

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS



Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues

**Aspectos moleculares e clínicos do
sistema Rh em doadores de sangue e
na Doença Hemolítica do Feto e do
Recém-nascido**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2024

Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues

Aspectos moleculares e clínicos do sistema Rh em doadores de sangue e na Doença Hemolítica do Feto e do Recém-nascido

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador(a): Dr(a).Marilu Fiegenbaum

Coorientador(a): Dr(a).Silvana de Almeida

Porto Alegre

2024

Catálogo na Publicação

Rodrigues, Mirelen Moura de Oliveira Aspectos
moleculares e clínicos do sistema Rh em doadores de
sangue e na doença hemolítica do feto e do recém-
nascido / Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues. -2024.

105 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-
Graduação em BioCiências, 2024.

Orientador(a): Marilu Fiegenbaum ;
coorientador(a):
Silvana de Almeida.

1. Sistema de grupos sanguíneos Rh. 2.
Doença hemolítica do feto e do recém-nascido. 3.
Imunohematologia. 4. Imunogenética. I. Título.

Instituição e fonte financiadora:

Instituição:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA

Fonte financiadora:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) –
PqG 02/2014, 1412373-4 PQG

Dedicatória

A todos os doadores de sangue que voluntariamente dedicam um pouco do seu tempo para ajudar aos pacientes que necessitam de transfusões.

“Porque o Senhor dá a sabedoria; da sua boca é que vem o conhecimento e o entendimento.” Provérbios 2.6

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, por proporcionar a realização deste trabalho.

À FAPERGS pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Dr^a Marilu Fiegenbaum pelo incentivo, confiança, paciência e por me acalmar nos momentos em que as situações não estavam como o planejado, por me ensinar com maestria e ser exemplo profissional.

À minha coorientadora Dr^a Silvana de Almeida, por sua coorientação, pela confiança, dedicação e exemplo profissional.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, em especial a Dr^a Grasiela Agnes, pela amizade e colaboração durante a execução deste trabalho.

Ao meu esposo, Luiz Frederico, por todo o amor e apoio incondicional durante todos os momentos da tese, inclusive contribuindo com a leitura da tese.

Aos meus pais, Alfredo e Fátima, pelo amor, carinho e cuidados dedicados a mim em todos os momentos.

Ao meu irmão, Alcides, pelo incentivo, amizade e amor.

Aos meus sogros, Luiz Carlos e Marlise, pelo carinho e incentivo.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa, Andressa Alves, Vanessa Feistauer, Lariana Szczesny e Gabriel Tassi pelo companheirismo durante este período, pelas risadas, conversas e auxílio no laboratório.

Aos familiares e amigos que me incentivaram a continuar neste caminho.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	6
Lista de figuras e tabelas	7
Resumo	8
Abstract	11
1. Introdução e referencial teórico	13
1.1 Grupos Sanguíneos	13
1.2 Imunohematologia e biologia molecular	14
1.2 Sistema Rh.....	18
1.4 Doença hemolítica do feto e do recém-nascido	24
1.5 Aplicações da técnica de sequenciamento de DNA na imunohematologia ..	25
2. Objetivos:.....	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Artigo 1: Investigation of RHCE phenotype and genotype discrepancies in blood donors of South Brazil	29
4. Artigo 2: Hemolytic disease of the fetus and newborn - a perspective of immunohematology	30
5. Discussão	70
6. Conclusão.....	73
Referências	75
Anexo A - Parecer CEP nº 2.753.780.....	79
Anexo B – Genetic variability of blood groups in southern Brazil	83
Currículo Lattes	95

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

A – Adenina

AGH – Antiglobulina humana

APCs – Células apresentadoras de antígenos

cffDNA – DNA fetal de células livres na circulação materna (*non-invasive prenatal with cell-free fetal DNA*)

C - Citosina

DHFN – Doença hemolítica do feto e do recém-nascido

DHPN – Doença hemolítica perinatal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

G – Guanina

HLA – Antígeno leucocitário humano

IAI – Identificação do anticorpo irregular

InDels – Inserções e deleções

ISBT – Sociedade internacional de transfusão de sangue (*International Society of Blood Transfusion*)

MCA-PSV – Ultrassonografia com doppler da medida da velocidade de pico sistólico da artéria cerebral média (*doppler measurement of the fetal middle cerebral artery peak systolic velocity*)

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

PAI – Pesquisa de anticorpos irregulares

RBC – Hemácia (*Red blood cell*)

RhIg – Imunoglobulina anti-D

RTH – Reação transfusional hemolítica

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphism*)

T – Timina

WBCs – Glóbulos brancos (*White blood cell*)

Lista de figuras e tabelas

Figura 1: Teste de Coombs indireto

Figura 2: Teste de Coombs direto

Figura 3: Genes do sistema Rh e formação de gene híbrido.

Tabela 1: Principais antígenos do sistema Rh e frequência populacional.

Resumo

Introdução: O sistema Rh é um dos mais importantes sistemas de grupos sanguíneos, pois é considerado altamente imunogênico e polimórfico. Dois genes codificam os antígenos do sistema Rh, *RHD* e *RHCE*, sendo os mais importantes os antígenos D, C, c, E, e. O desenvolvimento de anticorpos contra antígenos do sistema Rh está associado a reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias e a Doença Hemolítica do Feto e do Recém-nascido (DHFN). No âmbito da imunohematologia, as técnicas de sequenciamento de DNA podem ser muito úteis para elucidar casos de discrepâncias entre genotipagem e fenotipagem e para identificação de novas variantes de grupos sanguíneos.

Objetivos: Compreender as discrepâncias entre os resultados de genotipagem e fenotipagem para os antígenos C/c, E/e em amostras de doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre utilizando o sequenciamento das regiões codificantes e adjacentes dos genes *RHD* e *RHCE* com discrepância, avaliando a presença de possíveis variantes que expliquem a discrepância. Devido à grande importância dos antígenos do sistema Rh no desenvolvimento da DHFN, a tese também tem como objetivo realizar uma busca sistemática na literatura sobre o tema DHFN e a frequência de anticorpos antieritrocitários em gestantes descrevendo mais prevalentes.

Método: O presente estudo avaliou 395 amostras fenotipadas e genotipadas para os antígenos C/c e E/E de doadores de sangue do Hospital de Clínicas, dentre estas foram avaliadas quais amostras apresentaram discrepâncias entre genótipo e fenótipo para os alelos *RHCE**e/*E (rs609320) e *RHCE**c/*C (rs676785). A fenotipagem foi realizada utilizando a metodologia de tubo com antissoros monoclonais e a genotipagem através da técnica de PCR em tempo real utilizando sistema TaqMan®. As amostras discrepantes para os dois alelos foram sequenciadas utilizando 20 pares de primers para abranger as regiões codificantes e adjacentes dos éxons dos genes *RHD* e *RHCE*. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método Sanger. Também foi realizada uma busca sistemática na literatura sobre o desenvolvimento de DHFN e a presença aloimunização em

gestantes. O estudo foi conduzido sob aprovação do CEP da UFCSPA 2.753.780).

Resultados: Dentre as 395 amostras avaliadas para as metodologias de genotipagem e fenotipagem, 15 apresentaram discrepância entre genótipo e fenótipo para os dois alelos investigados concomitantemente, em duas amostras a análise do sequenciamento confirmou o resultado obtido na genotipagem para o alelo *RHCE**E/*e. Foram identificadas variantes, que possivelmente possam explicar as discrepâncias nestas amostras. Dentre as variantes encontradas, duas ainda não estão descritas. Utilizando ferramentas de análise *in silico* foi possível observar que as variantes podem apresentar potencial de causar alterações na expressão da proteína RhCE e, conseqüentemente, na expressão dos alelos. A variante encontrada no éxon 6 do gene *RHCE* foi classificada como “provável dano” utilizando o software PolyPhen-2 com score de 0,999 (sensibilidade = 0,99) e classificada como “tolerada” pelo software SIFT. A segunda nova variante descrita, localizada no final do íntron 7 do gene *RHCE*, utilizando o software RegulomeDB foi obtido um score de 1,0 o que significa que a nova variante pode alterar a ligação e à expressão gênica. A partir da busca sistemática sobre DHFN e aloimunização, revisamos 75 artigos publicados, ao total 13.966 gestantes apresentavam aloimunização. Os anticorpos mais prevalentes neste estudo de revisão do sistema foram, anti-D (35,01%), anti-K (14,69%), anti-E (11,21%), anti-c (5,48%), anti-C (4,93%) e anti-M (2,35%).

Conclusão: Embora o genótipo seja preditor do fenótipo, há algumas situações em que expressão gênica é alterada, como por exemplo, no sistema Rh a presença de antígenos fracos e parciais. Nosso estudo contribui com a identificação de novas variantes que possivelmente podem ter influência na expressão da proteína RhCE. Em relação a DHFN, embora o anti-D ainda seja o anticorpo mais frequente associado a DHFN, podemos observar que outros anticorpos contra antígenos dos sistemas Rh, Kell e MNS apresentam grande prevalência, principalmente, o anti-K e anti-E. Sendo assim, há a necessidade de atentar para a DHFN com o entendimento de que outros anticorpos contra antígenos de grupos sanguíneos estão associados ao desencadeamento da doença implicando em anemia com implicação leve a grave e inclusive no óbito do feto ou recém-nascido e de que é

necessário identificar e acompanhar a gestantes com risco de incompatibilidade materno fetal.

Palavras-chave: Sistema Rh, Doença Hemolítica do Feto e do Recém-nascido, Rh variantes, discrepâncias entre genotipagem e fenotipagem

Abstract

Introduction: The Rh blood system is one of the most important blood group systems, as it is considered highly immunogenic and polymorphic. Two genes encode the antigens of the Rh system, *RHD* and *RHCE*, the antigens D, C, c, E, and e are the most important antigens of this system. The development of antibodies against Rh system antigens is associated with immediate and late hemolytic transfusion reactions and Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN). In the context of immunohematology, DNA sequencing techniques can be very useful for elucidating cases of discrepancies between genotyping and phenotyping, and for identifying new blood group variants.

Aim: Understand the discrepancies between the genotyping and phenotyping results for the C/c, E/e antigens in samples from blood donors at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre using sequencing of the coding and adjacent regions of the *RHD* and *RHCE* genes with discrepancies, evaluating the presence of possible variants that explain the discrepancy. Due to the great importance of Rh system antigens in the development of HDFN, this thesis also aims to carry out a systematic search in the literature on the topic of HDFN and the frequency of anti-erythrocyte antibodies in pregnant women, describing the most prevalent alloantibodies.

Methodology: The present study evaluated 395 samples of phenotype and genotype for C/c and E/E antigens from blood donors at Hospital de Clínicas, among which samples were evaluated that presented discrepancies between genotype and phenotype for the alleles for the *RHCE**e/*E (rs609320), and *RHCE**c/*C (rs676785) alleles. Phenotyping was performed using tube methodology with monoclonal antisera and genotyping using real-time PCR using the TaqMan® system. The discrepant samples for the two alleles were sequenced using 20 pairs of primers to cover the coding and adjacent regions of the exons of the *RHD* and *RHCE* genes. Sequencing reactions were performed using the Sanger method. A systematic search was also carried out in the literature on the development of HDFN and the presence of alloimmunization in pregnant women. The study was conducted with approval from UFCSPA ethical committee (number 2,753,780).

Results: Among the 395 samples evaluated for genotyping and phenotyping methodologies, 15 samples showed a discrepancy between genotyping and phenotyping, 2 confirmed the *RHCE**E/*e genotype. Variants were identified, which may explain the discrepancies in these samples. Among the variants found, two have not yet been described. Using *in silico* analysis tools, it was possible to observe that the variants have great potential to cause changes in protein expression and, consequently, in the expression of alleles. The variant found in exon 6 of the *RHCE* gene was classified as “probable damage” using the PolyPhen-2 software with a score of 0.999 (sensitivity = 0.99) and classified as “tolerated” by the SIFT software. The second new variant described, located at the end of intron 7 of the *RHCE* gene, using the RegulomeDB software, obtained a score of 1.0, which means that the new variant can alter gene binding and expression. From the systematic search on HDFN and alloimmunization, we reviewed 75 published articles; a total of 13,966 pregnant women had alloimmunization. The most prevalent antibodies in this system review study were anti-D (35.01%), anti-K (14.69%), anti-E (11.21%), anti-c (5.48 %), anti-C (4.93%), and anti-M (2.35%).

Conclusions: Although the genotype is a phenotype predictor, there are some situations in which gene expression is altered, such as, in the Rh system, the presence of weak and partial antigens. Our study contributes to identifying new variants that may influence the expression of the RhCE protein. Regarding to HDFN, although anti-D is still the most common, we can observe that other antibodies against antigens from the Rh, Kell, and MNS systems are highly prevalent, mainly anti-K and anti-E. Therefore, there is a need to pay attention to HDFN with the understanding that other antibodies against blood group antigens are associated with the onset of the disease, resulting in mild to severe anemia and even death of the fetus or newborn and that it is necessary to identify and monitor pregnant women at risk of maternal-fetal incompatibility.

Keywords: Rh blood group system, Hemolytic disease of the fetus and newborn, Rh genetic variants, genotype and phenotype discrepancies.

1. Introdução e referencial teórico

1.1 Grupos Sanguíneos

Os antígenos de grupos sanguíneos são partes específicas de estruturas formadas por proteínas, glicoproteínas, glicolípídios e carboidratos presentes na membrana eritrocitária, as quais desempenham diferentes funções na membrana eritrocitária, como estrutural, de receptor/adesão, de transporte, entre outras. Dependendo da imunogenicidade do antígeno, o sistema imunológico pode desencadear uma resposta imune induzindo a formação de um anticorpo contra um antígeno eritrocitário específico (BONIFÁCIO; NOVARETTI, 2009; CARTRON; COLIN, 2001; ISBT, 2023).

Desde 1900 com a descoberta do sistema ABO por Karl Landesteiner, até o momento são reconhecidos pela ISBT 378 antígenos, dos quais 360 estão agrupados em 45 sistemas de grupos sanguíneos codificados por 50 genes. As bases genéticas de 33 antígenos ainda permanecem desconhecidas (GASSNER et al., 2022; ISBT, 2023).

Os antígenos que não estão incluídos em algum dos 45 sistemas de grupos sanguíneos estão alocados entre as coleções (caracterizadas por antígenos que apresentam algumas características sorológicas, bioquímicas e genéticas semelhantes) e séries (estruturas antigênicas conhecidas do ponto de vista sorológico e agrupadas em dois grupos distintos, os antígenos de baixa frequência na população, menor do que 1% da população, e alta frequência, maior do que 90%) (ISBT, 2023).

Os grupos sanguíneos ABO e Rh são os mais importantes a serem considerados para que uma transfusão segura seja realizada, por isso a fenotipagem dos antígenos ABO e antígeno RhD devem ser realizadas em bancos de sangue para pacientes e doadores de sangue. De acordo com a Portaria de Consolidação nº 5, de 2017, que regulamenta a atividade hemoterápica no Brasil, é obrigatória a realização da tipagem ABO (direta e reversa) e RhD para qualificação do sangue do doador, a fim de garantir a eficácia terapêutica e a

segurança da futura doação e também em receptores de hemocomponentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A descrição de um antígeno de grupo sanguíneo geralmente ocorre a partir da identificação de um anticorpo contrário ao antígeno, devido a incompatibilidade materno-fetal ou a reação transfusional hemolítica imune (HENDRICKSON; DELANEY, 2016). A formação de anticorpos antieritrocitários irregulares pode ocorrer tanto por resposta imune pela exposição do indivíduo a antígenos não próprios (aloanticorpos), quanto ao desenvolvimento de anemia hemolítica autoimune (autoanticorpos). A aloimunização pode ocorrer por meio de transfusões sanguíneas, gestações, transplante de órgãos/tecidos. O mecanismo de aloimunização é mediado pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) as quais carregam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, que funciona apresentando antígenos processados e ativando linfócitos. Após a transfusão e/ou gestação interações entre as moléculas doadoras de MHC II em glóbulos brancos (*White blood cell* - WBCs) residuais e linfócitos receptores podem resultar em aloimunização ou supressão imune (REMY et al., 2018). Além da exposição ao antígeno não próprio outros fatores que influenciam no desencadeamento da aloimunização são: fatores genéticos relacionados ao sistema imunológico, dose e tipo do anticorpo e potencial imunogênico do anticorpo (DASARARAJU; MARQUES, 2015). O que provavelmente determina se os WBCs alogênicos residuais irão induzir aloimunização ou tolerância imune são características como a funcionalidade da APC do doador, o estado inflamatório do receptor e o grau de compatibilidade de HLA (REMY et al., 2018).

1.2 Imunohematologia e biologia molecular

Os antígenos de grupos sanguíneos expressos na membrana eritrocitária podem ser identificados utilizando técnicas de imunohematologia, em que a hemácia é testada com um antissoro específico para o antígeno desejado (técnica Coombs indireto) podendo utilizar a metodologia de gel centrifugação ou tubo.

A técnica de Coombs indireto também é utilizada para realizar a busca e identificação de anticorpos livres no plasma, para isso são realizados os testes de

pesquisa (PAI) e identificação (IAI) de anticorpos antieritrocitários, sendo necessária a amostra de plasma ou soro do paciente ou doador de sangue, um kit de hemácias testes comerciais e um potencializador como a antiglobulina humana (AGH) (Figura 1) (ACKER et al., 2020). Estas hemácias comerciais apresentam fenotipagem eritrocitária conhecida para os principais antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos (Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Diego, Lewis, P, Lutheran) que podem apresentar algum anticorpo significativo clinicamente, ou seja, aqueles que à 37°C e podem desencadear aloimunização. Na resolução de casos complexos podem ser realizadas técnicas adicionais de adsorção e eluição (ISBT, 2023). Entretanto, o paciente pode apresentar um baixo título do anticorpo irregular, levando a um teste PAI falso negativo com risco de que uma unidade de concentrado de hemácias aparentemente compatível seja transfundida, o que poderá desencadear uma reação transfusional imune devido a incompatibilidade pela presença do anticorpo no plasma do paciente e o antígeno na membrana do eritrócito transfundido. As falhas na identificação dos anticorpos irregulares podem levar a reação transfusional hemolítica (RTH) aguda ou tardia de intensidade variável, a qual implica em complicações para o receptor agravando sua condição clínica (HARMENING, 2006). Por isso, investir na prevenção a aloimunização é necessário.

O teste de Coombs direto (Figura 2) pode ser utilizado para avaliar se existe algum anticorpo ligado a hemácia *in vivo*, ou seja, as hemácias coletadas do paciente ou doador já apresentam anticorpos ligados a elas. Quando positivo, este resultado deve ser avaliado em conjunto com os dados clínicos do paciente e pode ser um indicativo de reação transfusional hemolítica mediada por anticorpos. A fim de confirmar a reação transfusional devem ser realizados testes que possibilitem identificar o anticorpo ligado a hemácia.(HARMENING, 2012)

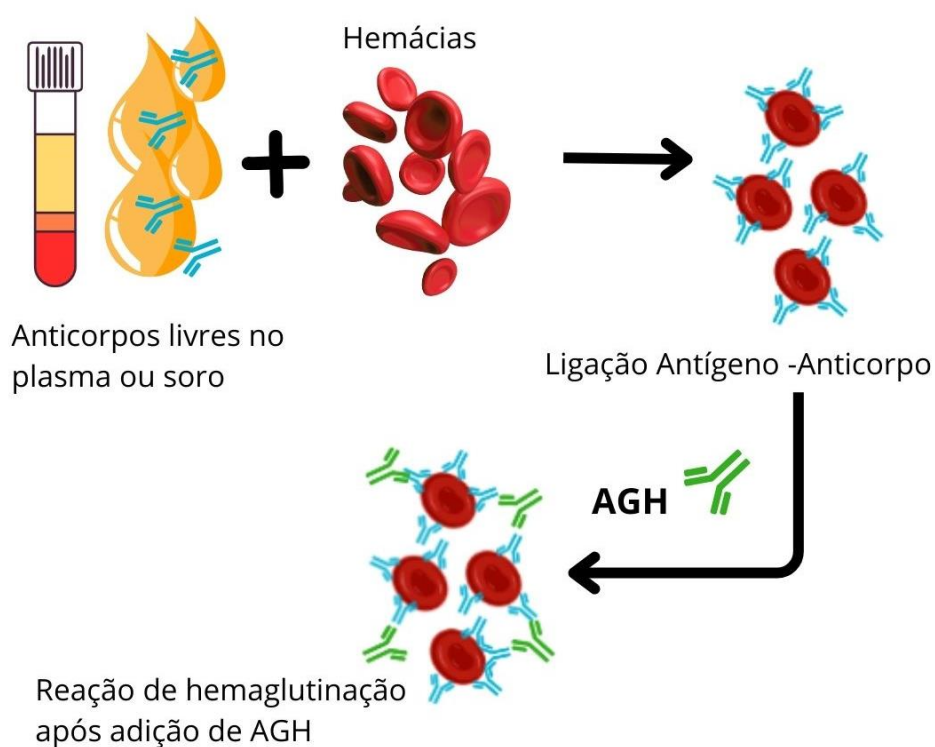


Figura 1: Teste de Coombs Indireto

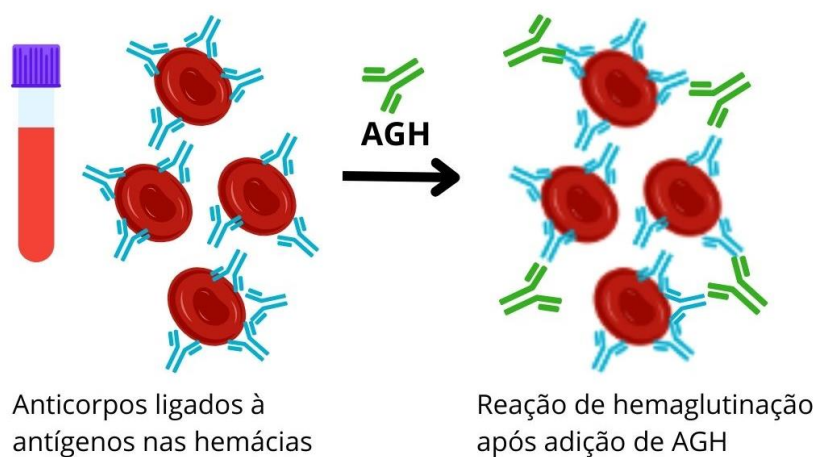


Figura 2: Teste de Coombs Direto

As aloimunizações são mais frequentes em pacientes politransfundidos, ou seja, aqueles que recebem diversas transfusões ao longo da vida, dentre eles os pacientes com anemia falciforme, talassemias, com aplasia de medula. Além do risco aumentado de aloimunização quando comparado com um indivíduo que

recebeu transfusão eventualmente (por exemplo devido à realização de uma cirurgia) os serviços de hemoterapia poderão ter dificuldade de encontrar doadores de sangue compatíveis para esses pacientes quando eles apresentarem muitos anticorpos irregulares ou quando apresentam um perfil fenotípico raro (CHOU et al., 2013; GEHRIE et al., 2017). Além disso a fenotipagem eritrocitária nesses pacientes pode apresentar resultados discrepantes devido as muitas transfusões em períodos menores do que três meses, não sendo possível identificar se os antígenos encontrados são das hemácias do próprio paciente ou das obtidas pela transfusão (PUTZULU et al., 2017).

A resolução de casos complexos em imunohematologia, bem como resolução de discrepâncias, confirmação de fenótipos raros, pode ser auxiliada utilizando técnicas de biologia molecular, desde a genotipagem para prever o fenótipo, até o sequenciamento dos genes envolvidos na expressão dos antígenos de grupos sanguíneos (ISBT, 2023).

As técnicas moleculares podem ser utilizadas em diversas situações, como por exemplo, quando o paciente é politransfundido e/ou recebeu transfusão nos últimos três meses, em situações de pesquisa populacional quando não há mais amostra de sangue total disponível para realização dos testes imunohematológicos (fenotipagem) (Rodrigues et al., 2021) e, na genotipagem fetal não invasiva auxiliando na decisão de utilização de profilaxia com imunoglobulina anti-D (RhIg) (BENACHI et al., 2012; LUO et al., 2018). Além disso, o sequenciamento pode ser utilizado para confirmação da identificação de novos antígenos e de novos sistemas de grupos sanguíneos.

A genotipagem dos grupos sanguíneos avalia qual a alteração molecular que ocasiona a formação dos diferentes antígenos de grupos sanguíneos, bem como aquelas variantes previamente conhecidas pela fraca ou nula expressão dos antígenos na membrana eritrocitária. A maioria dessas alterações moleculares ocorre por uma substituição de um único nucleotídeo (polimorfismo de nucleotídeo único - SNP), mas também podem ocorrer por deleções, inserções, formação de genes híbridos (FLEGEL; GOTTSCHALL; DENOMME, 2015).

Metodologias diferentes podem ser empregadas para a realização da genotipagem, entre elas, reação em cadeia da polimerase (PCR) alelo específico

(AS-PCR), PCR seguido de clivagem com enzimas de restrição (PCR-RFLP), PCR multiplex, PCR em tempo real (qPCR) utilizando sondas de hidrólise, high resolution melting (HRM). Por não necessitarem de manipulação na etapa pós PCR, as técnicas de qPCR e HRM, diminuem o risco de erros referentes as etapas manuais e também tempo dispendido na execução da técnica (DENOMME; JOHNSON; PIETZ, 2011; TANAKA et al., 2011).

Além dessas metodologias, é possível utilizar microarray, MALDI-TOF e sequenciamento (Sanger e sequenciamento de nova geração), essas técnicas são consideradas mais robustas, pois oferecem a possibilidade de identificar variações no número de cópias (CNVs) e outros tipos de alterações genômicas nos genes codificadores de proteínas que são capazes de estimular a produção de anticorpos específicos. Essas metodologias podem ser aplicadas com o propósito de solucionar casos discrepantes entre a fenotipagem e genotipagem eritrocitária na busca por variantes que alteram a expressão gênica e consequentemente a expressão do antígeno na membrana do eritrócito (BELSITO; MAGNUSSEN; NAPOLI, 2017).

