

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

Scheila da Silva Soares

**Caracterização molecular e fenotípica
de grupos sanguíneos em doadores
de sangue de uma cidade no noroeste
do Rio Grande do Sul**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2022**

Scheila da Silva Soares

Caracterização molecular e fenotípica de grupos sanguíneos em doadores de sangue de uma cidade no noroeste do Rio Grande do Sul

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Marilu Fiegenbaum
Coorientadora: Dra. Silvana de Almeida

**Porto Alegre
2022**

Catalogação na Publicação

Soares, Scheila da Silva

Caracterização molecular e fenotípica de grupos sanguíneos em doadores de sangue de uma cidade no noroeste do Rio Grande do Sul / Scheila da Silva Soares. -- 2022.

56 p. : 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

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

1. Grupos sanguíneos. 2. Polimorfismo de um único nucleotídeo . 3. Doadores de sangue. 4. PCR em tempo real. 5. Genótipo-fenótipo. I. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFCSPA.

Aos colaboradores diretos e indiretos desse projeto de pesquisa, especialmente aos doadores voluntários de sangue e equipe técnica do Hemocentro Regional de Santa Rosa - HEMOSAR/Santa Rosa, Rio Grande do Sul.

À Fundação Municipal de Saúde de Santa Rosa – FUMSSAR.

À farmacêutica Josiane Rodrigues Aquino pela colaboração e apoio na realização desse trabalho.

A minha família e em especial ao meu esposo Tiago Bittencourt, pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos.

A minha linda filha Maria Valentina, eu te amo!

À professora Marilu Fiegenbaum, minha orientadora, pela oportunidade, conselhos, amizade e incentivo.

Agradeço a minha coorientadora Silvana de Almeida pela parceria.

Às colegas Mirelen, Vanessa e Ana Carolina, pelas contribuições na realização dos experimentos.

Aos demais colegas do laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA pelo apoio nos experimentos, trocas de experiências e pela parceria.

Aos bolsistas de iniciação científica, pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas, amigos, professores e funcionários do programa de Pós-graduação Ciências da Saúde pela troca de experiências e contribuições para meu crescimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese “*Caracterização molecular e fenotípica de grupos sanguíneos em doadores de sangue de uma cidade no noroeste do Rio Grande do Sul*” segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:

- 1) A tese será apresentada com uma introdução e uma revisão bibliográfica sobre os principais conceitos envolvidos na medicina transfusional, tais como aloimunização eritrocitária, funções dos antígenos eritrocitários, grupos sanguíneos, reações transfusionais e tipagem sorológica e molecular.
- 2) A seguir, o capítulo I, com a descrição da análise experimental desenvolvida durante o trabalho e os resultados obtidos apresentados no artigo original: “*Frequencies of genetic variants of the Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS and Diego systems of northwest Rio Grande do Sul, Brazil* ” publicado no periódico *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*.
- 3) As considerações finais com as perspectivas acerca da caracterização do perfil genético no progresso da tipagem molecular sanguínea. Os documentos suplementares estão apresentados na forma de anexos.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AHAI – Anemia hemolítica autoimune
- DARC – Duffy antígeno/ receptor de citocinas (*Duffy Antigen receptor for chemokines*)
- DHFRN – Doença hemolítica do feto e do recém-nascido
- DHRN – Doença hemolítica do recém-nascido
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético
- GPA - Glicoforina A
- GPB - Glicoforina B
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ISBT – Sociedade Internacional de Transfusão Sanguinea (*International Society of Blood Transfusion*)
- LISS - Solução salina de baixa força iônica (*Low Ionic Strength Saline*)
- PCR – Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
- PCR-RFLP – Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (*Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism*)
- PCR-SSP - Reação em Cadeia da Polimerase-Sequência Específica (*Polymerase chain reaction sequence-specific primers*)
- PEG – Polietilenoglicol
- RHA – Reações hemolíticas agudas
- RHT – Reações hemolíticas tardias
- RS – Rio Grande do Sul
- SBHH – Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
- SNPs – Polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*)
- SMP1 - Pequena Proteína de Membrana 1 (*Small Membrane Protein 1*)
- TAD - Teste da Antiglobulina Direta
- TAI - Teste da Antiglobulina Indireto
- TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

RESUMO

A frequência alélica dos grupos sanguíneos é variável dependendo da origem étnica da população, o que torna importante a determinação da variabilidade desses alelos em diversas regiões do Brasil, e também em várias regiões do estado do Rio Grande do Sul. Os antígenos eritrocitários são polimórficos devido à diferentes variações genéticas, desde polimorfismos de um único nucleotídeo até inversões, deleções, inserções, entre outros. Na prática transfusional, tem-se cada vez mais, procurado reduzir as chances de um indivíduo formar aloanticorpos. Em alguns casos, dependendo do fenótipo de um paciente, o doador pode ser encontrado com facilidade, porém em alguns casos específicos, no qual há a necessidade de uma combinação de antígenos negativos, é mais eficiente pesquisar doadores a partir de uma população de mesma origem étnica. Portanto, a pesquisa da frequência dos alelos e genótipos envolvidos na expressão dos antígenos de grupos sanguíneos em doadores e correlacionar com os diferentes fenótipos encontrados na rotina imuno-hematológica pode ter relevância para a prática transfusional. O presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil antigênico dos grupos sanguíneos dos sistemas Rh, MNS, Kell, Duffy, Diego e Kidd em doadores de sangue de uma cidade do noroeste do RS. Foram analisados o perfil genotípico de 810 doadores de sangue, as análises das variantes genéticas de grupos sanguíneos foram realizadas utilizando a técnica de PCR em tempo real. Já a fenotipagem eritrocitária foi realizada pela técnica de hemaglutinação com kits de cartão-gel (Bio-rad®). Para a genotipagem foram utilizadas sondas de hidrólise do sistema TaqMan® (Thermo Fisher) para o sistema Diego c.2561C>T (*DI*01/*02*, rs2285644), Kell c.578C>T (*KEL*01/*02*, rs8176058), Duffy c.125A>G e c.1-67T>C (*FY*01/*02*, rs12075; *FY*02N.01*, rs2814778), Kidd c.838G>A (*JK*01/*02*, rs1058396) e MNS c.143T>C (*GYPB*S/GYPB*s*, rs7683365). As frequências alélicas foram comparadas utilizando o teste de qui-quadrado com correção de Yates. Todas as frequências genotípicas estão de acordo com o esperado para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os fenótipos sanguíneos estimados através dos genótipos mais frequentes na população do presente estudo foram: *RHC*Cc* (51,5%), *RHC*ee* (70,1%), *FY*A/FY*B* (49,2%), *GATA-67T/T* (93,5%), *KEL*02/KEL*02* (93,3%) *JK*A/JK*B* (53,2%) e *DI*02/DI*02* (95,4%). Também calculamos a distância genética D_{ST} entre a população do nosso estudo com outros estudos semelhantes realizados em diferentes regiões do Brasil. O principal resultado da análise D_{ST} mostrou que as populações dos estados do Paraná, Minas Gerais e

Bahia são geneticamente diferentes das demais populações. A população do nosso estudo, por outro lado, é semelhante às populações dos estados de São Paulo e Santa Catarina. Estudos que caracterizem o impacto funcional das variantes genéticas associadas à predição de novos alelos de grupos sanguíneos, são fundamentais no embasamento e implementação de técnicas moleculares seguras para a genotipagem desses antígenos. As técnicas moleculares podem contribuir para a prática transfusional através do manejo de unidade de sangue apropriada de acordo com as necessidades de cada indivíduo e em situações complexas, nas quais a sorologia não é eficiente, tornam-se uma boa opção, pois possibilitam uma aplicação em escala maior quando comparada às técnicas sorológicas.

Palavras-chave: grupos sanguíneos; polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs); doadores de sangue; hemaglutinação; PCR em tempo real; genótipo-fenótipo.

ABSTRACT

The allele frequency of blood groups varies depending on the ethnic origin of the population, which makes it important to determine the variability of these alleles in different regions of Brazil, and also in several regions of the state of Rio Grande do Sul. Erythrocyte antigens are polymorphic due to different genetic variations, from single nucleotide polymorphisms to inversions, deletions, insertions, among others. In transfusion practice, there has been an increasing effort to reduce the chances of an individual forming alloantibodies. In some cases, depending on the phenotype of a patient, the donor can be easily found, but in some specific cases, in which there is a need for a combination of negative antigens, it is more efficient to search for donors from a population of the same origin ethnic. Therefore, investigating the frequency of alleles and genotypes involved in the expression of blood group antigens in donors and correlating them with the different phenotypes found in the immunohematological routine may have relevance for transfusion practice. The present study aimed to analyze the antigenic profile of the blood groups of the Rh, MNS, Kell, Duffy, Diego and Kidd systems in blood donors from a city in the northwest of RS. The genotypic profile of 810 blood donors were analyzed, the analysis of genetic variants of blood groups were performed using the real-time PCR technique. Erythrocyte phenotyping was performed using the hemagglutination technique with gel card kits (Bio-rad®). For genotyping, hydrolysis probes from the TaqMan® system (Thermo Fisher) were used for the Diego c.2561C>T system (*DI*01/*02*, rs2285644), Kell c.578 C>T (*KEL*01/*02*, rs8176058), Duffy c.125 A>G and c.1-67T>C (*FY*01/*02*, rs12075; *FY*02N.01*, rs2814778), Kidd c.838G>A (*JK*01/*02*, rs1058396) and MNS c.143T>C (*GYPB*S/GYPB*s*, rs7683365). Allele frequencies were compared using the chi-square test with Yates correction. All genotypic frequencies are as expected for populations in Hardy-Weinberg equilibrium. The blood phenotypes estimated through the most frequent genotypes in the population of the present study were: *RHC*Cc* (51.5%), *RHC*ee* (70.1%), *FY*A/FY*B* (49.2%), *GATA-6TT/T* (93.5%), *KEL*02/KEL*02* (93.3%) *JK*A/JK*B* (53.2%) and *DI*02/DI*02* (95.4 %). We also calculated the D_{ST} genetic distance between the population of our study with other similar studies carried out in different regions of Brazil. The main result of the D_{ST} analysis showed that the populations of the states of Paraná, Minas Gerais and Bahia are genetically different from the other populations. The population of our study, on the other hand, is similar to the populations of the states of São Paulo and Santa Catarina. Studies that characterize the functional impact of genetic variants associated with the prediction of new blood group alleles are fundamental in the foundation and implementation of safe molecular techniques for the genotyping of these antigens. Molecular techniques can contribute to transfusion practice through the

management of an appropriate blood unit according to the needs of each individual and in complex situations, in which serology is not efficient, they become a good option, as they allow an application in larger scale when compared to serological techniques.

Keywords: Blood group systems; single nucleotide polymorphisms (SNP); blood donors; hemagglutination; real-time PCR; genotype-phenotype.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Medicina transfusional.....	13
2.2 Imuno-hematologia eritrocitária	14
2.3 Funções dos antígenos eritrocitários	16
2.6 Sistemas de Grupos Sanguíneos	17
2.6.1 Sistema Rh	18
2.6.2 Sistema Kell.....	20
2.6.3 Sistema Duffy	21
2.6.4 Sistema Kidd.....	23
2.6.5 Sistema MNS.....	24
2.6.6 Sistema Diego	25
2.7 Reações transfusionais	26
2.8 Tipagem sorológica e molecular.....	27
2.9 Composição étnica da população.....	29
2.10 Hemocentro Regional de Santa Rosa – HEMOSAR.....	31
3. JUSTIFICATIVA	33
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
5. OBJETIVOS	39
5.1 Objetivo geral	39
5.2 Objetivos Específicos	39
6. RESULTADOS	40
CAPÍTULO I	40
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
APÊNDICE A - Dados suplementares.....	49
ANEXOS	52
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em pesquisa da FUMSSAR	52
Anexo B – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA	53

1. INTRODUÇÃO

A transfusão de hemocomponentes é uma prática comum, estima-se que 15 a 53% dos pacientes gravemente enfermos são transfundidos durante o período de internação ¹. A transfusão sanguínea é uma terapia eficaz em situações em que há desequilíbrio do sistema circulatório, ocasionado por hemorragias, traumatismos, doenças hemorrágicas e processos cirúrgicos. Embora a transfusão sanguínea seja uma atividade que proporciona bastante benefícios ao receptor, ela também pode oferecer riscos.

A transfusão de sangue alogênico é considerada uma forma de transplante temporário, uma vez que o procedimento expõe o receptor a uma infinidade de antígenos estranhos. Essa exposição pode estimular uma resposta imune, o que leva a formação de anticorpos nos indivíduos receptores, processo chamado de aloimunização.

Na rotina transfusional métodos de prevenção à aloimunização incluem transfusões com fenótipos compatíveis para os sistemas ABO, Rh e Kell, e também para os sistemas Duffy, Kidd e MNS, quando possível ². A fenotipagem é realizada pela técnica de hemaglutinação, na qual as hemácias suspensas em uma solução salina, são adicionadas a um antissoro específico, sendo essa técnica até hoje considerada o “padrão ouro” para identificação dos antígenos na rotina laboratorial. A hemaglutinação é uma técnica de fácil execução, relativamente rápida, e capaz de identificar a maior parte dos antígenos, quando bem executada, mas possui limitações técnicas e clínicas, uma vez que utiliza antissoros comerciais.

A maior limitação dos testes sorológicos está em encontrar no mercado os anticorpos específicos disponíveis para antígenos raros. Em situações em que o banco de sangue necessita realizar a triagem de antígenos de alta ou baixa prevalência, onde não há antissoros disponíveis e/ ou os recursos financeiros são escassos, a genotipagem pode ser utilizada para predição do fenótipo. Os testes moleculares são ferramentas poderosas e podem complementar a fenotipagem, mas ainda é preciso avaliar a correlação entre o fenótipo determinado a partir de testes sorológicos e fenótipos preditos a partir da análise dos genes envolvidos nas expressões dos antígenos sanguíneos.

Assim, considerando a importância de caracterização do perfil dos doadores em bancos de sangue, aliado ao uso de novas ferramentas moleculares para inferir os fenótipos, este trabalho teve como objetivo principal estabelecer a frequência fenotípica e molecular de grupos sanguíneos em doadores de sangue de uma cidade no noroeste do Rio Grande do Sul.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Medicina transfusional

O primeiro grande avanço na medicina transfusional ocorreu em 1900 quando o médico austríaco Karl Landsteiner ao realizar um experimento de prova cruzada com hemácias e soro dos seus colegas observou aglutinações³. Com base nos distintos padrões de aglutinações, ele nomeou os dois primeiros antígenos dos grupos sanguíneos A e B, usando as primeiras letras do alfabeto. Hemácias não aglutinadas foram chamadas C, posteriormente renomeadas de “O”. O grupo sanguíneo ABO é, até hoje, considerado o mais importante sistema de grupos sanguíneos na clínica transfusional, pois uma transfusão ABO incorreta pode resultar na morte do receptor⁴.

A medicina transfusional é uma ciência que vem apresentando expressivos progressos e modifica-se continuamente, não apenas no Brasil como em outros países. No Brasil, nos anos 40, surgiram os primeiros serviços especializados em doação de sangue localizados na cidade do Rio de Janeiro. Na época, graças a remuneração oferecida aos doadores esses serviços foram crescendo. Nos anos 50, foi fundada a Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (SBHH)^{3,5}. Já na década de 80, após conhecimento da possibilidade de transmissão de doenças via transfusão de sangue, proibiu-se de forma definitiva a doação remunerada, critério esse estabelecido pela Constituição Brasileira de 1988, a qual proibiu toda e qualquer forma de comercialização de sangue e derivados⁶.

A transfusão sanguínea é um ato no qual ocorre transferência de hemocomponentes (hemácias, plaquetas, plasma, crioprecipitado) ou hemoderivados (albumina, fator VIII, fator IX, entre outros) de um doador para

um receptor. Deve ser realizada sob prescrição e supervisão médica, seguindo as boas práticas de manipulação e as recomendações das legislações brasileiras ^{2,7}.

