham os diagnósticos de síndrome mielodisplásica, anemias aplásticas, esferocitose hereditária e anemias hemolíticas, além das hemoglobinopatias (anemia falciforme e talassemia) que já seguem a legislação nacional. Além disso, recomendamos verificar nos pacientes que já possuem HLA a presença do alelo HLA-DRB1*15 e, se

presente, estender o fenótipo do paciente para selecionar o concentrado de hemácias com o maior número de antígenos negativos. No entanto, sugerimos estudos adicionais desse marcador com a aloimunização.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho estudou o impacto de um protocolo de profilaxia primária de aloimunização (considerando os sistemas Rh e Kell), entre outros possíveis fatores preditores, para pacientes que apresentem doenças que exijam suporte transfusional crônico, com o intuito de melhor entender e potencialmente reduzir a taxa de aloimunização dos pacientes, conforme pressuposto na literatura.

A melhor compreensão da magnitude e relevância destes fatores no processo de aloimunização eritrocitária permitirá que a indicação de profilaxia possa ser estratificada, sendo então reservada para pacientes que efetivamente possuem um risco inerente maior de aloimunização em detrimento de outros, nos quais este risco pode ser considerado eventualmente desprezível. Para tanto são necessários estudos com desenho prospectivo, que arrolem os pacientes ainda antes do início de seu suporte transfusional, avaliando sua tipificação HLA entre outras potenciais variáveis (como atividade inflamatória).

A indicação de profilaxia estratificada por risco genético, por exemplo, pode ser um passo em direção a uma medicina transfusional personalizada, onde as características individuais dos pacientes seriam avaliadas para otimizar o seu suporte transfusional, impondo um menor risco ao paciente e potencialmente um gerencialmente de custo mais racional aos serviços de saúde.

10. ANEXOS:

Anexo 1 - Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais

Título do Projeto	Cadastro no GPPG
ESTUDO DE ALOIMUNIZAÇÃO EM PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS NO AMBULATÓRIO DE TRANSFUSÃO DO HCPA	

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar as informações institucionais que serão coletadas em bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas em atividades acadêmicas e científicas, no contexto do projeto de pesquisa aprovado.

Porto Alegre, _26_ de _Outubro_ de 2017_.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Daniela Michelim Rodriguez Speransa	
Juliana Pires Marafon Franz	
Gustavo Adolpho Moreira Fauhaber	
Leo Sekine	

Anexo 2 - Strobe Statement

	Recommendation	Please insert check where included or N/A where not applicable
No		
Title and abstract	(A) Estudo de aloimunização em pacientes politransfundidos no ambulatório de transfusão do HCPA	06
1		
	(b) Analisar a prevalência de pacientes que recebem sistema de transfusão crônica e aloimunizaram no ambulatório no setor de Hemoterapia do HCPA, relacionando com os fatores que predispõem a aloimunização e criar um protocolo de profilaxia.	06
Introduction	A aloimunização, que é a disparidade genética entre as células do doador e receptor, desencadeando a formação de um anticorpo irregular, é responsável pela segunda reação transfusional mais grave em banco de sangue, reação hemolítica. A taxa de aloimunização pode chegar a 30% dos paciente que transfundem. A	14
2		

		fenotipagem eritrocitárias, introduzida em banco de sangue, tem contribuído gradativamente para a diminuição do processo de aloimunização e aumentando a segurança transfusional. Esses dados são embasados em Portarias do Ministério da Saúde e autores como Fasano et al (2015), Alves (2012) e Lin (2016).	
Objectives	3	Determinar a prevalência e as especificidades dos anticorpos eritrocitários em pacientes hematológicos que transfundem cronicamente no ambulatório de hemoterapia do HCPA no período de 2007 a 2017, e relacionar com os principais fatores de predisõem a aloimunização.	28
Methods			
Study design	4	O presente estudo será realizado de forma coorte retrospectivo	37
Setting	5	Serão analisadas histórico transfusionais, através do prontuário eletrônico, do período de 2007 à 2017 dos pacientes que recebem transfusões crônicas e	37

		que tem como base as doenças: síndrome mielodisplásica, anemia aplástica, anemia hemolítica, esferocitose hereditária, anemia falciforme e talassemia.	
Variables	6	No banco de dados serão registrados informações como: quantidade de hemocomponentes transfundido, gênero, etnia, fenótipo, idade do diagnóstico, etnia, ABO, fator Rh, doença que levou à indicação das transfusões, tipo de anticorpo identificado, alelo HLA-DRB1*15, se já havia protocolo de profilaxia anterior à primeira transfusão.	38
Data sources/ measurement	7	As variáveis contínuas foram avaliadas quanto a sua distribuição através do teste de Shapiro-Wilk e descritas por média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartilico, para distribuições normais ou assimétricas, respectivamente. Variáveis categóricas foram descritas por frequência absoluta e relativa. O desfecho principal considerado (taxa de aloimunização e tempo decorrido	39

até o desfecho) foi avaliado em relação à múltiplos potenciais fatores de risco/proteção através da regressão de riscos proporcionais de Cox (por envolverem também variáveis contínuas), de forma univariável. Um único modelo multivariável final foi utilizado para testar a hipótese de que o fator genético era preponderante em relação a outros fatores com associação estatisticamente significativa. O ajuste do modelo foi avaliado através da análise de resíduos (Schoenfeld, Martingale, Deviance e Cox-Snell) e linearidade das variáveis contínuas foram avaliadas através do teste de verossimilhança pela estatística -2 Log de L. Para ilustração dos principais fatores qualitativos, optou-se por utilizar gráficos oriundos das curvas de Kaplan-Meier. As análises estatísticas serão realizadas com o software SPSS 23.0. O nível de significância considerado foi de 0,05.