1.2 Sistema Rh

O sistema Rh foi descrito em 1939 por Levine e Stetson, quando uma mulher necessitou de transfusão sanguínea após o parto e mesmo recebendo hemácias ABO compatíveis apresentava RTH grave e seu soro apresentava reação de aglutinação com aproximadamente 80% dos doadores eurodescendentes ABO compatíveis. Como Landstainer e Wiener, observaram que 85% das hemácias humanas aglutinavam com soro de coelhos imunizados com hemácias de macaco Rhesus (antígeno Rh), os pesquisadores pensaram que o mesmo antígeno estava envolvido nos dois casos e nomearam o sistema sanguíneo de Rh. Entretanto, foi observado posteriormente que os anticorpos envolvidos eram diferentes, por isso o aloanticorpo (humano) foi renomeado como o anti-D e o heteroanticorpo (de coelho) como anti-LW, mas o sistema Rh continuou com o mesmo nome (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O sistema Rh é altamente polimórfico, apresentando 56 antígenos descritos até o momento (GASSNER et al., 2022), a Tabela 1 apresenta alguns dos antígenos do sistema Rh bem como a prevalência. Dois genes, localizados no cromossomo 1, são responsáveis por codificar os antígenos do sistema Rh, *RHD* e *RHCE*. A posição em que os genes são transcritos favorece a grande diversidade genética deste sistema, uma vez que são transcritos em sentidos opostos, gerando possibilidade de rearranjos com a formação de híbridos entre os dois genes (Figura 1) (PEDINI et al., 2022). A expressão do sistema Rh também está associada ao gene *RHAG*, que codifica a glicoproteína RhAG, a qual forma um complexo com as proteínas do sistema Rh (RhD e RhCE). Este complexo provavelmente tem como função o transporte iônico (CO_2/O_2 , $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) e é expresso apenas nos eritrócitos, por isso, os antígenos do sistema Rh são encontrados apenas nessas linhagens celulares. O gene *RHAG* não é polimórfico como os genes *RHD* e *RHCE*, porém quando ocorrem alterações nesse gene que levam a perda da função proteica nenhum dos antígenos Rh é expresso na membrana eritrocitária (DANIELS, 2009).

O gene *RHD* codifica principalmente o antígeno D, sendo o gene *RHCE* o responsável pela codificação da maioria dos antígenos do sistema Rh, dentre eles antígenos antitéticos C/c e E/e. Uma única troca de nucleotídeo, SNP, no éxon 2 ocasiona a presença dos alelos *RHCE**c/*C pela substituição c.307C>T, gerando a troca de aminoácido p.Pro103Ser (rs676785). Para os alelos *RHCE**e/*E o SNP que codifica os antígenos ocorre no éxon 5, na posição c.676G>C levando a troca de aminoácido p.Ala226Pro (rs609320) (ISBT, 2022).

A ausência da proteína RhD (altamente imunogênica) leva ao fenótipo RhD negativo, podendo ser determinado por diferentes alterações genéticas, dependendo da ancestralidade do indivíduo. Em populações eurodescendentes predominantemente ocorre a deleção completa em homozigose do gene *RHD* (*RHD**01N.01), já em populações afrodescendentes outras alterações moleculares além da deleção do gene *RHD* levam a não expressão proteica, por exemplo: o *RHD**ψ (*RHD**08N.01) e o *RHD**DIIIa-CEVS(4-7)-D. O *RHD**ψ ocorre devido a uma mudança no quadro de leitura que conduz a um stop códon prematuro devido a duplicação de 37 pb dos últimos 19 nucleotídeos do íntron 3 e dos primeiros 18 nucleotídeos do éxon 4 e apresenta mutações nas seguintes posições c.609G>A;

c.654G>C; c.667T>G; c.674C>T; c.807T>G. A formação do gene híbrido *RHD*DIlla-CEVS(4-7)-D (RHD*03N.01)* compreende os éxons 1 a 3, 8 a 10 do gene *RHD*, éxons 4 a 7 do gene *RHCE*. Esse gene híbrido além de não produzir o antígeno D, também pode produzir um antígeno C fraco, e os indivíduos com esse genótipo se expostos ao antígeno C apresentam risco de desenvolver anticorpos anti-C (DANIELS, 2009; CHOU et al., 2013).

A presença de outras variantes genéticas em *RHD* e *RHCE* pode resultar em antígenos com fraca expressão, parciais, novos antígenos, bem como, a perda de antígenos de alta frequência e/ou presença de antígenos de baixa frequência (VENDRAME et al., 2023). Os antígenos RhD resultantes destas variantes genéticas podem ser classificados em três grupos diferentes, D fraco, D parcial e DELL. Algumas variantes são raras, como a D-- e Rh_{null}. As variantes que geram expressão parcial do antígeno RhD são caracterizadas pela alteração nos epítomos presentes no antígeno, podendo ocorrer a perda de epítomos e/ou novos epítomos no antígeno. Estas alterações podem ocasionar o desenvolvimento do aloanticorpo anti-D em situações de transfusão RhD positivo e incompatibilidade materno fetal. A presença do antígeno D fraco ocorre quando há diminuição da expressão dos antígenos RhD na membrana do eritrócito, sem alteração de estrutural ou de sequência de aminoácidos do antígeno codificado (Bakry et al., 2019).

No âmbito da hemoterapia, a presença do antígeno D é avaliada utilizando antissoro anti-D, quando o resultado é negativo, em doadores de sangue, é necessário realizar a técnica confirmatória (pesquisa de D fraco) na qual é utilizada um potencializador (antiglobulina humana) para avaliar a presença do antígeno. Quando positivo, os hemocomponentes são considerados RhD positivos (fraco ou parcial), não sendo realizada obrigatoriamente a diferenciação entre as variantes fraca ou parcial. Para fins transfusionais, na tipagem RhD do receptor quando negativa ou com intensidade de reação menor do que 2+, o receptor deve receber concentrado de hemácias RhD negativo para evitar a aloimunização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A diferenciação entre as variantes D fraca e D parcial podem ser realizadas utilizando técnicas de biologia molecular complementares às técnicas sorológicas da imunohematologia (Bakry et al., 2019).

Tabela 1: Principais antígenos do sistema Rh e frequência populacional.

Terminologia			
Ag	ISBT (símbolo)	Prevalência	Observações
D	RH1	comum	85% Eurodescendentes, 92% Afrodescendentes e 99% Asiáticos
C	RH2	comum	68% Eurodescendentes, 27% Afrodescendentes e 93% Asiáticos
E	RH3	comum	29% Eurodescendentes, 22% Afrodescendentes e 39% Asiáticos
c	RH4	comum	80% Eurodescendentes, 96% Afrodescendentes e 47% Asiáticos
e	RH5	comum	98% Eurodescendentes, 98% Afrodescendentes e 96% Asiáticos
f	RH6	comum	65% Eurodescendentes e 92% Afrodescendentes
G	RH12	comum	84% Eurodescendentes e 92% Afrodescendentes
Hr ₀	RH17	alta	
Hr ^S	RH18	alta	
hr ^B	RH31	98%	
Hr ^B	RH34	alta	
JAL	RH48	baixa	

Adaptada do Manual Técnico da Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB) (ACKER et al., 2020) e Blood Groups and Red Cell Antigens (DEAN, 2005)

Ag: antígeno

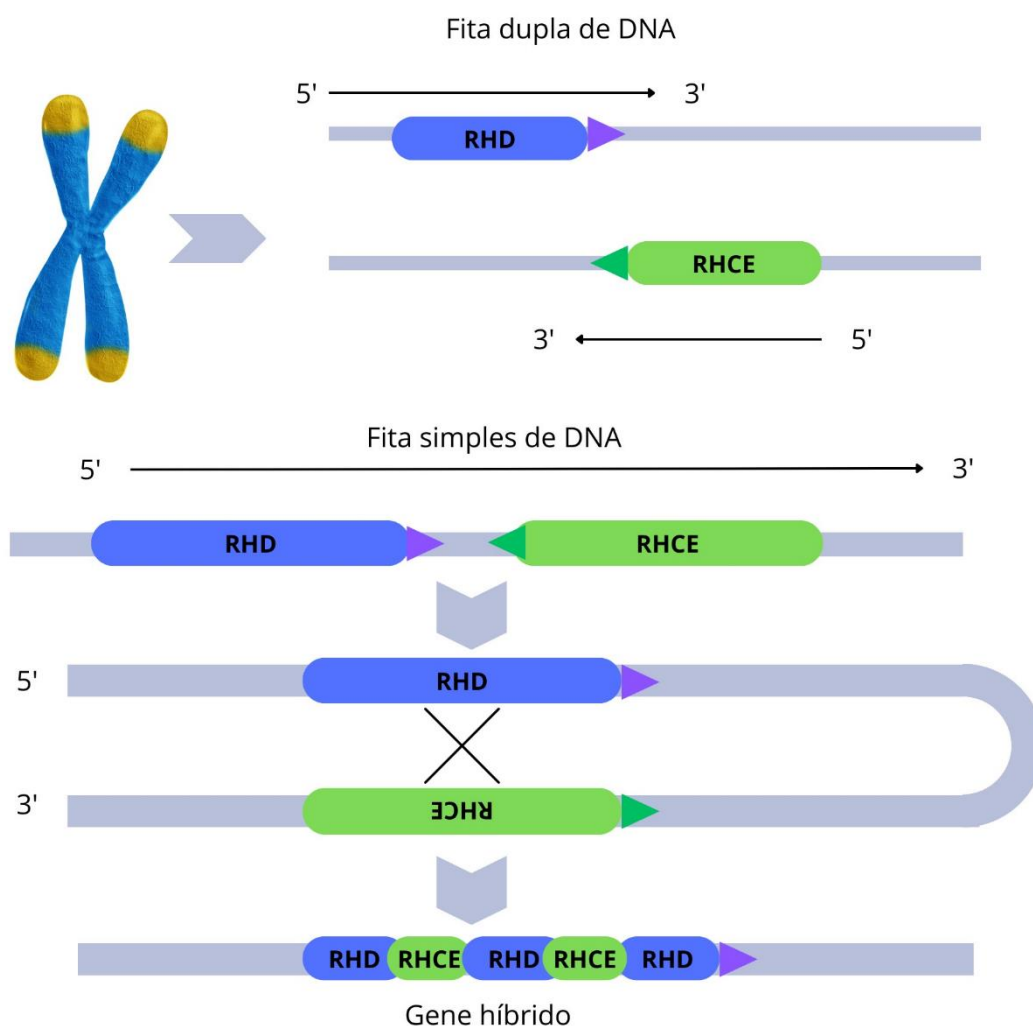


Figura 2: Genes do sistema Rh e formação de gene híbrido.

A variabilidade genética em *RHD* e *RHCE* é alta e extremamente diversa entre diferentes populações. Populações africanas e afrodescendentes apresentam um maior número de variantes descritas (CHOU et al., 2018). Aproximadamente 85% dos pacientes afrodescendentes, diagnosticados com anemia falciforme, apresentam pelo menos um alelo Rh variante que difere do encontrado na população de doadores de sangue, podendo resultar em aloimunização e reações transfusionais hemolíticas tardias (Chou et al., 2018). Considerando este dado, a transfusão em pacientes com anemia falciforme consiste em um desafio para os serviços de hemoterapia, a fim de otimizar o atendimento a esta população é importante avaliar o perfil fenotípico do paciente (imunohematologia) e se possível

a presença de variantes Rh utilizando as técnicas de genotipagem e sequenciamento.

A variante D-- é decorrente da não expressão dos antígenos RhCE na membrana do eritrócito, a qual pode ser ocasionada por genes híbridos CE-D-CE, deleções ou inserções (CHEN et al., 2021; DEZAN et al., 2022). Em diversas populações, pode ser observada a presença de D--, por exemplo, Chen e colaboradores (2021) identificaram em uma paciente chinesa da etnia Han uma duplicação em homozigose de quatro pares de base (CTCT) na posição 569 a 572 do éxon 4 de *RHCE*. Essa duplicação gera um códon de terminação prematuro na sequência ocasionando a não expressão dos antígenos RhCE (CHEN et al., 2021). Em uma doadora de sangue de origem peruana, uma outra variante genética foi detectada em homozigosidade no éxon 5 do gene *RHCE* (c.659G > A). Esta variação também causa um códon de terminação prematuro (DEZAN et al., 2022). Além das variantes citadas, já foram documentadas pelo menos 25 variações em *RHCE* associadas ao fenótipo D-- (CHEN et al., 2021).

O fenótipo Rh_{null} ocorre em decorrência de diferentes variações genéticas e pode ser classificado em dois tipos: tipo amorfo e o tipo regulatório. O tipo amorfo ocorre devido a variações nos genes codificantes do sistema Rh, já o tipo regulatório é causado por alterações no gene *RHAG*, o qual tem como função codificar a proteína RhAG que serve de ancoragem para as proteínas do sistema Rh (RhD e RhCE), ou seja, sem a proteína não há expressão funcional dos antígenos Rh (KATO-YAMAZAKI et al., 2000; JUNCA et al., 2021).

A frequência antigênica é diferente dependendo da população avaliada e a presença de variantes e híbridos no sistema Rh pode ocasionar a não expressão de antígenos de alta frequência. Considerando pacientes politransfundidos que apresentam variantes que podem ser raras, há o risco de sensibilização, ocasionando aloimunização contra um antígeno de alta frequência populacional, dificultando a compatibilização de unidades de concentrado de hemácias compatíveis com o paciente, para isso é importante identificar doadores com fenótipos raros para suprir possíveis demandas transfusionais (RISTOVSKA et al., 2022).

1.4 Doença hemolítica do feto e do recém-nascido

A DHFN ou DHPN ocorre devido a incompatibilidade materno-fetal, em que a gestante apresenta um anticorpo antieritrocitário no plasma e o feto apresenta na membrana do eritrócito o antígeno correspondente ao anticorpo materno (Zwiers et al., 2018). Para que a DHFN ocorra de fato existem diversos fatores que devem estar presentes: 1) resposta imune primária materna, ou seja, a gestante deve ter sido sensibilizada previamente, o que pode ocorrer por gestação prévia ou transfusão prévia; 2) resposta imune secundária, quando os eritrócitos fetais expressam o antígeno ao qual a gestante apresenta anticorpo; 3) presença de anticorpo de classe IgG, o qual apresenta capacidade de atravessar a placenta; 4) ligação do anticorpo com antígeno eritrocitário; 5) hemólise intra ou extra vascular, dependendo do anticorpo envolvido na reação. A DHFN pode levar a anemia fetal progressiva, hidropisia fetal e até morte intrauterina. Após o nascimento, persistindo a hemólise ocorrerá anemia neonatal e hiperbilirrubinemia, que pode levar a dano do sistema nervoso central, condição chamada de kernicterus (ZINEB et al., 2015; DE WINTER et al., 2023).

A incompatibilidade materno-fetal mais conhecida é a causada pela presença do anti-D, principalmente em gestantes com fenótipo RhD negativo com fetos RhD positivo. Devido à grande importância clínica desta incompatibilidade, na década de 1960 foi introduzida a utilização profilática da Rhlg, mais conhecida como Rogan (Chatziantoniou et al., 2017). Entretanto, a DHFN mediada por anti-D ainda continua um problema de saúde pública, uma vez em que nem todos os países realizam a profilaxia com Rhlg, principalmente os países em desenvolvimento e em baixo desenvolvimento (Zonneveld et al., 2017).

Diversos outros anticorpos antieritrocitários também tem a capacidade de causar a DHFN, porém apenas para o anti-D existe profilaxia. Além do anti-D, os demais anticorpos contra antígenos do sistema Rh e o anti-K (sistema Kell), são de grande importância, pois podem levar a DHFN grave, incluindo na manifestação de kernicterus (ZWIERs et al., 2018).

O acompanhamento pré-natal é importante para todas as gestantes. A utilização de ultrassonografia com doppler da medida da velocidade de pico

sistólico da artéria cerebral média (MCA-PSV) para diagnóstico precoce de anemia fetal é uma técnica que pode ser utilizada para diminuir procedimentos invasivos (O’Riordan et al., 2022). Os testes imunohematológicos também são utilizados durante o acompanhamento, a fim de avaliar a presença de anticorpos antieritrocitários no plasma materno e o possível desenvolvimento de DHFN (de Winter et al., 2023). Durante o período pré-natal é importante a realização do teste tipagem ABO RhD da mãe, a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) e a identificação do anticorpo irregular (IAI) materno em casos de PAI positiva, a fim de avaliar a possibilidade do desenvolvimento de DHFN. Se possível, também é importante avaliar o fenótipo paterno, uma vez que se o pai possuir o antígeno correspondente ao anticorpo materno há possibilidade de o feto apresentar o antígeno. Entretanto, muitas vezes a avaliação paterna não é realizada ou não está disponível para realização (Sánchez-Durán et al., 2019).

A fenotipagem do feto é possível utilizando técnicas invasivas, como cordocentese. Entretanto, técnicas moleculares podem prever o fenótipo do feto e estimar o risco de DHFN, sem a necessidade de utilização de técnicas invasivas. A utilização do DNA fetal de células livres na circulação materna (cffDNA) é uma alternativa que tem sido realizada em alguns países. A técnica de cffDNA tem sido utilizada para que apenas mulheres RhD negativa com fetos RhD positivos recebam RhIg em países como Alemanha (Tiblad et al., 2013; Papasavva et al., 2016).

1.5 Aplicações da técnica de sequenciamento de DNA na imunohematologia

No âmbito da imunohematologia, a técnica de sequenciamento de DNA pode ser bastante útil para elucidar casos de discrepância entre genotipagem e fenotipagem, para identificação de novas variantes de grupos sanguíneos, assim como, para identificação de novos sistemas. Até o momento, a técnica de sequenciamento pode ser dividida em primeira, segunda e terceira geração.

Descrito inicialmente por Sanger e colaboradores na década de 1970, Smith e colaboradores e Jorgensen e colaboradores aprimoraram a técnica na década de 1980. O sequenciamento de 1ª geração consiste em avaliar a sequência de

nucleotídeos - adenina (A), citosina (C), timina (T) e guanina (G) – utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluorescência. O DNA é sequenciado utilizando eletroforese capilar, em que os fragmentos são separados de acordo com o tamanho, no equipamento há um detector sensível a fluorescência emitida, gerando um gráfico de eletroferograma com a sequência avaliada (TIPU; SHABBIR, 2015).

No âmbito da imunohematologia, o sequenciamento de 1ª geração pode ser utilizado para solucionar os casos de discrepâncias entre genótipo e fenótipo, sendo efetivo para caracterização molecular de variantes. Entretanto, esta técnica apresenta limitações referentes a detecção de InDels e resolução cis/trans de polimorfismos de grupos sanguíneos (Stabentheiner et al., 2011).

Utilizando o sequenciamento de alto rendimento (2ª geração) é possível avaliar vários pequenos fragmentos de DNA (50 a 500 pb), simultaneamente, e identificar InDels acima de 50 pb. As metodologias mais utilizadas são Ion Torrent (sequenciamento semicondutor) e Illumina (técnica de síntese). A metodologia Ion Torrent utiliza a detecção indireta do nucleotídeo a partir da mudança do potencial elétrico após a inserção do nucleotídeo na sequência avaliada. O sequenciamento por Illumina utiliza a detecção direta via fluorescência do nucleotídeo inserido na sequência, esta metodologia permite que a leitura em duas vias do fragmento, ou seja, sequência direta e reversa na mesma análise, apresentando uma taxa de erro de aproximadamente 0,1% (FÜRST et al., 2020). Entretanto, como limitações apresenta dificuldade na leitura de genomas com áreas muito repetitivas, como por exemplo, os genes do sistema Rh (THUN; GUEUNING; MATTLE-GRENINGER, 2023).

A utilização do sequenciamento de 3ª geração permite a leitura de sequências de DNA e RNA longas, não sendo necessária a amplificação por PCR. Dentre as metodologias utilizadas na imunohematologia estão: Sequenciamento em tempo real de molécula única [*The single-molecule real-time* (SMRT)] e o Nanopore (*Oxford Nanopore's MinION*). A técnica SMRT utiliza a detecção de fluorescência emitida pelos nucleotídeos marcados adicionados a sequência pela polimerase, o sinal de fluorescência é identificado em tempo real. O Nanopore MinION realiza o sequenciamento de fita-simples por meio de detecção de alteração meio iônico da membrana do nanoporo de proteína (Fürst et al., 2020).

Dentre as vantagens desta técnica está a possibilidade de identificar variações estruturais amplas, como grandes inserções ou deleções; identificação de genes híbridos e definição de sequências hemizigotas (D parcial e D fraco).

2. Objetivos:

2.1 Objetivo geral

Estudar aspectos moleculares e clínicos do sistema Rh para doação de sangue e DHFN.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Artigo 1

2.2.1.1 Realizar o sequenciamento da região codificante dos genes *RHD* e *RHCE* em amostras de doadores de sangue com discrepância de resultados entre as técnicas de genotipagem e fenotipagem.

2.2.1.2 Avaliar a presença de possíveis variantes que expliquem a discrepância entre genótipo e fenótipo.

2.2.2 Artigo 2

2.2.2.1 Revisar a frequência de anticorpos antieritrocitários em gestantes e o desenvolvimento de DHFN.

3. Artigo 1: Investigation of RHCE phenotype and genotype discrepancies in blood donors of South Brazil

Manuscrito em preparação para submissão à revista *Genetics and Molecular Biology*

Fator de impacto = 2.1

Normas da revista disponíveis em:

<https://www.gmb.org.br/instructions-to-authors>

4. Artigo 2: Hemolytic disease of the fetus and newborn - a perspective of immunohematology

Artigo submetido à revista: ***Hematology, Transfusion and Cell Therapy***

Fator de impacto: 2,1

Normas da revista disponíveis em:

<https://www.sciencedirect.com/journal/hematology-transfusion-and-cell-therapy/publish/guide-for-authors>

Hemolytic disease of the fetus and newborn - a perspective of immunohematology

Short running headline: **HDFN a perspective of immunohematology**

Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues^{a,b} (ORCID 0000-0003-1067-9160), Denise Mattos^b (ORCID 0009-0001-3519-1287), Silvana Almeida^{a,c} (ORCID 0000-0001-7959-3723), Marilu Fiegenbaum^{a,c} (ORCID 0000-0002-5408-2078)

mirelenrodrigues@gmail.com;

denisembio@gmail.com;

salmeida@ufcspa.edu.br;

mariluf@ufcspa.edu.br

Authors' contributions:

MMOR and MF designed the study, performed the systematic literature search, performed data interpretation, and wrote the manuscript; MMOR, DM, SA and MF analyzed the data. All authors were involved in writing the paper and had final approval of the submitted and published versions.

Conflicts of interest:

The authors declare that they have no conflicts of interest.

^a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Programa de Pós-Graduação em Biociências, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Grupo Hospitalar Conceição (GHC), Serviço de Hemoterapia, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author: Marilu Fiegenbaum, Sarmiento Leite 245/403, Centro Histórico, CEP 90050170 - Porto Alegre, RS – Brazil, +55 51 33038773, mariluf@ufcspa.edu.br

Funding:

FAPERGS (PqG 02/2014, 1412373-4 PQG)

Acknowledgements:

We thank FAPERGS (PqG 02/2014, 1412373-4 PQG) for their financial support.

Word count: 3,138

Abstract word count: 181

Number of figures: 2

Number of tables: 4

Hemolytic disease of the fetus and newborn - a perspective of immunohematology

Abstract

Background: Hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) is a public health problem caused by maternal-fetal incompatibility and for most alloantibodies that can induce HDFN, no prophylaxis is available. This study performs a review regarding which antibodies were the most present in maternal plasma and which were involved with HDFN.

Method: 75 studies were included in this review using a systematic search. Two independent authors extracted studies of interest from PubMed and SciELO databases.

Main results: From case reports, 44 cases were extracted, and of these 11 evolved to death. From 17 prevalence studies, the alloimmunization rate was 0.17% (6,007 women) with 161 babies performed intrauterine transfusion (IUT), and 23 performing transfusion. From 28 studies with alloimmunized pregnant women (7,616 women), 455 babies performed IUT, and 21 performed transfusion.

Conclusion: Rh, Kell, and MNS were the most frequent blood systems involved. Geographical distribution of studies points out, that there was a disproportional number in different continents, which enhanced that more studies should perform in different countries. Investing in early diagnosis is important for managing the risks and complications of HDFN.

Keywords: Hemolytic disease of the fetus and newborn, alloimmunization, immunohematology

1.1 Introduction

Hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) is caused by maternal-fetal incompatibility when the mother has an antibody (IgG subclass) against an antigen expressed on the fetal erythrocyte and this antibody crosses the placenta.¹ The presence of alloantibody usually occurs when exposure to non-self-antigens after transfusion, transplantation, or pregnancy results in sensibilization and formation of antibodies against red blood cell (RBC) antigens.² HDFN has different degrees of complications and can be classified into mild, moderate, and severe. Physiopathology results in various complications such as anemia, aplastic anemia, hyperbilirubinemia, fetal hydrops, kernicterus, and death.³

Different maternal alloantibodies can cause HDFN, the most common is anti-D and other Rh antibodies, and Kell.¹ However, antibodies against high prevalence antigens can also cause severe HDFN, as the case report described by Levitt et al (2018).⁴ Administration of prophylactic anti-D immunoglobulin (RhIG) in women RhD negative after delivery of a child RhD positive has significantly reduced the incidence of HDFN related to anti-D in the high-income countries after the 1960s,^{1,5} however, in lower development countries HDFN is a significant problem.⁶ Besides that, pregnant women classified as RhD positive for the D variant (partial D phenotype) and who do not receive RhIG prophylaxis, may develop anti-D antibodies.⁷

Until now ISBT recognized 43 blood group systems and 378 RBC antigens of which 345 are within the blood group system.⁸ No prophylaxis is available to other antibodies from blood groups.¹ In this way, identifying other antibodies implied in HDFN and which alloantibodies were the most frequent in populations could corroborate to new research and development to alloantibodies prophylaxis. In addition, is also important to monitor fetuses and babies with chance to developed HDFN and identify correct the alloantibody involved in HDFN and know the pathophysiology of these, enhancing the safety of the fetus' healthy development. This study

aims to perform a review regarding which antibodies were the most prevalent in maternal plasma and which were involved with HDFN.