2.2 *Imuno-hematologia eritrocitária*

A membrana eritrocitária é composta de lipídios, proteínas e carboidratos, os quais interagem de forma dinâmica e proporcionam força e flexibilidade necessária para hemácia sobreviver por cerca de 120 dias na circulação. A superfície externa da membrana, contém estruturas antigênicas, as quais formam os grupos sanguíneos ^{8,9}. Os antígenos são estruturas polimórficas que se constituem em proteínas, que podem ou não estar ligadas a carboidratos ou lipídios, podendo ser reconhecidas pelo sistema imune e induzir a formação de anticorpos ⁴.

Quando um indivíduo é exposto a antígenos eritrocitários não próprios, seu organismo é capaz de rejeitá-los. A aloimunização é caracterizada pela produção de anticorpos contra antígenos eritrocitários transfundidos ^{10,11}. Alguns anticorpos de grupos sanguíneos, por exemplo do sistema ABO, formam-se sem a necessidade de um contato prévio com o antígeno. Sabe-se que algumas bactérias que fazem parte da microbiota intestinal, possuem carboidratos similares aos antígenos A e B, conseqüentemente essas bactérias estimulam a produção de anticorpos anti-A e anti-B ¹². No entanto, a maioria dos anticorpos de grupos sanguíneos são formados em resposta a exposição aos antígenos não próprios, como resultado de uma transfusão sanguínea ou de uma gestação ¹².

A aloimunização pode ser entendida como um efeito indesejável da transfusão que pode resultar em hemólise do sangue transfundido devido a presença dos anticorpos no plasma do receptor ¹¹. O significado clínico dos anticorpos anti-eritrocitários depende da frequência do respectivo antígeno na população, o que pode variar de acordo com suas origens étnicas ^{11,13,14}. Na prática transfusional tem-se, cada vez mais, procurado reduzir as chances de um indivíduo formar aloanticorpos, assim, a transfusão de sangue fenotipicamente

compatível com os antígenos eritrocitários mais imunogênicos tem sido recomendada ².

A legislação brasileira de hemoterapia recomenda a realização da fenotipagem de antígenos eritrocitários dos sistemas ABO, Rh (D, C, c, E, e) e Kell (K) nas amostras de sangue de doadores. E a realização da fenotipagem para os antígenos eritrocitários dos sistemas ABO, Rh (E, e, C, c), Kell (K), Duffy (Fy^a, Fy^b), Kidd (Jk^a, Jk^b) e MNS (S, s) no sangue do receptor, e em pacientes aloimunizados que estão ou poderão entrar em esquema de transfusão crônica ². Esta recomendação visa auxiliar a identificação de possíveis anticorpos anti-eritrocitários irregulares.

Quanto maior o número de transfusões que um paciente recebe, maior a é a probabilidade de ser exposto a antígenos não próprios e maior a probabilidade que ele desenvolva anticorpos. A resposta primária produz anticorpos da classe IgM, e resposta secundária produz anticorpos da classe IgG. Os anticorpos com importância clínica são da classe IgG, que se ligam aos seus antígenos na temperatura corporal e podem atravessar a placenta ocasionando a destruição imunológica das hemácias do feto. Os anticorpos mais frequentemente encontrados na triagem transfusionais, são contra os antígenos dos cinco principais sistemas de grupo sanguíneos: Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS. Os anticorpos produzidos são quase sempre da classe IgG e clinicamente relevantes ^{12,13,15}.

Se anticorpos clinicamente significantes são encontrados no soro de um receptor, os componentes de hemácias a serem transfundidos não devem apresentar o antígeno correspondente, assim a seleção de uma unidade de hemácia para transfusão deve ser mais próxima e exata com a relação de antígenos do receptor. A probabilidade de encontrar unidades de sangue compatíveis depende na frequência do antígeno na população em geral.

A maioria dos antígenos de grupos sanguíneos possui um padrão de herança mendeliana. A diversidade dos antígenos eritrocitários é originada a partir de mudanças ao nível genético que variam desde polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) a trocas gênicas como inversões, deleções, inserções, *splicing* alternativo, dentre outros mecanismos ¹⁶. O conhecimento da distribuição dos antígenos de grupos sanguíneos entre diferentes grupos étnicos é importante na busca de sangue com fenótipo compatível, entre doadores e

receptores, em especial, nos casos de fenótipos raros ou variantes, que são predominantes em determinadas populações.

2.3 Funções dos antígenos eritrocitários

Os antígenos eritrocitários são formados por sequências específicas de aminoácidos que constituem uma proteína, essas podem ser encontradas na membrana do eritrócito como estrutura de passagem única, múltiplas passagens ou ligadas à glicosilfosfatidinositol (GPI) conforme demonstrado na figura 1 ¹⁷.

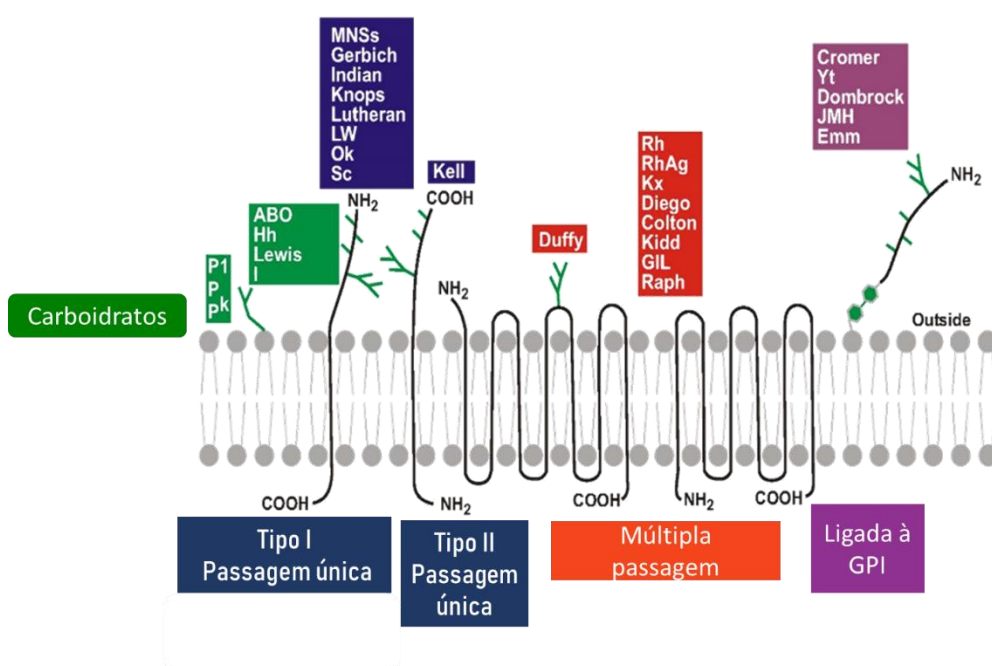


Figura 1: Bicamada lipídica da membrana eritrocitária com as diferentes estruturas que carregam os antígenos de grupos sanguíneos. Adaptado de Reid & Westhoff, 2007 ¹⁷.

Essas proteínas desempenham importantes funções biológicas, tais como: transporte de ânions, função estrutural, de adesão, receptora, entre outras ^{17,18}. A proteína banda 3, que expressa antígenos do grupo sanguíneo Diego, é a proteína de transmembrana eritrocitária mais abundante, codificada pelo gene *SLC4A1*, pertence à família dos genes transportadores de ânions ¹⁹. Já a glicoproteína Kidd codificada pelo gene *JK* ou *SLC14A1* é da família dos transportadores de ureia ²⁰. O Gene *FY* ou *ACKR1*, é responsável por codificar a glicoproteína Duffy, também chamada de *Duffy Antigen Receptor for*

Chemokines (DARC) que também é expressa em outros tecidos não eritróides, tem função de receptor para as formas merozoítas do parasita *Plasmodium vivax* em humanos ^{21,22}. A glicoproteína Kell, produto do gene *KEL*, possui sequência homóloga com a família da endopeptidases neutras, uma enzima conversora de endotelina 3, é possível que a glicoproteína Kell esteja envolvida com a regulação do tono vascular ¹⁹.

2.6 Sistemas de Grupos Sanguíneos

Até o momento, a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) reconhece 345 antígenos de grupos sanguíneos, dos quais 322 estão dispersos em 43 grupos sanguíneos determinados geneticamente por 48 genes ²³. Os demais antígenos não estão, atualmente, atribuídos a um sistema conhecido.

Os antígenos dos grupos sanguíneos também são importantes marcadores de estudos genéticos e antropológicos, uma vez que, alguns desses são considerados específicos em determinadas populações ²⁴⁻²⁶.

Antigamente, os antígenos de grupos sanguíneos eram nomeados com o nome da primeira pessoa cuja hemácias apresentavam o antígeno ou anticorpo correspondente em seu plasma. Por quase 30 anos, não havia regras nem supervisão, somente a partir de 1980, a ISBT organizou os grupos sanguíneo de forma mais prática em; “sistemas sanguíneos”, “coleções” e “séries”. Um “sistema sanguíneo” pode ser representado por um único gene ou por genes estritamente relacionados, em que os antígenos apresentam características genéticas e bioquímicas semelhantes e definidas ^{12,27}.

As “coleções” são caracterizadas por antígenos que apresentam algumas relações sorológicas, e genéticas, porém não estão relacionadas a gene específico. As “séries” são formadas por estruturas antigênicas conhecidas do ponto de vista sorológico e agrupadas em dois grupos distintos, os antígenos de baixa frequência na população (< de 1% da população) e os antígenos de alta frequência (> de 90%), quando um antígeno de uma “coleção” ou de uma “série” de alta ou baixa prevalência é associado com um gene específico, ele é provido ao status de “sistema sanguíneo” ^{12,27}.

2.6.1 Sistema Rh

O sistema Rh (ISBT 004) é considerado o mais complexo dos sistemas de grupos sanguíneos devido à presença de numerosos polimorfismos ²⁸. Atualmente, o grupo Rh compreende 54 antígenos nos quais os antígenos D, E, e, C e c são os mais importantes clinicamente ^{15,29}. A expressão dos antígenos do sistema Rh é controlada por dois genes, altamente homólogos, localizados no cromossomo 1 (1p36.13-p34.3). Os genes *RHD* e o *RHCE* que têm 98% homologia, cada um tem 10 éxons, distribuídos por 69 kbp de gDNA em orientações opostas ^{16,30,31}. Esses genes são separados por uma região com cerca de 30 kbp que contém o gene *TMEM50A* (previamente chamado de SMP1 - *Small Membrane Protein 1*) ¹⁶. O gene *RHD*, também é flanqueado por duas regiões homólogas denominadas caixas *Rhesus* ¹⁶.

Cada gene codifica uma proteína de transmembrana com 417 aminoácidos, e diferem entre si em apenas por 32-35 aminoácidos. O gene *RHD* é responsável pela expressão do antígeno D, e o gene *RHCE* pelos antígenos C/c e E/e ^{29,30,32}. Do ponto de vista clínico, o antígeno D é o mais importante por ter alto grau de imunogenicidade. As hemácias humanas são classificadas como “Rh positivas” ou “Rh negativas”, dependendo da presença ou ausência do antígeno D ^{15,29}.

Os antígenos Rh são exclusivos eritrocitários. Na membrana do eritrócito, as proteínas Rh formam um complexo com outras proteínas codificadas por genes independentes, como por exemplo, a glicoproteína RhAG, codificada pelo gene *RHAG* localizado no cromossomo 6 (6p12-p21), que são necessárias para expressão dos antígenos do sistema Rh ²⁹. A presença ou ausência dos antígenos Rh na membrana dos eritrócitos está diretamente associada a presença ou ausência do complexo de proteínas RhD, RhCE e RhAG. Mutações no gene *RHAG* codificam uma glicoproteína RhAG alterada que pode levar ao fenótipo Rh_{null}, caracterizado pela ausência dos antígenos Rh ^{15,29}.

A causa mais comum para o fenótipo “RhD negativo” é deleção do gene *RHD* em indivíduos homozigotos, mas outros mecanismos ainda estão sendo descritos ^{33,34}. A exclusão do gene inclui uma porção de cada caixa *Rhesus*,

deixando uma caixa *Rhesus* híbrida, um marcador para exclusão *RHD* (veja figura 2) ^{29,35}. Cerca de 66% dos africanos com o fenótipo “RhD negativo” têm um gene *RHD* inativo, um pseudogene (*RHD*Ψ*), o qual é resultado de uma inserção de 37 bp no éxon 4 que introduz um códon de parada, enquanto que, cerca de 16% têm o gene híbrido *RHD-CE-D^s* ³³. Nesse gene, faltam vários éxons do gene *RHD* e contém, em vez disso, éxons correspondentes do gene *RHCE*, com isso não expressam o antígeno D, porém codificam um antígeno C parcial ^{30,33,35}.

A distinção sorológica entre hemácias RhD⁺ e RhD⁻ nem sempre é uma tarefa fácil, devido à presença de antígenos de D variantes. Alelos variantes do gene *RHD* apresentam variações de expressão qualitativas ou quantitativas. O antígeno D é considerado um mosaico composto por 30 epítomos, dos quais, até o momento, 9 epítomos já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais ^{15,16}. Pessoas com hemácias faltando um ou mais epítomos têm expressão parcial do antígeno D (alteração qualitativa), indivíduos RhD⁺ podem desenvolver aloanticorpos anti-D dirigidos contra um ou mais epítomos ausentes em suas hemácias. Antígenos D parciais ocorrem pela presença de vários SNPs no gene *RHD* ¹⁶. Pacientes portadores de antígenos D parcial devem ser transfundidos com sangue “RhD negativo” ¹⁵.

Cerca de 0,2-1% dos europeus têm hemácias com uma expressão reduzida do antígeno D (fenótipo D fraco), uma alteração quantitativa ^{29,36}. No fenótipo D fraco, o antígeno está presente com todos os epítomos, porém expressos fracamente na membrana da hemácia. É muito difícil determinar os tipos de D fraco sorologicamente, pois os anticorpos monoclonais anti-D podem simplesmente não reagir pela baixa avidéz do anticorpo nas células D fraco ³⁵.

No geral, os genes *RHD* e *RHCE* são muitos polimórficos devido a eventos, tais como: conversão gênica, crossing-over, translocações, entre outras. Esses eventos dificultam a identificação dos antígenos Rh utilizando plataforma de larga escala customizada, tornando-se necessário desenhos de ensaios exclusivos para identificação do sistema Rh ³⁰.

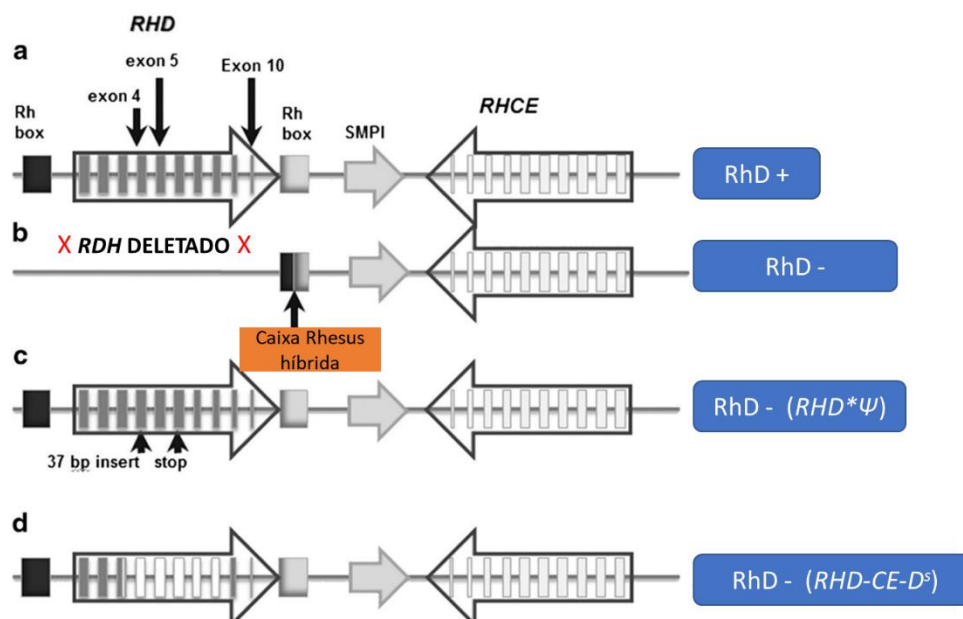


Figura 2: Estrutura esquemática do gene *RHD*. a) Em indivíduos “RhD positivos” b) Indivíduos “RhD negativos” c) Pseudogene *RHD*ψ*. e) Gene híbrido *RHD* (*RHD-CE-D^s*). Adaptado de Papasavva *et al.*, 2016 ³³.