Study size

Realizado uma Query com os
8 dados de 2007 à 2017 dos

37

pacientes que transfundiram no
ambulatório do HCPA

Fonte: www.strobe-statement.org.

Anexo 3 – Normas para Submissão da Revista *Vox Sanguinis*

Author Guidelines

1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium. All manuscripts must be submitted in English.

2. AIMS AND SCOPE

Vox Sanguinis reports on important, novel developments in transfusion medicine. Original papers, reviews and international fora are published on all aspects of blood transfusion and tissue transplantation, comprising five main sections:

- Transfusion - Transmitted Infectious Diseases and their prevention;
- Blood Component Collection and Production;
- Transfusion Medicine and New Therapies;
- Immunohaematology and Immunogenetics;
- Cellular Therapy.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

Original Articles :

Original Articles should not exceed 5000 words (including the title page, abstract, main text, references, and all figure legends and table legends). Please note that ***Vox Sanguinis*** no longer separates Short Reports from Original Articles. Original Articles are judged on their novelty and importance to the field irrespective of manuscript length. The submission of case reports is not encouraged.

4. PREPARING THE SUBMISSION

Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- i. Title Page;
- ii. Acknowledgments;
- iii. Abstract and keywords;
- iv. Main text;
- v. References;
- vi. Tables (each table complete with title and footnotes);
- vii. Figure legends;
- viii. Appendices (if relevant).

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Title Page

The first page of each paper should contain:

- A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's best practice SEO tips);
- A short running title of less than 40 characters;
- The full names of the authors;
- The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- A statement regarding any identified conflicts of interest for all authors, or the statement that there are no conflicts identified;
- Details of sources of research support (where applicable).
- The total word count of the manuscript, after carefully reviewing the author instructions regarding the word limit of your manuscript category.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section 'Conflict of Interest' in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract

Abstracts are required for all Original Article and Review manuscripts. Abstracts should not exceed 250 words and should be organised as follows:

- *Background and Objectives*: What is the purpose of the study?
- *Materials and Methods*: How was the study done?
- *Results*: Most important findings?
- *Conclusion*: Most important conclusion?

The abstract should include only text. Avoid the use of abbreviations and citations. Review abstracts should define the subject area of the review and summarize the scope but do not necessarily have to follow the structure above.

Keywords

Please provide three to six keywords from the options provided.

Main Text

- All original manuscripts must have an appropriate introduction, a single materials and methods section (with the methodology of all experiments), results and discussion
- The journal uses British spelling; however, authors may submit using either option, as spelling of accepted papers is converted during the production process.
- Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

References

In the text identify references by Arabic numerals [in square brackets]. Material submitted for publication but not yet accepted should be noted as 'unpublished data' and not be included in the reference list. The list of references should include only those publications which are cited in the text. Do not alphabetise; number references in the order in which they are first mentioned in the text. The surnames of the authors followed by initials should be given. There should be no punctuation other than a comma to separate the authors. **List all authors when three or less; when four or more, list the first three and add ',et al.'** Journal names must be italicised, and abbreviated according to the Index Medicus system. (Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *N Engl J Med* 1997;**336**:309-315.)

Examples

a. *Papers published in periodicals:*

Curley A, Stanworth SJ, Willoughby K, et al: Randomized trial of platelet transfusion thresholds in neonates. *N Engl J Med* 2019;**380**:242-251.

b. *Monographs:*

Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M: Blood Transfusion in Clinical Medicine, ed 10. Oxford, Blackwell Science, 1997

c. *Edited books:*

Luzzatto L, Karadimitris A: The molecular basis of anaemia; in Provan D, Gribben J (ed): Molecular Haematology. Oxford, Blackwell Science, 2000

Footnotes

Footnotes should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals. Keep footnotes brief; they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper and should not include references.

Tables

Each table should be numbered and provided with the manuscript. Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Do not use graphics software to create tables. Each table requires a title. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Please identify footnotes (which should be kept to a minimum and written in bold print) by superscripts, a, b, c etc. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted.

Color Figures. Figures submitted in color may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white. If an author would prefer figures printed in colour in hard copies of the journal, a fee will be charged by the Publisher. When your article is published in Early View in Wiley Online Library, you will be emailed a link to RightsLink for Author Services allowing you to select optional color printing and pay the associated fee.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- **Units of measurement:** Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website for more information about SI units.
- **Numbers:** numbers under 10 are spelt out, except for: measurements with a unit (8mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils).
- **Trade Names:** Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.