1.2 Material and Methods

1.2.1 Eligibility criteria and literature search:

A systematic search performed by two independent authors extracted studies of electronic databases, including MEDLINE (accessed by PubMed) and The Scientific Electronic Library Online (SciELO). The terms used in our search were “hemolytic disease of the fetus and newborn”, “alloimmunization”, “isoimmunization”, “hydrops fetalis”, “fetal hemolytic anemia” using the function “AND” and “OR”. Also, the exact words and synonyms were used as text words for searches in titles and abstracts, we obtained 1690 results. The search restricted studies published between 2013 and 2023.

After reading the title and abstract 101 studies remain. Finally after reading papers, 75 were selected for data collection. To be considered eligible, case report studies should present at least one case identified by the study authors of HDFN (anemia, presence of alloantibody causing anemia). For other study types (cross-sectional, case-control, cohort), the presence of maternal alloimmunization was accepted even though the study did not mention the clinical outcome of the babies or the development of HDFN and mentioned only the risk of development of HDFN. Were excluded, case reports without HDFN, even alloimmunization was present if the newborn or fetus did not present symptoms of HDFN the study was excluded. To case controls, cross-sectional and cohort studies were excluded when alloantibodies did not measure and when the study was only about phenotyping and/or genotyping pregnant without alloimmunization.

1.3 Results

Table 1 shows data collected from case-report studies,^{4,7,9-37} Table 2 presents data from prevalence studies,^{3,5,6,38-51} and Table 3 presents data from alloimmunized pregnant women.^{1,11,52-77} A total of 75 studies were reviewed, 31 case reports, 19 cohorts, 22 cross-sectional, and 3 case-control. One study was classified both in the case report and review and was included in both tables (1 and 3).

Our results extracted from case reports included 47 cases with antibody detection, but 3 cases were excluded because the babies did not show any signs of HDFN, one with anti-H,²² two with anti-Jk3.²⁴ Table 1 presents 44 cases with HDFN, 26 women had already been screened for antibodies before the reported pregnancy. The antibodies implicated as causing HDFN were anti-D (10 cases alone and 5 with antibodies associated), anti-E (3 cases alone and 3 cases antibodies associated), anti-M (6 cases), anti-Jk3 (1 alone and 1 with antibody-associated), anti-Jk^a (1 alone and 1 other antibody associated), anti-G (2 cases with antibodies associated), anti-K (2 alone and 1 other antibody associated), anti-S (2 cases), anti-SARA (2 cases), anti-C (4 cases with antibodies associated), anti-e and anti-A (1 case associated each) and anti-Ku, anti-Goa, anti-Ge3, anti-Kp^a, anti-Rd, anti-HTML and anti-H with one alone each. Regarding the mentioned complications, severe anemia (13 cases), mild anemia (6 cases), and jaundice (12 cases) were the most observed. Of the 44 cases, 11 evolved to death. Of the anti-D cases, two women were D partial^{7,25} responsible for 5 cases of anti-D HDFN. A total of 20 IUTs were performed in 9 fetuses, 16 exchange transfuse in 12 babies and 33 transfusions were performed in 14 babies. Phototherapy were necessary as treatment for 25 patients.

Table 2 presents 17 prevalence studies (15 cross-sectional, 1 cohort, and 1 case-control). A total of 3,555,414 pregnant women were evaluated; of these 6,007 women presented alloantibodies in the gestational period, corresponding to 0.17% of the alloimmunization rate.

HDFN was present in 470 babies, of these 161 babies performed at least one intrauterine transfusion (IUT), 23 performed transfusion, 23 performed exchange transfusion, and 115 performed phototherapy. Four babies had hydrops fetalis, and 20 evolved to death [15 intrauterine death (IUD)].

For alloimmunized pregnant women, 28 studies were included (1 review, 2 casecontrol, 7 cross-sectional, and 18 cohorts) according to Table 3. A total of 7,911 women presented alloantibodies in the gestational period. HDFN was present in 2,996 babies, of these 1,768 babies performed at least one IUT, 397 performed exchange transfusion, 573 performed transfusion, and 1,071 performed phototherapy.

The presence of single or multiple maternal antibodies was input in Table 4 according to present in the original study (alone or with other antibodies), multiple antibodies were found in 1,791 cases. The antibodies were present in maternal plasma and could cause HDFN. From case-report studies, 19 different alloantibodies which cause HDFN in different severities and clinical outcomes were cited. From observational studies the total number of all antibodies present in maternal plasma, even the clinical outcome was not implied in HDFN or was not reported in the original study. ABO incompatibility was found in 3,307 cases.

Figure 1 presents the number of alloantibodies found (alone or with other antibodies). Anti-D was the most present in maternal plasma (4,890 cases), anti-K (2,051 cases), and anti-E (1,566 cases). Figure 2 presents the number of antibodies against RBC antigens classified according to the blood group system. Rh was the most frequent, with 7,358 cases, Kell (2,080 cases), MNS (394 cases), Duffy (237 cases), and Kidd antibodies (200 cases). Anti-Lewis was not mentioned in Figure 1 and Figure 2 because not implied in HDFN.⁷⁸

1.4 Discussion

HDFN is an important public health problem, caused by maternal-fetal incompatibility, which occurs due to RBCs fetal or neonatal hemolysis caused by IgG antibodies transfer through the placenta.² Only the presence of alloantibody on maternal plasma was not sufficient to cause HDFN, it is necessary that antibody cross the placenta and the fetus or neonate have the antigen expressed on his RBC.

In this review, we found 13,966 pregnant women alloimmunized, that anti-D was the most frequent alloantibody (35.01%) followed by anti-K (14.69%), anti-E (11.21%), anti-c (5.48%), anti-C (4.93%) and anti-M (2.35%). From prevalence studies, 0.17% of pregnant women were alloimmunized, and from studies with alloimmunized pregnant women, 36.84% had a baby with HDFN and these numbers could be higher because some studies do not mention newborn clinical outcomes. When verifying the geographical distribution of alloantibodies studies, we found a disproportional number of studies in different continents, the major number of studies was performed in Europe (35 studies), America (16 studies), and Asia (15 studies). These data enhanced the need to perform more studies in different countries, contributing to the understanding of alloimmunization (for example which antibody was the most involved in HDFN) and HDFN in different locations.

The Rh blood system is a highly polymorphic blood group,⁷⁹ until now 56 antigens were described.⁸⁰ The most important antigens are D, E, e, C, c. Table 4 describes antibodies present in the plasma of pregnant alloimmunization, Rh antibodies were found in 7,358 cases of 13,966 cases, alone or with other antibodies, corresponding to 52.69%. From the Rh system, anti-E was the second alloantibody most frequent (Figure 1 and Table 4), followed by anti-c, anti-C, anti-C^w, anti-e, anti-G, anti-f and anti-Go^a. Concern about anti-G alloantibody is important for correct identification of this alloantibody and differentiation of anti-C and anti-D because if the pregnant

does not present anti-D the prophylaxis is strongly recommended to avoid alloimmunization to anti-D.^{18,28}

ABO maternal-fetal incompatibility is frequent because ABO antibodies were developed naturally, Table 4 presents 3,307 cases of these, Matteocci et al⁴⁶ analyzed HDFN due to ABO incompatibility, 81 babies had a direct antiglobulin test (DAT) positive, and 32 requiring invasive treatments (exchange transfusion or intravenous immunoglobulins) (Table 2).⁴⁶ When ABO incompatibility was present, historically blood group O was associated with reduced alloimmunization to other blood group antigens because of the presence of anti-A/anti-B antibodies in maternal plasma, these could occur because of the clearance of A or B fetal red cells in maternal plasma mediated by ABO antibodies. This clearance could avoid other alloimmunizations. Doyle et al (2014) analyzed anti-D levels and IUT, when comparing IUT between ABO blood group, A women have a high risk of carrying a fetus with significant HDFN compared with O women.⁵²

After Rh alloantibodies, Kell alloantibodies are the second to matter in HDFN.⁴⁴ Anti-K is associated with the risk of HDFN, and the titer did not always necessarily correlate to the clinical severity of HDFN.²⁶ However, in a retrospective cohort that evaluated 1026 Kell immunized pregnancies, 93 with K-positive fetuses established a cut-off value to risk for severe HDFN, a value of 4 was the best titer to select the risk of severe HDFN.⁴⁴ Still, there is the occurrence of severe cases of HDFN with low titer anti-K, demonstrating there is no correlation between clinical outcome and titer.⁸¹ Therefore any case of anti-K positive pregnancy should be accompanied when fetus phenotype was not possible to predict because of anti-K cause erythropoiesis suppression and the destruction of erythroid progenitors.

Anti-M is one alloantibody with the presence of IgM and IgG antibodies, when IgG is present could cross the placenta and cause HDFN in variable degrees. A review of the Japanese

population presented thirty-three cases of HDFN caused by anti-M, of those twenty-nine with severe HDFN, five present IgG subclass (IgG1 or IgG3).¹¹ Six case reports caused by anti-M (Table 1) present HDFN, three with different titer and clinical outcomes, in which three newborns required transfusion (RBC and platelet), one required intrauterine transfusion for severe fetal anemia, and 2 intrauterine death caused by anti-M. These data showed that severity was independent of the anti-M titer and the importance of differentiation of IgG and IgM antibody class.^{11,13,21}

The physiopathology of anti-M is similar to anti-K and anti-Ge3 (anti-Gerbich) the mechanism involving apoptotic or erythropoietic suppression, which differs from the physiopathology of anti-D which is extracellular hemolysis.⁸²

Kidd blood group antigens imply hemolytic transfusion reaction (HTR) and HDFN. The most common antibodies are anti-Jk^a and anti-Jk^b, which are involved in mild to severe HDFN. There is also another antibody, anti-Jk3 which can be induced by alloimmunization in a Kidd null phenotype people.²⁴ That antibody, reacts with both antigens, Jk^a and Jk^b.²⁴ In HDFN the anti-Jk3 titers remain unclear to measure clinical significance risk HDFN, according to Lawicki et al,²⁴ titers of 16 or 32 or greater should be fetal monitoring for HDFN.

Multiple maternal alloantibodies could represent an increased risk of developing HDFN, one study from Israel showed that 6.8% of pregnancies with multiple alloantibodies developed a severe HDFN.³ Phung et al (2018) compared the mean estimated daily decrease in Hb between the first and second IUT when the pregnant had only anti-D and when anti-D was associated with two other antibodies showing that the decrease was lower when the pregnant had only anti-D.⁵⁸ These datasets corroborate that the presence of multiple maternal alloantibodies could imply an increase in the risk of severity of HDFN. In this review, Table 4 presents data extracted from

observation studies with the presence of multiple maternal antibodies and six case reports in which the HDFN was caused by the presence of multiple alloantibodies.^{6,7,16–18,24,37,38,40,43,58}

One key factor in the risk of HDFN is the antibody class, IgM antibodies were not implied in HDFN because they were not capable of crossing the placenta. IgG antibodies cross the placenta and could cause HDFN. IgG was subclassified into IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4. The severity of HDFN could be related to the IgG subclass, IgG1, and IgG3 cause severe HDFN, and these parameters should be included in protocols for measuring the intensity of the HDFN.⁴⁰

When all antigens' sites were occupied by the respective antibody the reaction of these erythrocytes with commercial antisera produced a false negative phenotype in the antihuman globulin (AHG) phase.²⁶ These cases are rare but could occur when a direct antiglobulin test is positive. Using methods without AHG phase with saline monoclonals IgM antiserum is an option to solve these cases, but these reagents were not always available.⁸³ IgG blocking technique could be used for RBCs that have a weak to moderately positive (2+) DAT,⁸⁴ other methods use acid/EDTA elution, chloroquine diphosphate (CPD), and heat elution to remove IgG from RBCs.²⁶

Molecular tests present an option to solve cases of false negative phenotype newborns. Novoselac et al (2020) used a genotyping test (PCR-SSP) to confirm baby *K*01/K*02* genotype and solve an anti-K mediated HDFN.²⁶ Lawicki et al (2018) also used genotyping test (PCR-SSP) to confirm baby *JK*A/JK*B* genotype and solve an HDFN mediated by anti-Jk3.²⁴

Knowing the molecular basis of blood group antigens is also important to understanding predicting phenotype and the formation of null alleles which might cause a lack of expression of the phenotype. The ISBT presents all blood groups' antigens discovered until now and genes involved in the antigen's expression. The null phenotype was caused by different mutations in the genes. However, some had more frequency in population groups, for example, Fy null (c.1-67T>C,

rs2814778) in African descendants⁸⁵ and Jk null caused by T871C mutation in Polynesian descendants which cause Jk^b null expression.⁸⁶

Sequencing tests are useful to understand unexplained discrepancies between phenotype and genotype, discover antigens variants, such as Rh variants, and predict the risk and significance of alloimmunization causes HDFN and HTR.²⁵ To understand the risk of HDFN is recommended performed maternal and paternal phenotyping or genotyping testing to predict fetal phenotype.⁶⁶ However, paternal phenotyping is not available to all cases of suspect HDFN,²⁴ which could be a potential confounder in HDFN analysis.

The screening of irregular erythrocyte antibodies, antibody identification panel, and maternal antibody titer using the indirect antiglobulin test (IAT) during prenatal care is important for correct diagnosis and early clinical intervention associated with image diagnosis, as Doppler measurement of peak velocity of systolic blood flow in the middle cerebral artery (PVS-MCA).⁶⁵ The corrected identification of maternal alloantibodies and estimated risk of the fetus carrying the RBC antigen is important in prenatal considering the risk of fetal anemia and newborn anemia.⁷⁷ The precise identification of one or multiple alloantibodies and their clinical significance help to select RBC units for transfusion without the presence of the correspondent antigens, when IUTs were needed, and after birth if the newborn needed any transfusion. In the newborn is important to perform DAT, and if DAT is positive, perform an elution to identify the antibody bound on the RBC membrane.⁷⁸

Some developed countries use non-invasive prenatal with cell-free fetal DNA (cffDNA) circulating in the maternal plasma of pregnant women to perform fetus genotype and estimate the risk of HDFN.⁸⁷ To RhD incompatibility performing cffDNA is an efficient prevention strategy because providing anti-D prophylaxis only if the fetus is RhD-positive.⁶¹ To other RBC antigens cffDNA is useful to determine if the fetus presents the antigens which the mother has

alloantibodies and determine the risk of development HDFN. That method is not invasive but is not available for all hemotherapy services.

IUTs was needed at least one time in 1,938 fetus in this review however, this data was limited because some studies did not mention fetal outcomes. IUT is an intervention related to anemia severity, and early IUT (before 20 weeks) is associated with a higher risk of fetal damage.⁷³ Despite the risk, IUT is an important intervention to treat fetal anemia. The need for IUT should be considered in prenatal care. However, there is a high difference between countries' prenatal care and some pregnant women who need an IUT could not receive an IUT when it is needed.

Unfortunately, some countries do not screen all pregnant women for alloantibodies, due to many reasons such as the absence of a universal access program for all pregnant women, failure to recognize events in pregnancy that could trigger an alloimmunization, and geographical difficulties in accessing a hemotherapy reference center.⁷⁷

1.5 Conclusions:

Investing in early diagnosis is important for the management of risks and complications of the development of HDFN. Approaches using serological and molecular tests were useful in the early diagnosis. Knowing the physiopathology of alloantibody is also helpful in understanding this pathology's evolution. Furthermore, considering the highest population diversity of blood group alleles, there is a need to research the frequency of pregnant alloimmunization and HDFN in different populations.

References

1. Zwiers C, Koelewijn JM, Vermij L, et al. ABO incompatibility and RhIG immunoprophylaxis protect against non-D alloimmunization by pregnancy. *Transfusion (Paris)*. 2018;58(7):1611-1617. doi:10.1111/trf.14606

2. Gupta GK, Balbuena-Merle R, Hendrickson JE, Tormey CA. Immunohematologic aspects of alloimmunization and alloantibody detection: A focus on pregnancy and hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion and Apheresis Science*. 2020;59(5). doi:10.1016/j.transci.2020.102946

3. Rahimi-Levene N, Chezard J, Yahalom V, et al. Red blood cell alloimmunization prevalence and hemolytic disease of the fetus and newborn in Israel: A retrospective study. *Transfusion (Paris)*. 2020;60(11):2684-2690. doi:10.1111/trf.15987

4. Levitt RN, Gourri E, Gassner C, et al. Molecular characterization and multidisciplinary management of Gerbich hemolytic disease of the newborn. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(6):4-7. doi:10.1002/pbc.27014

5. Chatziantoniou V, Heeney N, Maggs T, et al. A descriptive single-centre experience of the management and outcome of maternal alloantibodies in pregnancy. *Transfusion Medicine*. 2017;27(4):275-285. doi:10.1111/tme.12430

6. Zonneveld R, Kanhai HHH, Lamers M, Brand A, Zijlmans WCWR, Schonewille H. D antibodies in pregnant women in multiethnic Suriname: the observational RheSuN study. *Transfusion (Paris)*. 2017;57(10):2490-2495. doi:10.1111/trf.14235

7. Quantock KM, Lopez GH, Hyland CA, et al. Anti-D in a mother, hemizygous for the variant RHD*DNB gene, associated with hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion (Paris)*. 2017;57(8):1938-1943. doi:10.1111/trf.14156

8. Gassner C, Castilho L, Chen Q, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Report of Basel and three virtual business meetings: Update on blood group systems. Vox Sang. Published online 2022.
doi:10.1111/vox.13361
9. Usman AS idu, Mustaffa R, Ramli N, Diggi SA. Hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-E. Asian J Transfus Sci. 2013;7(1):84-85. doi:10.4103/0973- 6247.106750
10. Pitan C, Syed A, Murphy W, Akinlabi O, Finan A. Anti-S antibodies: An unusual cause of haemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN). BMJ Case Rep. Published online 2013:2012-2014. doi:10.1136/bcr-2012-006547
11. Yasuda H, Ohto H, Nollet KE, et al. Hemolytic disease of the fetus and newborn with late-onset anemia due to anti-M: A case report and review of the Japanese literature. Transfus Med Rev. 2014;28(1):1-6. doi:10.1016/j.tmr.2013.10.002
12. Reddy V, Kohan R. Severe hemolytic disease of fetus and newborn due to Anti-S antibodies. J Clin Neonatol. 2014;3(2):128. doi:10.4103/2249-4847.134719
13. Arora S, Doda V, Maria A, Kotwal U, Goyal S. Maternal anti-M induced hemolytic disease of newborn followed by prolonged anemia in newborn twins. Asian J Transfus Sci. 2015;9(1):98-101. doi:10.4103/0973-6247.150968
14. Mittal K, Sood T, Bansal N, Bedi RK, Kaur P, Kaur G. Clinical Significance of Rare Maternal Anti Jka Antibody. Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion. 2016;32(4):497-499.
doi:10.1007/s12288-016-0688-5
15. Mattaloni SM, Arnoni C, Céspedes R, et al. Clinical Significance of an Alloantibody against the Kell Blood Group Glycoprotein. Transfusion Medicine and Hemotherapy. 2017;44(1):53-57.
doi:10.1159/000448381

16. DeMoss P, Asfour M, Hersey K. Anti-K1 (Kell) Antibody Expressed in Maternal Breastmilk: A Case Report of a Neonate with Multiple Intrauterine Transfusions and Postnatal Exposure to Kell Antibody in Maternal Breastmilk. *Case Rep Pediatr.* 2017;2017:1-4. doi:10.1155/2017/6927813

17. Li M, Blaustein JC. Persistent hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) associated with passive acquisition of anti-D in maternal breast milk. *Transfusion (Paris).* 2017;57(9):2121-2124. doi:10.1111/trf.14171

18. Yousuf R, Mustafa A, Ho SL, Tang YL, Leong CF. Anti-G with concomitant anti-C and antiD: A case report in a pregnant woman. *Asian J Transfus Sci.* 2017;11(1):62-64. doi:10.4103/0973-6247.200770

19. Venkataraman R, Yusuf K. Intravenous immunoglobulin in the management of a rare cause of hemolytic disease of the newborn: Anti-SARA antibodies. *J Neonatal Perinatal Med.* 2017;10(3):329-332. doi:10.3233/NPM-16131

20. Rauch S, Ritgen J, Wißkirchen M, Bauerfeind U, Kohne E, Weinstock C. A case of anti-Rd causing fetal anemia. *Transfusion (Paris).* 2017;57(6):1485-1487. doi:10.1111/trf.14078

21. Hubinont C, Delens G, Vanalbada De Haan Hettema J, Lambert C, Debauche C, Biard JM. Successful management of a severe anti-M alloimmunization during pregnancy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* 2017;217:175-176. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.07.024

22. Bullock T, Win N, Jackson B, Sivarajan S, Penny J, Mir N. Bombay phenotype (O h) and high-titer anti-H in pregnancy: two case reports and a review of the literature. *Transfusion (Paris).* 2018;58(12):2766-2772. doi:10.1111/trf.14906

23. Millard GM, McGowan EC, Wilson B, et al. A proposed new low-frequency antigen in the Augustine blood group system associated with a severe case of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion (Paris)*. 2018;00(February):3-5. doi:10.1111/trf.14562

24. Lawicki S, Coberly EA, Lee LA, Johnson M, Eichbaum Q. Jk3 alloantibodies during pregnancy-blood bank management and hemolytic disease of the fetus and newborn risk. *Transfusion (Paris)*. 2018;00:1-6. doi:10.1111/trf.14548

25. Turley E, McGowan EC, Hyland CA, et al. Severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to allo-anti-D in a patient with a partial DEL phenotype arising from the variant allele described as RHD*148+1T (RHD*01EL.31). *Transfusion (Paris)*. 2018;58(10):2260-2264. doi:10.1111/trf.14944

26. Novoselac J, Raos M, Tomac G, Lukić M, Golubić Ćepulić B. K antigens on neonatal red blood cells blocked by anti-K with titer of 32. *Immunohematology*. 2020;36(2):54-57. doi:10.21307/immunohematology-2020-041

27. Unterscheider J, Ryan H, Morrison JJ, Malone FD. Intrauterine red cell transfusion for anti-Kell isoimmunization in a fetus with Glanzmann's thrombasthenia. *Prenat Diagn*. 2013;33(11):1107-1109. doi:10.1002/pd.4201

28. Houston BL, Govia R, Abou-Setta AM, et al. Severe Rh alloimmunization and hemolytic disease of the fetus managed with plasmapheresis, intravenous immunoglobulin and intrauterine transfusion: A case report. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015;53(3):399-402. doi:10.1016/j.transci.2015.07.010

29. Kamei K, Yamaguchi K, Sato M, et al. Successful treatment of severe rhesus D incompatible pregnancy with repeated double-filtration plasmapheresis. *J Clin Apher*. 2015;30(5):305-307. doi:10.1002/jca.21372

30. Zineb B, Boutaina L, Ikram L, Driss MR, Mohammed D. Alloimmunisation foetomaternelle Rhésus grave à propos d'un cas et revue de la littérature. *Pan African Medical Journal*. 2015;22:4-5. doi:10.11604/pamj.2015.22.137.3508

31. Colpo A, Tison T, Gervasi MT, et al. Personalized treatment with immunoadsorption and intravenous immunoglobulin in a case of severe Rh alloimmunization during pregnancy unresponsive to plasma – exchange. *Transfusion and Apheresis Science*. 2017;56(3):480-483. doi:10.1016/j.transci.2017.05.024

32. Lee TTSM, Clarke P, Prosser-Snelling E. Haemolytic disease of the fetus and newborn diagnosed after delivery of a baby to a mother with low anti-E antibody titres. *BMJ Case Rep*. 2019;12(9). doi:10.1136/bcr-2019-229816

33. Riis SST, Joergensen MH, Rasmussen KF, et al. Transient congenital hyperinsulinism and hemolytic disease of a newborn despite rhesus D prophylaxis: a case report. *J Med Case Rep*. 2021;15(1). doi:10.1186/s13256-021-03167-9

34. Souabni SA, Habib B El, Oubahha I, Baqali J El, Aboufalah A, Soummani A. Severe neonatal thrombocytopenia due to maternal alloimmunization: Case report and literature review. *Pan African Medical Journal*. 2021;38:1-8. doi:10.11604/pamj.2021.38.67.26353

35. Pina Moreno J, Ortega Abad V, Perez Corral A, Garcia-Tizon Larroca S. Maternal mirror syndrome with foetal hydrops due to isoimmunization by anti-KPa antibodies: A case report and narrative literature review. *Clin Case Rep*. 2022;10(2). doi:10.1002/ccr3.5484

36. Fives KR, Chism DA, Beetz B, Elkins I, Butala M. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn Due to Anti-Gonzales Antibody. *Cureus*. Published online March 29, 2023. doi:10.7759/cureus.36860

37. Mandal S, Malhotra S, Negi G, et al. Severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-E and anti-Jka. *Immunohematology*. 2020;36(2):60-63.
doi:10.21307/immunohematology-2020-043
38. Altuntas N, Yenicesu I, Himmetoglu Ö, et al. The risk assessment study for hemolytic disease of the fetus and newborn in a University Hospital in Turkey. *Transfusion and Apheresis Science*. 2013;48(3):377-380. doi:10.1016/j.transci.2013.04.021
39. Hassan MN, Noor NHM, Noor SRJ, Sukri SA, Mustafa R, Aster HVRL. Hemolytic disease of fetus and newborn due to maternal red blood cell alloantibodies in the Malay population. *Asian J Transfus Sci*. 2014;8(2):113-117. doi:10.4103/0973-6247.137449
40. Velkova E. Correlation between the amount of anti-D antibodies and IgG subclasses with severity of haemolytic disease of foetus and newborn. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2015;3(2):293-297. doi:10.3889/oamjms.2015.058
41. Krstic JL, Dajak S, Bingulac-Popovic J, Dogic V, Mratinovic-Mikulandra J. Anti-D Antibodies in Pregnant D Variant Antigen Carriers Initially Typed as RhD+. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2016;43(6):419-424. doi:10.1159/000446816
42. Sidhu M, Bala R, Akhtar N, Sawhney V. Prevalence, Specificity and Titration of Red Cell Alloantibodies in Multiparous Antenatal Females at a Tertiary Care Centre from North India. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2016;32(3):307-311. doi:10.1007/s12288-015-0593-3
43. Peeters B, Geerts I, Badts AM, Saegeman V, Moerman J. Usefulness of maternal red cell antibodies to predict hemolytic disease of the fetus and newborn and significant neonatal hyperbilirubinemia: A retrospective study. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(9):e202-e205.
doi:10.1515/cclm-2016-0545