2.6.2 Sistema Kell

O sistema Kell (ISBT 006) tem 34 antígenos descritos até o momento, sendo o terceiro sistema mais polimórfico depois dos sistemas Rh e MNS ³⁵. O gene *KEL* está localizado no cromossomo 7 (7q34) e seus antígenos são expressos na glicoproteína de transmembrana Kell (*metallo-endopeptidase*) ¹⁶. O antígeno *KEL*01* (K, “Kell”), é mais importante na clínica transfusional, pois o anticorpo anti-K pode causar reações transfusionais hemolíticas, e na gravidez, tem uma importância particular, pois pode causar anemia fetal grave pela consequente supressão da eritropoiese fetal decorrente da reação hemolítica imunomediada em células eritrocitárias circulantes e progenitoras da medula óssea ³².

O antígeno K tem uma frequência de cerca de 9% na população de origem europeia, e 2% na população de origem africana, enquanto seu antígeno antitético *KEL*02* (k, “Cellano”) tem uma frequência >90% (alta prevalência na população) ^{37–39}. O SNP na posição c.578C>T (rs8176058) codifica os alelos *KEL*02* e *KEL*01* ocasionando uma troca de aminoácidos treonina (antígeno k)

por metionina (antígeno K) na posição 193 (p.Thr193Met) no éxon 6 do gene *KEL* (figura 3) ¹⁶.

A expressão fraca dos antígenos Kell também pode ser vista no fenótipo *KEL_{mod}*, que está associada a uma variação (1208G>A) no éxon 10 do gene *KEL* ^{14,25}. Indivíduos portadores de fenótipos com baixa expressão antigênica de kell, representam um desafio na prática transfusional, uma vez que, o padrão de aglutinação com antissoros anti-Kell é fraca e nesses casos faz-se necessário o uso de técnicas mais sensíveis para detecção do antígeno na superfície da hemácia.

O fenótipo *KEL_{null}* (*K₀*) é um tipo sanguíneo raro no qual há falta de expressão de todos os antígenos Kell na membrana da hemácia. A frequência de alelos *K₀* é estimada em 0,007% nas populações europeias e 0,008% nas populações japonesas ^{15,40,41}. A base molecular desse fenótipo ainda não está elucidada. Sabe-se que indivíduos com o fenótipo *K₀* têm o potencial de formar vários outros anticorpos específicos contra o Sistema Kell, como anti-K, anti-k e anti-Kp^a ⁴⁰.

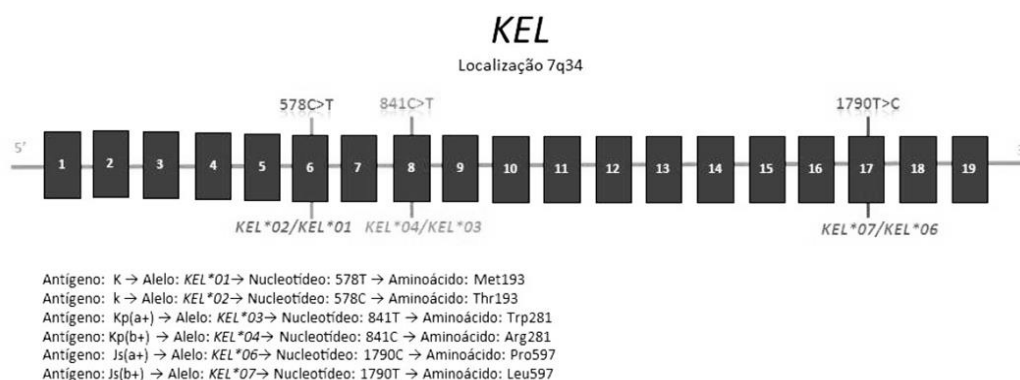


Figura 3: Gene *KEL* e as representações de SNPs que forma os antígenos do sistema Kell. Disponível em Reid et al., 2004 ¹⁶ e Bianchi, 2016 ⁴².

2.6.3 Sistema Duffy

O sistema Duffy (ISBT 008) é conhecido também como *Duffy antigen receptor for Chemokines-DARC* (antígeno receptor de citocinas) ⁴³. Os principais antígenos do sistema Duffy são Fy^a e Fy^b, codificados pelos alelos codominantes *FY*A* e *FY*B*, respectivamente, que diferem pela substituição de um aminoácido

na posição c.125G>A (rs12075) no éxon 2. O gene *ACKR1*, também conhecido como *FY* ou *ACKR1* possui somente dois éxons, e está localizado no cromossomo 1 (1q23.2 esse gene) ⁴⁴.

Os quatro possíveis fenótipos do sistema Duffy são: Fy (a+b-), Fy (a-b+), Fy (a+b+) e Fy (a-b-) ⁴⁵. Esses antígenos já estão desenvolvidos ao nascimento, sendo detectados em células de embriões com 6-7 semanas de gestação, e têm sua expressão tão forte em hemácias fetais, quanto em hemácias de adulto ¹⁵.

Existem mutações no gene *ACKR1* que podem levar à fraca expressão dos antígenos ou à ausência da expressão dos antígenos Duffy. O fenótipo Fy (a-b-) é resultado de uma mutação pontual no local de ligação do fator de transcrição GATA-1 na região promotora do gene na posição -67 alterando um nucleotídeo T para um C (c.1-67T>C, rs2814778). Essa variante impede que o antígeno Fy^b seja expresso nos eritrócitos ^{46,47} (Figura 4). Este genótipo é conhecido também como eritrócito silencioso (Fy^{bES} ou FY*02N.01) porque indivíduos homozigotos para esta variação não possuem a proteína Duffy nos eritrócitos, já indivíduos heterozigotos expressam aproximadamente 50% do total esperado de proteína Duffy ⁴⁷.

O fenótipo Fy (a-b-) é comum em africanos com uma frequência em torno de 98% ²². Outras formas alélicas de *FY*B* também podem modificar a expressão do antígeno Fy^b, o que pode ocasionar resultados sorológicos fracos ou equivocados, como por exemplo, SNP c.265C>T (Arg89Cys) que ocorre em cerca de 1-2% dos europeus, levando a expressão do fenótipo (Fy^b fraco) ⁴⁸. A mutação c.1-67t>c também foi encontrada no alelo *FY*A* (FY*01N.01), mas é rara ⁴⁹.

O interesse no grupo sanguíneo Duffy aumentou substancialmente, após a demonstração experimental da dependência do *Plasmodium vivax*, parasita causador da malária em humanos, nos antígenos Duffy que servem de receptores para internalização das formas merozoítas do *P. vivax* no eritrócito e assim causar a infecção. O *Plasmodium vivax* está praticamente ausente na África Ocidental, onde mais de 98% da população é Duffy negativa ^{22,50}.

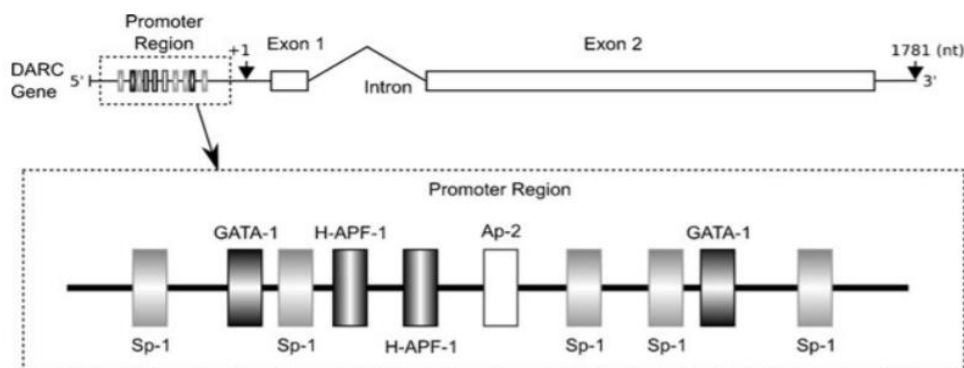


Figura 4: Estrutura do gene *ACKR1*. A figura indica a localização de GATA-1 na região promotora, e outros locais de ligação regulatória conhecidos. Disponível em Oliveira *et al* ⁵¹.

2.6.4 Sistema Kidd

O sistema Kidd (ISBT 009), consiste em três antígenos localizados na glicoproteína Jk; Jk^a (*JK*01*), Jk^b (*JK*02*) e antígeno de alta prevalência *JK*03* ¹⁶. O antígeno Jk^a e seu antitético Jk^b são encontrados com a mesma prevalência em europeus, mas apresentam grandes diferenças em outros grupos populacionais. O antígeno *JK*03* é expresso em todos os indivíduos, exceto naqueles com o fenótipo raro de Kidd-nulo.

Os antígenos Jk^a e Jk^b são produtos de alelos codominantes, o alelo *JK*01* (G) e o alelo *JK*02* (A) que são determinados por uma mutação pontual c.838G>A (rs1058396) no éxon 9 do gene *SLC14A1* localizado no cromossomo 18 (18q12-q21). Os fenótipos do sistema Kidd são; Jk (a+b-), Jk (a-b+), Jk (a+b+) e Jk (a-b-) ⁵². A frequência dos alelos, *JK*01* e *JK*02*, é diferente em cada população, por exemplo, o alelo *JK*01* é mais frequente em africanos (77,2%), já o alelo *JK*02* em americanos (51,9%) ^{52,53}.

O fenótipo nulo de Kidd, Jk (a-b-), resultado da homozigose de um gene silencioso no locus Jk, foi descrito pela primeira vez em 1959, em um caso de icterícia logo após transfusão sanguínea em uma mulher filipina ⁵⁴. Ela já havia dado à luz a dois filhos sem evidência de doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) e não tinha histórico de abortos ou transfusões de sangue anteriores ⁵⁴. Dada a falta de transfusões anteriores e o fenótipo Jk (a-b+) do seu marido, é

mais provável que ela tenha sido imunizada contra os antígenos Kidd nas gestações anteriores.

Os anticorpos do sistema Kidd podem causar reação hemolítica aguda (RHA) e reação hemolítica tardia (RHT), sendo responsáveis por até 1/3 dessas reações. Outra característica desses anticorpos é que são difíceis de detectar por testes sorológicos rotineiros, devido a rápida queda dos seus títulos, e fraca reatividade ^{4,15}.

2.6.5 Sistema MNS

O sistema MNS (ISBT 002) só perde em complexidade para o sistema Rh. Atualmente, esse sistema compreende 49 antígenos transportados na glicoforina A (GPA) e na glicoforina B (GPB) ou em híbridos dessas glicoforinas ⁵⁵. Os principais antígenos desse sistema são M e N, presentes na proteína glicoforina A (GPA), e S, s, U, presentes na glicoforina B (GPB). Os genes *GYPA* e *GYPB*, codificam as proteínas GPA e GPB, respectivamente, representam dois loci intimamente ligados, localizados no cromossomo 4 (4p28-q31) ^{56,57}.

Os genes *GYPA* (7 éxons) e *GYPB* (5 éxons) são homólogos compartilham mais de 95% de similaridade em suas sequências, o que sugere que ambos os genes derivam de um ancestral comum ⁵⁶. Durante o isolamento dos genes *GYPA* e *GYPB*, um terceiro gene, o *GYPE*, foi descoberto ¹⁶. *GYPE* normalmente não expressa proteínas detectáveis no eritrócito, mas está envolvido em alguns rearranjos de genes que codificam proteínas híbridas que podem ser expressas na membrana celular ¹⁶. Os três genes demonstraram homologia >90% ⁵⁵.

Os antígenos M e N são decorrentes de variações na proteína GPA, maior glicoforina presente no eritrócito, com aproximadamente 1.000.000 cópias na membrana. Esses antígenos diferem na composição dos seus aminoácidos na extremidade extracelular da GPA; os SNPs c.59C>T (rs7682260), c.71G>A (rs7687256), c.72G>T (rs7658293) no gene *GYPA* são responsáveis pela expressão dos antígenos M e N ^{32,57}. A glicoforina B (GPB), produto do gene *GYPB*, transporta os antígenos S (MNS3) e s (MNS4). A diferença entre esses antígenos é determinada por uma alteração de aminoácidos: o S está associado

à presença de metionina, enquanto s à presença de treonina (Met29Thr), consequência do SNP c.143T>C (rs7683365) ^{55,57}.

O antígeno U é de alta frequência populacional, sendo o fenótipo U negativo sempre associado ao fenótipo S-s-, porém o fenótipo S-s- nem sempre está associado ao fenótipo U negativo ⁵⁵. Os raros fenótipos S-s-U- e S-s-U+ originam-se de deleções de *GYPB* ou de formas variantes de *GYPB* que levam à expressão alterada do antígeno U. Os fenótipos S-s-U- ou S-s-U+ são exclusivos de descendentes de africanos ⁵⁵. Embora o antígeno U esteja presente nas formas variantes, sua detecção por métodos sorológicos requer um potente anti-U ¹².

É comum a ocorrência natural de anticorpos anti-M e anti-N, podendo ser encontrados em indivíduos que não foram expostos às hemácias humanas ¹⁵. Geralmente, reagem a temperaturas abaixo de 37°C, sendo consideradas aglutininas frias, com temperaturas ótimas de reação à 4°C, raramente apresentam significado clínico, embora há na literatura relatos de reação hemolítica tardia (RHT) envolvendo anti-N ⁵⁸. Os anticorpos S, s e U ocorrem após aloimunização, e são da classe IgG, esses são capazes de causar reações hemolíticas transfusionais e DHRN ¹⁵.

2.6.6 Sistema Diego

O sistema Diego (ISBT 010) foi descoberto em 1955, em uma pesquisa de anticorpos no soro de uma mulher venezuelana, após o filho recém-nascido apresentar grave DHRN. Esse anticorpo nomeado de anti-Di^a, em homenagem a mulher foi usado o seu sobrenome “Diego” para designar o novo sistema Diego ⁵⁹.

A clonagem e sequenciamento do gene *SLC4A1*, localizado no cromossomo 17 (17q21-q22), permitiu a identificação do gene que controla a expressão da proteína banda 3 na membrana do eritrócito, e caracteriza os alelos Di^a (*DI*01*), Di^b (*DI*02*), assim como, outros antígenos do sistema Diego ^{16,19}.

Atualmente, estão descritos 22 antígenos para o sistema Diego, sendo os antígenos Di^a (*DI*01*) e Di^b (*DI*02*) os mais importantes na clínica transfusional.

Os alelos codominantes *DI*01* e *DI*02* são derivados de um SNP c.2561C>T (rs2285644) no éxon 19 do gene *SLC4A1*, ocorrendo a substituição do aminoácido prolina (Di^b) por leucina (Di^a) na posição 854 (p.Pro854Leu) da glicoproteína de múltipla passagem na membrana denominada banda 3 ^{32,60}.

A frequência populacional do antígeno Di^b é >99,9% em praticamente todas as populações, exceto em algumas populações orientais e nativos americanos ¹⁶. Já o antígeno Di^a é considerado um importante marcador antropológico, por ocorrer exclusivamente em descendentes de mongóis, particularmente em japoneses, chineses, e índios sul-americanos e estar totalmente ausente em populações africanas e europeias ^{24,26}. No Brasil a frequência do antígeno Di^a foi estudada em diversas tribos indígenas e os resultados variam, cerca de 36,1% nos índios Carajás, 45,8% em índios Caingangues e 75% em Parakañas ⁵⁹. Os anticorpos anti- Di^a/Di^b são da classe IgG, e podem causar reações hemolíticas transfusionais e estão envolvidos em casos de DHRN ³².

2.7 Reações transfusionais

As reações transfusionais podem ser classificadas em agudas ou tardias. A reação hemolítica aguda é consequência de uma transfusão ABO incompatível, é grave e pode ser fatal, ocorre geralmente por erros na identificação de amostras de pacientes. Sempre que houver suspeita de reação hemolítica aguda, a transfusão deve ser imediatamente suspensa ⁶¹. Reações hemolíticas tardias, ocorrem em 0,05–0,07% das transfusões e a hemólise nesses casos, é extravascular e ocorre devido à produção de anticorpos anti-eritrocitários, após uma transfusão ou gestações prévias, no qual ocorre exposição do paciente a antígenos que ele não possui. O quadro clínico é caracterizado por febre, icterícia, queda da concentração da hemoglobina e mau aproveitamento da transfusão. Esse tipo de reação deve ser suspeito sempre que o paciente apresentar febre sem causa aparente após uma transfusão ⁶¹.

Aloanticorpos eritrocitários clinicamente significativos se desenvolvem em mais de 30% dos pacientes que recebem múltiplas transfusões, como por exemplo, pacientes com: anemia falciforme, talassemia, anemia aplásica e anemia hemolítica autoimune (AHAI) ^{11,12}. Um estudo realizado por Cruz e colaboradores ¹¹ com 12.904 pacientes, dos quais 3.044 pacientes eram

politransfundidos, mostrou que 227 (7,5%) apresentaram anticorpos eritrocitários irregulares, com a seguinte ordem de prevalência de aloanticorpos: anti-E > anti-D > anti-K > anti-C > anti-Di^a > anti-c > anti-Jk^a > anti-S. No mesmo estudo, 79 pacientes (34,8%) tinham combinações de aloanticorpos contra antígenos dos sistemas Rh e/ou Kell ¹¹.

2.8 Tipagem sorológica e molecular

O teste de hemaglutinação que detecta aglutinação direta de anticorpos, pouco mudou desde que a técnica foi utilizada pela primeira vez, há mais de 100 anos ¹². As maiores mudanças foram feitas para aumentar a velocidade e a sensibilidade com adição de potencializadores, como por exemplo o polietilenoglicol (PEG), e a solução de baixa força iônica (solução de LISS). Atualmente, há vários antissoros disponíveis comercialmente para a fenotipagem da maioria dos antígenos, mas não para todos.

Coombs, Mourant e Race, descreveram o “Teste da antiglobulina” ou “Teste de Coombs”, em 1945 ⁶². Este teste representa a forma mais importante de aglutinação artificial em imuno-hematologia, permitindo revelar a presença de anticorpos na membrana da hemácia. O “teste de Coombs” pode ser realizado de duas formas: Direto (*Teste antiglobulina direto-TAD*) que detecta hemácias sensibilizadas por anticorpos ou frações do complemento *in vivo*, é utilizado na investigação de DHRN e na anemia hemolítica autoimune (AHAI) ou indireto (*Teste da antiglobulina indireto-TAI*) que detecta hemácias sensibilizadas *in vitro* por anticorpos, e é utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-eritrocitários irregulares no plasma em provas de compatibilidade ^{12,63}.

Os testes de aglutinação direta ou indireta são simples, de fácil execução, não necessitam de equipamentos caros, e quando realizados corretamente, são reprodutíveis, sensíveis e específicos. Porém, é importante ressaltar que a hemaglutinação pode ser influenciada por vários fatores, tais como: localização do antígeno na membrana, densidade antigênica, interação antígeno-anticorpo, temperatura, tempo de incubação, preparo inadequado das suspensões de hemácias, centrifugação excessiva, além da subjetividade na interpretação dos resultados, entre outros ¹².

Durante décadas os testes de hemaglutinação foram usados para determinar o fenótipo e deduzir o genótipo. Atualmente, com o conhecimento da sequência de vários genes de grupos sanguíneos e de seus alelos determinantes, assim como a disponibilidade de novas técnicas moleculares, tem-se possibilitado determinar o genótipo e prever o fenótipo de um indivíduo.

Os testes de hemaglutinação avaliam os produtos dos genes de grupos sanguíneos, enquanto os testes moleculares avaliam o DNA responsável pela expressão destes produtos (os antígenos eritrocitários) ^{38,64}. A genotipagem pode ser realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar uma região de interesse. Os *primers* de amplificação e as sondas de detecção devem ser projetados para evitar falsos positivos devido às regiões homólogas em um gene (por exemplo, testes para *RHD* e *RHCE*), e controles de ensaio adequados devem ser usados para garantir a validade do teste ³⁵.

São várias as razões para introdução da genotipagem na prática clínica. Os testes moleculares estão avançando rapidamente e são uma ferramenta poderosa para complementar e superar as limitações da sorologia. Em certos cenários, a genotipagem molecular pode ser o único método capaz de fornecer unidades sanguíneas precisas e compatíveis, principalmente para pacientes politransfundidos, reduzindo o risco de reações transfusionais ^{15,25}. Estudos têm demonstrado que os ensaios de genotipagem são mais precisos que o método sorológico de hemaglutinação em pacientes com transfusões recentes, e são úteis para resolução de discrepâncias da fenotipagem ⁶⁴⁻⁶⁸.

Quirino et al ⁶⁹ comparam as técnicas de hemaglutinação em gel, Microarray, PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e PCR-SSP (*sequence-specific primers*) em termos de custo, tempo de reação e confiabilidade dos resultados. O PCR-SSP foi mais econômico comparado a outros métodos, com um custo de U\$ 18,07 por amostra, e o método sorológico teve um custo U\$ 32,45 por amostra, porém o tempo de análise do método sorológico foi mais curto do que os métodos moleculares. É importante observar que, para as reações de PCR-SSP, é possível reduzir o custo consideravelmente processando múltiplas amostras em cada ensaio. Em relação a confiabilidade dos resultados, todos os métodos mostraram-se eficazes na detecção de antígenos eritrocitários.

As técnicas moleculares podem ainda identificar a presença de variações em genes que codificam antígenos de grupos sanguíneos fracamente expressos na membrana, contribuindo para a prevenção de possíveis reações transfusionais hemolíticas ¹⁶. A genotipagem tem se mostrado muito útil em algumas situações, como por exemplo, nos casos de pacientes portadores de antígenos com fraca expressão e portadores de alelos que provocam a não expressão proteica, como por exemplo, alelo *FY*B* do sistema Duffy silenciado com a variante c.1-67T>C na região promotora GATA-1 ¹².

É importante esclarecer que os testes sorológicos de hemaglutinação continuam sendo a espinha dorsal na imuno-hematologia, uma vez que os ensaios baseados em DNA caracterizam o genótipo e na prática transfusional o fenótipo é o mais importante. Embora os métodos moleculares sejam considerados mais sensíveis e específicos, devemos considerar que a presença de um gene em particular não garante sua expressão na membrana eritrocitária, ou seja, pacientes com fenótipos nulos podem ser genotipados como positivos para um determinado antígeno, levando a resultados falsos positivos.

Apesar da limitação de estar testando o genótipo e não o fenótipo, a genotipagem é considerada uma ferramenta essencial nos laboratórios de imuno-hematologia. Em um estudo realizado por Menegati e colaboradores ⁶⁵ foram analisados todos os resultados discrepantes entre sorologia e testes moleculares em pacientes e doadores de sangue durante um período de dois anos, sendo observadas 452 discrepâncias, com uma alta prevalência de discrepâncias entre fenótipos e genótipos em doadores de sangue (13,73%). A análise dos motivos que levaram às discrepâncias revelou que transfusões recentes, dificuldades na diferenciação de auto e aloanticorpos, limitações na fenotipagem por antissoros ruins ou indisponíveis, expressões fenotípicas fracas e parciais foram as principais causas.

2.9 Composição étnica da população

A partir de 1500, com a descoberta do Brasil, houve a migração dos portugueses, espanhóis, africanos e, posteriormente, no início do século XX, também italianos, japoneses, alemães e poloneses em todo território nacional. Além das migrações externas, ocorreram internas. Essas migrações

contribuíram ao longo do tempo para um elevado grau de miscigenação da população brasileira ⁷⁰.

Sabe-se que mundialmente as populações variam consideravelmente em relação às suas pré-disposições a doenças e nas frequências alélicas de importantes *locus*, provavelmente como resultado das variações genéticas, mas também devido à adaptação a fatores seletivos locais, como clima e nutrientes disponíveis. A população brasileira é formada por uma extensa mistura de três raízes ancestrais: ameríndios, europeus e africanos. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), emprega poucas categorias de cores já pré-estabelecidas, baseadas na autoclassificação. Desde 1991, elas são cinco: preta, parda, amarela, branca e indígena. Em um estudo realizado com 934 brasileiros das quatro regiões mais populosas do Brasil (Norte, Nordeste, Sudeste e Sul), utilizando um painel de 40 polimorfismos validados com deleção-inserções do DNA utilizados como informativos de ancestralidade (HGDP-CEPH), demonstrou que a população brasileira apresenta uma diversidade ancestral evidente nas proporções ameríndias, europeias e africanas nas diferentes regiões estudadas, principalmente em indivíduos que se autodeclararam pardos de acordo com a classificação do IBGE ^{70,71}.

Os processos migratórios no Rio Grande do Sul (RS) também ocorreram de forma heterogênea. Esses processos tiveram início no século do século XVII, quando o atual Estado do Rio Grande do Sul era constituído pela chamada "*Província do Tape*", situada entre a "*Província do Uruguai*" conhecida pelo povoamento europeu e a "*Província Ibiçá*" que se estendia até Santa Catarina. Na vasta extensão da "*Província do Tape*" os indígenas eram os únicos habitantes, divididos em diferentes grupos que se espalhavam pelo território. Os *Guaranis*, povoavam a margem esquerda do Uruguai, desde Palmeira das Missões até Itaqui. Existe uma grande controvérsia sobre qual teria sido a nacionalidade dos primeiros desbravadores da região noroeste e campanha do estado do Rio Grande do Sul. Alguns afirmam que foram os padres jesuítas portugueses, sob o comando do Padre Roque Gonzales de Santa Cruz, a partir de 1605. Outra corrente, entretanto, afirma ter sido os jesuítas espanhóis que, a contar de 1609, deslocaram-se para o noroeste do Rio Grande do Sul ⁷². Em 1890, iniciou-se a expansão colonizadora da região do Alto Uruguai, até então quase toda despovoada. Para ali se dirigiram imigrantes de várias

nacionalidades e seus descendentes, originando a formação de colônias etnicamente heterogêneas ⁷² .

Face ao exposto, o conhecimento das variações genóticas ou fenóticas dos vários grupos sanguíneos na população brasileira é essencial para promover melhor seleção de sangue compatível, e para isso se faz necessário conhecer o perfil antigênico dos doadores. A população da região noroeste do RS, caracteriza-se pelo seu povoamento heterogêneo, sugerindo que a população dos doadores e receptores possa ser geneticamente diferente devido as suas ancestralidades, uma vez que os antígenos eritrocitários são herdados geneticamente, essa questão deve ser levada em consideração em doações/recepções.

2.10 Hemocentro Regional de Santa Rosa – HEMOSAR

O Hemocentro Regional de Santa Rosa está localizado na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. A cidade de Santa Rosa está a uma distância de 496 km da capital Porto Alegre, localiza-se a uma latitude 27°52'15" sul e a uma longitude 54°28'53" oeste, sua população, conforme estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2018 era de 72.919 habitantes ⁷³. O HEMOSAR tem como missão fornecer aos seus conveniados, através da hemorrede pública, acesso a serviços hemoterápicos de qualidade, e tem a visão de consolidar-se como centro de referência na área da hemoterapia na região noroeste do RS. Atualmente, o HEMOSAR abrange 52 municípios, e possui contrato firmado com 25 hospitais da região, atende uma área de abrangência com uma população aproximada de 600.000 habitantes.

O HEMOSAR é um dos 2.156 serviços de hemoterapia existente no Brasil, estes estabelecimentos, são responsáveis por cerca de 3,3 milhões de coletas e pela produção de aproximadamente 8 milhões de hemocomponentes. Estes serviços hemoterápicos (SH) estão distribuídos em todo o território nacional é uma rede bastante capilarizada, em função das dimensões territoriais brasileiras, aproximadamente 75% desses serviços são públicos ou conveniados ao SUS ⁷⁴.

O uso de sangue e hemocomponentes é uma prática cara para o SUS, que necessita e utiliza tecnologia de ponta e recursos humanos altamente

especializados. Tais particularidades tornam indispensável a racionalização na utilização dos hemocomponentes, considerando sempre a segurança do doador e do receptor. A transfusão de sangue e seus componentes deve ser utilizada criteriosamente na medicina, devendo ser indicada de forma criteriosa quando não há alternativas terapêuticas.

Os produtos gerados nos serviços de hemoterapia, a partir do sangue total, por meio de processos físicos (centrifugação e congelamento) são denominados hemocomponentes. Já os produtos obtidos em escala industrial, a partir do fracionamento do plasma por processos físico-químicos são denominados hemoderivados. No HEMOSAR são produzidos os seguintes hemocomponentes: concentrado de hemácia (CH), concentrado de plaquetas (CP), plasma fresco congelado (PFC) e crioprecipitado (CRIO). Os hemocomponentes de grande consumo mensal são os CH e o CP.

3. JUSTIFICATIVA

A transfusão sanguínea deve ser segura também na perspectiva imunohematológica. A frequência dos antígenos dos grupos sanguíneos varia conforme o grupo étnico populacional. Em alguns casos, dependendo da prevalência do fenótipo de um paciente, o doador pode ser encontrado com facilidade, porém em alguns casos específicos, no qual há a necessidade de uma combinação de antígenos negativos, é mais eficiente pesquisar doadores a partir de uma população de mesma origem étnica. No Brasil, já tivemos um caso de um menino indígena Pataxó, que precisava realizar cirurgia cardíaca e teve que aguardar por dois meses para conseguir um doador de sangue compatível⁷⁵. O tipo sanguíneo dele é "O positivo", que é um dos mais comuns entre os brasileiros, porém a dificuldade estava em encontrar um doador "D^b negativo" o que é raro na maioria da população brasileira. Neste caso, fez-se necessário pesquisar em diferentes bancos de sangue ou doadores da mesma etnia.

Sabe-se que a população brasileira é formada por uma extensa mistura de três raízes ancestrais: ameríndios, europeus e africanos, sendo considerada uma das população mais heterogêneas do mundo⁷⁶. O conhecimento das variações genotípicas e fenotípicas dos vários grupos sanguíneos é essencial para estimar a disponibilidade de sangue compatível para pacientes que apresentam anticorpos contra antígenos eritrocitários. Assim, para promover a melhor seleção de sangue compatível, se faz necessário conhecer o perfil antigênico dos doadores, para reduzir o risco de uma aloimunização e de possíveis reações transfusionais adversas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramos P de S, Amorim AVC, Ferreira CBT, Romaneli DAV de R, Campos IM, Dias VL. Reação hemolítica transfusional: Diagnóstico e manejo anestésico. *Rev Médica Minas Gerais*. 2017;27(0):S46-S51. doi:10.5935/2238-3182.20170044
2. Brasil. *Portaria N 158, de 4 de Fevereiro de 2016 - Redefine o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos*. Brasil: Ministério da Saúde; 2016:1-58. doi:22/jul NV - 730
3. Batisso AC, Novaretti MCZ. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2003;25(1):47-58. doi:10.1590/s1516-84842003000100008
4. Daniels GL. *Human Blood Groups*. Vol 2. 2nd ed. (Blackwell Science, ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.; 2002.
5. Junqueira PC, Rosenblit J, Hamerschlak N. A história da Hemoterapia no Brasil. *Rev bras hematol hemoter*. 2005;27(3):201-207. doi:10.1590/S1516-84842005000300013
6. Brasil. *Lei 10.205, de 21 de Março de 2001. Regulamenta à Coleta, Processamento, Estocagem, Distribuição e Aplicação Do Sangue, Seus Componentes e Derivados, Estabelece o Ordenamento Institucional Indispensável*. Brasil; 2001:1-6.
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/leis_2001/l10205.html
7. Brasil. *Resolução N 34, de 11 de Junho de 2014 - Dispõe Sobre as Boas Práticas No Ciclo Do Sangue*. Vol 2014. Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2014.
8. García-Roa M, Del Carmen Vicente-Ayuso M, Bobes AM, et al. Red blood cell storage time & transfusion: Current practice, concerns & future perspectives. *Blood Transfus*. 2017;15(3):222-231. doi:10.2450/2017.0345-16
9. Bryk AH, Wiśniewski JR. Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome. *J Proteome Res*. 2017;16(8):2752-2761. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00025
10. Den L. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. 1st ed. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US); 2005.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2275/>.
11. Cruz RDO, Mota MA, Conti FM, et al. Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes poli transfundidos. *Eistein*. 2011;9(2):173-178.
12. Castilho, Lilian; Reid E. Marion; Pellegrino J. *Fundamentos de Imuno-Hematologia*. 1ed ed. São Paulo: Atheneu; 2015.
13. Castilho L. The future of red cell alloimmunization. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(4):259-265.
14. Davoudi-Kiakalayeh A, Mohammadi R, Pourfathollah AA, Siery Z, Davoudi-Kiakalayeh S. Transfusion Medicine and Molecular Genetic Methods. *Int J Prev Med*. 2018;9(45):1-12. doi:10.4103/ijpvm.IJPVM_232_16
15. Bordin, José Orlando; Langhi, Júnior Mario Dante; Covas DT. *Tratado de Hemoterapia - Fundamentos e Prática*. 1ed. (Bordin, José; Dante, Mário Langhi Júnior; Covas DT, ed.). Rio de Janeiro: Atheneu; 2019.
16. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. *The Blood Group Antigen Facts Book*. Vol 1. Third. (Elsevier, ed.). London; 2012.