44. Slootweg YM, Lindenburg IT, Koelewijn JM, van Kamp IL, Oepkes D, de Haas M. Predicting anti-Kell-mediated hemolytic disease of the fetus and newborn: diagnostic accuracy of laboratory management. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;219(4):393.e1-393.e8. doi:10.1016/j.ajog.2018.07.020
45. Kahar M. Frequency of Red Cell Alloantibodies in Pregnant Females of Navsari District: An Experience that Favours Inclusion of Screening for Irregular Erythrocyte Antibody in Routine Antenatal Testing Profile. *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*. 2018;68(4):300-305. doi:10.1007/s13224-017-0984-5
46. Matteocci A, de Rosa A, Buffone E, Pierelli L. Retrospective analysis of HDFN due to ABO incompatibility in a single institution over 6 years. *Transfusion Medicine*. 2019;29(3):197-201. doi:10.1111/tme.12512
47. Mbalibulha Y, Muwanguzi E, Mugenyi GR, Natukunda B. Occurrence of anti-D alloantibodies among pregnant women in Kasese District, Western Uganda. *J Blood Med*. 2015;6:125-129. doi:10.2147/jbm.s80977
48. Girault A, Friszer S, Maisonneuve E, Guilbaud L, Cortey A, Jouannic JM. Intrauterine blood transfusion: Status report of 4 years of practice in France (2011–2014). *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2017;46(2):119-124. doi:10.1016/j.jogoh.2016.09.001
49. Moinuddin I, Fletcher C, Millward P. Prevalence and specificity of clinically significant red cell alloantibodies in pregnant women-a study from a tertiary care hospital in Southeast Michigan. *J Blood Med*. 2019;10:283-289. doi:10.2147/JBM.S214118
50. Özköse ZG, Oğlak SC. The combined effect of anti-D and non-D rh antibodies in maternal alloimmunization. *Turk J Obstet Gynecol*. 2021;18(3):181-189. doi:10.4274/tjod.galenos.2021.68822

51. Ali NMA, Mohamed AA. Frequency and specificity of red blood cells alloantibodies among Sudanese multiparous women. *Journal of Bioscience and Applied Research*. 2022;0(0):89-92.

doi:10.21608/jbaar.2022.229094

52. Doyle B, Quigley J, Lambert M, et al. A correlation between severe haemolytic disease of the fetus and newborn and maternal ABO blood group. *Transfusion Medicine*. 2014;24(4):239-243. doi:10.1111/tme.12132

53. Kapur R, della Valle L, Sonneveld M, et al. Low anti-RhD IgG-Fc-fucosylation in pregnancy: A new variable predicting severity in haemolytic disease of the fetus and newborn. *Br J Haematol*. 2014;166(6):936-945. doi:10.1111/bjh.12965

54. Verduin EP, Brand A, van de Watering LMG, et al. Factors associated with persistence of red blood cell antibodies in woman after pregnancies complicated by fetal alloimmune haemolytic disease treated with intrauterine transfusions. *Br J Haematol*. 2015;168(3):443-451. doi:10.1111/bjh.13130

55. Kristinsdóttir T, Kjartansson S, Hardardóttir H, Jonsson T, Halldorsdóttir AM. Positive Coomb's test in newborns; causes and clinical consequences Summary of cases diagnosed in the Blood Bank in the years 2005 to 2012. *Laeknabladid*. 2016;2016(0708):326-331. doi:10.17992/lbl.2016.0708.90

56. Stetson B, Scrape S, Markham K. Anti-M Alloimmunization: Management and Outcome at a Single Institution. *American Journal of Perinatology Reports*. 2017;07(04):e205- e210. doi:10.1055/s-0037-1607028

57. Sonneveld ME, Koelewijn J, de Haas M, et al. Antigen specificity determines anti-red blood cell IgG-Fc alloantibody glycosylation and thereby severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Br J Haematol*. 2017;176(4):651-660. doi:10.1111/bjh.14438

58. Phung TV, Houfflin-Debarge V, Ramdane N, et al. Maternal red blood cell alloimmunization requiring intrauterine transfusion: A comparative study on management and outcome depending on the type of antibody. *Transfusion (Paris)*. Published online 2018.

doi:10.1111/trf.14542

59. Rath MEA, Smits-Wintjens VEJ, Lindenburg ITM, et al. Postnatal outcome in neonates with severe Rhesus c compared to Rhesus D hemolytic disease. *Transfusion (Paris)*.

2013;53(7):1580-1585. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03937.x

60. Smits-Wintjens VEJ, Rath MEA, Van Zwet EW, et al. Neonatal morbidity after exchange transfusion for red cell alloimmune hemolytic disease. *Neonatology*. 2013;103(2):141- 147.

doi:10.1159/000343261

61. Tiblad E, Westgren M, Pasupathy D, Karlsson A, Wikman AT. Consequences of being Rhesus D immunized during pregnancy and how to optimize new prevention strategies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2013;92(9):1079-1085. doi:10.1111/aogs.12193

62. Garabedian C, Rakza T, Thomas D, et al. Neonatal outcome after fetal anemia managed by intrauterine transfusion. *Eur J Pediatr*. 2015;174(11):1535-1539. doi:10.1007/s00431-015-2573-x

63. Garabedian C, Vaast P, Behal H, et al. Management of severe fetal anemia by Doppler measurement of middle cerebral artery: are there other benefits than reducing invasive procedures? *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*.

2015;192:27-30. doi:10.1016/j.ejogrb.2015.06.016

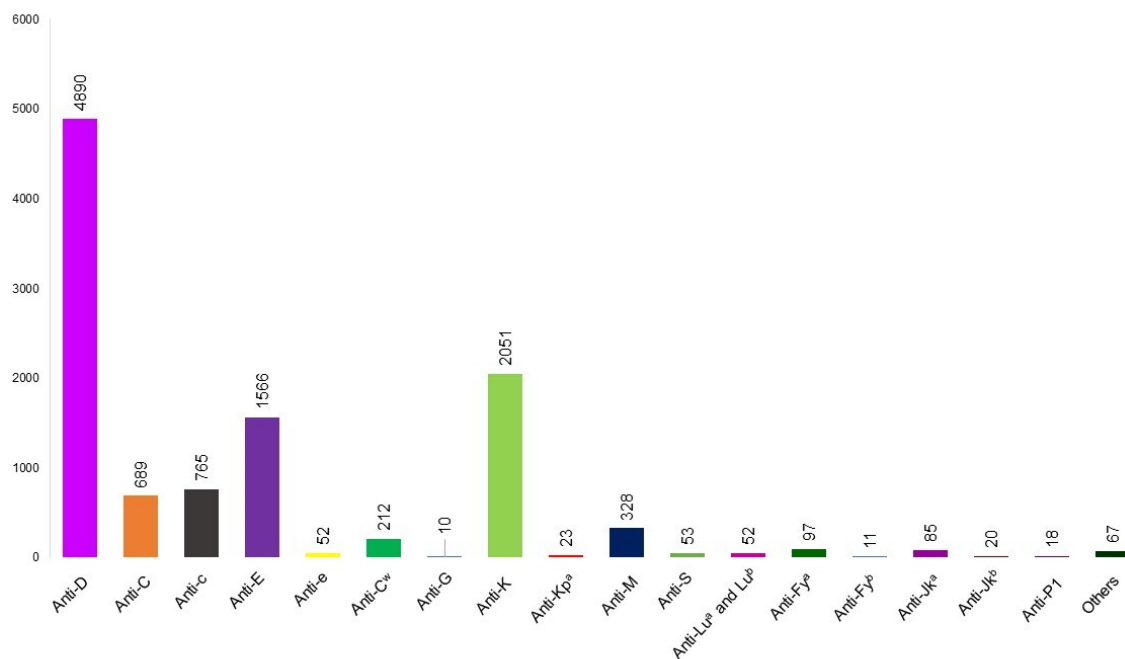
64. Philip J, Jain N. Antenatal Maternal Serum IAT Titer and Fetal Outcome in Rh Isoimmunized Pregnancies. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2015;31(1):137-141. doi:10.1007/s12288-014-0390-4

65. Healsmith S, Savoia H, Kane SC. How clinically important are non-D Rh antibodies? *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2019;98(7):877-884. doi:10.1111/aogs.13555
66. Sánchez-Durán MÁ, Higuera MT, Halajdian-Madrid C, et al. Management and outcome of pregnancies in women with red cell isoimmunization: A 15-year observational study from a tertiary care university hospital. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019;19(1). doi:10.1186/s12884-019-2525-y
67. Snelgrove JW, D'souza R, Seaward PGR, Windrim R, Kelly EN, Ryan G. Predicting Intrauterine Transfusion Interval and Perinatal Outcomes in Alloimmunized Pregnancies: Time-to-Event Survival Analysis. *Fetal Diagn Ther*. 2019;46(6):425-432. doi:10.1159/000499972
68. Crawford NEH, Parasuraman R, Howe DT. Intraperitoneal transfusion for severe, early-onset rhesus disease requiring treatment before 20 weeks of gestation: A consecutive case series. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2020;244:5-7. doi:10.1016/j.ejogrb.2019.10.027
69. Gudlaugsson B, Hjartardottir H, Svansdottir G, et al. Rhesus D alloimmunization in pregnancy from 1996 to 2015 in Iceland: a nation-wide population study prior to routine antenatal anti-D prophylaxis. *Transfusion (Paris)*. 2020;60(1):175-183. doi:10.1111/trf.15635
70. Lieberman L, Callum J, Cohen R, et al. Impact of red blood cell alloimmunization on fetal and neonatal outcomes: A single center cohort study. *Transfusion (Paris)*. 2020;60(11):2537-2546. doi:10.1111/trf.16061
71. Şavkli AÖ, Çetin BA, Acar Z, et al. Perinatal outcomes of intrauterine transfusion for foetal anaemia due to red blood cell alloimmunisation. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2020;40(5):649-653. doi:10.1080/01443615.2019.1647521

72. Liu S, Ajne G, Wikman A, Lindqvist C, Reilly M, Tiblad E. Management and clinical consequences of red blood cell antibodies in pregnancy: A population-based cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2021;100(12):2216-2225. doi:10.1111/aogs.14261
73. Maisonneuve E, Dugas A, Friszer S, et al. Effect of intravenous immunoglobulins to postpone the gestational age of first intrauterine transfusion in very severe red blood cell alloimmunization: A case-control study. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2021;50(7). doi:10.1016/j.jogoh.2021.102119
74. Lee AJ, Leonard A, Markham KB. Fetal and Neonatal Reticulocyte Count Response to Intrauterine Transfusion for the Treatment of Red Blood Cell Alloimmunization. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2022;44(8):E1046-E1049. doi:10.1097/MPH.0000000000002450
75. Vlachodimitropoulou E, Garbowski M, Anne Solomon S, et al. Outcome predictors for maternal red blood cell alloimmunisation with anti-K and anti-D managed with intrauterine blood transfusion. *Br J Haematol*. 2022;196(4):1096-1104. doi:10.1111/bjh.17956
76. Ghesquière L, Leroy J, Deken V, et al. Anti-RH1 alloimmunization: At what maternal antibody threshold is there a risk of severe fetal anemia? *Transfusion (Paris)*. 2023;63(3):629-637. doi:10.1111/trf.17264
77. Kureba AA, Gudu W, Mersha A, Jemal E, Abdosh AA. Perinatal Outcome of Pregnant Women with RhD Sensitization: A Five-Year Cross-Sectional Study at a Tertiary Care Hospital in Ethiopia. *Int J Womens Health*. 2023;15:571-578. doi:10.2147/IJWH.S402373
78. Acker J, Alquist CR, Jr CA, et al. Technical Manual. 20th ed. (Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, eds.); 2020.
79. Dean L. The Rh blood group. In: *Blood Groups and Red Cell Antigens*. National Center for Biotechnology Information (US); 2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2269/>

80. ISBT. Names for RH (ISBT 004) Blood Group Alleles: RHCE Alleles. Published March 31, 2022. Accessed September 4, 2023. <https://www.isbtweb.org/isbt-workingparties/rcibgt/blood-group-terminology.html>
81. Sun JB. The prenatal intervention of pregnancy complicated with anti-Kell isoimmunization: a review. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2021;34(17):2893-2899. doi:10.1080/14767058.2019.1671330
82. Hitoshi O, Denomme GA, Shoichi I, Atsushi I, Nollet KE, Hiroyasu Y. Three non-classical mechanisms for anemic disease of the fetus and newborn, based on maternal anti-Kell, anti-Ge3, anti-M, and anti-Jra cases. *Transfusion and Apheresis Science*. 2020;59(5). doi:10.1016/j.transci.2020.102949
83. Covas DT, Langhi Junior DM, Bordin JO. Hemoterapia: Fundamentos e Prática. Atheneu; 2007.
84. Sererat TS, Veidt D, Dutched A. A quick and simple method for phenotyping IgG sensitized red blood cells. *IMMUNOHEMATOLOG*. 2000;16(4):154-156. doi:10.21307/immunohematology-2019-598
85. Höher G, Fiegenbaum M, Almeida S. Molecular basis of the Duffy blood group system. *Blood transfusion*. Published online 2017:1-8. doi:10.2450/2017.0119-16
86. Irshaid NM, Henry SM, Olsson ML. Genomic characterization of the Kidd blood group gene: different molecular basis of the Jk(a-b-) phenotype in Polynesians and Finns. *Immunohematology*. 2000;40(1):69-74. doi:10.1046/j.1537-2995.2000.40010069.x.
87. Papasavva T, Martin P, Legler TJ, et al. Prevalence of RhD status and clinical application of non-invasive prenatal determination of fetal RHD in maternal plasma: A 5 year experience in Cyprus. *BMC Res Notes*. 2016;9(1):1-8. doi:10.1186/s13104-016-2002-x

88. Yousuf R, Mustafa A, Ho SL, Tang YL, Leong CF. Anti-G with Concomitant Anti-C and Anti-D: A Case Report in a Pregnant Woman.; 2017. <http://www.medknow.com>
89. Philip J, Kushwaha N, Jain N. Report of two cases of anti-M antibody in antenatal patients. Asian J Transfus Sci. 2015;9(1):89-91. doi:10.4103/0973-6247.150963

Figures:**Figure 1:** RBC antibodies present in maternal plasma.

Others: anti-N (n=7), anti-U (n=7), anti-Yta (n=6), anti-Bga (n=6), anti-s (n=5), anti-Cra (n=5), anti-f (n=4), anti-k (n=4), anti-Vel (n=3), anti-Jk3 (n=3), anti-SARA (n=2), anti-H (n=2), anti-Chido (n=2), anti-Jra (n=2), anti-Wra (n=2), anti-Goa , anti-Kna , anti-Ku, anti-Kpb , anti-Cha , anti-Rd, anti-ATML, anti-Ge3 (n=1 each)

Figure 2: RBC blood group system present in maternal plasma

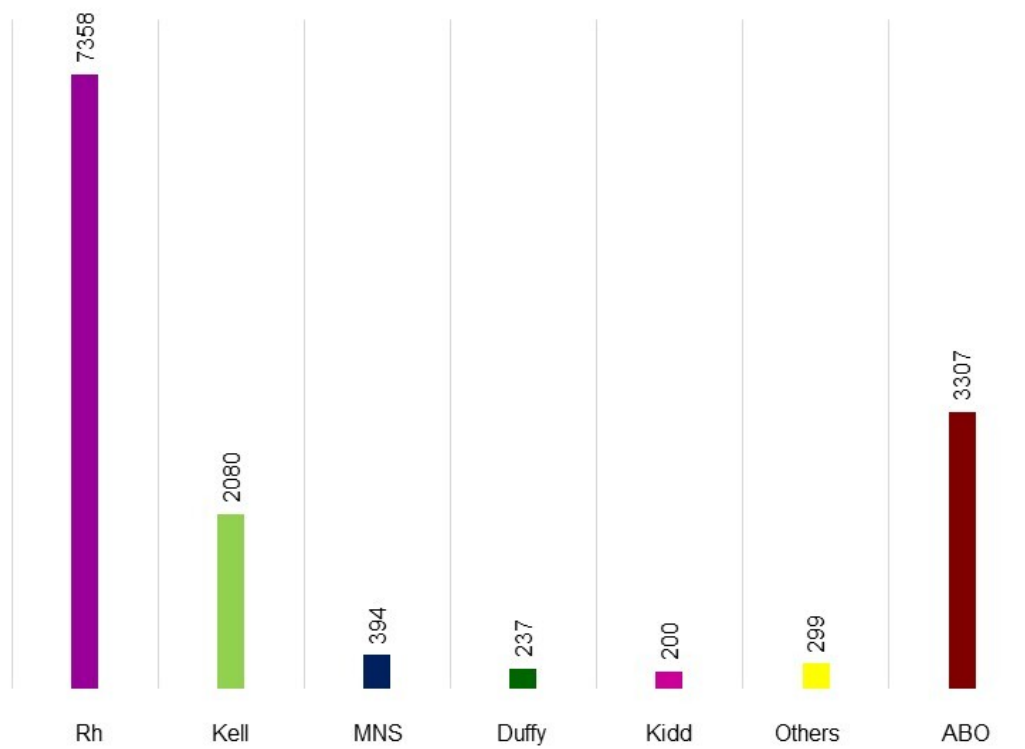


Table 1: RBC alloantibodies in case-report studies

Case	First author, year	Country	Pregnant woman				Infant							outcome
			P	Previous histories of antibody screening	Antibody	Titer	DAT	Highest Bil	Lowest Hb	Major complaint	Intervention			
								(mg/dL)	(g/dL)		RBC Intrau Tr	Ex tr	Other Tr	
1	Usman et al, 2013 ⁹	Malaysia		na	anti-E	na	+	23.45	6.2	jaundice, severe anemia, thrombocytopenia		1*	IVIG, photo	alive
2				na	anti-E	na	+	na	10.2	jaundice, mild anemia		1	IVIG, photo, 1 fresh frozen plasma transfusion	alive
3	Pitan et al, 2013 ¹⁰	Ireland		Yes	anti-S	64	+	9.59	5.23	hepatosplenomegaly, hypocalcemia		1	IVIG, photo, calcium infusion, and platelet transfusion	alive
4	Unterscheider et al, 2013 ²⁷	Ireland	P3	yes	anti-K	512	na	na	Na	severe anemia	1			death
5	Yasuda et al, 2014 ¹¹	Japan		Yes	anti-M	4	-	17.00	6.7	severe anemia		6	IVIG, photo, corticosteroid	alive
6	Reddy and Kohan, 2014 ¹²	Australia		Yes	anti-S	na	+	11.70	8.1		1		IVIG, photo, platelet transfusion	alive
7	Arora et al, 2015 ¹³	India	T1	na	anti-M	32	-	na	Na	jaundice, prolonged anemia		3	photo	alive
8			T2	na		32	-	na	Na	jaundice, prolonged anemia		2	photo	alive

9	Houston et al, 2015 ²⁸	Canada	P4	No	anti-D, -C	1,096 2,048 (anti-D), 4 (anti-C)	na	na	Na	hydrops fetalis	2			death
10			P5	Yes	anti-D, -C		na	180	18	hydrops fetalis, severe anemia	6	photo		alive
11	Kamei et al, 2015 ²⁹	Japan	P5	Yes	anti-D	512	+	Na	11.2		1	photo		alive
12	Zineb et al, 2015 ³⁰	Maroc		Yes	anti-D	na	na	na	6	hepatomegaly, hydrops fetalis	1			death
13	Mittal et al, 2016 ¹⁴	India		na	anti-Jk ^a	64	+	20.50	Na			photo		alive
14	Mattaloni et al, 2017 ¹⁵	Brazil		Yes	anti-Ku	na	na	Na	na	jaundice, mild anemia		photo		alive
15	DeMoss et al, 2017 ¹⁶	USA		Yes	anti-K, anti-C, anti-e	1,024 (anti-K)	+ (anti-K and anti-C)	13.19	6		3	1	photo	alive
16	Li and Blaustein, 2017 ¹⁷	USA		Yes	anti-D and anti-G	na	+	4.70	4.8	jaundice	2	3* 3	IVIG, photo	alive
17	Yousuf et al, 2017 ⁸⁸	Malaysia		Yes	anti-D, anti-G, anti-C	512	na	13.59	9.7	mild anemia			photo	alive
18	Venkataraman and Yusuf, 2017 ¹⁹	Canada	P8	Yes	anti-SARA	na	na	na	na	severe anemia	1			alive
19			P10		anti-SARA	na	+	17.00	na	jaundice	2		IVIG, photo, ventilatory support	alive

20	Quantock et al, 2017 ⁷	Australia	P1	na	anti-D, anti-E, anti-A	na	+	16.90	na	jaundice			photo	alive
21			P2	na	anti-D	256	+	15.14	na	mild anemia			IVIG, photo	alive
22	Rauch et al, 2017 ²⁰	Germany		No	anti-Rd	256	+	na	3	severe anemia	3	2	ventilatory support,	alive
23			P1	na	anti-M	256	na	na	na	hydrops fetalis				IUD
24	Hubinont et al, 2017 ²¹	Belgium	P2	Yes	anti-M	na	na	na	na	hydrops fetalis				IUD
25			P3	Yes	anti-M	na	na	na	na	severe fetal anemia	1			IUD
26			P4	Yes	anti-M	2048	na	na	10.9	mild anemia			photo	alive
27			P2	No	anti-D	2048	na	na	na	hydrops fetalis				IUD
28	Colpo et al, 2017 ³¹	Italy	P3	Yes	anti-D	2048	na	na	na	spontaneous abortion				IUD
29			P4	Yes	anti-D	4096	+	13.68	5.7	severe fetal anemia	1	1	2	IVIG, photo
30	Bullock et al, 2018 ²²	UK		na	anti-H	4000	+	2104.00	19.0				photo	alive
31	Millard et al, 2018 ²³	Australia		na	anti-ATML	na	+	na	4.5	cardiac failure, pleural effusion, generalized edema		2	4	alive
32	Levitt et al, 2018 ⁴	USA		Yes	anti-Ge3	256	+	6.60	6.1	mild intrauterine anemia			3	alive
33	Lawicki et al, 2018 ²⁴	USA	case 1	Yes	anti-Jk3	128	+	7.00	11.4				IVIG	alive
34			case 2	Yes	anti-Jk3, anti-E	16	+	9.60	na				photo	alive
35	Turley et al, 2018 ²⁵	Canada	P2	No	anti-D	na	na	na	na					alive
36			P3	Yes	anti-D	na	na	na	na					IUD
37			P4	Yes	anti-D	32	+	11.52	13		1	1*		alive
38	Lee et al, 2019 ³²	UK	P2	No	anti-E	8	+	7.84	6.4	severe anemia, moderate hypoxic-		1	photo	alive

										ischemic encephalopathy, jaundice, hepatomegaly.		
						8 (anti-E) and 2 (anti-Jka)						
39	Mandal et al, 2020 ³⁷	India		Yes	Anti-E, anti-Jk ^a		na	na	na	respiratory distress		alive
40	Novoselac et al, 2020 ²⁶	Croatia		Yes	anti-K	32	+	6.55	na	severe anemia, jaundice	2 photo	alive
41	Riis et al, 2021 ³³	Denmark	P1	No	anti-D	16,000	+	27.01	7.25	severe anemia, jaundice, hepatosplenomegaly	1 photo	alive
42	Souabni et al, 2021 ³⁴	Maroc	P3	Yes	anti-D	na	na	na	5.8	severe anemia		death
43	Moreno et al, 2022 ³⁵	Spain		No	anti-Kp ^a	16	+	na	4.2	severe anemia, hydrops fetalis	1	death
44	Fives et al, 2023 ³⁶	USA		No	anti-Go ^a	na	+	18.8	6.7	jaundice	2 photo	alive

DAT, direct antiglobulin test; Bil, bilirubin; Hb, hemoglobin; photo, phototherapy; Intrau Tr, intrauterine transfusion; Ex tr, exchange transfusion; Tr, transfusion; IVIG, intravenous immunoglobulin; +, positive; -, negative; IUD, intrauterine death; P, pregnancy; T, Twin; np, not performed; *, double volume exchange transfusion; na, not available

Table 2: Frequency of RBC alloantibodies in prevalence studies

Study	study type	Country	n total pregnant	presence of alloantibody		n HDFN	Intervention*				Outcomes
				n pregnant	(%)		IUT	Ex Tr	Tr	Photo	
Altuntas et al, 2013 ³⁸	cross sectional	Turkey	4,840	65	1.34	30	3			30	3 hydrops fetalis, 1 death
Hassan et al, 2014 ³⁹	cross sectional	Malaysia	5,163	30	0.58	14		1	1	14	1 hydrops fetalis
Velkova, 2015 ⁴⁰	cross sectional	Macedonia	22,009	205	0.93	48					2 deaths
Mbalibulha et al, 2015 ⁴⁷	cross sectional	Uganda	726	88	12.12	NA					
Krstic et al, 2016 ⁴¹	cross sectional	Croatia	102,982	184	0.18	3			1	2	
Sidhu et al, 2016 ⁴²	cross sectional	India	750	15	2.00	NA					
Girault et al, 2017 ⁴⁸	cross sectional	France	113	78	69.00	78	78				
Peeters et al, 2017 ⁴³	cross sectional	Belgium	9,419	46	0.49	25	1			1	1 death
Zonneveld et al, 2017 ⁶	cross sectional	Suriname	214	19	8.87	11		2		4	
Chatziantoniou et al, 2017 ⁵	cross sectional	UK	46,182	130	0.28	65	6	9		19	8 IUD
Slootweg et al, 2018 ⁴⁴	cohort	Netherlands	3,200,000	1,026	0.000003	49	48	1			3 IUD
Kahar, 2018 ⁴⁵	cross sectional	India	1,960	20	1.02	NA					
Matteocci et al, 2019 ⁴⁶	cross sectional	Italy	28,089	3,000	11.00	81					
Moinuddin et al, 2019 ⁴⁹	cross sectional	USA	4,545	34	0.74	NA					
Rahimi-Levene et al, 2020 ³	cross sectional	Israel	90,948	900	0.99	17	2	2	13		1 death
Özköse et al, 2021 ⁵⁰	case-control	Turkey	37,344	153	0.40	49	23	8	8	45	4 IUD
Ali et al, 2022 ⁵¹	cross sectional	Sudan	130	14	10.77	NA					
total			3,555,414	6,007	0.17	470	161	23	23	115	

§, 9 cases of intravenous immunoglobulin

%, rate of n pregnant with antibody; IUT, intrauterine transfusion; Ex tr, exchange transfusion; Tr, transfusion; Photo, phototherapy; NA, not available; IUD, intrauterine death

* Some cases of HDFN have not received clinical intervention or the study does not mention the intervention

Table 3: Studies with alloimmunized pregnant women, HDFN, and intervention.