17. Reid ME, Westhoff CM. Membrane Blood Group Antigens and Antibodies. In: *Blood Banking and Transfusion Medicine*. Second Edi. Elsevier; 2007:53-68. doi:10.1016/B978-0-443-06981-9.50010-7
18. Bonifácio SL, Novaretti MCZ. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(2):104-111. doi:10.1590/S1516-84842009005000015
19. Reid ME, Mohandas N. Red Blood Cell Blood Group Antigens: Structure and Function. *Semin Hematol*. 2004;41(2):93-117. doi:10.1053/j.seminhematol.2004.01.001
20. Lomas-Francis C. The value of DNA analysis for antigens of the Kidd blood group system. *Transfusion*. 2007;47(SUPPL. 1):23-27. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01306.x
21. Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE M-PO. Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to Plasmodium vivax. Presented at the: 2013. doi:10.1016/B978-0-12-407826-0.00002-3.Red
22. Howes RE, Patil AP, Piel FB, et al. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun*. 2011;2(1):266. doi:10.1038/ncomms1265
23. ISBT. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. <https://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>. Accessed July 10, 2020.
24. Komatsu F, Hasegawa K, Yanagisawa Y, et al. Prevalence of diego blood group Dia antigen in mongolians: comparison with that in Japanese. *Transfus Apher Sci*. 2004;30(2):119-124. doi:10.1016/j.transci.2003.11.004
25. Saleh, M.R, Zefarina, Z et al. Transfusion Medicine and Molecular Genetic Methods. *Int J Prev Med*. 2018;9(45):1-13. doi:10.4103/ijpvm.IJPVM_232_16
26. Bégat C, Bailly P, Chiaroni J, Mazières S. Revisiting the Diego Blood Group System in Amerindians: Evidence for Gene-Culture Comigration. Caramelli D, ed. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132211. doi:10.1371/journal.pone.0132211
27. ISBT. International Society of Blood Transfusion Working Group. Red cell immunogenetics and blood group terminology. ISBT Science Series. <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>. Accessed July 13, 2020.
28. Costa SS, Souza Silva TC, Chiba AK, Cruz BR, Langhi Junior DM, Bordin JO. Molecular study of C w /C x antigens and frequency of Rh phenotypes in southeast Brazilian blood donors. *J Clin Lab Anal*. 2018;32(8):e22570. doi:10.1002/jcla.22570
29. Raud L, Férec C, Fichou Y. From genetic variability to phenotypic expression of blood group systems. *Transfus Clin Biol*. 2017;24(4):472-475. doi:10.1016/j.tracli.2017.06.011
30. Westhoff CM. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. *Semin Hematol*. 2007;44(1):42-50. doi:10.1053/j.seminhematol.2006.09.010
31. Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, et al. Blood group terminology 2004: From the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang*. 2004;87(4):304-316. doi:10.1111/j.1423-0410.2004.00564.x
32. Daniels GL. *Human Blood Groups*. Vol 2. 2nd ed. (Blacwell Science, ed.).

- Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.; 2002. doi:10.1016/B978-0-12-812851-0.09987-0
33. 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
 34. Huang CH, Liu PZ, Cheng JG. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. *Semin Hematol*. 2000;37(2):150-165. doi:10.1016/S0037-1963(00)90040-4
 35. Quraishy N, Sapatnekar S. Advances in Blood Typing. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Vol 77. 1st ed. Elsevier Inc.; 2016:221-269. doi:10.1016/bs.acc.2016.06.006
 36. Rizzo C, Castiglia L, Arena E, et al. Weak D and partial D: Our experience in daily activity. *Blood Transfus*. 2012;10(2):235-236. doi:10.2450/2012.0060-11
 37. Reid, Marion E.; Francis CL. *The Blood Group Antigen - Facts Book*. second edi. (An Imprint of Elsevier, ed.). New York; 2004. doi:10.1016/C2011-0-69689-9
 38. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol*. 2005;14(2005):143-153. doi:10.1016/j.trim.2005.03.003
 39. Yu LC, Twu YC, Chang CY, Lin M. Molecular basis of the Kell-null phenotype: A mutation at the splice site of human KEL gene abolishes the expression of Kell blood group antigens. *J Biol Chem*. 2001;276(13):10247-10252. doi:10.1074/jbc.M009879200
 40. Virk M, Papakonstantino K, Cai W, Oh D, Andrews J. Blood donation during pregnancy due to anti-Ku hemolytic disease of the fetus and newborn. *Lab Med*. 2019;50(4):421-425. doi:10.1093/labmed/lmz020
 41. Storry JR, Castilho L, Daniels G, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Cancun report (2012). *Vox Sang*. 2014;107(1):90-96. doi:10.1111/vox.12127
 42. Bianchi JVS. Genotipagem de grupos sanguíneos por meio de microarranjos líquidos. 2016:154.
 43. Tournamille C. Bases moléculaires et relations structure-fonction des antigènes de groupe sanguin Duffy: Récepteur de chimiokines et de *Plasmodium vivax*. *Transfus Clin Biol*. 2000;7(5):497-509. doi:10.1016/S1246-7820(00)80038-5
 44. Höher G, Rodrigues MM de O, Waskow G, et al. Identification of ACKR1 variants associated with altered Duffy phenotype expression in blood donors from southern Brazil. *Transfus Apher Sci*. 2020;(March):102768. doi:10.1016/j.transci.2020.102768
 45. ISBT. Names for FY (ISBT 008) Blood Group Alleles. ISBT Science Series. http://isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/_ISBT_008__FY_blood_group_alleles_v5.0_01-MAR-2020.pdf. Accessed July 14, 2020.
 46. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Kim CL Van. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet*. 1995;10(2):224-228. doi:10.1038/ng0695-224
 47. Popovici J, Roesch C, Rougeron V. The enigmatic mechanisms by which

- Plasmodium vivax infects Duffy-negative individuals. *PLoS Pathog.* 2020;16(2):1-14. doi:10.1371/journal.ppat.1008258
48. Lopez GH, Morrison J, Condon JA, et al. Duffy blood group phenotype-genotype correlations using high-resolution melting analysis PCR and microarray reveal complex cases including a new null FY*A allele: The role for sequencing in genotyping algorithms. *Vox Sang.* 2015;109(3):296-303. doi:10.1111/vox.12273
 49. Lopez GH, Condon JA, Wilson B, et al. A novel FY *A allele with the 265T and 298A SNP s formerly associated exclusively with the FY *B allele and weak Fy b antigen expression: implication for genotyping interpretative algorithms. *Vox Sang.* 2015;108(1):52-57. doi:10.1111/vox.12185
 50. Langhi DM, Orlando Bordin J, Bordin JO. Duffy blood group and malaria. *Hematology.* 2006;11(5-6):389-398. doi:10.1080/10245330500469841
 51. Kikuchi Oliveira TY, Harris EE, Meyer D, Jue CK, Silva WA. Molecular evolution of a malaria resistance gene (DARC) in primates. *Immunogenetics.* 2012;64(7):497-505. doi:10.1007/s00251-012-0608-2
 52. Lawicki S, Covin RB, Powers AA. The Kidd (JK) Blood Group System. *Transfus Med Rev.* 2017;31(3):165-172. doi:10.1016/j.tmr.2016.10.003
 53. International Society of Blood Transfusion. Names for JK (ISBT 009) Blood Group Alleles General. ISBT Science Series. http://isbtweb.org/fileadmin/user_upload/_ISBT_009__JK_blood_group_alleles_v6.0_01-MAR-2020.pdf. Accessed July 14, 2020.
 54. Pinkerton FJ, Mermod LE, Liles BA, Jack JA, Noades J. The Phenotype Jk(a-b-) in the Kidd Blood Group System. *Vox Sang.* 1959;4(2):155-160. doi:10.1111/j.1423-0410.1959.tb04031.x
 55. Santos FLS, Cuter TB, Rodrigues ES, et al. "Molecular analysis of the rare S-s- red blood cell phenotype in blood donors and patients in south-east Brazil." *Vox Sang.* 2019;114(3):262-267. doi:10.1111/vox.12751
 56. Kudo S, Fukuda M. Structural organization of glycoporphin A and B genes: Glycophorin B gene evolved by homologous recombination at Alu repeat sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(12):4619-4623. doi:10.1073/pnas.86.12.4619
 57. International Society of Blood Transfusion. Names for MNS (ISBT 002) Blood Group Alleles. ISBT Science Series. http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red cells/blood group allele terminology/allele tables/002_MNS_Alleles_v4.1.pdf. Published 2018. Accessed July 12, 2020.
 58. Kumawat V, Jain A, Marwaha N, Sharma RR. Anti-N antibody reacting at 37°C: An unusual occurrence interfering with routine testing: Two interesting cases. *Asian J Transfus Sci.* 2015;9(1):92-93. doi:10.4103/0973-6247.150964
 59. Junqueira PC, Castilho L. The history of the Diego blood group. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2002;24(1):15-23. doi:10.1590/S1516-84842002000100004
 60. ISBT. Names for DI (ISBT 010) Blood Group. ISBT Science Series. http://isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red cells/blood group allele terminology/allele tables/010 DI Alleles v2.0 110914.pdf. Accessed July 12, 2020.
 61. Oliveira LCO, Cozac APC. Transfusion Reactions: Diagnosis and Treatment. *Med Ribeirão Preto.* 2003;36:431-438. doi:10.11606

62. Matthews J, Newton S. The Coombs test. *Clin J Oncol Nurs*. 2010;14(2):143-145. doi:10.1188/10.CJON.143-145
63. Ministério da Saúde Brasil. *Técnico Em Hemoterapia - Livro Texto*. 1ª edição. (Editora MS, ed.); 2013.
64. Hillyer CD, Shaz BH, Winkler AM, Reid M. Integrating Molecular Technologies for Red Blood Cell Typing and Compatibility Testing Into Blood Centers and Transfusion Services. *Transfus Med Rev*. 2008;22(2):117-132. doi:10.1016/J.TMRV.2007.12.002
65. Menegati SFP, Santos TD, Macedo MD, Castilho L. Discrepancies between red cell phenotyping and genotyping in daily immunohematology laboratory practice. *Transfus Apher Sci*. 2020;59(1):102585. doi:10.1016/j.transci.2019.06.020
66. Castilho L, Rios M, Bianco C, et al. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion*. 2002;42(2):232-238. doi:10.1046/j.1537-2995.2002.00029.x
67. Castilho L, Rios M, Pellegrino J, Saad STO, Costa FF. Blood group genotyping facilitates transfusion of β -thalassemia patients. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(5):216-220. doi:10.1002/jcla.10044
68. Ye Z, Zhang D, Boral L, Liz C, May J. Comparison of Blood Group Molecular Genotyping to Traditional Serological Phenotyping in Patients with Chronic or Recent Blood Transfusion. *J Biosci Med*. 2016;04(03):1-8. doi:10.4236/jbm.2016.43001
69. Quirino MG, Colli CM, Macedo LC, Sell AM, Visentainer JEL. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019;41(1):44-49. doi:10.1016/j.htct.2018.06.006
70. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PEM, et al. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet*. 2000;67(2):444-461. doi:10.1086/303004
71. Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. Harpending H, ed. *PLoS One*. 2011;6(2):e17063. doi:10.1371/journal.pone.0017063
72. Thomas C. Conquista e povoamento do Rio Grande do Sul. *Bol Geográfico do Rio Grande do Sul*. 1976;(19):17-27. <https://revistas.fee.tche.br/index.php/boletim-geografico-rs/article/download/.../3395>.
73. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/santa-rosa.html>. Accessed July 20, 2020.
74. Anvisa. *10º Boletim Avaliação Sanitária Em Serviços de Hemoterapia*. Brasília; 2020.
75. Ílian Marques. Sangue para doação a índio ainda não foi encontrado, diz hematologista - notícias em Bahia. <http://g1.globo.com/bahia/noticia/2012/04/sangue-para-doacao-indio-ainda-nao-foi-encontrado-diz-hematologista.html>. Published 2012. Accessed November 15, 2018.
76. Pena SDJ, Carvalho-Silva DR, Alves-Silva J, Prado VF. Retrato Molecular. *Ciência Hoje*. 2000;27(159):17-25.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- I. Analisar o perfil antigênico dos grupos sanguíneos dos sistemas Rh, MNS, Kell, Duffy, Diego e Kidd em doadores de sangue de um hemocentro da região noroeste do RS.

5.2 Objetivos Específicos

- I. Analisar os polimorfismos dos sistemas MNS c.143C>T (*GYP**S/s, rs7683365), Kell c.578 C>T (*KEL**01/*02, rs8176058), Duffy c.125 A>G e c.67T>C (*FY**01/*02, rs12075; *FY**02N.01, rs2814778), Diego c.2561C>T (*DI**01/*02, rs2285644), Kidd c.838G>A (*JK**01/*02, rs1058396) e Rh c.676G>C e c.307C >T (*RHCE**E/e, rs609320; *RCHE**C/c, rs676785) através da técnica de PCR em tempo real, determinando a frequência dessas variantes.
- II. Determinar a frequência de genótipos raros na população amostrada e comparar com dados já publicados para outras regiões do país.

6. RESULTADOS

CAPÍTULO I: Frequencies of genetic variants of the Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS and Diego systems of northwest Rio Grande do Sul, Brazil

Artigo publicado:

- Frequencies of genetic variants of the Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS and Diego systems of northwest Rio Grande do Sul, Brazil

Autores:

- Scheila da Silva Soares, Josiane Rodrigues Aquino, Francini Petrolli, Tiago Bittencourt de Oliveira, Silvana Almeida e Marilu Fiegenbaum.

Periódico:

- Hematology, Transfusion and Cell Therapy. ISSN: 2531-1379.
<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.05.004>

Ano de publicação:

- 2022



HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY

www.htct.com.br



Original article

Frequencies of genetic variants of the Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS and Diego systems of northwest Rio Grande do Sul, Brazil

Scheila da Silva Soares ^a, Josiane Rodrigues Aquino ^b, Francini Petrolli ^a,
Tiago Bittencourt de Oliveira ^c, Silvana Almeida ^a, Mariluf Fiegenbaum ^{a,*}

^a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Hemocentro Regional de Santa Rosa, Rio Grande do Sul (HEMOSAR), Santa Rosa, RS, Brazil

^c Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Santo Ângelo, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2021

Accepted 4 May 2022

Available online xxx

Keywords:

Blood group antigens

Genotype

Polymorphism

Blood donors

ABSTRACT

Introduction: To date, 340 antigen-organized 43 blood group systems are recognized, being ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS and Diego the most clinically relevant. The aim of this study was to assess the distribution of alleles and genotypes of the blood group systems Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS and Diego in 810 blood donors registered in the hemotherapy unit in northwest Rio Grande do Sul, Brazil

Methods: We evaluated the genetic variability of blood groups Rh (c.676G>C and c.307C>T), Kell (c.578C>T), Kidd (c.838A>G), Duffy (c.125A>G and c.1-67T>C), Diego (c.2561C>T) and MNS (c.143T>C) in 810 volunteer blood donors of Rio Grande do Sul, southern Brazil. The genetic profiling was performed through allelic discrimination assays using hydrolysis probes (TaqMan[®]) real-time PCR system.

Results: The most frequent blood group genotypes found in our study population were: RHC^cCc (51.5%), RHC^cee (70.1%), FY^A/FY^B (49.3%), GATA -67T/T (93.5%), KEL²/KEL² (93.4%), JK^A/JK^B (53.2%) and DI^{*02}/DI^{*02} (95.4%). Some statistical differences were observed on comparing the population of this study with populations from other states in Brazil, mainly with population of Minas Gerais, Bahia and Paraná, which showed some differences from the population of Porto Alegre, which was more similar to those of Santa Catarina and São Paulo

Conclusion: The frequency of red blood cell polymorphisms in our study is different from that of blood donors in other regions of Brazil. The results showed the importance of extended genotyping in adequate blood screening and the existence of rare genotypes in Brazilian regular blood donors

© 2022 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author at: Rua: Sarmiento Leite, 245/403, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: mariluf@ufcsa.edu.br (M. Fiegenbaum).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.05.004>

2531-1379/© 2022 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Erythrocyte antigens are polymorphic structures that can induce an immune response with a risk of hemolytic transfusion reactions. Currently, the International Society for Blood Transfusion (ISBT) recognizes 340 antigens organized into 43 blood group systems, with ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS and Diego being the most clinically relevant.¹ The molecular mechanisms responsible for these polymorphisms are diverse, although the majority represent single nucleotide polymorphisms (SNPs) encoding amino acid substitutions.² The clinical relevance of an erythrocyte antigen in transfusion depends on the incidence of the antigen in the population, which can vary in different ethnic groups, and Brazil is characterized by its mixture of ethnicities with specific characteristics for each region of the country.^{3,4} The frequency of these antigens is also quite variable across the country.^{5,6} The most implicated antibodies in delayed hemolytic transfusion reactions are directed against antigens D, K, E, C, c, Fy^a, Di^a, S and Jk^a.^{7,8}

In transfusion practice, knowing the blood profiles of donors/recipients can contribute to transfusion safety, as knowing the frequencies of antigens of the main blood groups in each population can help in the search for compatible donors. Although there are data on allelic variability and genotypic frequency of erythrocyte antigens in the country,^{5,6,8-11} these data are still scarce in Rio Grande do Sul (RS) in southern Brazil.¹² The colonization of the capital and the metropolitan region is different from that in the interior of the state; thus, our study is the first carried out in a population in the northwest region of the state of Rio Grande do Sul.

The aim of this study was to determine the allelic and genotypic frequencies of variants in genes of blood groups, including Diego c.2561C>T (DI*01/*02), Kell c.578 C>T (KEL*01/*02), Duffy c.125 A>G and c.67T>C (FY*01/*02 and FY*02N.01) and Kidd c.838G>A (JK*01/*02), MNS c.143C>T (GYPB*S/s), Rh c.676G>C (RHCE*E/e) and c.307C>T (RCHE*C/c) in blood donors in a city in northwestern Rio Grande do Sul, Brazil and compare these frequencies between donors and patients with those found in other Brazilian regions.

Methods

Sample selection

All donors participating in this study agreed to participate through written informed consent. This study was approved by the Ethics Research Committee of the Hemocentro Regional de Santa Rosa (HEMOSAR) (No: 1964/2018) and the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA) (No: 3.225.821). The sample consisted of individuals of both sexes between 18 and 70 years of age. Considering an error of 5% and a confidence level of 95%, the sample size for estimating the frequency of antigens must be greater than 400. A total sample of 818 regular voluntary blood donors of both sexes was collected from the Blood Bank of Hemocentro Regional de Santa Rosa (HEMOSAR), Rio Grande do Sul, Brazil ("54°28'53 S, 27°52'15 W"), between April 2019 and August 2019.

Sample collection and DNA extraction

To obtain the DNA, 5 mL of peripheral blood was collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and centrifuged (2,500 rpm for 10 min.) to obtain the buffy coat. Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood using a standard salting-out procedure.¹³ The concentration and purity of DNA samples were analyzed by optical density at 260/280 nm (BioSpec-Nano, Shimadzu, Columbia, MD), diluted to 10 ng/ μ L and kept at -20°C for long-term storage.

Genotyping

The genotypes of blood group polymorphisms were determined by allele discrimination using a hydrolysis probe with TaqMan 5'-nuclease assays on a real-time PCR system (StepOnePlus, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The following assays were used: (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA): C_26654865_10 (DI*01/*02 - rs2285644), AHAB14V (KEL*01/*02 - rs8176058), C_2493442_20 (FY*01/*02 - rs12075), C_15769614_10 (FY*02N.01 - rs2814778), C_1727582_10 (JK*01/*02 - rs1058396), ANMF7P2 (GYPB*S/GYPB*s - rs7683365), AH6R2NT (RHCE*C/c - rs676785) and AH514HL (RHCE*E/e - rs609320). The reactions were performed with fast thermal cycling conditions and the reagent concentrations were as follows: 10 ng of DNA, 1X TaqMan genotyping assay, 1X TaqMan genotyping master mix and nuclease-free water (final volume 8 μ L).

The polymorphisms chosen were those that define the evaluated blood groups, based on the genotype-phenotype correlation, according to the International Society of Blood Transfusion (<https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>).

Statistical analysis

Categorical variables are presented as absolute numbers and proportions. The Chi-square test (χ^2), or Fisher's exact test, was used to determine the differences between genotypic and allelic frequencies in the present study and data from populations (POPs) in other regions of Brazil: POP-Porto Alegre (RS)¹²; POP-Santa Catarina (SC)^{6,14}; POP-Paraná (PR)⁹; POP-São Paulo (SP)¹⁰; POP-Minas Gerais (MG)¹⁵; and; POP-Bahia (BA).^{6,14} A *p*-value < 0.05 was considered significant and comparisons were performed using the Winpepi version 11.65 software.¹⁶ The Arlequin computer version 3.5.2.2, available at (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>), was used to test the Hardy-Weinberg equilibrium. Pairwise Nei's *D*_{ST} genetic distances¹⁷ were employed to estimate genetic distances between populations, using the Poptree2.¹⁸ The nonmetric multidimensional scaling (MDS) for distances was performed to visualize the populations in a two-dimensional frame. A stress (distortion) lower than 0.05 was considered to be acceptable. To conduct the MDS, we employed the Statistical Package for Social Sciences Version 23.0 software (SPSS, Chicago, IL). For the statistical tests, a *p*-value < 0.05 was considered significant. The sample power was calculated using the Winpepi v. 11.65 (<http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>). Considering our sample and the smallest comparison sample (POP-BA), the study has a power of 80% to detect a

difference of 8 percentage points and 93% for 10 percentage points. Considering the study sample and the largest comparison population (POP-SP), the study has a power of 83% to detect a difference of 5 percentage points and 100% to detect a difference of 10 percentage points.

Results

In total, 818 blood samples were collected from the HEMOSAR donors. Eight samples that did not have good performance in the DNA extraction were discarded, totaling 810 individuals analyzed. The donors were between 18 and 70 years old (38.48 ± 11.91 years) and from both sexes (male, 59.5% and female, 40.5%). Regarding ethnicity, according to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), 81.5% declared themselves white, 13.7% brown, 1.2% black, 2.1% yellow, 0.4% indigenous (native-American) and 1.1% did not declare their ethnicity.

The Rh system

According to the HEMOSAR database, 25.4% of the donors were classified as negative for the RHD phenotype and 74.6%, positive for the RHD phenotype. The frequencies for the RHCE gene, producing the Cc and Ee antigens, were 17.5% for the RHCE^{C/C} genotype, 51.5% for the RHCE^{C/c}, 31.0% for the RHCE^{c/c} and 6.7% for the RHCE^{E/E}, 23.2% for the RHCE^{E/e} and 70.1% for the RHCE^{e/e}. Compared to other regions of Brazil, the RHCE^{c/c} was more frequent in Santa Catarina and Paraná ($p < 0.01$) and Minas Gerais and Bahia ($p < 0.001$). The comparison with the RHCE^{E/E} was different in Minas Gerais and Bahia ($p < 0.01$), Santa Catarina and Paraná ($p < 0.01$) and São Paulo ($p < 0.001$) (Table 1).

The Duffy system

The FY^A/FY^A genotype was observed in 143 (17.6%) samples, FY^A/FY^B, in 399 samples (49.3%) and FY^B/FY^B, in 268

Table 1 – Comparison of genotype frequencies for the Rh, Duffy, Kell, Kidd, MNS and Diego blood group systems in voluntary blood donors in the population of northwest Rio Grande do Sul with other populations of Brazil.

Genotype	Our study (n = 810)	POP-SC ^{5,14} (n = 373)	POP-PR ⁹ (n = 400)	POP-SP ¹⁰ (n = 948)	POP-MG ¹⁵ (n = 287)	POP-BA ⁶ (n = 196)
Rh system						
RHCE ^{C/C}	0.175 (142)	0.161 (60)	0.175 (70)	0.170 (161)	0.132 (38)	0.102 (20) ^a
RHCE ^{C/c}	0.515 (417)	0.427 (159) ^a	0.427 (171) ^b	0.490 (465)	0.369 (106) ^c	0.398 (78) ^b
RHCE ^{c/c}	0.310 (251)	0.412 (154) ^b	0.398 (159) ^b	0.340 (322)	0.499 (143) ^c	0.500 (98) ^c
RHCE ^{E/E}	0.067 (54)	0.026 (10) ^b	0.022 (9) ^b	0.020 (19) ^b	0.027 (8) ^a	0.020 (4) ^a
RHCE ^{E/e}	0.232 (187)	0.255 (95)	0.257 (103)	0.260 (246)	0.212 (61)	0.189 (37)
RHCE ^{e/e}	0.701 (564)	0.719 (268)	0.721 (288)	0.720 (683)	0.761 (218)	0.791 (155) ^a
Duffy system						
FY ^A /FY ^A	0.176 (143)	0.184 (69)	0.125 (50) ^a	0.120 (114) ^b	0.098 (28) ^b	0.127 (25)
FY ^A /FY ^B	0.493 (399)	0.473 (176)	0.480 (192)	0.480 (455)	0.397 (114) ^b	0.460 (90)
FY ^B /FY ^B	0.331 (268)	0.343 (128)	0.395 (158) ^a	0.400 (379) ^b	0.505 (145) ^c	0.413 (81) ^a
Duffy Null						
GATA-67 T/T	0.935 (757)	0.944 (352)	0.780 (312) ^c	0.690 (654) ^c	0.568 (163) ^c	0.318 (62) ^c
GATA-67 T/C	0.061 (50)	0.037 (14)	0.195 (78) ^c	0.250 (237) ^c	0.297 (85) ^c	0.492 (97) ^c
GATA-67 C/C	0.004 (3)	0.019 (7) ^b	0.025 (10) ^b	0.060 (57) ^c	0.135 (39) ^c	0.190 (37) ^c
Kidd system						
JK ^A /JK ^A	0.225 (182)	0.295 (110) ^b	0.272 (109)	0.280 (265) ^b	0.383 (110) ^c	0.378 (74) ^c
JK ^A /JK ^B	0.532 (431)	0.472 (176)	0.480 (192)	0.520 (493)	0.457 (131) ^a	0.480 (94)
JK ^B /JK ^B	0.243 (197)	0.233 (87)	0.248 (99)	0.200 (190) ^a	0.160 (46) ^b	0.142 (28) ^b
Kell system						
KEL ^{*01} /KEL ^{*01}	0.006 (5)	0	0.002 (1)	0 ^a	0	0
KEL ^{*01} /KEL ^{*02}	0.060 (49)	0.057 (21)	0.050 (20)	0.049 (47)	0.041(12)	0.036 (7)
KEL ^{*02} /KEL ^{*02}	0.934 (756)	0.943 (352)	0.948 (379)	0.951 (901)	0.959 (275)	0.964 (189)
Diego system						
DI ^{*01} /DI ^{*01}	0.016 (13)	0 ^a	-nt	0 ^c	-nt	0
DI ^{*01} /DI ^{*02}	0.030 (24)	0.056 (21) ^a	-nt	0.040 (38)	-nt	0.030 (6)
DI ^{*02} /DI ^{*02}	0.954 (773)	0.944 (352)	-nt	0.960 (910)	-nt	0.970 (190)
MNS system						
GYPB ^{*S} /GYPB ^{*S}	0.126 (102)	-nt	-nt	0.090 (86) ^a	-nt	-nt
GYPB ^{*S} /GYPB ^{*s}	0.436 (353)	-nt	-nt	0.380 (360) ^a	-nt	-nt
GYPB ^{*s} /GYPB ^{*s}	0.438 (355)	-nt	-nt	0.530 (502) ^c	-nt	-nt

n = number of subjects, n = number of subjects with genotype, -nt = not-tested.

^a $p < 0.05$

^b $p < 0.01$

^c $p < 0.001$ with Chi-square test or Fisher's exact test, compared in our study. POP-SC: Blood donors in Santa Catarina,^{6,14} POP-PR: Blood donors in Paraná,⁹ POP-SP: Blood donors in São Paulo,¹⁰ POP-MG: Blood donors in Minas Gerais,¹⁵ POP-BA: Admixed population in Bahia.⁶

(33.1%) samples. The FY*B/FY*B compared frequencies were different, mainly in Minas Gerais ($p < 0.001$), São Paulo ($p < 0.01$) and Bahia ($p < 0.05$) (Table 1). The mutation (c.1-67T>C), which occurs in the GATA-box gene promoter region and prevents the expression of the FY*B allele on the membrane of red blood cells, was evaluated. For this polymorphism, 3 (0.4%) samples were genotyped as being homozygous (GATA-67C/C), 50 (6.1%), as heterozygous (GATA-67T/C) and the vast majority, 757 samples (93.5%), without this mutation (GATA-67T/T). All of the homozygous samples (GATA-67C/C) had the FY*B/FY*B genotype, which corresponds to the Fy(a-b-) phenotype. The GATA-67C/C genotype was more frequent in other regions than in our study ($p < 0.01$).

The Kidd system

The genotype distribution for the Kidd system for the genotype JK*A/JK*A was observed in 182 (22.5%) samples, JK*A/JK*B, in 431 (53.2%) and JK*B/JK*B, in 197 (24.3%). For comparisons, the JK*A/JK*A was more frequent in Santa Catarina, São Paulo ($p < 0.01$) and Minas Gerais, Bahia ($p < 0.001$) (Table 1).

The Kell system

For the Kell system, 5 samples (0.6%) were genotyped for the rare KEL*01/KEL*01 genotype, 49 samples (6.0%), for the

KEL*01/KEL*02 genotype and 756 genotyped samples (93.4%), for the KEL*02/KEL*02 genotype. The Kell values were not different from those of the other regions.

The Diego system

The genotype frequencies for the Diego blood group were 13 samples (1.6%) for DI*01/DI*01, 24 samples (3%), for DI*01/DI*02 and 773 samples (95.4%), for DI*02/DI*02. The presence of genotype DI*01/DI*01 was higher in our study than in Santa Catarina ($p < 0.05$) and São Paulo ($p < 0.001$) (Table 1).

The MNS system

The genotype distribution for the MNS system for the genotype GYPB*S/GYPB*S was observed in 102 (12.6%) samples, GYPB*S/GYPB*s, in 353 (43.6%) and GYPB*s/GYPB*s, in 355 (43.8%). The genotype GYPB*s/GYPB*s was more common in relation to São Paulo ($p < 0.001$) (Table 1).