Study	study type	Country	presence of alloantibody	n HDFN	Intervention			
			n pregnant		IUT	Ex Tr	Tr	Photo
Rath et al, 2013 ⁵⁹	cohort	Netherlands	393	393	70		93	
Smits-Wintjens et al, 2013 ⁶⁰	cohort	Netherlands	347	347	240	134	255	
Tiblad et al, 2013 ⁶¹	cohort	Sweden	290	108	37	46		94
Doyle et al, 2014 ⁵²	cross sectional	Ireland	1,106	62	62			
Kapur et al, 2014 ⁵³	cross sectional	Netherlands	70	NA				
Yasuda et al, 2014 ¹¹	review	Japan	34	34				
Verduin et al, 2015 ⁵⁴	cohort	Netherlands	260	287	287			
Garabedian et al, 2015 ⁶³	cohort	France	81	81	81	28	42	70
Garabedian et al, 2015 ⁶²	cohort	France	77	77	77			
Philip et al, 2015 ⁸⁹	cross sectional	India	42	42	42		13	
Kristinsdóttir et al, 2016 ⁵⁵	cross sectional	Iceland	375	179		8		179
Stetson et al, 2017 ⁵⁶	cross sectional	USA	146	NA				4
Sonneveld et al, 2017 ⁵⁷	cohort	Netherlands	679	37			13	24
Zwiers et al, 2018 ¹	case-control	Netherlands	1,326	232				
Phung et al, 2018 ⁵⁸	cross sectional	France	106	106	106			
HealSmith et al, 2019 ⁶⁵	cohort	Australia	115	59	11	6		59
Sánchez-Durán et al, 2019 ⁶⁶	cohort	Spain	337	103	45	24	21	38
Snelgrove et al, 2019 ⁶⁷	cohort	Canada	232	232	232			131
Crawford et al, 2020 ⁶⁸	cohort	UK	11	11	11			
Gudlaugsson et al, 2020 ⁶⁹	cohort	Iceland	130	35	5	13	7	32
Lieberman et al, 2020 ⁷⁰	cohort	Canada	128	21	2	2	7	17
Şavkli et al, 2020 ⁷¹	cohort	Turkey	42	42	42			
Liu et al, 2021 ⁷²	cohort	Sweden	1,079	157	87	52		216
Maisonneuve et al, 2021 ⁷³	case-control	France	41	41	41	4		
Lee et al, 2022 ⁷⁴	cohort	USA	36	35	36			
Vlachodimitropoulou et al, 2022 ⁷⁵	cohort	Canada	128	128	128	12	26	54

Ghesquière et al, 2023 ⁷⁶	cohort	France	207	126	105	53	92	133
Kureba et al, 2023 ⁷⁷	cross sectional	Ethiopia	98	21	21	15	4	20
total			7,916	2,996	1,768	397	573	1,071

IUT, intrauterine transfusion; Ex tr, exchange transfusion; Tr, transfusion; Photo, phototherapy; NA, not available

Table 4: RBC antibodies present in maternal plasma.

Antibody	Case report (Table 1)	Prevalence studies (Table 2)	Alloimmunized pregnant women (Table 3)	Antibody	Case report (Table 1)	Prevalence studies (Table 2)	Alloimmunized pregnant women (Table 3)
	n	n	n		n	n	n
Anti-D	11	821	3366	anti-C, -G; -K		1	
Anti-D, -C	2	24	354	anti-c		85	543
anti-D, -c			3	anti-c; -K			5
anti-D, -E		7	45	anti-c; -K; -Jk ^a ; -M			1
anti-D, -C, -E		1	31	anti-c; -Le ^a			1
anti-D, -E; -K		1	1	anti-cE			12
anti-D, -Jk ^a			7	anti-cE; -Jk ^a			1
anti-D; -S		2		anti-ce			1
anti-D; -Le ^a		1	3	anti-Ce			1
§ anti-D and multiple antibodies		36	104	anti-c, -C			1
anti-D, -C, -G	1	1	2	anti-c, -C ^w			1
anti-D, -G	1		2	anti-c; -Jk ^b			1
anti-D, -E; -A	1			anti-c, -E; -Fy ^a			1
anti-D, -Ce		13		anti-c, -E; -Jk ^a		1	1
anti-D, -cE		1		anti-c, -E; -K		2	
anti-D, -Cc		1		anti-c; -Fy ^a ; -K		1	1
anti-D; -K		1		anti-c, -E; -Lu ^a		1	
anti-D; -Cce		5		anti-c; -s		1	
anti-D, -C; -Jk ^a			8	anti-c; -Fy ^a		2	2

anti-D; -K		4	anti-c, -E; -Le ^b ; -M	1	
anti-D, -C; -M		2	anti-c; -S	1	
anti-D, -C; -Kp ^a		2	anti-c; -Jk ^a	2	2
anti-D; -Fy ^a		1	anti-E	3	182
anti-D, -C; -Jk ^b		1	anti-E; -K		6
anti-D, -C; -K		3	anti-c, -E		49
anti-D, -C; -Fy ^b		1	anti-E, -C ^w		4
anti-D, -C; -Kp ^a		1	anti-E; -Fy ^a		2
anti-D, -C, -Fy ^a		5	anti-E; -Jk ^a	1	4
anti-D, -E; -Fy ^a		1	anti-E; -Le ^a		2
anti-D, -E; -Jk ^a		1	anti-E; -Le ^b		1
anti-D; -Jk ^a ; -S		1	anti-E; -Lu ^a		1
anti-CD		9	anti-E; -P1		1
anti-CD; -K		1	anti-E; -M		2
anti-D, -E, -G		1	anti-E; -K; -C ^w		1
anti-D; -s		2	anti-E; -Fy ^a ; -K		1
anti-D, -C; -S		4	anti-E; -S; -Le ^a		1
anti-D; -Fy ^a ; -Jk ^a		1	anti-E; -Fy ^a , -Fy ^b ; -K; -S	1	
anti-D, -C, -E; -Fy ^a		1	anti-E, -C ^w ; -Fy ^a ; -S; -Jk ^a	1	
anti-D; -K; -M		1	anti-E, -f; -K; -Le ^a ; -Jk ^b		1
anti-C	20	27	anti-E; -S		1
anti-C; -K	1		anti-E; -s		1
anti-C, -C ^w	2	156	anti-e	6	29
anti-C, -G	1		anti-e, -Ce		1
anti-C, -e	6	7	anti-e; -S		1
anti-C, -E	2		§ anti-E or anti-c		10
anti-C; -Jk ^b	2		anti-C ^w	37	3

anti-C; -Le ^a		1	1	anti-C ^w ; -P1		1	
anti-C; -Lu ^a		1		anti-C ^w ; -Le ^a		1	
anti-C; -Jk ^a			2	anti-C ^w ; -Fy ^a			1
anti-C; -Fy ^a			1	anti-C ^w ; -S			1
anti-C, -E; -K		2		anti-f		1	2
anti-C, -K, -e	1	1		anti-Go ^a	1		
anti-C, -E; -Le ^a		1		* anti-Le ^a		108	
anti-C; -K; -Le ^a		1		* anti-Le ^a ; -M		1	
anti-K	2	1176	805	* anti-Le ^b		34	
anti-K; -U		1		* anti-Le ^a , -Le ^b		14	26
anti-K; -Le ^a		2	1	* anti-Le ^a , -Le ^b ; -Lu ^a		1	
anti-K; -Le ^b			1	anti-S	2	16	19
anti-K; -Le ^a , -Le ^b		1		anti-S, -U		1	
anti-K; -Jk ^a		2	1	anti-s		2	1
anti-K -Jk ^b		1		anti-U		1	5
anti-K; -Fy ^a		3		anti-M	6	104	207
anti-K; -Jk ^a ; -S		1		anti-M; -Lu ^a		1	
anti-K, -Kp ^a		2		anti-N		6	1
anti-K; -C ^w		2		anti-SARA	2		
anti-K; -Bg ^a		1		§ anti-Jk			93
anti-K; -Kn ^a		1		anti-Jk ^a	1	22	19
anti-K or -Lu ^b		5		anti-Jk ^a ; -Cr ^a		1	
anti-k		3		anti-Jk ^a ; -Le ^a		1	
anti-Ku	1			anti-Jk ^b		9	5
anti-k; -Lu ^b		1		anti-Jk3	1		
anti-Kp ^a	1	16	1	anti-Jk3; -E	1		
anti-Kp ^a ; -Le ^b		1		anti-Lu ^a		35	2

anti-Kp ^a ; -P1	1		anti-Lu ^b	1	2
anti-Kp ^b	1		* anti-Ch ^a	1	
[§] anti-Fy		129	* anti-Bg ^a	5	
anti-Fy ^b	6	3	* anti-Rd	1	
anti-Fy ^b ; -M	1		anti-Cr ^a	4	
anti-Fy ^a	12	55	anti-ATML	1	
anti-Fy ^a ; -M		1	anti-Ge3	1	
anti-Fy3	1		anti-H	1	1
anti-P1	14	1	anti-Chido	1	1
anti-Yt ^a	6		anti-Jr ^a	1	1
anti-Wr ^a	1	1	anti-Vel	1	2
ABO incompatibility	3000	291	ABO incompatibility and other antibodies	15	
Antibody not indicated or unidentified [§]	5	468			
Total	43	5999			

* Rarely imply in HDFN; [§] unspecified; RBC, red blood cell

Important: Lewis's antibodies do not imply HDFN.

5. Discussão

Até o momento, foram identificados 45 sistemas de grupos sanguíneos, os quais apresentam funções biológicas para funcionamento celular (GASSNER et al., 2022; ISBT, 2023). Considerando os aspectos da medicina transfusional, alguns sistemas apresentam maior capacidade imunogênica, ou seja, a capacidade de estimular a formação de um anticorpo específico ao antígeno.

O sistema Rh é considerado altamente imunogênico e polimórfico, apresentando implicações clínicas tanto no âmbito transfusional como materno-fetal (ACKER et al., 2020). Os anticorpos contra antígenos do sistema Rh estão implicados em reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias e em DHFN, devido a incompatibilidade materno-fetal.

Identificar corretamente os antígenos eritrocitários é de grande importância, no âmbito transfusional, uma vez que os principais antígenos do sistema Rh têm potencial imunogênico, resultando em auto ou aloimunização (MENEGATI et al., 2020). A correta classificação e identificação norteia a escolha do hemocomponente a ser transfundido, principalmente, quando o paciente já apresenta anticorpo no plasma e a bolsa de concentrado de hemácias deve carecer do antígeno correspondente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No presente estudo avaliamos 15 amostras com resultados discrepantes entre genotipagem e fenotipagem dos antígenos do sistema Rh C/c e E/e. As regiões codificantes e adjacentes de cada gene foram sequenciadas e comparadas com a sequência consenso, a fim de, identificar novas variantes e compreender as discrepâncias evidenciadas entre genótipo e fenótipo. Dentre as 15 amostras avaliadas, duas (amostra 46 e 149) apresentaram concordância entre o resultado obtido na técnica de genotipagem e o sequenciamento de DNA para os alelos *RHCE*E/*e*, sendo consideradas como fenótipo falso negativo e genótipo verdadeiro positivo. As demais amostras confirmaram os resultados obtidos na fenotipagem, ou seja, fenótipo verdadeiro negativo e genótipo falso positivo. Para os alelos *RHCE*C*c*, 12 amostras apresentaram fenótipo verdadeiro negativo e genótipo falso positivo, em 2 amostras o teste de sequenciamento não funcionou, mesmo após repetições.

Discrepâncias entre os testes de genotipagem e fenotipagem foram evidenciadas em outros estudos, tanto com doadores de sangue quanto com pacientes. Um estudo com 200 doadores de sangue da Jordânia, em que a maioria apresentou alto grau de concordância entre os testes, identificou em dois casos discrepantes a variante rs586178, c.48 G>C, presente no éxon 1 do gene *RHCE* (IRSHAID et al., 2002). A mesma variante é mencionada pelo ISBT como causa de fenótipos Rh c+ parcial ou fraco (ISBT, 2022). Entretanto, ainda não há relato de associação desta variante com a fraca ou nula expressão do antígeno Rh E+, podendo ser uma nova associação encontrada neste trabalho.

Genes variantes ou híbridos podem estar associadas as discrepâncias entre genotipagem e fenotipagem eritrocitária, ocasionando fraca, parcial ou nula expressão de um determinado antígeno (MENEGATI et al., 2020). Duas novas variantes foram identificadas, neste estudo, utilizando ferramentas de análise *in silico* foi possível observar que as mesmas têm grande potencial de causar alterações na expressão da proteína e, conseqüentemente, na expressão dos alelos. A variante encontrada no éxon 6 do gene *RHCE* da amostra 149 foi classificada como “provável dano” utilizando o software PolyPhen-2 (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013) com score de 0,999 (sensibilidade = 0,99) e classificada como “tolerada” pelo software SIFT (*Sorting Intolerant from Tolerant*) (KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009). A segunda nova variante descrita, está localizada no final do íntron 7 do gene *RHCE* da amostra 46, utilizando o software RegulomeDB (BOYLE et al., 2012) foi obtido um score de 1,0 o que significa que a nova variante pode alterar a ligação e à expressão gênica.

Menegati e colaboradores (2020) avaliaram discrepâncias em amostras de doadores de sangue e pacientes para os antígenos dos sistemas Rh, MNS, Duffy, Kidd, Kell, Diego e Dombrock, totalizando em doadores de sangue 13,7% de discrepâncias, sendo o sistema Rh responsável por 12,7% (MENEGATI et al., 2020). Em nosso estudo, o percentual de discrepância foi de 4,44% para os antígenos E/e (Kappa = 0,894) e 21,27% para os antígenos C/c (Kappa = 0,108). Entretanto, Shih e colaboradores (2020), observaram grande variabilidade para os dois pares de antígenos C/c (Kappa = 0,47) e E/e (Kappa = 0,17), o estudo foi conduzido em pacientes com anemia falciforme (SHIH et al., 2020), os quais têm

grande probabilidade de apresentarem antígenos Rh variantes ou nulos (CHOU; WESTHOFF, 2009), diferente do esperado em uma população de doadores de sangue.

Além disso, os sistemas de grupos sanguíneos são importantes quando há incompatibilidade materno-fetal. Alguns anticorpos anti-eritrocitários apresentam a capacidade de atravessar a placenta, quando o feto apresenta o antígeno correspondente ao anticorpo materno há o processo de desencadeamento de hemólise dos eritrócitos, implicando em DHFN com gravidade diferente, com anemia leve a grave, podendo inclusive evoluir para dano neurológico no recém-nascido e óbito do feto ou do recém-nascido (RAHIMI-LEVENE et al., 2020).

A partir da busca sistemática sobre DHFN e aloimunização, revisamos 75 artigos publicados, ao total 13.966 gestantes apresentavam aloimunização. Os anticorpos mais prevalentes neste estudo de revisão do sistema foram, anti-D (35,01%), anti-K (14,69%), anti-E (11,21%), anti-c (5,48%), anti-C (4,93%) e anti-M (2,35%). Embora o anti-D ainda seja o mais frequente, podemos observar que outros anticorpos contra antígenos dos sistemas Rh, Kell e MNS apresentam grande prevalência, principalmente, o anti-K e anti-E. Cabe ressaltar que a profilaxia existe apenas com imunoglobulina anti-D (RhIg), sendo importante o desenvolvimento de novas imunoglobulinas para profilaxia dos demais anticorpos implicados com maior frequência na DHFN, como o anti-K.

Considerando os anticorpos do sistema Rh, é de grande importância realizar a fenotipagem correta dos antígenos deste sistema, principalmente, que há presença de antígenos variantes, como o D parcial. Se na execução da fenotipagem, a gestante for classificada RhD positivo e apresentar RhD parcial, ela não receberá a profilaxia com RhIg, existindo há a possibilidade de sensibilização em casos de incompatibilidade materno fetal (QUANTOCK et al., 2017; TURLEY et al., 2018). Além disso, quando há presença no plasma materno são identificados os anticorpos anti-D e anti-C concomitantemente, há a possibilidade da presença de outro anticorpo do sistema Rh, o anti-G, sendo importante o serviço de hemoterapia confirmar a identificação dos três anticorpos, pois se a gestante não apresentar o anti-D a profilaxia é indicada (HOUSTON et al., 2015; YOUSUF et al., 2017).

Quando avaliamos geograficamente os estudos publicados sobre DHFN e aloimunização, observamos que são necessários mais estudos que avaliem diferentes populações. Considerando as características de ancestralidade local e que a frequência dos antígenos de grupos sanguíneos varia conforme a etnia e em populações miscigenadas, inclusive em regiões distintas de um grande país como o Brasil (WASKOW et al., 2020), a frequência dos aloanticorpos também é variável.

6. Conclusão

A utilização de técnicas moleculares para genotipagem e sequenciamento de grupos sanguíneos tem crescido nos últimos anos, auxiliando na resolução de casos complexos na imunohematologia, na pesquisa de novas variantes e descrição de novos sistemas de grupos sanguíneos. Compreender as variantes associadas a cada sistema e as limitações de cada técnica, seja as convencionais (fenotipagem) ou as moleculares (genotipagem e sequenciamento), é de suma importância para a interpretação crítica dos resultados.

Embora o genótipo seja preditor do fenótipo, há algumas situações em que expressão gênica é alterada, como por exemplo, no sistema Rh a presença de antígenos fracos e parciais. Nosso estudo contribui com a identificação de novas variantes que podem ter influência na expressão da proteína RhCE, bem como na compreensão de que os testes de genotipagem podem apresentar falsos positivos devido a alterações moleculares que não puderam ser explicadas pelas técnicas utilizadas neste trabalho. Para a utilização de qualquer metodologia na prática clínica, incluindo os testes moleculares, há a necessidade de validação da técnica e a compreensão das limitações de cada teste, bem como o entendimento clínico e interpretação adequada dos resultados.

Além disso, há a necessidade de atentar para a DHFN com o entendimento que outros anticorpos contra antígenos de grupos sanguíneos estão associados ao desencadeamento da doença implicando em anemia leve a grave e inclusive no óbito do feto ou recém-nascido. Com isso, a revisão realizada aponta para a necessidade de identificar e acompanhar a gestantes com risco de incompatibilidade materno fetal e identificar corretamente os anticorpos presentes

no plasma materno e o significado clínico do anticorpo presente. Além disso, há a necessidade de quantificar e identificar corretamente os casos de DHFN e quando possível para estimar risco do desencadeamento de DHFN realizar a fenotipagem paterna.

Devido à grande complexidade do sistema Rh se faz necessário mais estudos para continuar compreendendo a variabilidade deste sistema, tanto em doadores de sangue como em pacientes.

Referências

- ACKER, J. et al. **Technical Manual**. 20th. ed. Bethesda: [s.n.].
- ADZHUBEI, I.; JORDAN, D. M.; SUNYAEV, S. R. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. **Current Protocols in Human Genetics**, n. SUPPL.76, 2013.
- BAKRY, R. M. et al. Evaluation of molecular typing and serological methods in solving discrepant results of weak and partial D (Rh) in South Egypt. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 13, n. 2, p. 110–114, 1 jul. 2019.
- BELSITO, A.; MAGNUSSEN, K.; NAPOLI, C. Emerging strategies of blood group genotyping for patients with hemoglobinopathies. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 56, p. 206–213, 2017.
- BENACHI, A. et al. Impact of non-invasive fetal RhD genotyping on management costs of rhesus-D negative patients : results of a French pilot study. **European Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 162, n. 1, p. 28–32, 2012.
- BONIFÁCIO, S. L.; NOVARETTI, M. C. Z. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 104–111, 2009.
- BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, set. 2012.
- CARTRON, J.; COLIN, Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 8, n. 3, p. 163–199, 2001.
- CHATZIANTONIOU, V. et al. A descriptive single-centre experience of the management and outcome of maternal alloantibodies in pregnancy. **Transfusion Medicine**, v. 27, n. 4, p. 275–285, 2017.
- CHEN, Q. et al. A null allele caused by a four-base-pair duplication within the RHCE gene encoding a D– phenotype. **Transfusion**, v. 61, n. 3, p. E23–E25, 2021.
- CHOU, S. T. et al. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 1062–1071, 2013.
- CHOU, S. T. et al. **RH genotype matching for transfusion support in sickle cell disease** *Blood*. [s.l.: s.n.].
- CHOU, S. T.; WESTHOFF, C. M. Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 1, n. December 2009, p. 178–84, 2009.
- DANIELS, G. The molecular genetics of blood group polymorphism. **Human Genetics**, v. 126, p. 729–742, 2009.
- DASARARAJU, R.; MARQUES, M. B. Adverse Effects of Transfusion. **Cancer Control**, v. 22, n. 1, p. 16–25, 2015.

DE WINTER, D. P. et al. Hemolytic disease of the fetus and newborn: systematic literature review of the antenatal landscape. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2023.

DEAN, L. The Rh blood group. Em: **Blood Groups and Red Cell Antigens**. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US), 2005.

DENOMME, G. A.; JOHNSON, S. T.; PIETZ, B. C. Mass-scale red cell genotyping of blood donors. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 44, n. 1, p. 93–99, 2011.

DEZAN, M. R. et al. RHCE null allele causing D-- phenotype in a Latin-American blood donor. **Transfusion**, v. 62, n. 3, p. E21–E23, 2022.

FLEGEL, W. A.; GOTTSCHALL, J. L.; DENOMME, G. A. Implementing mass-scale red cell genotyping at a blood center. **Transfusion**, v. 55, n. 11, p. 2610–2615, 2015.

FÜRST, D. et al. **Next-Generation Sequencing Technologies in Blood Group Typing**. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**. S. Karger AG, , 1 fev. 2020.

GASSNER, C. et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Report of Basel and three virtual business meetings: Update on blood group systems. **Vox Sanguinis**, 2022.

GEHRLE, E. A. et al. Medical and economic implications of strategies to prevent alloimmunization in sickle cell disease. **Transfusion**, v. 57, n. 9, p. 2267–2276, 2017.

HARMENING, D. M. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

HARMENING, D. M. **Modern Blood Banking & Transfusion Practices**. 6th. ed. Philadelphia: F.A. Davis, 2012.

HENDRICKSON, J. E.; DELANEY, M. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn: Modern Practice and Future Investigations. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 30, p. 159–164, 2016.

HOUSTON, B. L. et al. Severe Rh alloimmunization and hemolytic disease of the fetus managed with plasmapheresis, intravenous immunoglobulin and intrauterine transfusion: A case report. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 53, n. 3, p. 399–402, 1 dez. 2015.

IRSHAID, N. M. et al. **Phenotype prediction by DNA-based typing of clinically significant blood group systems in Jordanian blood donors** *Vox Sanguinis*. [s.l.: s.n.].

ISBT. **Names for RH (ISBT 004) Blood Group Alleles: RHCE Alleles**. Disponível em: <<https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt/blood-group-terminology.html>>. Acesso em: 4 set. 2023.

ISBT. **Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology**. Disponível em: <www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>.

JUNCA, T. G. et al. A novel mutation in RHAG causing Rhnull phenotype in Colombia. **Transfusion**, v. 61, n. 9, p. E62–E64, 2021.

KATO-YAMAZAKI, M. K. et al. Molecular genetic analysis of the Japanese amorph Rhnull phenotype. **Transfusion**, v. 40, n. 5, p. 617–618, 2000.

KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature Protocols**, v. 4, n. 7, p. 1073–1081, 25 jul. 2009.

LUO, X. et al. Strategies to identify candidates for D variant genotyping. **Blood Transfusion**, v. 16, n. 3, p. 293–301, 2018.

MENEGATI, S. F. P. et al. Discrepancies between red cell phenotyping and genotyping in daily immunohematology laboratory practice. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 59, n. 1, 1 fev. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Imuno-Hematologia Laboratorial**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência, 2014. v. 1

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 5. Portaria de Consolidação nº5** Brasília Ministério da Saúde, , 28 set. 2017.

O'RIORDAN, S. L. et al. The rate of decline in fetal hemoglobin following intrauterine blood transfusion in the management of red cell alloimmunization. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 271, n. August 2021, p. 93–96, 2022.

PAPASAVVA, T. et al. Prevalence of RhD status and clinical application of non-invasive prenatal determination of fetal RHD in maternal plasma: A 5 year experience in Cyprus. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2016.

PEDINI, P. et al. Five-Years Review of RHCE Alleles Detected after Weak and/or Discrepant C Results in Southern France. **Genes**, v. 13, n. 6, p. 1058, 2022.

PUTZULU, R. et al. The role of molecular typing and perfect match transfusion in sickle cell disease and thalassaemia: An innovative transfusion strategy. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 56, p. 234–237, 2017.

QUANTOCK, K. M. et al. Anti-D in a mother, hemizygous for the variant RHD*DNB gene, associated with hemolytic disease of the fetus and newborn. **Transfusion**, v. 57, n. 8, p. 1938–1943, 2017.

RAHIMI-LEVENE, N. et al. Red blood cell alloimmunization prevalence and hemolytic disease of the fetus and newborn in Israel: A retrospective study. **Transfusion**, v. 60, n. 11, p. 2684–2690, 1 nov. 2020.

REMY, K. E. et al. Mechanisms of red blood cell transfusion-related immunomodulation. **Transfusion**, v. 58, n. March, 2018.

RISTOVSKA, E. et al. Rare Blood Groups in ABO, Rh, Kell Systems – Biological and Clinical Significance. **PRILOZI**, v. 43, n. 2, p. 77–87, 1 jul. 2022.

RODRIGUES, M. M. DE O. et al. Blood groups in native americans: A look beyond abo and rh. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, n. 2, 2021.

SÁNCHEZ-DURÁN, M. Á. et al. Management and outcome of pregnancies in women with red cell isoimmunization: A 15-year observational study from a tertiary care university hospital. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 19, n. 1, 15 out. 2019.

SHIH, A. W. et al. Utilising red cell antigen genotyping and serological phenotyping in sickle cell disease patients to risk-stratify patients for alloimmunisation risk. **Transfusion Medicine**, v. 30, n. 4, p. 263–274, 1 ago. 2020.

STABENTHEINER, S. et al. Overcoming methodical limits of standard RHD genotyping by next-generation sequencing. **Vox Sanguinis**, v. 100, n. 4, p. 381–388, 2011.

TANAKA, M. et al. High-resolution melting analysis for genotyping Duffy, Kidd and Diego blood group antigens. **Legal Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–6, 2011.

THUN, G. A.; GUEUNING, M.; MATTLE-GREMINGER, M. Long-Read Sequencing in Blood Group Genetics. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 184–197, 2023.

TIBLAD, E. et al. Consequences of being Rhesus D immunized during pregnancy and how to optimize new prevention strategies. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 92, n. 9, p. 1079–1085, set. 2013.

TIPU, H. N.; SHABBIR, A. Evolution of DNA sequencing. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 25, n. 3, p. 210–215, 2015.

TURLEY, E. et al. Severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to allo-anti-D in a patient with a partial DEL phenotype arising from the variant allele described as RHD*148+1T (RHD*01EL.31). **Transfusion**, v. 58, n. 10, p. 2260–2264, 2018.

VENDRAME, T. A. DE P. et al. From the investigation of RHD-CE hybrid genes to the recognition of RHCE variants and RHD zygosity. Expanding the analysis by QMPF in Brazilian donors and in patients with sickle cell disease. **Blood transfusion**, v. 21, n. 3, p. 202–208, 1 maio 2023.

WASKOW, G. et al. Genetic variability of blood groups in Southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, 2020.

YOUSUF, R. et al. **Anti-G with concomitant anti-C and anti-D: A case report in a pregnant woman**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.medknow.com>>.

ZINEB, B. et al. Alloimmunisation foeto-maternelle Rhésus grave à propos d'un cas et revue de la littérature. **Pan African Medical Journal**, v. 22, p. 4–5, 2015.

ZONNEVELD, R. et al. D antibodies in pregnant women in multiethnic Suriname: the observational RheSuN study. **Transfusion**, v. 57, n. 10, p. 2490–2495, 2017.

ZWIERS, C. et al. ABO incompatibility and RhIG immunoprophylaxis protect against non-D alloimmunization by pregnancy. **Transfusion**, v. 58, n. 7, p. 1611–1617, 2018.

Anexo A - Parecer CEP nº 2.753.780

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de variantes moleculares dos grupos sanguíneos em doadores de sangue e em tribos indígenas brasileiras

Pesquisador: Silvana de Almeida

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 89680818.3.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.753.780

Apresentação do Projeto:

Projeto de doutorado com o tem como objetivo de investigar a presença de variações nos genes dos grupos sanguíneos ABO e Rh em Ameríndios das tribos Kaingang e Guarani e em doadores de sangue de Porto Alegre. Além disso, pretende-se solucionar os casos discrepantes entre genotipagem e fenotipagem para os genes RHD e RHCE em doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, utilizando a técnica de sequenciamento. As variantes observadas nos genes RHD e RHCE serão avaliadas in silico utilizando as ferramentas computacionais PolyPhen-2, SIFT e RegulomeDB. A partir dos resultados in silico, as variantes com maior probabilidade de alterar a expressão dos antígenos serão testadas in vivo, para isso, será realizada uma nova coleta dos doadores de sangue que apresentarem as variantes selecionadas. Desta forma, o presente estudo pretende disponibilizar aos serviços de hemoterapia dados sobre o perfil dos grupos sanguíneos ABO e Rh da população indígena e de doadores de sangue de Porto Alegre/RS, a fim de ajudar no entendimento da diversidade da população brasileira.

Objetivo da Pesquisa:

Gerar:

Investigar a presença de variações nos genes dos grupos sanguíneos ABO e Rh em indígenas das

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.752.760

tribos Kaingang e Guaraní e em doadores de sangue de Porto Alegre.

Específicos:

1. Buscar novas variantes de grupos sanguíneos em indígenas e doadores de sangue: a fim de estimar o percentual de variantes raras/ híbridos.
2. Correlacionar as variantes raras identificadas em doadores de sangue com discrepâncias entre genotipagem X fenotipagem.
3. Comparar as frequências das variantes com as disponíveis no banco de dados 1000 Genomas e com outros dados disponíveis na literatura.
4. Testar funcionalidade das variantes observadas dos genes RHD e RHCE para a amostra de doadores de sangue in silico.
5. Testar a funcionalidade in vivo das principais variantes observadas in silico, realizando a coleta de amostras de sangue total dos doadores de sangue selecionados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: associados a coleta de sangue, que poderá gerar um hematoma em alguns casos, melhorando em alguns dias, mas que para minimizar o risco as coletas serão feitas por profissionais capacitados para fazê-lo.

Benefícios: saber o tipo sanguíneo do paciente com mais detalhe, beneficiando suas futuras transfusões, bem como melhoria de processos em bancos de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No descrição dos materiais e métodos serão utilizadas 688 amostras de doadores de sangue. Entretanto não é especificado claramente que tipo de amostra.

Os indivíduos que compõem a presente amostra concordaram em participar de estudos anteriores, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em dois projetos anteriores avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA e CONEP. Na segunda

etapa, as avaliações previstas no presente projeto que incluem novas coletas com os indivíduos participantes, terão a coleta de um novo Termo de Consentimento Livre Esclarecido. Este estudo será realizado após apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e segue a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 2.752.760

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Parecer 1.885.647 (Análise molecular de variantes de grupos sanguíneos em populações indígenas) - aprovado em 05 de Janeiro de 2017

Parecer 2.230.605 (Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos: Impacto sobre a prática Transfusional) - aprovado 21 de Agosto de 2017

Folha de rosto assinada e carimbada

Termo compromisso entrega relatório (6 relatórios parciais previstos, iniciando em dezembro de 2018 até o relatório final em dez/2021)

Recomendações:

Aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovar

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1123330.pdf	09/05/2018 09:29:45		Aceito
Outros	PBPARECERCONS1885647.pdf	09/05/2018 09:28:41	Silvana de Almeida	Aceito
Outros	PBPARECERCONS2230605.pdf	09/05/2018 09:27:02	Silvana de Almeida	Aceito
Outros	TermoCompromissoRelatorios.pdf	09/05/2018 09:14:34	Silvana de Almeida	Aceito
Outros	TCLEs_Assinados.pdf	09/05/2018 09:13:45	Silvana de Almeida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_recoleta.pdf	09/05/2018 09:12:00	Silvana de Almeida	Aceito
Outros	TermoAnuenciaPauloZen.pdf	09/05/2018 09:11:42	Silvana de Almeida	Aceito
Outros	anuenciaProfVanessa.pdf	09/05/2018 09:10:57	Silvana de Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projetoDoutoradoMIResvisadoSIICEP.pdf	09/05/2018 09:06:32	Silvana de Almeida	Aceito

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 2.753.760

Investigador	projetoDoutoradoMResvisadoSICEP.pdf	09/05/2018 09:06:32	Silvana de Almeida	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoAssinada.pdf	09/05/2018 09:06:14	Silvana de Almeida	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 04 de Julho de 2018

Assinado por:

Luciane Dalcanale Moussalle
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Anexo B – Genetic variability of blood groups in southern Brazil

Artigo publicado na revista *Genetics and Molecular Biology*

Genetics and Molecular Biology 43, 2, e20180327 (2020)

Copyright © 2020, Sociedade Brasileira de Genética.

DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2018-0327>



Research Article
 Human and Medical Genetics

Genetic variability of blood groups in southern Brazil

Gabriela Waskow^{1*}, Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues^{1*}, Gabriela Höher¹, Tor Onsten², Juliana Dal-Ri Lindenau³, Marilu Fiegenbaum^{1,4} and Silvana Almeida^{1,4}

¹
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Programa de Pós-Graduação em Biociências, Porto Alegre, RS, Brazil.

²
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

³
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Florianópolis, SC, Brazil.

⁴
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

We evaluated genetic variability among the blood groups Kell (c.578C>T and c.1790T>C), Kidd (c.838A>G), Duffy (c.125A>G, c.265C>T and c.1-67T>C), Diego (c.2561C>T), MNS (c.143T>C) and Rh (c.676G>C) in Rio Grande do Sul in southern Brazil. Genetic profiling from 382 volunteer blood donors was performed through allelic discrimination assays using a hydrolysis probe (TaqMan®) with a real-time PCR system. The sample was divided into two groups: Euro-Brazilian and Afro-Brazilian. A comparison with studies from other regions of Brazil and the 1000 Genomes Database showed significant differences for almost all polymorphisms evaluated in our population.

Population differentiation between the Euro- and Afro-Brazilian groups was low (F_{ST} value 0.055). However, when each locus was evaluated individually, KEL*06 and FY*02N.01 allele frequencies were significantly higher in the Afro-Brazilian group than in the Euro-Brazilian group. Ethnic classification that uses phenotypic criteria to find blood units with rare antigens may be important when there is a need to detect blood units with an absence of Duffy antigens. There is also a greater probability of finding donors in the Afro-Brazilian group. Taken together, the data indicate strong European and African contributions to the gene pool, with intense admixture.

Keywords: Genotyping techniques, blood group antigens, genetic variation, transfusion reaction, genetic polymorphism.

Received: November 5, 2018; Accepted: August 8, 2019.

Introduction

Blood group systems are characterized by the presence of antigens on red blood cells (RBCs) (Issitt and Anstee, 1998). Currently, 345 blood group antigens are recognized, of which 316 are dispersed among 36 blood group systems (International Society of Blood Transfusion, 2017). Some of these antigens are highly immunogenic, resulting in alloimmunization, hemolytic transfusion reaction (HTR) and hemolytic disease of the fetus and

newborn (HDFN) (Anstee, 2009). The main complication directly associated with blood transfusion is HTR, which is mainly induced by the presence of antibodies for blood group antigens (Issitt and Anstee, 1998).

Overall, better characterization of the profiles of blood donors/recipients might increase compatibility and

Send correspondence to Silvana Almeida. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: salmeida@ufcspa.edu.br.
 *These authors contributed equally to the study.

consequently blood transfusion safety. Some rare blood antigens have highly variable frequencies among distinct populations (Pellegrino *et al.*, 2001), which directly impacts transfusion practice, and knowledge of the frequencies of antigens of the main blood groups in each population may help in the search for compatible donors. This is notably true for admixed populations, such as those in Brazil.

Identification of variability in blood groups provides insight into gene ethnic diversity (Pellegrino *et al.*, 2001). Brazil has a territory of continental size, with an area of more than 8 million km² (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017). Moreover, in Brazil, interethnic crosses from four continents, Europe, Africa, America and Asia, have formed one of the most heterogeneous populations in the world (Parra *et al.*, 2003; Pena *et al.*, 2011; Durso *et al.*, 2014). Although there are data concerning RBC allelic variability throughout the country (Ribeiro *et al.*, 2009; Baleotti *et al.*, 2011; Credidio *et al.*, 2011; Guelsin *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2012; Faria *et al.*, 2012; Mota *et al.*, 2012; Arnoni *et al.*, 2013; Piassi *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2016a, 2016b; Zacarias *et al.*, 2016), such data are not available for Rio Grande do Sul in southern Brazil. In general, these data may improve the searchability and availability of compatible blood units for patients with antibodies to blood group antigens.

Therefore, the aim of this study was to determine the allelic frequencies of polymorphisms in genes in clinically important blood groups, including Kell (*c.578C > T* and *c.1790T > C*), Kidd (*c.838A > G*), Duffy (*c.125A > G*, *c.265C > T* and *c.1-67T > C*), Diego (*c.2561C > T*), MNS (*c.143T > C*), and Rh (*c.676G > C*), in blood donors from a city in southern Brazil. Additionally, the study aimed to evaluate whether ethnic classification might improve the search for rare blood units in a blood center.

Material and Methods

Sample characterization

A total sample of 382 regular repetitive voluntary blood donors of both sexes was collected from the Blood Bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio

Grande do Sul, Brazil (30°01'59''S 51°13'48''), between 2012 and 2015. The population from southern Brazil is ethnically admixed (Santos, 2002; Flôres *et al.*, 2014); thus, the sample was divided into Euro-Brazilian (n= 334) and Afro-Brazilian (n= 48) groups. This classification was performed by trained blood bank professionals according to the following phenotypic characteristics: color and texture of hair, skin color in the medial part of the arm, and the shape of the nose and lips (Parra *et al.*, 2003). This is a standard classification used to assist rare phenotypes.

The blood donors agreed to participate through written informed consent. This study was approved by the Ethics Research Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (No: 110418) and the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA) (No: 1829-12).

DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a standard salting out procedure (Lahiri and Nurnberger, 1991). The DNA samples were quantified based on optical density at 260 nm (BioSpec-Nano, Shimadzu, Columbia, MD) and diluted to 10 ng/L.

As listed in Table 1, single nucleotide polymorphisms SNPs) *c.578C > T* and *c.1790T > C* in *KEL* (Kell, rs8176058 and rs8176038), *c.838A > G* in *SLC14A1* (Kidd, rs1058396), *c.125A > G*, *c.265C > T* and *c.1-67T > C* in *ACKR1* (Duffy, rs12075, rs34599082 and rs2814778), *c.2561C > T* in *SLC4A1* (Diego, rs2285644), *c.143T > C* in *GYPB* (MNS, rs7683365), and *c.676G > C* in *RHCE* (Rh, rs609320) were analyzed by allelic discrimination using

TaqMan 5'-nuclease assays with a real-time PCR system (StepOnePlus, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The following assays were used: AH8979I, C_25596899_20, C_1727582_10, C_2493442_10, C_11324554_10, C_15769614_10, C_26654865_10, C_34183121_10, and AH5I4HL (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). The reactions were performed with fast thermal cycling conditions with 1X TaqMan® genotyping master mix, 1X TaqMan® genotyping assay, 10 ng of DNA and nuclease-free water (final volume 8 L).

Statistical analyses

A chi-square adjustment test was applied to determine whether the distribution of observed genotype frequencies agreed with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). We compared the allele frequencies in the present study with data in the 1000 Genomes database (Ensembl GRCh38 – phase III) (African – AFR, European – EUR, East Asian – EAS, South Asian – SAS, and Admixed American – AMR) and data for blood donors from other states of Brazil [Santa Catarina - SC (Costa *et al.*, 2016a,b), Paraná – PR-POP1 and PR-POP2

(Guelsin *et al.*, 2011; Zacarias *et al.*, 2016), São Paulo - SP (Ribeiro *et al.*, 2009), Bahia – BA (Costa *et al.*, 2016a,b), and Minas Gerais – MG (Alves *et al.*, 2018)]. Comparison of allelic frequencies was performed using Fisher's exact test with R software in the Rcmdr package (Fox, 2005). A p -value < 0.05 was considered significant.

Genetic distance was determined as F_{ST} using the Arlequin v.3.5 program (Excoffier and Lischer, 2010), and 95% confidence intervals were estimated with R software using the diveRsity package with 3000 bootstraps (Keenan and McGinnity, 2013).

Results

The distribution of genotype frequencies was in HWE. Minor allele frequencies (MAFs) of the investigated polymorphisms in the Euro- and Afro-Brazilians of our sample, 1000 Genomes database, and data of blood donors from other states of Brazil are shown in Table 2. In our study, *KEL**06 and *FY**02N.01 allele frequencies differed between the

Euro- and Afro-Brazilian subgroups ($p=0.023$ and $p < 0.001$, respectively; Table 2). When compared to the 1000 Genomes database, the allele frequencies of our Euro-Brazilians were different from those described for AFR, EAS, and SAS

Table 1 - Characterization of blood groups alleles evaluated in present study.

BGS	Gene	Allele	dbSNP	Nucleotide	Amino acid
Kell	<i>KEL</i>	<i>KEL</i> *01 <i>KEL</i> *02	rs8176058	c.578C > T	p.Thr193Met
Kell	<i>KEL</i>	<i>KEL</i> *06 <i>KEL</i> *07	rs8176038	c.1790T > C	p.Leu597Pro
Kidd	<i>SLC14A1</i>	<i>JK</i> *01 <i>JK</i> *02	rs1058396	c.838A > G	p.Asn280Asp
Duffy	<i>ACKR1</i>	<i>FY</i> *01 <i>FY</i> *02	rs12075	c.125A > G	p.Asp42Gly
Duffy	<i>ACKR1</i>	<i>FY</i> *02W.01	rs34599082	c.265C > T	p.Arg89Cys
Duffy	<i>ACKR1</i>	<i>FY</i> *02N.01	rs2814778	c.1-67T > C	p.0
Diego	<i>SLC4A1</i>	<i>DI</i> *01 <i>DI</i> *02	rs2285644	c.2561C > T	p.Pro854Leu
MNS	<i>GYPB</i>	<i>GYPB</i> *S <i>GYPB</i> *s	rs7683365	c.143T > C	p.Met48Thr
Rh	<i>RHCE</i>	<i>RHCE</i> *E <i>RHCE</i> *e	rs609320	c.676G > C	p.Ala226Pro

Data obtained from ISBT; (Issitt and Crookston, 1984). BGS = Blood group system.

populations, except for the *GYPB*5* allele in the SAS population and the *KEL*06* allele in the EAS and SAS populations. When compared to EUR, the allele frequencies in Euro-Brazilians for *JK*02* ($p=0.002$), *FY*02N.01* ($p < 0.001$), and *DI*01* ($p=0.002$) variants differed. Comparison with the AMR population also revealed differences in *JK*02* ($p < 0.001$), *DI*01* ($p < 0.001$), and *RHCE*E* ($p < 0.001$) variants.

Comparison of Euro-Brazilians with blood donors from other regions of Brazil indicated differences in allele frequencies for *FY*01* ($p < 0.001$), *FY*02N.01* ($p=0.047$), and *DI*01* ($p=0.014$) from

Table 2 - Minor allele frequencies of blood groups variants in Euro and Afro-Brazilians from Rio Grande do Sul, 1000 Genomes Database and previous studies performed at Brazil.

Sample (n)	<i>KEL*01</i>	<i>KEL*06</i>	<i>JK*02</i>	<i>FY*01</i>	<i>FY*02W.01</i>	<i>FY*02N.01</i>	<i>DI*01</i>	<i>GYPB*5</i>
Euro-Brazilians (334)	0.033	0.003	0.424	0.444	0.015	0.076	0.010	0.320
Afro-Brazilians (48)	0.010	0.021	0.353	0.357	0.000	0.408	0.011	0.350
<i>p</i>	<i>ns</i>	<i>0.023</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>< 0.001</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
EUR (503) ¹	0.038	0.000 [§]	0.501 ^{¥§}	0.398	0.013	0.006 ^{¥§}	0.000 [¥]	0.339
AFR (661) ²	0.002 [¥]	0.099 ^{¥§}	0.228 ^{¥§}	0.019 ^{¥§}	0.000 ^{¥§}	0.964 ^{¥§}	0.001 [¥]	0.185 ^{¥§}
EAS (504) ³	0.000 [¥]	0.000 [§]	0.526 ^{¥§}	0.923 ^{¥§}	0.001 [¥]	0.000 ^{¥§}	0.026 [¥]	0.035 ^{¥§}
SAS (489) ⁴	0.006 [¥]	0.000 [§]	0.371 [¥]	0.640 ^{¥§}	0.004 [¥]	0.000 ^{¥§}	0.002 [¥]	0.325
AMR (347) ⁵	0.022	0.009	0.519 ^{¥§}	0.461	0.007	0.078 [§]	0.052 [¥]	0.344
SC (373) ⁶	0.030	nt	0.460	0.560 ^{¥§}	nt	0.050 ^{¥§}	0.030 [¥]	nt
PR-POP1 (251) ⁷	0.043	nt	0.498 ^{¥§}	0.436	nt	0.023 ^{¥§}	0.022	nt
PR-POP2 (400) ⁸	0.028	nt	0.488 ^{¥§}	0.365 [¥]	nt	0.123 ^{¥§}	nt	nt
SP (948) ⁹	0.024	nt	0.460 [§]	0.360 [¥]	0.016	0.185 ^{¥§}	0.020	0.279 [¥]
BA (196) ¹⁰	0.020	nt	0.380	0.357 [¥]	nt	0.436 [¥]	0.020	nt
MG (170) ¹¹	0.015	nt	0.406	0.297 [¥]	nt	0.229 ^{¥§}	nt	nt

Data are presented as relative frequency. Euro-Brazilians and Afro-Brazilian, present study. ns, non-significant; nt, non-tested; [¥] p -value < 0.05 when compared with Euro-Brazilians; [§] p -value < 0.05 when compared with Afro-Brazilians; [£] statistical analysis for comparison between Afro-Brazilians and AFR cannot be performed.

¹ EUR: European (CEU, Utah Residents (CEPH) with Northern and Western Ancestry; TSI, Toscani in Italia; FIN, Finnish in Finland; GBR, British in England and Scotland; IBS, Iberian Population in Spain). ²AFR: African (YRI, Yoruba in Ibadan, Nigeria; LWK, Luhya in Webuye, Kenya; GWD, Gambian in Western Divisions in the Gambia; MSL, Mende in Sierra Leone; ESN, Esan in Nigeria; ASW, Americans of African Ancestry in the SW USA; ACB, African Caribbeans in Barbados). ³EAS: East Asian (CHB, Han Chinese in Beijing, China; JPT, Japanese in Tokyo, Japan; CHS, Southern Han Chinese; CDX, Chinese Dai in Xishuangbanna, China; KHV, Kinh in Ho Chi Minh City, Vietnam). ⁴SAS: South Asian (IH, Gujarati Indians from Houston, Texas; PJL, Punjabi from Lahore, Pakistan; BEB, Bengali from Bangladesh; STU, Sri Lankan Tamils from the UK; ITU, Indian Telugu from the UK).

⁵ AMR: Admixed American (MXL, Mexican Ancestry from Los Angeles USA; PUR, Puerto Ricans from Puerto Rico; CLM, Colombians from Medellin, Colombia; PEL, Peruvians from Lima, Peru) of 1000 Genomes Project; ⁶ SC: Blood donors from the state of Santa Catarina (Costa *et al.* (2016a and 2016b)); ⁷ PR-POP1: Blood donors from the Southwest region of the state of Parana (Zacarias *et al.* (2016)), ⁸ PR-POP2: Blood donors from the state of Parana (Guelsin *et al.* (2011)), ⁹ SP: Blood donors from the state of São Paulo (Ribeiro *et al.*, 2009), ¹⁰ BA: Admixed population from the state of Bahia (Costa *et al.*, 2016a and 2016b and ¹¹ MG: Blood donors from the state of Minas Gerais (Alves *et al.*, 2018).

SC; *JK*02* ($p=0.013$), *FY*02N.01* ($p < 0.001$), and *RHCE*E* ($p=0.048$) from PR-POP1; *JK*02* ($p=0.016$), *FY*01* ($p=0.003$), and *FY*02N.01* ($p=0.004$) from PR-POP2; *FY*01* ($p < 0.001$), *FY*02N.01* ($p < 0.001$), and *GYPB*S* ($p=0.047$) from SP; and *FY*01* ($p=0.005$ and $p < 0.001$) and *FY*02N.01* ($p < 0.001$ and $p < 0.001$) from BA and MG, respectively.

The allele frequencies for *KEL*06* observed in Afro-Brazilians were similar only in AMR (Table 2), though the *JK*02* allele distribution in Afro-Brazilians was similar to that observed in the SAS, SC, BA and MG populations. Moreover, the *FY*01* allele frequency in Afro-Brazilians was similar to that in the EUR, AMR, PR, SP, BA and MG populations, but the *FY*02N.01* allele frequency observed in the present sample was different in all populations, except for BA (Table 2). The frequency of the *DI*01* variant was similar in all populations assessed. The *GYPB*S* variant showed different distributions in AFR ($p < 0.001$) and EAS ($p < 0.001$) and the *RHCE*E* variant in SAS ($p=0.028$).

Pairwise F_{ST} values for the samples of the present study and the 1000 Genomes database are shown in Table 3. Low genetic distance ($F_{ST}=0.055$) between Euro- and Afro-Brazilians of Rio Grande do Sul was observed when evaluated for population differentiation. In relation to EUR populations, the Euro- and Afro-Brazilian groups showed the lowest F_{ST} values (0.004 and 0.080, respectively), and lower F_{ST} values were also observed in comparisons of our groups and AMR populations (0.009 for Euro- and 0.061 for Afro-Brazilians). In contrast, the highest genetic distance was found between Euro-Brazilians of Rio Grande do Sul and the AFR population (0.431) and between AfroBrazilians and AFR (0.297). Figure 1 shows the genetic distance observed for the populations analyzed in this study based on blood group alleles. The main result of F_{ST} analysis indicated that the AFR population is genetically more distinct than the other populations. To evaluate the contribution of each variant to the genetic distance observed, F_{ST} values were also

estimated for each SNP by examining the present sample and the 1000 Genomes Database. According to F_{ST} values, rs2814778 (*c.1-67T > C*) and rs12075 (*c.125A > G*) polymorphisms in the *ACKR1* gene (Duffy blood group) present high differentiation among populations (0.865 and 0.399, respectively, Table 4).