Comparison of allelic frequencies with other Brazilian populations

The allelic frequencies are shown in Table 2. For the Rh system, allele c was the most frequent (56.8%) for comparisons and was significantly different from all other regions, except São Paulo

Table 2 – Comparison of allelic frequencies for the Rh, Duffy, Kell, Kidd, MNS and Diego blood group systems in voluntary blood donors in the population in northwest Rio Grande do Sul with other regions of Brazil.

Alleles	Our study n = 810	POP-RS ¹² n = 382	POP-SC ^{6,14} n = 373	POP-PR ⁹ n = 400	POP-SP ¹⁰ n = 948	POP-MG ¹⁵ n = 287	POP-BA ⁶ n = 196
RHCE*C	0.432 (701)	-nt	0.373 (279)	0.388 (311)	0.415 (786)	0.318 (182)	0.301 (118)
RHCE*c	0.568 (919)	-nt	0.627 (467)	0.612 (489)	0.585 (1.110)	0.682 (392)	0.699 (274)
p			0.008	0.043	0.293	< 0.001	< 0.001
RHCE*E	0.183 (295)	0.149 (114)	0.154 (115)	0.151 (121)	0.150 (284)	0.134 (77)	0.110 (43)
RHCE*e	0.817 (1.315)	0.851 (650)	0.846 (631)	0.849 (679)	0.850 (1.612)	0.866 (497)	0.890 (349)
p		0.046	0.094	0.058	0.009	0.009	0.001
FY*01	0.423 (685)	0.432 (330)	0.421 (314)	0.365 (292)	0.360 (682)	0.297 (170)	0.357 (140)
FY*02	0.577(935)	0.568 (434)	0.579 (425)	0.635 (508)	0.640 (1.214)	0.703 (404)	0.643 (252)
p		0.675	0.928	0.007	< 0.001	< 0.001	0.021
-67T	0.965 (1.566)	0.882 (674)	0.946 (706)	0.877 (702)	0.815 (1.543)	0.716 (411)	0.564 (221)
-67C	0.035 (56)	0.118 (90)	0.054 (40)	0.123 (98)	0.185 (350)	0.284 (163)	0.436 (171)
p		< 0.001	0.038	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
JK*01	0.491 (795)	0.588 (449)	0.530 (396)	0.513 (410)	0.540 (1.024)	0.611 (351)	0.620 (243)
JK*02	0.509 (825)	0.412 (315)	0.470 (350)	0.487 (390)	0.460 (872)	0.389 (223)	0.380 (149)
p		0.001	0.077	0.335	0.004	<0.001	<0.001
KEL*01	0.037 (59)	0.030 (23)	0.030 (23)	0.028 (22)	0.025 (48)	0.020 (12)	0.020 (8)
KEL*02	0.963 (1.561)	0.970 (741)	0.970 (723)	0.972 (778)	0.975 (1.848)	0.980(562)	0.980 (384)
p		0.503	0.569	0.304	0.070	0.095	0.153
DI*01	0.030 (50)	0.010 (8)	0.028 (21)	-nt	0.005 (10)	-nt	0.020 (8)
DI*02	0.970 (1.570)	0.990 (756)	0.972 (725)	-nt	0.995(1.886)	-nt	0.980 (384)
p		0.003	0.818		<0.001		0.346
GYPB*S	0.344 (557)	0.322 (246)	-nt	-nt	0.280 (532)	-nt	-nt
GYPB*s	0.656 (1.063)	0.678 (518)	-nt	-nt	0.720 (1.364)	-nt	-nt
p		0.314			<0.001		

n = number of subjects, -nt = not-tested.

^a $p < 0.05$

^b $p < 0.01$

^c $p < 0.001$ with Chi-square test or Fisher's exact test, compared in our study. POP-RS: Blood donors in Porto Alegre, Rio Grande do Sul.¹² POP-SC: Blood donors in Santa Catarina.^{6,14} POP-PR: Blood donors in Paraná, southern Brazil.⁹ POP-SP: Blood donors in São Paulo.¹⁰ POP-MG: Blood donors in Minas Gerais,¹⁵ POP-BA: Admixed population in Bahia.^{6,10}

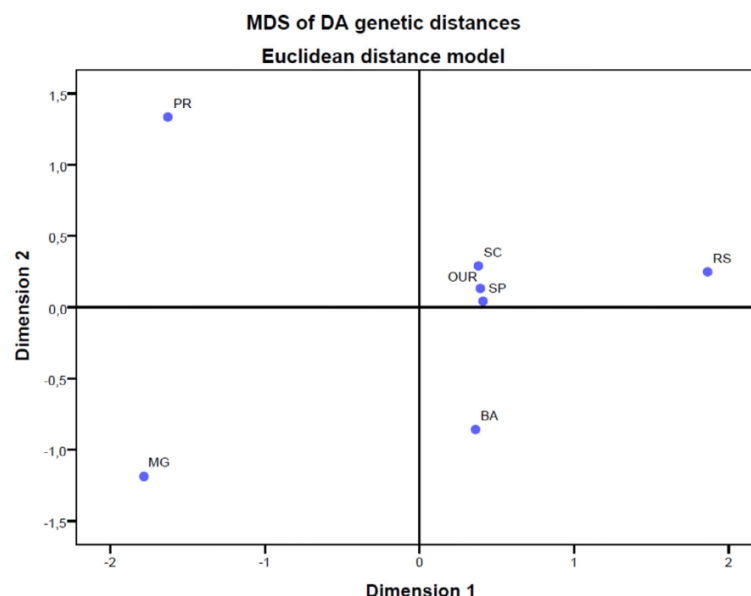


Figure 1 – Nonmetric multidimensional scaling of DA genetic distances among 7 population samples, based on the Rh, Kell, Kidd, MNs, Duffy and Diego red cell polymorphisms. OUR: Populations of this study, RS: Blood donors in Porto Alegre, Rio Grande do Sul,¹⁴ SC: Blood donors in Santa Catarina,^{5,16} PR: Blood donors in Paraná, southern Brazil,¹⁰ SP: Blood donors in São Paulo,¹¹ MG: Blood donors in Minas Gerais,¹³ BA: Admixed population in Bahia.^{5,11}

($p = 0.293$). The allele *e* was the most frequent (81.7%) and was significantly different from Porto Alegre ($p = 0.046$), São Paulo, Minas Gerais ($p = 0.009$) and Bahia ($p < 0.001$).

The FY*02 allele was more frequent (57.7%) and different from that in Paraná ($p = 0.007$), São Paulo, Minas Gerais ($p < 0.001$) and Bahia ($p = 0.021$). For variant c.1-67T>C, the allele -67T was most frequent (96.5%) and different from Porto Alegre, Paraná, São Paulo and Minas Gerais ($p < 0.001$). The JK*02 was 50.9% in our study and was different from Porto Alegre, Minas Gerais, Bahia ($p < 0.001$) and São Paulo ($p = 0.004$). The alleles KEL*01 and KEL*02 were not different from those in our study. The frequency of the allele DI*01 was 3% in our study and was different from Porto Alegre ($p = 0.003$) and São Paulo ($p < 0.001$). The GYPB*S were different in São Paulo ($p < 0.001$).

We also computed pairwise D_{ST} genetic distances between populations of the study. Multidimensional scaling was applied to D_{ST} distances to produce Figure 1. The main result of the genetic distance analysis showed that the populations of the states Paraná, Minas Gerais and Bahia are genetically different from other populations. The population in our study, on the other hand, is similar to populations in the states São Paulo and Santa Catarina and shows some differences from the population of Porto Alegre (RS).

Discussion

The Brazilian population is one of the most heterogeneous in the world, as a result of the intense process of miscegenation.³ The process of colonization was highly diverse in

different regions; for instance, in the Rio Grande do Sul population, the composition of Europeans, Africans and Amerindians was 72.9%, 14% and 13%, respectively,⁴ which explains the high prevalence of European ancestry in this study.

The most frequent blood group genotypes found in this study population were RHC*Cc, RHC*ee, FY*A/FY*B, GATA-67 T/T, KEL*02/KEL*02, JK*A/JK*B and DI*02/DI*02. Some significant differences were observed when comparing the population in this study with populations from other states in Brazil, mainly with populations from Minas Gerais (MG), Bahia (BA) and São Paulo (SP) for the Rh, Duffy, Kidd, Diego and MNS blood group systems.^{10,15}

In our study, the frequency of the RHCE*Cc genotype was higher, when compared to the populations of the studies from Santa Catarina and Paraná,^{6,9,14} which is also different from the study carried out in the southeast (Minas Gerais) and the study in the northeast (Bahia)^{6,15}; in these populations, the most frequent genotype was the RHCE*cc. There is a high prevalence of the RHCE*cc in Afro-descendants,¹⁹ which can be explained by the southeast and northeast of the country having the greatest African presence.^{8,12} The RHC*ee genotype was more frequent, in relation to the RHC*Ee and RHC*EE, similar to those found in the other Brazilian populations studied.^{8,15}

The most frequent genotype for the Duffy system was FY*A/FY*B, different from the studies in Minas Gerais and Bahia. In a study carried out in the population of the state of Pará, the frequency for the FY*A/FY*B was 29.1%,²⁰ while the present study showed 49.3%. The Duffy glycoprotein is a receptor in the erythrocyte membrane for malaria protozoa in red blood cells (RBCs).²¹ The point mutation c.1-67T>C in the

promoter region of the GATA-box gene impairs the expression of the Fyb antigen, causing the phenotype known as Fy (a-b-), which is also known as erythrocyte silent (Fyb^{es}).²² Comparing the allelic frequencies of our study, performed in northwest Rio Grande do Sul, with the study carried out in Porto Alegre, we observed differences for the null allele (FY*02N.01 or FY*B^{E5}) homozygotes. The frequency of this allele was higher in Porto Alegre,¹² Paraná,⁹ São Paulo¹⁰ and Bahia.^{6,14} This difference can probably be explained by the fact that these studies present a population with a greater presence of African descent, as this allele has a frequency greater than 98% in Africans.²³ On the other hand, in SC, the frequency of this allele was 5.3%, similar to that in our study.

For the Kidd system, the genotype JK*A/JK*B was more frequent, similar to the frequencies found in the studies in SC, PR and SP. However, the opposite was observed in the MG and BA studies, in which the JK*A/JK*A genotype was the most frequent. There was a significant difference in the presence of the JK*01 allele in São Paulo, Minas Gerais and Bahia in our study.

There were no differences in the Kell system antigens, both genotypic and allelic, when compared to the other Brazilian populations studied.

In transfusion practice, antibodies against the M and N antigens are not problematic and rarely cause hemolysis. On the other hand, antibodies against S, s and U antigens are clinically significant. There are few studies that report the frequency of the MNS system in blood donors in Brazil; comparing the frequency of the GYPB*S allele with the study performed with SP donors, we observed differences.¹⁰

The first antigen identified in the Diego blood system was the Di^a antigen, in 1953, in a Venezuelan woman after the birth of a baby with hemolytic disease of the newborn (HDRN).²⁴ Years later, the Di^b antigen was identified.²⁵ Since then, a total of 22 Diego antigens have been discovered dispersed; two alleles, DI*B and DI*A, responsible for the expression Di^b and Di^a antigens respectively. The Di^a antigen (DI*01 allele) is considered an anthropological marker of Native American populations.^{26,27} In our study, the frequency of the genotype DI*01/DI*01 was 1.6%, different from studies carried out in SC, SP and BA, that did not observe the genotype in their work. In the study by Zacarias et al. (2016),⁸ which evaluated donors of Japanese descent in southwest Paraná, the frequency for the genotype was 0.4%.

In our work, the frequency found for the DI*01 allele was 3.0%, similar to the frequency found in SC (2.8%) and greater than those found in SP (0.5%) and BA (2%). The higher frequency of the DI*01 allele in our study can be explained by the possible presence of native Americans in our study population. Santa Rosa was a neighborhood in the territory of the "Sete Povos das Missões", the name given to the group of seven indigenous villages founded by the Jesuits and Spaniards at the end of the 17th century and beginning of the 18th century. In the study performed by Rodrigues et al. (2021),²⁷ which evaluated samples of native Americans, a frequency for the DI*01 allele of 11.8% was found in the Kaingang and 6.8% in the Guaranis, presenting a high frequency, when compared to the Brazilian population (range: 0.9% - 4.3%),²⁷ except when compared to the study with the population of Japanese descent, which presented a frequency for the allele of 4.8%, similar to that of the Guarani.⁵

It is not always possible to phenotype all clinically relevant antigens in routine blood bank screening due to difficulties in finding specific anti-sera, such as for the Diego system antigens. Anti-serum for the Di^a and Di^b antigens is extremely expensive and has a short shelf life and low volume, which make them inefficient for use in routine immunohematology.²⁸ Currently, the Brazilian legislation does not include research on Diego antigens in the phenotyping of erythrocytes, so these antigens are only researched in specific cases.²⁹ In hemotherapy services, knowledge on the prevalence of blood group antigens is important to meet the transfusion needs of the population served; therefore, these services must be prepared for opportune cases or for low-frequency occurrences.^{8,27}

In general, the analysis of the genetic distance is similar to those of the populations in the studies performed in São Paulo and Santa Catarina. Although the self-declaration of ethnicity does not accurately assess ancestry in the Brazilian population, our results indicate that the population of our study was not very close to the population of Porto Alegre, a city located in the same state. This was expected because, in our study, only 1.2% declared themselves black, while in the study in Porto Alegre, 12.5% declared themselves black. The same situation can be applied to studies in Paraná, Minas Gerais and Bahia, as they have a greater African presence.^{3,4}

It is important that studies determining the frequencies of the genotypes be useful in transfusion medicine in creating a database of genotyped donors to facilitate the selection of suitable blood components for patients. Genotyping can also contribute to the identification of rare alleles. We highlight the importance of identifying rare alleles, such as the Di^a (DI*01) and K (KEL*01) antigens and variation c.1-67T>C. Overall, the results obtained in our study can be used for anthropological comparisons and contribute to the knowledge of the distribution of genotypes and phenotypes in the donors in Rio Grande do Sul.

Conflicts of interest

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

Acknowledgments

The authors are very grateful to nurse Rosane Werlang Schneider (*in memoriam*) for her contribution and dedication to this study. We would also like to thank the nursing technicians at the Hemosar and the CAPES for their financial support.

REFERENCES

1. ISBT. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. <https://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>. Accessed July 10, 2020.

2. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol.* 2005;14(2005):143–53. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2005.03.003>.
3. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FS, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected Harpending H, ed. *PLoS One.* 2011;6(2):e17063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017063>.
4. Manta FS, Pereira R, Vianna R, Araújo AR, Gitaí DL, Silva DA, et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-indels. *PLoS One.* 2013;8(9):1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075145>.
5. Flôres MA, Visentainer JE, Guelsin GA, Fracasso AS, Melo FC, Guelsin GA, et al. Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group system polymorphism in Brazilian Japanese descendants. *Transfus Apher Sci.* 2014;50(1):123–8. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2013.09.014>.
6. Costa DC, Schinaider AA, Santos TM, Schörner EJ, Simon D, Maluf SW, et al. Frequencies of polymorphisms of the Rh, Kell, Kidd, Duffy and Diego systems of Santa Catarina, Southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2016;38(3):199–205. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.04.005>.
7. Cruz RD, Mota MA, Conti FM, Pereira RA, Kutner JM, Aravechia MG, et al. Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes poli transfundidos. *Eistein.* 2011;9(2):173–8.
8. Zacarias JM, Langer IB, Visentainer JE, Sell AM. 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.* 2016;55(3):302–7. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.08.001>.
9. Guelsin GA, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, et al. Genetic polymorphisms of Rh, Kell, duffy and kidd systems in a population from the state of paraná, Southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011;33(1):21–5. <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20110009>.
10. Ribeiro KR, Guarnieri MH, Da Costa DC, Costa FF, Pellegrino J, Castilho L. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang.* 2009;97(2):147–52. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01185.x>.
11. Santos RF, Bordin RO, Alves SM, Medeiros MO. Frequência fenotípica, alélica e genotípica dos grupos sanguíneos ABO e RH segundo os doadores da unidade de coleta e transfusão “dr. Marcio Curvo de Lima” polo de Rondonópolis, MT no período de janeiro a dezembro de 2015. *Biodiversidade.* 2018;17(2):102–14. <http://www.periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/biodiversidade/article/view/7077/4672>.
12. Waskow G, Rodrigues MM de O, Höher G, Onsten T, Dal-Ri Lindenau J, Fiegenbaum M, et al. Genetic variability of blood groups in Southern Brazil. *Genet Mol Biol.* 2020;43(2). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2018-0327>.
13. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: High-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal.* 2005;19(6):229–32. <https://doi.org/10.1002/jcla.20083>.
14. Costa DC, Schinaider AA, Santos TM, Schörner EJ, Simon D, Maluf SW, et al. Erratum to “Frequencies of polymorphisms of Rh, Kell, Kidd, Duffy and Diego systems of Santa Catarina, southern Brazil” (*Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* (2016) 38(3) (199–205) (S1516848416300160) (10.1016/j.bjhh.2016.04.005). *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2016;38(4):371–2. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.09.001>.
15. Alves VM, De Vito FB, Martins PRJ, Silva SS, Castilho L, Moraes-Souza H. Frequency of red blood cell genotypes in multi-transfused patients and blood donors from Minas Gerais, Southeast Brazil. *Transfus Apher Sci.* 2018;57(1):71–5. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.12.002>.
16. Abramson JH. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol Perspect Innov.* 2011;8(1):1. <https://doi.org/10.1186/1742-5573-8-1>.
17. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 1978;89(3):583–90.
18. Takezaki N, Nei M, Tamura K. POPTREE2: software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with windows interface. 2009. doi:10.1093/molbev/msp312
19. Daniels GL. *Human Blood Groups.* 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.; 2002. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812851-0.09987-0> Vol 2 (Blackwell Science, ed.).
20. Carvalho TAA, Queiroz MG, Cardoso GL, Diniz IG, Silva ALNM, Pinto AYN, et al. *Plasmodium vivax* infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals. *Malar J.* 2012;11(1):1. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-430>.
21. Rowe JA, Opi DH, Williams TN. Blood groups and malaria: fresh insights into pathogenesis and identification of targets for intervention. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(6):480–7. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283313de0>.
22. Höher G, Fiegenbaum M, Almeida S. Molecular basis of the Duffy blood group system. *Blood Transfus.* 2018;16(1):93–100. <https://doi.org/10.2450/2017.0119-16>.
23. Howes RE, Patil AP, Piel FB, Nyangiri OA, Kabaria CW, Gething PW, et al. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun.* 2011;2(1):266. <https://doi.org/10.1038/ncomms1265>.
24. Allen FH. Inheritance of the Diego (Di^a) blood-group factor. *Am J Hum Genet.* 1957;19:53:64–7.
25. Junqueira PC, Castilho L. The history of the Diego blood group. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2002;24(1):15–23. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842002000100004>.
26. Bégat C, Bailly P, Chiaroni J, Mazières S. Revisiting the Diego blood group system in amerindians: evidence for gene-culture comigration Caramelli D, ed *PLoS One.* 2015;10(7):e0132211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132211>.
27. Rodrigues MM de O, Höher G, Waskow G, Hutz MH, Dal-Ri Lindenau J, Petzl-Erler ML, et al. Blood groups in native americans: a look beyond abo and rh. *Genet Mol Biol.* 2021;44(2). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2020-0255>.
28. Santos Caldas A, dos Santos BC, Palmeira MK, Ribeiro Carvalho FR, Melo ACE. Frequency of antigen Di^a on the blood donor population of the Hemocenter coordinator of the Hemopa Foundation. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2021(xx):2–7. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.12.007>.
29. Brasil. Portaria N 158, de 4 de Fevereiro de 2016 - redefina o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Brasil: Ministério da Saúde. 2016: 1–58. doi:22/jul NV - 730.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até meados da década de 1990, a fenotipagem sanguínea dependia inteiramente de técnicas sorológicas. A hemaglutinação até hoje é o “padrão-ouro” para identificação de antígenos eritrocitários, usada em todos os serviços de hemoterapia. Apesar desse clássico ser método confiável, reprodutível e fácil execução, ele apresenta limitações que podem ser supridas por testes moleculares. A clonagem e sequenciamento dos genes envolvidos na expressão dos antígenos de grupo sanguíneo têm fornecido um grande progresso no entendimento dos eventos moleculares que levam à diversidade desses antígenos. A aplicação deste conhecimento é importante na tipagem sanguínea e possui impacto na medicina transfusional que busca cada vez mais por processos seguros e eficazes para os pacientes. As variações nas sequências gênicas podem direta ou indiretamente afetar a expressão ou a natureza do epítipo dos antígenos na superfície das hemácias o que pode levar a uma tipagem sanguínea discrepante pelo método sorológico. Presumindo que o genótipo reflete o fenótipo, alguns pesquisadores defendem que a medicina transfusional poderia adotar um processo “Genótipo-Fenótipo” no qual a base genética é reconhecida para predição do fenótipo. Desta forma, estudos que caracterizem o impacto funcional de variantes genéticas associadas a predição de novos alelos de grupos sanguíneos são fundamentais para o desenvolvimento das plataformas de genotipagem. Além disso, o conhecimento das variações genótípicas e fenótípicas dos vários grupos sanguíneos é essencial para estimar a disponibilidade de sangue compatível para pacientes que apresentam anticorpos contra antígenos eritrocitários. Assim, para promover a melhor seleção de sangue compatível, se faz necessário conhecer o perfil antigênico dos doadores locais e regionais, para reduzir o risco de uma aloimunização e de possíveis reações transfusionais adversas. Com estes dados poder-se-á implementar um banco regional de gerenciamento de estoque de sangue com doadores genotipados e fenotipados para melhor atender as necessidades da população.

APÊNDICE A - Dados suplementares

De acordo com a legislação brasileira, o serviço de hemoterapia deverá realizar os seguintes exames imuno-hematológicos para qualificação do sangue do doador: tipagem ABO direta e reversa; tipagem RhD e pesquisa do antígeno D-fraco para doadores fenotipados com Rh negativo; pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) e pesquisa de hemoglobina S. A mesma portaria recomenda a realização da fenotipagem de antígenos eritrocitários dos sistemas Rh (D, C, c, E, e) e Kell (K) nas amostras de sangue de doadores, conforme as demandas do serviço de hemoterapia, além disso é recomendada a realização da fenotipagem para os antígenos eritrocitários dos sistemas Rh (E, e, C, c), Kell (K), Duffy (Fy^a, Fy^b), Kidd (Jk^a, Jk^b) e MNS (S, s) no sangue do receptor, e em pacientes aloimunizados que estão ou poderão entrar em esquema de transfusão crônica ².

Os testes imuno-hematológicos estão baseados na interação de antígenos eritrocitários com anticorpos que reconhecem os respectivos antígenos. Esta interação pode ser visualizada macroscopicamente sob a forma de aglutinação. Esses testes podem ser realizados utilizando a técnica em coluna de aglutinação em gel ou utilizando a técnica em tubo. Para todos os testes deve-se utilizar reagentes inspecionados e com controles internos. A pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) é obrigatória em pacientes e doadores de sangue. O teste deve ter a capacidade de detectar anticorpos circulantes, dirigidos contra antígenos eritrocitários. Os reagentes utilizados no PAI são compostos, no mínimo, de hemácias de dois fenótipos distintos. Estas hemácias devem ser fenotipadas para os principais antígenos eritrocitários, cujos anticorpos apresentam importância clínica: D, C, c, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, Le^a, Le^b, M, N, S, s e P¹. Junto ao kit de reagentes para triagem do PAI, vem um diagrama que mostra o perfil antigênico das hemácias, que permite a comparação dos resultados obtidos ⁶³.

Tabela 1 – Dados dos doadores fenótipos cadastrados no HEMOSAR.

Sistemas	Fenótipo	Doadores	Frequência %
ABO (N=818)	A	325	39,73
	B	77	9,41
	O	386	47,18
	AB	30	3,66
RhD (N=818)	RhD+	614	75,06
	RhD-	204	24,93
RhCE (n=177)	E	14	7,90
	e	163	92,09
	C	28	15,81
	c	149	84,18
Duffy (N=80)	Fy (a+b+)	46	57,5
	Fy (a+b-)	12	15,0
	Fy (a-b+)	22	27,5
	Fy (a-b-)	0	0
Kidd (N=80)	Jk (a+b+)	40	50,0
	Jk (a+b-)	23	28,8
	Jk (a-b+)	16	20,0
	JK(a-b-)	1	1,25
Kell (N=175)	K+/k+	10	5,7
	K-/k+	165	94,3
MNS (N=84)	S-s+	33	39,3
	S+s-	14	16,7
	S+s+	37	44,0
	s-S-	0	0
	M+N-	29	34,5
	M-N+	11	13,1
	M+N+	44	52,4
	M-N-	0	0

Tabela 2 – Mostra o grau concordância entre a fenotipagem com a genotipagem dos doadores cadastrados.

Sistemas	Grau de concordância	Grau de Discordância (discrepâncias)
Kell*		
K	8/10 (80%)	2/10 (20%)
k	162/165 (98,1%)	3/165 (1,8%)
Duffy*		
Fya	12/12 (100%)	0
Fya/Fyb	44/46 (95,6%)	2/46 (4,4%)
Fyb	21/22 (95,4%)	1/22 (4,6%)
MNS		
s	33/33 (100%)	0
S	14/14 (100%)	0
Ss	36/37 (97,2%)	1/37 (2,7%)
Kidd*		
Jka	21/23 (91,3%)	2/23 (8,7%)
Jka/Jkb	40/40 (100%)	0
Jkb	14/16 (87,5%)	2/16 (12,5%)
Rh*		
C	14/17 (82,3%)	3/17 (17,6%)
c	128/139 (92%)	11/139 (7,91%)
Cc	18/19 (94,7%)	1/19 (5,2%)
E	1/1 (100%)	0
e	141/149 (94,6%)	7/149 (4,6%)
Ee	14/26 (53,8%)	7/26 (26,9%)

* sistemas com mais discordância.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de  tica em pesquisa da FUMSSAR



**AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL PARA
REALIZAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA**



Considerando o parecer da Comissão Científica da FUMSSAR através do processo administrativo nº 1964/2018 de 17/09/2018, **autorizamos** a realização e desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado: **“Caracterização molecular e fenotípicas de grupos sanguíneos em doadores de sangue de uma cidade no noroeste do Rio Grande do Sul.”**. A pesquisa está vinculada a Trabalho de Conclusão da Pós Graduação modalidade Doutorado, com coleta de dados junto ao Hemocentro da Fundação Municipal de Saúde de Santa Rosa. Este estudo está sob a responsabilidade da doutoranda **Scheila da Silva Soares de Oliveira**.

Santa Rosa, 17 de setembro de 2018

Anderson Mantei

Presidente FUMSSAR



Anexo B – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização molecular e fenotípica de grupos sanguíneos em doadores de sangue de uma cidade no noroeste do Rio Grande do Sul

Pesquisador: Marilu Fiegenbaum

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 03931018.7.0000.5345

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.225.821

Apresentação do Projeto:

Os grupos sanguíneos são caracterizados pela presença ou ausência de antígenos polimórficos bem definidos na membrana eritrocitária. Os antígenos eritrocitários são herdados geneticamente. Embora a transfusão sanguínea seja uma atividade que proporciona bastante benefícios aoreceptor, ela também pode oferecer riscos inerentes. Um desses riscos é a aloimunização, caracterizada pela produção de anticorpos contra antígenos eritrocitários transfundidos. O risco de aloimunização é muito maior nos pacientes a serem transfundidos que apresentam ausência de antígenos de alta frequência, ou seja, possuem tipos sanguíneos raros. A frequência dos alelos de grupos sanguíneos é diferente de acordo com a origem étnica da população, o que torna importante a determinação da variabilidade desses alelos em doadores de sangue. Quando a população de doadores de sangue é geneticamente diferente da de receptores a probabilidade de ocorrer aloimunização aumenta. O conhecimento das variações genotípicas ou fenotípicas dos vários grupos sanguíneos é essencial para estimar a disponibilidade de sangue compatível para pacientes que apresentam anticorpos contra antígenos eritrocitários. Sendo assim, nosso trabalho tem por objetivo analisar o perfil antigênico dos grupos sanguíneos dos sistemas MNSs, Kell, Duffy, Diego e Kidd em doadores de sangue de uma cidade

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

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: 3.225.821

do noroeste do RS. Com estes dados poder-se-ia implementar um programa de melhor gerenciamento de estoque de sangue de doadores raros de acordo com as necessidades locais e promover melhor seleção de sangue compatível com receptores e reduzir o percentual de aloimunizações dos pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Analisar o perfil antigênico dos grupos sanguíneos dos sistemas MNSs, Kell, Duffy, Diego e Kidd em doadores de sangue de uma cidade do noroeste do RS.

Objetivos específicos

Identificar doadores com fenótipos raros, possibilitando assim, agilidade no atendimento das transfusões sanguíneas em populações especiais.

Correlacionar as variantes raras identificadas com discrepâncias entre genotipagem e fenotipagem em doadores de sangue.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quais os riscos em participar?

O risco dessa pesquisa está relacionado a coleta de sangue que será realizada em uma das veias do braço, com material estéril e descartável, podendo causar desconforto semelhante a uma injeção na veia e em alguns casos deixar uma mancha roxa, que habitualmente melhora algumas horas depois ou em poucos dias. Para minimizar esses riscos as coletas serão realizadas somente por profissionais treinados e capacitados a fazê-los e será feita juntamente com a doação de sangue.

Quais os benefícios para os participantes desse estudo?

Com a análise, poderemos saber qual o seu tipo sanguíneo com mais detalhes, o que pode trazer benefícios em relação a transfusões futuras, caso você venha necessitar, pois poderão ser utilizadas unidades de sangue mais parecidas com o seu tipo sanguíneo, do que é possível atualmente. No entanto, somente a longo prazo poderemos saber todos os benefícios desse estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A transfusão de sangue, ou de componentes sanguíneos é sempre restrita

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

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: 3.225.821

e complicada pela incompatibilidade entre doador e receptor. Isso é determinado por vários antígenos, como os dos grupos sanguíneos e antígenos de plaquetas humanas (APH), que atuam como marcadores de identidade tecidual. Esses antígenos são codificados por genes altamente polimórficos e, portanto, apresentam um desafio para encontrar doadores adequados para pacientes específicos. Os antígenos incompatíveis tornam-se alvos do sistema imunológico do receptor. Assim, a correspondência de alta qualidade entre doador e receptor tornou-se clínica importante para garantir procedimentos transfusionais bem-sucedidos. Com estes dados poder-se-ia implementar um programa de melhor gerenciamento de estoque de sangue de doadores raros de acordo com as necessidades locais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além dos documentos obrigatórios solicitados pela Plataforma Brasil como de preenchimento obrigatório, o pesquisador anexou todos os outros documentos conforme está previsto na Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/2012.

Recomendações:

Encaminhou Carta Resposta esclarecendo todas as pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Encaminhou Carta Resposta esclarecendo todas as pendências.

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_BASICAS_DO_PROJETO_1225059.pdf	09/01/2019 17:16:40		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	resposta.pdf	09/01/2019 17:16:25	Marilu Fiegenbaum	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	09/01/2019 17:16:14	Marilu Fiegenbaum	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto.pdf	09/01/2019 17:16:06	Marilu Fiegenbaum	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

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: 3.225.821

Investigador	projeto.pdf	09/01/2019 17:16:06	Marilu Fiegenbaum	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	13/11/2018 10:05:34	SCHEILA DA SILVA SOARES DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	relatorio.pdf	12/11/2018 13:56:11	Marilu Fiegenbaum	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	fumssar.pdf	12/11/2018 13:55:33	Marilu Fiegenbaum	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 27 de Março de 2019

Assinado por:
Luciane Dalcanale Moussalle
(Coordenador(a))