Discussion

We examined population differentiation for the distribution of blood group alleles in blood donors from Rio Grande do Sul. Analysis of all variants together demonstrated that Euro- and Afro-Brazilian individuals from Rio Grande do Sul are genetically close ($F_{ST}=0.055$; Table 3). However, when each locus was evaluated individually, *KEL*06* and *FY*02N.01* allele frequencies were found to be significantly higher in the Afro-Brazilian group when compared with the Euro-Brazilian group (Table 2). Furthermore, based on data for AFR and EUR populations of the 1000 Genomes database, *KEL*06* allele frequencies differ between these continents, with higher frequencies in AFR than in EUR. The Fy^a and Fy^b antigens of the Duffy blood group act as receptors for malarial parasites on human RBCs (Miller *et al.*, 1976). The *FY*02N.01* allele predominates in malaria-endemic areas, such as some Africa regions, because it prevents expression of the receptor on the erythrocyte membrane, and consequently, these erythrocytes become refractory to infection by malarial parasites. These antigenic determinants have been used for determining ethnic composition and as anthropological markers (Cavasini *et al.*, 2007), possibly due to their impact on natural selection in different geographical regions (Miller *et al.*, 1976; Hamblin *et al.*, 2002). Taken together, these findings for *KEL*06* and *FY*02N.01* allele frequencies distributions indicate, as expected, a greater African background in the genetic pool of Afro-Brazilians than in EuroBrazilians in Rio Grande do Sul.

Table 3 - Pairwise F_{ST} among South Brazilian population and populations evaluated in 1000 Genome Database.

	Euro- descendants	Afro-descendants	AFR ¹	EUR ²	EAS ³	SAS ⁴	AMR ⁵
Euro- descendants	-						
Afro-descendants	0.055 (0.021 - 0.097)	-					
AFR ¹	0.431 (0.410 - 0.450)	0.297 (0.218 - 0.370)	-				
EUR ²	0.004 (0.001 - 0.008)	0.080 (0.042 - 0.131)	0.456 (0.441 - 0.469)	-			
EAS ³	0.200 (0.178 - 0.222)	0.350 (0.274 - 0.415)	0.633 (0.621 - 0.646)	0.205 (0.186 - 0.224)	-		
SAS ⁴	0.037 (0.024 - 0.051)	0.137 (0.080 - 0.199)	0.514 (0.499 - 0.529)	0.046 (0.034 - 0.060)	0.132 (0.116 - 0.150)	-	
AMR ⁵	0.009 (0.003 - 0.016)	0.061 (0.024 - 0.104)	0.438 (0.417 - 0.459)	0.009 (0.005 - 0.015)	0.174 (0.154 - 0.195)	0.044 (0.033 - 0.058)	-

Data are presented as F_{ST} (95% confidence interval).

¹ AFR: African (YRI, Yoruba in Ibadan, Nigeria; LWK, Luhya in Webuye, Kenya; GWD, Gambian in Western Divisions in the Gambia; MSL, Mende in Sierra Leone; ESN, Esan in Nigeria; ASW, Americans of African Ancestry in the SW USA; ACB, African Caribbeans in Barbados). ²EUR: European (CEU, Utah Residents (CEPH) with Northern and Western Ancestry; TSI, Toscani in Italia; FIN, Finnish in Finland; GBR, British in England and Scotland; IBS, Iberian Population in Spain). ³EAS: East Asian (CHB, Han Chinese in Beijing, China; JPT, Japanese in Tokyo, Japan; CHS, Southern Han Chinese; CDX, Chinese Dai in Xishuangbanna, China; KHV, Kinh in Ho Chi Minh City, Vietnam). ⁴SAS: South Asian (IH, Gujarati Indians from Houston, Texas; PJL, Punjabi from Lahore, Pakistan; BEB, Bengali from Bangladesh; STU, Sri Lankan Tamils from the UK; ITU, Indian Telugu from the UK).

⁵ AMR: Admixed American (MXL, Mexican Ancestry from Los Angeles USA; PUR, Puerto Ricans from Puerto Rico; CLM, Colombians from Medellin, Colombia; PEL, Peruvians from Lima, Peru).

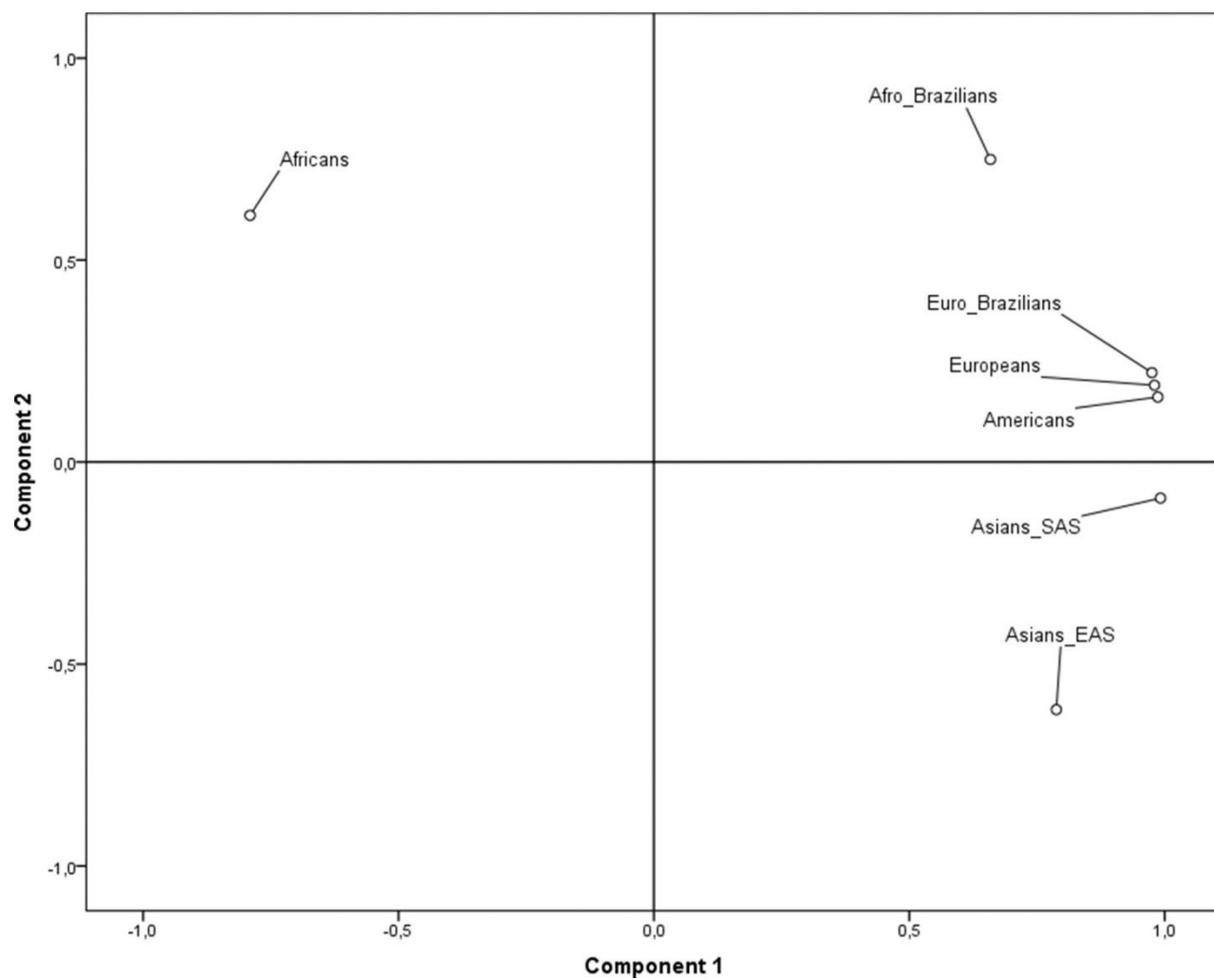


Figure 1 - Genetic distance among the populations analyzed in this study based on blood group alleles.

Table 4 - SNPs population differentiation.

Gene	dbSNP	F_{ST} (95% CI)
<i>ACKR1</i>	rs34599082	0.007 (0.003 - 0.012)
<i>KEL</i>	rs8176058	0.018 (0.012 - 0.025)
<i>SLC4A1</i>	rs2285644	0.028 (0.018 - 0.040)
<i>RHCE</i>	rs609320	0.029 (0.020 - 0.038)
<i>SLC14A1</i>	rs1058396	0.064 (0.051 - 0.079)
<i>KEL</i>	rs8176038	0.082 (0.066 - 0.097)
<i>GYPB</i>	rs7683365	0.083 (0.072 - 0.094)
<i>ACKR1</i>	rs12075	0.399 (0.384 - 0.413)
<i>ACKR1</i>	rs2814778	0.865 (0.847 - 0.881)

Based on the comparison of allele frequencies, which was conducted separately for blood group systems, it is evident that our Euro-Brazilian group had more similarities with the EUR and AMR populations in the 1000 Genomes database than with the AFR, EAS and SAS populations (Table 2). Although some significant differences have been reported, the frequencies observed for these alleles were not highly discrepant among these populations. Moreover, these findings were corroborated by analyses of all genetic markers together (EUR: F_{ST} =0.004 and AMR: F_{ST} =0.009, Table 3). In the same way, the Afro-Brazilians were found to be closer to EUR (F_{ST} =0.080) and AMR (F_{ST} =0.061) than to AFR (F_{ST} =0.297) populations. It is important to emphasize that the classification of ancestry in our sample was performed according to phenotypic characteristics, as it is performed in the blood bank. Previous studies have also demonstrated a discrepancy between skin color information and genetic ancestry (Boquett *et al.*, 2015; Lima-Costa *et al.*, 2015). For example, Boquett *et al.* (2015) evaluated self-assessed skin color and HLA genetic information of bone marrow donors from the state of Rio Grande do Sul and found that Brazilian individuals self-assessing as Black were closer genetically to European populations than to African populations (Boquett *et al.*, 2015). Lima-Costa *et al.* (2015) also demonstrated that the association between ethnorracial self-classification and genome-based ancestry is not linear.

Although the *KEL**06 and *FY**02N.01 allele frequencies indicated more African ancestry in the Afro-Brazilian group than in the Euro-Brazilian group, these allele frequencies in the former are intermediate between the AFR and EUR populations. These findings were expected due to the colonization process of southern Brazil, which is predominantly characterized by admixture between European descendants. Consequently, this population has a distinct genetic background in relation to populations from other Brazilian regions (Pena *et al.*, 2011; Salzano and Sans, 2014).

When our data were compared to allele frequencies of blood donors from Santa Catarina (Costa *et al.*, 2016a,b), Paraná (Guelsin *et al.*, 2011; Zacarias *et al.*, 2016), São Paulo (Ribeiro *et al.*, 2009), Bahia (Costa *et al.*, 2016a,b) and Minas Gerais (Alves *et al.*, 2018), *JK**02, *FY**01 and *FY**02N.01 variants presented greater differences in frequency among Brazilian regions (Table 2). Regardless of the similarities in the ancestral process of colonization among some localities, European ancestry is uniformly preponderant in southern Brazil. For instance, in the Rio Grande do Sul population, the composition of Europeans, Africans, and Amerindians is 72.9%, 14%, and 13%, respectively. In Santa Catarina, it is 79.7%, 11.4%, and 8.9%, respectively. In the state of Paraná, the average individual has 71% European ancestry, followed by 17.5% African, and 11.5% Amerindian. In São Paulo, the genetic background of the population is composed of 62.9%

European, 25.5% African, and 11.6% Amerindian. In Minas Gerais, it is 59.2%, 28.9%, and 11.9%, respectively (Manta *et al.*, 2013). The genomic ancestry of the Bahia population is

42.4% European, 50.5% African, and 5.8% Amerindian (Lima-Costa *et al.*, 2015). Despite observed interethnic genetic similarity, there are significant differences in the frequencies of RBC polymorphisms among these populations. This suggests that data must be well documented and considered within the perspective of transfusion medicine.

Although similarity was demonstrated between Euroand Afro-Brazilians when all variants were analyzed together, the ethnic classification that uses phenotypic criteria to find blood units with rare antigens may be important when the *KEL*06* and, mainly, *FY*02N.01* alleles are considered for this southern Brazilian population. Thus, when there is a need to detect blood units with an absence of Duffy antigens, there is a greater probability of finding donors in this group. To the best of our knowledge, no other studies have reported RBC genetic variability in Rio Grande do Sul, emphasizing the intense process of admixture that makes the Brazilian population unique in its ethnic background.

Acknowledgments

The authors are very grateful to Ananda C.S. Galvão (*in memoriam*) for her effort and dedication in this study.

This study was supported by the grant

PqG2014/FAPERGS 2373-2551/14-4.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

Author Contribution

SA, TO and MF designed the research and conceived the project; GW and MMOR performed the data collection; GW, MMOR, GH, MF, and SA carried out the research; GW, MMOR, GH, MF, JDL, and SA performed the literature search and analyzed the data. GW, MMOR, GH, MF, and SA interpreted the data and wrote the manuscript. SA had the primary responsibility for the final content. All authors were involved in writing the paper and gave final approval to the submitted and published versions.

References

- Alves VM, De Vito FB, Martins PRJ, Silva SS, Castilho L and Moraes-Souza H (2018) Frequency of red blood cell genotypes in multi-transfused patients and blood donors from Minas Gerais, Southeast Brazil. *Transfus Apher Sci* 57:71–75.
- Anstee DJ (2009) Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood* 114:248–256.
- Arnoni CP, Muniz JG, Paula TA, Person RDM, Gazito D, Baleotti Jr W, Barreto JA, Castilho L and Latini FRM (2013) An easy and efficient strategy for KEL genotyping in a multiethnic population. *Rev Bras Hematol Hemoter* 35:99–102.
- Baleotti W, Suzuki RB, Polotto M, Ruiz MO, Fabron A and Castilho L (2011) A PCR-based strategy for Dombrock screening in Brazilian blood donors reveals a novel allele: The DO*A-WL. *J Clin Lab Anal* 25:79–82.

- Boquett J, Schüler-Faccini L, Jobim LF, Jobim M, Fagundes NJR and Hünemeier T (2015) Self-assessment of color categories and its relationship with HLA profiling in Brazilian bone marrow donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 21:1140–1144.
- Cavasini CE, De Mattos LC, Couto AARDA, Couto VSCDA, Gollino Y, Moretti LJ, Bonini-Domingos CR, Rossit ARB, Castilho L and Machado RLD (2007) Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 6:1–8.
- Costa D, Schinaider A, Santos M, Schörner E, Simon D, Maluf S, Moraes A and Silva M (2016a) Frequencies of polymorphisms of the Rh, Kell, Kidd, Duffy and Diego systems of Santa Catarina, Southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 38:199–205.
- Costa DC, Schinaider AA, Santos TM, Schörner EJ, Simon D, Maluf SW, Moraes ACR and Silva MCS (2016b) Erratum to “Frequencies of polymorphisms of Rh, Kell, Kidd, Duffy and Diego systems of Santa Catarina, southern Brazil”. *Rev Bras Hematol Hemoter* 38:371–372.
- Credidio D, Pellegrin J and Castilho L (2011) Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: Impact for typing and transfusion strategy. *Immunohematology* 27:6–11.
- Cruz BR, Chiba AK, Moritz E and Bordin JO (2012) RHD alleles in Brazilian blood donors with weak D or D-negative phenotypes. *Transfus Med* 22:84–89.
- Durso DF, Bydlowski SP, Hutz MH, Suarez-Kurtz G, Magalhães TR and Pena SDJ (2014) Association of genetic variants with self-assessed color categories in Brazilians. *PLoS One* 9:e83926.
- Excoffier L and Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564–567.
- Faria MA, Martins ML, Schmidt LC and Malta MCFS (2012) Molecular analysis of the GYPB gene to infer S, s, and U phenotypes in an admixed population of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 34:212–216.
- Flôres MALR, Visentainer JEL, Guelsin GAS, Fracasso AS, Melo FC, Hashimoto MN and Sell AM (2014) Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group system polymorphism in Brazilian Japanese descendants. *Transfus Apher Sci* 50:123–128.
- Fox J (2005) The R commander: A basic statistics graphical user interface to R. *J Stat Softw* 14:1–42.
- Guelsin GAS, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, Hirle LS and Visentainer JEL (2011) Genetic polymorphisms of Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in a population from the State of Paraná, southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 33:21–5.
- Hamblin MT, Thompson EE and Di Rienzo A (2002) Complex signatures of natural selection at the Duffy blood group locus. *Am J Hum Genet* 70:369–383.
- Issitt P and Anstee D (1998) *Applied Blood Group Serology*. 4th edition. Montgomery Scientific Publications, Montgomery, 1232 pp.
- Keenan K and McGinnity P (2013) *diveRsity*: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors. *Methods Ecol Evol* 4:782–788.
- Lahiri D and Nurnberger J (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Lima-Costa M, Rodrigues L, Barreto M, Gouveia M, Horta B, Mambrini J, Kehdy F, Pereira A, Rodrigues-Soares F, Victora C *et al.* (2015) Genomic ancestry and ethnoracial selfclassification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep* 5:9812.
- Manta FSN, Pereira R, Vianna R, Araújo A, Gitaí D, Silva D, Wolfgramm E, Pontes I, Aguiar J, Moraes M *et al.* (2013) Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-indels. *PLoS One* 8:e75145.
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF and McGinniss MH (1976) The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks - the Duffy blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 295:302–304.
- Mota M, Dezan M, Valgueiro MC, Sakashita AM, Kutner JM and Castilho L (2012) RHD allelic identification among D-Brazilian blood donors as a routine test using pools of DNA. *J Clin Lab Anal* 26:104–108.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM and Pena SDJ (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:177–182.
- Pellegrino J, Castilho L, Rios M and De Souza CA (2001) Blood group genotyping in a population of highly diverse ancestry. *J Clin Lab Anal* 15:8–13.
- Pena SDJ, di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FSG, Kohlrausch F, Magno LAV, Montenegro RC, Moraes MO *et al.* (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6:e17063.

- Piassi FCC, Santos SME, Castilho LM, Baleotti Júnior W, Suzuki RB and Cunha DM (2013) Dombrock genotyping in Brazilian blood donors reveals different regional frequencies of the HY allele. *Rev Bras Hematol Hemoter* 35:400–403.
- Ribeiro KR, Guarnieri MH, Da Costa DC, Costa FF, Pellegrino J and Castilho L (2009) DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigenmatched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang* 97:147–152.
- Salzano FM and Sans M (2014) Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet Mol Biol* 37:151–170.
- Santos SA (2002) Historical roots of the “Whitening” of Brazil. *Polit Cult Form* 29:61–82.
- Zacarias JMV, Langer IBV, Visentainer JEL and Sell AM (2016) Profile of Rh, Kell, Duffy, Kidd, and Diego blood group systems among blood donors in the Southwest region of the Paraná state, Southern Brazil. *Transfus Apher Sci* 55:302–307.

Internet resources

- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística I (2017) Área territorial oficial, http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/default_territ_area.shtm (accessed 25 February 2017).
- International Society of Blood Transfusion I (2017) Red Cell Immunogenetics and Blood Terminology, <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cellimmunogenetics-and-blood-group-terminology> (accessed 25 February 2017).
- ThermoFisher Scientific SNP Genotyping Analysis Using TaqMan Assays, <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assayshtml>.

Associate Editor: Regina C. Mingroni-Netto

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (type CC-BY), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited.

Currículo Lattes



Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7547162227885244>

ID Lattes: **7547162227885244**

Última atualização do currículo em 07/01/2024

Biomédica (dezembro/ 2015) com habilitação em Biologia molecular, Banco de sangue e Patologia Clínica pela Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Mestre em Biociências pela UFCSPA (janeiro/ 2018) com ênfase em genética populacional. Atualmente é doutoranda no Programa de Pós-graduação em Biociências UFCSPA e Especialista em Hemoterapia na Agência Transfusional do Hospital Cristo Redentor - Grupo Hospitalar Conceição. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues
Nome em citações bibliográficas	RODRIGUES, M. M. O.; RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA; RODRIGUES, MMO
Lattes iD	 http://lattes.cnpq.br/7547162227885244

Endereço

Endereço Profissional	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Rua Sarmento Leite Centro Histórico 90050170 - Porto Alegre, RS - Brasil Telefone: (51) 33039000
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2018	Doutorado em andamento em BIOCIÊNCIAS. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Avaliação de variantes moleculares dos grupos sanguíneos ABO e Rh em doadores de sangue de Porto Alegre/ RS e em tribos indígenas brasileiras Orientador:  Marilu Fiegenbaum. Coorientador: Silvana de Almeida. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, FAPERGS, Brasil.
2016 - 2018	Mestrado em BIOCIÊNCIAS. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Análise molecular de variantes de grupos sanguíneos em populações indígenas  , Ano de Obtenção: 2018. Orientador:  Marilu Fiegenbaum. Coorientador: Silvana de Almeida. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Humana e Médica. Graduação em Biomedicina.
2011 - 2015	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Análise do polimorfismo 2561 C>T no gene SLC4A1 em doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Orientador: Silvana de Almeida.

Formação complementar

- 2022 - 2023** Curso de curta duração em Patient Blood Management para Serviços de Saúde. (Carga horária: 45h). Instituto Pró-Hemo, IPH, Brasil
- 2019 - 2019** Fundamentos da Biologia Molecular. . (Carga horária: 60h). Nacientífico, NAC, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em Como Escrever Artigos de Revisão. (Carga horária: 3h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2019 - 2019** NGS: a nova era no sequenciamento de DNA e análise de dados. . (Carga horária: 60h). Nacientífico, NAC, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em II Simpósio Interdisciplinar em hemostasia e trombose - HEMO 2019. (Carga horária: 10h). Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia, ABHH, Ribeirão Preto, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em Highlights of ISBT - HEMO 2019. (Carga horária: 10h). Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia, ABHH, Ribeirão Preto, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em Terapias avançadas em hemoglobinopatias no HEMO 2019. (Carga horária: 3h). Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia, ABHH, Ribeirão Preto, Brasil
- 2018 - 2018** minicurso Sequenciamento de nova geração (next generation sequencing). . (Carga horária: 3h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2017 - 2017** Análises bioinformáticas de dados gerados em plataforma NGS - Genética 2017. . (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirão Preto, Brasil
- 2014 - 2014** Extensão universitária em edições I, II, III e IV Feira de Saúde UFCSPA 2014. (Carga horária: 24h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2013 - 2013** Extensão universitária em edições IV, V Feiras de Saúde 2013. (Carga horária: 12h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2012 - 2012** Terapia gênica. . (Carga horária: 3h). Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, São Paulo, Brasil
- 2012 - 2012** Extensão universitária em edição I Feiras de Saúde UFCSPA 2012. (Carga horária: 4h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2012 - 2012** Programa de monitoria - disciplina de Citologia. . (Carga horária: 190h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2011 - 2011** Extensão universitária em edições I, IV Feiras de Saúde UFCSPA - 2011. (Carga horária: 8h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2011 - 2011** IV Mini-curso de Capacitação de Jovens Cientistas. . (Carga horária: 3h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional

1. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo Institucional

- 2021 - 2022** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Docente Convocado, Regime: Parcial
Outras informações:
Docente convidada para ministrar aulas de imunohematologia na disciplina de Banco de Sangue do curso de Biomedicina diurno e noturno.
- 2015 - 2015** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Colaboradora , Carga horária: 15, Regime: Parcial
Outras informações:
Ministração do módulo de Imunohematologia para o curso de Biomedicina Diurno e Noturno da UFCSPA.
- 2014 - 2015** Vínculo: Discente , Enquadramento funcional: Iniciação científica voluntária, Regime: Parcial
Outras informações:
Participação no Projeto de Pesquisa "Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos: Impacto sobre a prática Transfusional", orientado pela Professora Dr. Silvana Almeida.
- 2013 - 2015** Vínculo: Discente , Enquadramento funcional: Bolsista, Regime: Parcial
Outras informações:
Projeto de extensão Feira de Saúde - Banca de Tipagem sanguínea. Projeto orientado pela professora Drª Cristine Goebel.
- 2012 - 2012** Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitoria voluntária , Carga horária: 10, Regime: Parcial
Outras informações:
Realizando monitoria na disciplina de Citologia para o curso de Biomedicina, auxiliando a professora e alunos durante as aulas que contemplam atividades práticas, estudos extra-classe.
- 2011 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Título: Avaliação clínica de leveduras emergentes. Dez anos de experiência (2000-2010).

Atividades

- 03/2019 - 03/2021** Conselhos, Comissões e Consultoria, Programa de pós graduação em Biociências
Especificação:
Representante discente na comissão coordenadora do PPG Biociências UFCSPA

2. Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Vínculo Institucional

- 2015 - 2015** Vínculo: Estágio obrigatório , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Realização de Estágio final Obrigatório em Banco de Sangue - Hemoterapia no Banco de Sangue. Supervisionado pela professora Drª Sandrine Wagner e pelo preceptor local Dr Dario Brum.
- 2015 - 2015** Vínculo: Estágio obrigatório , Enquadramento funcional: Estagiária, Regime: Parcial
Outras informações:
Realização do estágio curricular obrigatório em Análises Clínicas no Laboratório Central. Supervisionado pela professora Drª Liane Rotta e pelo preceptor local Dr Carlos Voegeli.

3. Hospital Nossa Senhora da Conceição - GHC

Vínculo Institucional

- 2020 - Atual** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Especialista em hemoterapia , Carga horária: 36, Regime: Parcial
Outras informações:
Especialista em Hemoterapia na Agência Transfusional do Hospital Cristo Redentor - GHC

Atividades

- 08/2022 - Atual** Conselhos, Comissões e Consultoria, Comitê Transfusional HCR
Especificação:
membro

Projetos

Projetos de pesquisa

2023 - Atual Protocolo de Sangue Total (PST) no trauma hemorrágico, experiência no Hospital Cristo Redentor, Porto Alegre/ RS

Descrição: O HCR por ser especializado no atendimento a vítimas de politrauma, em abril de 2021 implementou o Protocolo de Sangue Total (PST) para uso em pacientes em choque hemorrágico, visando uma abordagem rápida e segura. Estudo observacional (transversal), baseado na coleta de dados de pacientes confirmados do uso do PST no HCR no período de utilização do PST. A coleta de dados será realizada por análise retrospectiva de prontuários dos pacientes admitidos no HCR (feita por leitura e extração de dados presentes nos prontuários médicos) dos diversos aspectos sobre o uso PST, entre os quais destacamos: perfil clínico epidemiológico, tipo de trauma, número de unidades transfundidas, grupo ABO/RhD do paciente, sexo e desfechos.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues; FERNANDES, MS (Responsável)

2013 - Atual Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos: Impacto sobre a prática transfusional

Descrição: Os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados por antígenos na membrana eritrocitária, com características funcionais e polimórficas definidas. A utilização de técnicas moleculares na determinação das variantes genéticas poderia contribuir para aumentar a segurança e eficácia dos procedimentos transfusionais de pacientes politransfundidos. A genotipagem de grupos sanguíneos permite conhecer qual alteração molecular ocasiona a formação de diferentes grupos sanguíneos, sendo que a maioria das alterações moleculares ocorre por uma única alteração de nucleotídeo (SNP). Além da importância clínica alguns alelos de grupos sanguíneos também podem ser considerados marcadores antropológicos, como o alelo D1*01 (sistema Diego) para populações de ameríndios e asiáticos. Os objetivos desse estudo são investigar polimorfismos em genes de grupos sanguíneos em doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, descrevendo a frequência destas variantes nesta amostra, bem como, correlacionar os achados genotípicos com os fenotípicos visando otimizar a prática transfusional. Além disso, também avaliamos o perfil dos mesmos grupos sanguíneos em amostras de tribos Guaraní e Kaingang.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (4);

Integrantes: Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues; Sandrine Comparsi Wagner; Gabriela Waskow; Tor Gunnar Hugo Onsten; Silvana de Almeida (Responsável); Samantha Brum Leite; Marilu Fiegenbaum; Gabriela Höher

2011 - 2013 Avaliação clínica de infecções por *Trichosporon* sp.

Descrição: Com o aumento de pacientes imunocomprometidos nas últimas décadas, os fungos têm emergido como uma das causas de doenças humanas, dentre as leveduras emergentes estão as do gênero *Trichosporon* sp.. Com o objetivo de avaliar clinicamente os casos de infecções por *Trichosporon* sp., foi realizado um estudo de casos diagnosticados da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (2000 - 2010), revisando a apresentação clínica, condição predisponente, terapia utilizada e evolução dos pacientes.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues; Cristine Souza Goebel (Responsável); Flávio Mattos de Oliveira; Luiz Carlos Severo; Alessandro Comarú Pasqualotto

Projeto de extensão

2015 - 2015 Liga do Sangue

Descrição: A Liga do Sangue é um órgão acadêmico com autonomia no que concerne a aspectos econômico-financeiros, didáticos, gerencial-administrativos, comunitários e científicos. A Liga do Sangue tem por finalidades: I - Congregar acadêmicos da UFCSPA interessados no aprendizado e no desenvolvimento de conhecimentos básicos e técnico-científicos, dos mais variados aspectos, relacionados à doação de sangue e à hemoterapia; II - Promover cursos, seminários, discussões de casos e palestras sobre o tema e afins; III - Construir um cadastro dos participantes interessados na doação de sangue, para que periodicamente, pequenos grupos sejam convidados a realizar a doação de sangue no hemocentro/ banco de sangue mais próximo; IV - Formar doadores de repetição voluntários e conscientes, que possam também ser disseminadores destas informações fora da universidade; V - Permitir o engajamento nas atividades da Liga de pessoas que sejam inaptos temporários ou definitivos para a doação, mas que se interessem no assunto, promovendo outros multiplicadores da ideia; VI - Congregar acadêmicos dos cursos da saúde, como Medicina, Enfermagem, Farmácia, Biomedicina, Psicologia, mostrando possibilidades de atuação na área de medicina transfusional junto aos hemocentros/ bancos de sangue; VII - Promover cursos, simpósios e congressos com enfoque no âmbito laboratorial da hematologia e da hemoterapia (que inclui todo o ciclo do sangue em bancos de sangue/hemocentros, desde a captação de doadores, processamento e análises laboratoriais, até a transfusão) com o objetivo de divulgá-las.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (4);

Integrantes: Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues; Sandrine Comparsi Wagner (Responsável); Gabriela Waskow; Samantha Brum Leite; Érika Leotério

2013 - 2015 Tipagem sanguínea e triagem de anemias em escolas públicas de Porto Alegre

Descrição: O curso de biomedicina realiza o projeto de "Tipagem sanguínea e triagem de anemias em escolas públicas de Porto Alegre" na Feira de Saúde/UFCSPA, objetivando a conscientização da importância da doação de sangue. Neste contexto, proporcionamos a interação entre os acadêmicos de diferentes séries e cursos, docentes e a comunidade para promover a saúde.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Mirelen Moura de Oliveira Rodrigues; Cristine Souza Goebel (Responsável); Pedro Roosevelt Torres Romão; Sandrine Comparsi Wagner

Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Hemoterapia
3. Micologia

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Razoavelmente
Espanhol	Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente
Português	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

- 2019** Melhor dissertação de mestrado dos programas de pós-graduação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)
- 2017** Menção honrosa pela participação no prêmio Francisco Mauro Salzano, trabalho intitulado "Genotyping of blood groups alleles in South American Indians" no Brazilian-International congress of genetics, Sociedade Brasileira de Genética
- 2015** Trabalho destaque na categoria "Trabalhos relacionados à pesquisa". Título: Genotipagem dos alelos D1*01 e D1*02 em doadores de sangue de Porto Alegre., UFCSPA
- 2014** Trabalho destaque na categoria "Trabalhos relacionados à extensão". Título: Tipagem sanguínea e incentivo à doação de sangue em escolas de Porto Alegre, UFCSPA

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **doi:** WOHLBERG, MF; RODRIGUES, MMO; OLIVEIRA, LCC; SCHNEIDER, E
PERFIL DE ANTICORPOS IRREGULARES IDENTIFICADOS EM PACIENTES ATENDIDAS POR UMA
AGÊNCIA TRANSFUSIONAL DE PORTO ALEGRE. Hematology Transfusion And Cell Therapy. **JCR**,
v.45, p.S616 - S617, 2023.
2. **doi:** RODRIGUES, MMO; WOHLBERG, MF; FERNANDES, MS
TWO YEARS OF USING LOW-TITER GROUP O WHOLE BLOOD TRANSFUSION EXPERIENCE IN A
TRAUMA HOSPITAL IN SOUTH BRAZILIAN. Hematology Transfusion And Cell Therapy. **JCR**, v.45,
p.S736 - , 2023.
3. **doi:** RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA; HÖHER, GABRIELA; WASKOW, GABRIELA;
HUTZ, MARA HELENA; LINDENAU, JULIANA DAL-RI; PETZL-ERLER, MARIA LUIZA; CALLEGARI-
JACQUES, SÍDIA MARIA; ALMEIDA, SILVANA; FIEGENBAUM, MARILU
Blood groups in Native Americans: a look beyond ABO and Rh. GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY
(ONLINE VERSION). **JCR**, v.44, p.e20200255 - , 2021.
4. **doi:** RODRIGUES, MMO; KNAU, T; GLADZIK, S; ROMAN, L; SANTOS, ARCD; ALVES, AP;
WINCKLER, MA; ANGNES, DI; FERNANDES, MS
CAPTAÇÃO DE DOADORES EM UM HOSPITAL DE TRAUMA DE PORTO ALEGRE/RS DURANTE A
PANDEMIA. Hematology Transfusion And Cell Therapy. **JCR**, v.43, p.S339 - , 2021.
5. **doi:** RODRIGUES, MMO; SILVA, HM; GLADZIK, S; MENEGOTO, PR; MATTOS, D; WINCKLER, MA;
FERNANDES, MS
IMPLEMENTAÇÃO DO PROTOCOLO DE SANGUE TOTAL NO HOSPITAL CRISTO REDENTOR/RS
ESPECIALISTA EM TRAUMA. Hematology Transfusion And Cell Therapy. **JCR**, v.43, p.S396 - , 2021.
6. **doi:** WASKOW, GABRIELA; RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA; HÖHER, GABRIELA;
ONSTEN, TOR; LINDENAU, JULIANA DAL-RI; FIEGENBAUM, MARILU; ALMEIDA, SILVANA
Genetic variability of blood groups in southern Brazil. GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY (ONLINE
VERSION). **JCR**, v.43, p.e20180327 - , 2020.
7. **doi:** HÖHER, GABRIELA; RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA; WASKOW, GABRIELA;
AGNES, GRASIELA; VON BURG, PÂMELA VICTORIA; ONSTEN, TOR; FIEGENBAUM, MARILU;
ALMEIDA, SILVANA
Identification of ACKR1 variants associated with altered Duffy phenotype expression in blood donors from
southern Brazil. TRANSFUSION AND APHERESIS SCIENCE. **JCR**, v.março, p.102768 - , 2020.
8. GOEBEL, C. S.; RODRIGUES, M. M. O.; PAZ, L. M.
Projeto de extensão - Feira de saúde do curso de biomedicina da Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre: aproximando a universidade da comunidade. Revista Extensão. , v.VII, p.166 -
175, 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. RODRIGUES, M. M. O.; WASKOW, G.; HOHER, G.; BURG, P. V. V.; HUTZ, M. H.; SALZANO, F. M.;
ALMEIDA, S.; FIEGENBAUM, M.
Genotipagem de grupos sanguíneos em tribos Kaingang e Guaraní In: CONGRESSO BRASILEIRO DE
HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR – HEMO 2017, 2017, Curitiba.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2017. v.39. p.S349 - S350
2. HOHER, G.; RODRIGUES, M. M. O.; WASKOW, G.; AGNES, G.; BURG, P. V. V.; ALMEIDA, S.;
FIEGENBAUM, M.; ONSTEN, T. G. H.
IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DO GENE ACKR1 ASSOCIADAS À EXPRESSÃO ALTERADA DO
FENÓTIPO DUFFY EM BRASILEIROS DA REGIÃO SUL In: CONGRESSO BRASILEIRO DE
HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR – HEMO 2017, 2017, Curitiba.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2017. v.39. p.S314 - S314
3. LEITE, S. B.; WAGNER, S. C.; RODRIGUES, M. M. O.; ALMEIDA, S.; WASKOW, G.; ONSTEN, T. G. H.
Classificação de Fitzpatrick: perfil fenotípico em doadores de sangue do HCPA-RS In: XV Congresso
Brasileiro de Biomedicina e III Congresso Internacional de Biomedicina, 2016, Bento Gonçalves.
Anais do XV Congresso Brasileiro De Biomedicina & III Congresso Internacional de Biomedicina. ,
2016.
4. WASKOW, G.; RODRIGUES, M. M. O.; HOHER, G.; WAGNER, S. C.; ONSTEN, T. G. H.; FIEGENBAUM,
M.; ALMEIDA, S.
Perfil de alelos raros de grupos sanguíneos em doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto
Alegre/RS In: XV Congresso Brasileiro de Biomedicina e III Congresso Internacional de Biomedicina.,
2016, Bento Gonçalves.
Anais do XV Congresso Brasileiro De Biomedicina & III Congresso Internacional de Biomedicina. ,
2016.

5. WASKOW, G.; RODRIGUES, M. M. O.; GALVAO, A. C. S.; LEITE, S. B.; ONSTEN, T. G. H.; ALMEIDA, S. GENOTIPAGEM DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS RAROS EM DOADORES DE SANGUE DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO), 2015, São Paulo.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2015. v.37. p.288 - 289
6. LEITE, S. B.; GALVAO, A. C. S.; WAGNER, S. C.; RODRIGUES, M. M. O.; WASKOW, G.; ALMEIDA, S. PERFIL DE FENÓTIPO ERITROCITÁRIO EM DOADORES DE SANGUE DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DE FITZPATRICK In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO), 2015, São Paulo.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2015. v.37. p.259 - 259
7. RODRIGUES, M. M. O.; ROMAO, P. R. T.; WAGNER, S. C.; CASTRO, E. C.; CAMARGO, A. L.; GOEBEL, C. S. Tipagem sanguínea em escolas públicas de Porto Alegre/RS: uma estratégia de incentivo à doação de sangue In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO), 2014, Florianópolis.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2014. v.36. p.260 - 261
8. RODRIGUES, M. M. O.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C.; GOEBEL, C. S. Avaliação Clínica de leveduras emergentes. Dez anos de experiência (2000-2010) In: V Congresso internacional de bioanálises, VIII Congresso sulbrasileiro de Biomedicina e XII Semana Gaúcha de Biomedicina, 2012, Novo Hamburgo.
V Congresso internacional de bioanálises e VIII Congresso sulbrasileiro de Biomedicina, 2012.

Apresentação de trabalho e palestra

1. RODRIGUES, M. M. O.; AGNES, G.; ALMEIDA, S.; FIEGENBAUM, M. AVALIAÇÃO DE DISCREPÂNCIA ENTRE GENOTIPAGEM E FENOTIPAGEM DO SISTEMA DE GRUPOS SANGÜÍNEOS RH EM DOADORES DE SANGUE DE UM HOSPITAL PÚBLICO DE PORTO ALEGRE, 2023. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
2. RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA Solicitei hemocomponente, e agora? Urgências, 2023. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
3. RODRIGUES, M. M. O.; WOHLBERG, M. F.; FERNANDES, MS TWO YEARS OF USING LOW-TITER GROUP O WHOLE BLOOD TRANSFUSION EXPERIENCE IN A TRAUMA HOSPITAL IN SOUTH BRAZILIAN, 2023. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
4. RODRIGUES, M. M. O. HÁ SANGUE ESCORRENDO EM SUAS VEIAS ... TUDO SOBRE DOAÇÃO DE SANGUE, 2022. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
5. RODRIGUES, M. M. O. Hemoterapia: quais são os processos que antecedem a transfusão?, 2022. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
6. RODRIGUES, M. M. O. Reações transfusionais, 2022. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
7. RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA; KNAU, T.; GLADZIK, S.; ROMAN, L.; SANTOS, ARCD; ALVES, AP; WINCKLER, MA; ANGNE, DI; FERNANDES, MS CAPTAÇÃO DE DOADORES EM UM HOSPITAL DE TRAUMA DE PORTO ALEGRE/ RS DURANTE A PANDEMIA, 2021. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
8. RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA; SILVA, HM; GLADZIK, S.; MENEGOTO, PR; MATTOS, D; WINCKLER, MA; FERNANDES, MS IMPLEMENTAÇÃO DO PROTOCOLO DE SANGUE TOTAL NO HOSPITAL CRISTO REDENTOR/ RS ESPECIALISTA EM TRAUMA, 2021. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
9. RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA; GOEBEL, C. S. Projeto piloto: triagem de anemias em escolas públicas de Porto Alegre, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
10. RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA; GOEBEL, C. S. Tipagem sanguínea e incentivo à doação de sangue em escolas de Porto Alegre, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
11. RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA; GOEBEL, C. S. Infecção por Trichosporon sp. em pacientes transplantados, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
12. RODRIGUES, MIRELEN MOURA DE OLIVEIRA; GOEBEL, C. S. Avaliação Clínica de leveduras emergentes. Dez anos de experiência (2000-2010), 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Orientação de outra natureza

1.  Patrícia Dias Barbosa. **Análise molecular dos antígenos c/C e e/E do sistema Rh em tribos indígenas Kaingang e Guaraní.** 2019. Orientação de outra natureza (Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **3º Congresso UFCSPA: ciência para um mundo em movimento**, 2023. (Congresso)
AVALIAÇÃO DE DISCREPÂNCIA ENTRE GENOTIPAGEM E FENOTIPAGEM DO SISTEMA DE GRUPOS SANGÜÍNEOS RH EM DOADORES DE SANGUE DE UM HOSPITAL PÚBLICO DE PORTO ALEGRE.
 2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso brasileiro de hematologia, hemoterapia e terapia celular**, 2023. (Congresso)
TWO YEARS OF USING LOW-TITER GROUP O WHOLE BLOOD TRANSFUSION EXPERIENCE IN A TRAUMA HOSPITAL IN SOUTH BRAZILIAN.
 3. Conferencista no(a) **I JORNADA DE HEMOTERAPIA GHC**, 2023. (Simpósio)
Solicitei Hemocomponente, e agora? Urgências.
 4. Simposista no(a) **SIMPÓSIO DE SEGURANÇA DO PACIENTE HOSPITAL CRISTO REDENTOR | 2022**, 2022. (Simpósio)
Hemoterapia: quais são os processos que antecedem a transfusão?
 5. Simposista no(a) **Semana Interna de Prevenção de Acidentes de Trabalho Cuidados com a Saúde do trabalhador Hospital Cristo Redentor**, 2022. (Simpósio)
HÁ SANGUE ESCORRENDO EM SUAS VEIAS ... TUDO SOBRE DOAÇÃO DE SANGUE.
 6. Simposista no(a) **Semana de Enfermagem Hospital Cristo Redentor**, 2022. (Simpósio)
Reações transfusionais.
 7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO PLAY 2021**, 2021. (Congresso)
CAPTAÇÃO DE DOADORES EM UM HOSPITAL DE TRAUMA DE PORTO ALEGRE/ RS DURANTE A PANDEMIA.
 8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO PLAY 2021**, 2021. (Congresso)
IMPLEMENTAÇÃO DO PROTOCOLO DE SANGUE TOTAL NO HOSPITAL CRISTO REDENTOR/ RS ESPECIALISTA EM TRAUMA*.
 9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II ENCONTRO DO PPG BIOCÊNCIAS DA UFCSPA E ENCONTRO DE PESQUISA EM BIOLOGIA CELULAR**, 2018. (Encontro)
AVALIAÇÃO DE VARIANTES MOLECULARES DO GRUPO SANGÜÍNEO RH EM DOADORES DE SANGUE DE PORTO ALEGRE/ RS.
 10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Brazilian international congress of genetics**, 2017. (Congresso)
Genotyping of blood groups alleles in South American Indians.
 11. Apresentação Oral no(a) **Brazilian international congress of genetics**, 2017. (Congresso)
Genotyping of blood groups alleles in South American Indians.
-

12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO)**, 2017. (Congresso)
Identification of ACKR1 genetic variants associated with altered expression of Duffy phenotype in Southern Brazilians.
 13. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO)**, 2017. (Congresso)
Genotipagem de grupos sanguíneos em tribos Kaingang e Guarani.
 14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II Encontro do PPG Biociências da UFCSPA & Encontro de Pesquisa em Fisiologia**, 2017. (Encontro)
Genotipagem de grupos sanguíneos em tribos Kaingang e Guarani.
 15. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II Encontro do PPG Biociências da UFCSPA & Encontro de Pesquisa em Fisiologia do RS**, 2017. (Encontro)
Identificação de variantes do gene ACKR1 associadas com expressão alterada do fenótipo Duffy em doadores de sangue de Porto Alegre/RS.
 16. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II Encontro do PPG Biociências da UFCSPA & Encontro de Pesquisa em Fisiologia do RS**, 2017. (Encontro)
Perfil alélico de variantes do grupo sanguíneo Duffy na população brasileira.
 17. **II Jornada da Liga do Sangue**, 2017. (Simpósio)
 18. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Encontro do Programa de Pós-graduação em Biociências, XIX Encontro de geneticistas do Rio Grande do Sul e I Encontro Regional Sul da Sociedade Brasileira de genética médica**, 2016. (Encontro)
Análise de antígenos raros de grupos sanguíneos em doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
 19. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Encontro do Programa de Pós-graduação em Biociências, XIX Encontro de geneticistas do Rio Grande do Sul e I Encontro Regional Sul da Sociedade Brasileira de genética médica**, 2016. (Congresso)
Investigação da variabilidade do gene ACKR1 em doadores de sangue de Porto Alegre/RS.
 20. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Encontro do Programa de Pós-graduação em Biociências, XIX Encontro de geneticistas do Rio Grande do Sul e I Encontro Regional Sul da Sociedade Brasileira de genética médica**, 2016. (Congresso)
Variabilidade genética dos grupos sanguíneos na população brasileira.
 21. **I Jornada da Liga do Sangue**, 2016. (Simpósio)
 22. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV Congresso brasileiro de biomedicina e III Congresso internacional de biomedicina**, 2016. (Congresso)
Classificação de Fitzpatrick: perfil fenotípico em doadores de sangue do HCPA -RS.
 23. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV Congresso brasileiro de biomedicina e III Congresso internacional de biomedicina**, 2016. (Congresso)
Perfil de alelos raros de grupos sanguíneos em doadores de sangue do HCPA/RS.
 24. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO)**, 2015. (Congresso)
Genotipagem de antígenos eritrocitários raros em doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
 25. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO)**, 2015. (Congresso)
Perfil de fenótipo eritrocitário em doadores de sangue de acordo com a classificação de Fitzpatrick.
-

26. **I Mostra de trabalhos de ensino, pesquisa e extensão da UFCSPA, 2015.** (Outra)
Frequência dos Alelos KELL*1, KELL*2, KELL*6 e KELL*7 em doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
27. **Apresentação Oral no(a) I Mostra de trabalhos de ensino, pesquisa e extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2015.** (Outra)
Genotipagem dos alelos DI*01 e DI*02 em doadores de sangue de Porto Alegre.
28. **I Mostra de trabalhos de ensino, pesquisa e extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2015.** (Outra)
Projeto piloto: triagem de anemias em escolas públicas de Porto Alegre.
29. **IX CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOSSEGURANÇA IX SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE BIOSSEGURANÇA DE PRODUTOS TRANSGÊNICOS IX EXPOSIÇÃO DE EQUIPAMENTOS E DISPOSITIVOS DE BIOSSEGURANÇA, 2015.** (Congresso)
30. **Apresentação de Poster / Paineis no(a) Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO), 2014.** (Congresso)
Tipagem sanguínea em escolas públicas de Porto Alegre/RS: uma estratégia de incentivo à doação de sangue.
31. **III Semana acadêmica da UFCSPA, 2014.** (Outra)
Tipagem sanguínea e incentivo à doação de sangue em escolas de Porto Alegre.
32. **II Semana acadêmica da UFCSPA, 2013.** (Outra)
Infecção por *Trichosporon* sp. em pacientes transplantados.
33. **FeSBE, 2012.** (Congresso)
34. **I Semana Acadêmica da UFCSPA 2012, 2012.** (Outra)
Avaliação Clínica de leveduras emergentes. Dez anos de experiência (2000-2010).
35. **I Simpósio de Circulação Extracorpórea Instituto de Cardiologia do RS, 2012.** (Simpósio)
36. **III Simpósio de Infecções em Pacientes Transplantados, 2012.** (Simpósio)
37. **Apresentação de Poster / Paineis no(a) V Congresso Internacional de Bioanálises, VIII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e XII Semana Gaúcha de Biomedicina, 2012.** (Congresso)
Avaliação Clínica de leveduras emergentes. Dez anos de experiência (2000-2010).
38. **Workshop - Microbiologia Aplicada, 2012.** (Outra)
39. **I Ciclo de Palestras em Análises Clínicas do curso de Biomedicina da UFCSPA, 2011.** (Outra)
40. **IV Semana Científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação, 2011.** (Outra)
41. **Módulo de Primeiros Socorros da Liga do Trauma da UFCSPA, 2011.** (Outra)
42. **Simpósio de Infecções em Pacientes Transplantados, 2011.** (Simpósio)
43. **VII Jornada Acadêmica de Biomedicina UFCSPA e III Simpósio Habilitações da Biomedicina, 2011.** (Simpósio)

Organização de evento

1. **RODRIGUES, M. M. O.**
III Encontro do PPG Biociências da UFCSPA & Encontro de pesquisa em biologia celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2018. (Congresso, Organização de evento)
2. **RODRIGUES, M. M. O.**
I Mostra de trabalhos de ensino, pesquisa e extensão da UFCSPA, 2015. (Outro, Organização de evento)
3. **RODRIGUES, M. M. O.**
IV Semana científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação, 2011. (Outro, Organização de evento)
4. **RODRIGUES, M. M. O.**
IV Semana científica da UFCSPA e I Semana de tecnologia e Inovação, 2011. (Outro, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. **RODRIGUES, M. M. O.**
Participação em banca de Thamires Packowski Braga. **Desempenho de proficiência de serviços de hemoterapia e laboratórios clínicos participantes de um programa de qualidade externa: uma análise retrospectiva de 10 anos.**, 2023
(Biomedicina) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
2. **RODRIGUES, M. M. O.; FROHLICH, A.; ALMEIDA, S.**
Participação em banca de Leonardo Moraes dos Santos. **Frequência fenotípica dos grupos sanguíneos ABO, Rh, Kell, Duffy, MNS, Kidd, Lutheran e Lewis e prevalência do antígeno P1 do Sistema P1PK em doadores de sangue do Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre.**, 2023
(Biomedicina) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
3. **RODRIGUES, M. M. O.**
Participação em banca de Paula Hubert Janzen. **SOROPREVALÊNCIA DE SÍFILIS EM DOADORES DE SANGUE DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO DE PORTO ALEGRE.**, 2023
(Biomedicina) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
4. **WAGNER, S. C.; RODRIGUES, M. M. O.; FROHLICH, A.**
Participação em banca de Alice Marques Ferrari. **TESTE DE COOMBS DIRETO E ELUATO PARA INVESTIGAÇÃO DE DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL POR INCOMPATIBILIDADE ABO.**, 2021
(Biomedicina) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
5. **ALMEIDA, S.; FEISTAUER, V.; RODRIGUES, M. M. O.; ALVES, A. F.**
Participação em banca de Carolina Kalkmann. **Análise da expressão gênica do receptor de dopamina D2 em áreas cerebrais de camundongos fêmeas lactantes submetidos a três diferentes dietas.**, 2018
(Biomedicina) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
6. **FIEGENBAUM, M.; RODRIGUES, M. M. O.; ALMEIDA, S.**
Participação em banca de Andressa Glaeser. **Análise molecular dos genes GPC3 e GPC4 em pacientes com suspeita clínica da Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel- tipo I.**, 2018
(Biomedicina) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
7. **RODRIGUES, M. M. O.; GENRO, J. P.**
Participação em banca de Maria Paula Oliveira de Moraes. **Estudo de associação entre o gene ADORA 1 e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH).**, 2018
(Biomedicina) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
8. **FIEGENBAUM, M.; RODRIGUES, M. M. O.**
Participação em banca de Simone Scherer. **Influência de polimorfismos de SEPP1 (rs3877899 e rs7579) sobre a memória episódica e sobre a doença de Alzheimer.**, 2018
(Biomedicina) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre