

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA

GLÁUCIA ANDRÉIA SOARES GUELSIN

Determinação dos alelos de grupos sanguíneos eritrocitários em doadores voluntários de sangue e medula óssea e pacientes politransfundidos da população Noroeste do Paraná, região Sul do Brasil.

Maringá
2010

GLÁUCIA ANDRÉIA SOARES GUELSIN

Determinação dos alelos de grupos sanguíneos eritrocitários em doadores voluntários de sangue e medula óssea e pacientes politransfundidos da população Noroeste do Paraná, região Sul do Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia
Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a Dr^a Jeane Eliete Laguila Visentainer

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria Sell

Maringá

2010

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)**

G925d Guelsin, Gláucia Andréia Soares
Determinação dos alelos de grupos sanguíneos eritrocitários em doadores voluntários de sangue e medula óssea e pacientes politransfundidos da população Noroeste do Paraná, região Sul do Brasil / Gláucia Andréia Soares Guelsin. -- Maringá, 2010. 56 f. : figs., tabs.

Orientadora : Prof^a. Dr^a. Jeane Eliete Laguila Visentainer.

Co-orientadora : Prof^a. Dr^a. Ana Maria Sell
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, 2010.

1. Grupos sanguíneos eritrocitários. 2. Polimorfismo - Grupos sanguíneos eritrocitários. 3. PCR-Multiplex (Biologia molecular). 4. PCR-RFLP (Biologia molecular). 5. Imunohematologia. I. Visentainer, Jeane Eliete Laguila, orient. II. Sell, Ana Maria, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas. Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. IV. Título.

CDD 21.ed. 573.1536

FOLHA DE APROVAÇÃO

GLÁUCIA ANDRÉIA SOARES GUELSIN

Determinação dos alelos de grupos sanguíneos eritrocitários em doadores voluntários de sangue e medula óssea e pacientes politransfundidos da população Noroeste do Paraná, região Sul do Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Jeane Eliete Laguila Visentainer
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dr^a Juliana Curi Martinichen
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Jordão Pellegrino Jr
Universidade Estadual de Campinas

Prof^a Dr^a Maryse St-Louis
Université Laval/ Canadá

Prof Dr Wilson Baleotti Jr
Faculdade de Medicina de Marília

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2010.

Local de defesa: Sala 005, Bloco I-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai, que nos criou com sabedoria e perfeição.

A minha mãe, sempre presente na minha vida, disposta a me ouvir, aconselhar e apoiar.

Ao meu marido, que com seu amor e carinho sempre me ajudou, incentivou e compreendeu a minha ausência em muitos momentos em que tive que escolher a pesquisa, acreditando em meu trabalho e confiante no meu futuro. Sem você eu não teria conseguido!

A Prof^a Dr^a Ana Maria Sell, pela orientação desde os primeiros passos na pesquisa científica. Obrigada pelos conhecimentos científicos, pelos ensinamentos de vida, companheirismo, amizade, dedicação e confiança transmitidos no decorrer de todos esses anos de convivência.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Jeane, toda minha gratidão e admiração. Muito obrigada pelas oportunidades oferecidas a mim e por acreditar na minha capacidade.

As minhas amigas Amanda, Daniela e Viviane que são anjos que Deus colocou no meu caminho.

Aos funcionários e professores do Laboratório de Imunogenética que me acolheram com amizade e foram sempre prontos a me ensinarem e ajudarem. Meus sinceros agradecimentos!

Ao Hemocentro Regional de Maringá pela infraestrutura e recursos oferecidos para a realização deste trabalho, especialmente a bioquímica Margareth, enfermeira Lóide e Dra Tatiana, pela dedicação e prontidão em me atender e ajudar.

Aos pacientes, que permitiram a realização dos exames em seu material biológico. Que esse trabalho possa contribuir para a melhoria de sua qualidade de vida.

Ao Laboratório de Parasitologia Básica, pela infraestrutura e recursos oferecidos para a realização deste trabalho.

A mestranda Amanda e ao aluno de iniciação científica Marcelo pela valiosa ajuda com os géis de poliacrilamida.

A Dr^a Lílian Castilho pelos ensinamentos em Imunohematologia, sem os quais teríamos muitas dificuldades em executar esse trabalho e as suas alunas Daphne, Daiane e Débora, por terem me acolhido com amizade e auxiliado na execução das técnicas laboratoriais.

Aos membros da banca, Prof^a Dr^a Juliana Curi Martinichen (UEM), Dr Jordão Pellegrino Jr (UNICAMP), Prof^a Dr^a Maryse St-Louis (Université Laval) e Prof Dr Wilson Baleotti Jr (FAMEMA) por aceitarem prontamente o convite para avaliação deste trabalho e pelas valiosas sugestões.

A Fundação Araucária/Universidade Estadual de Maringá pelo financiamento do projeto.

Determinação dos alelos de grupos sanguíneos eritrocitários em doadores voluntários de sangue e medula óssea e pacientes politransfundidos da população Noroeste do Paraná, região Sul do Brasil.

RESUMO

Antígenos de grupos sanguíneos são proteínas que estão ligadas a carboidratos ou a lipídeos e são expressas, principalmente, na superfície de hemácias. Os genes que codificam esses antígenos apresentam polimorfismos que são originados predominantemente por mutações de ponto, principalmente os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs). O conhecimento da variabilidade dos antígenos de grupos sanguíneos é essencial na prática transfusional, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos contra esses antígenos pode levar a quadros hemolíticos graves, principalmente em casos de pacientes portadores de hemoglobinopatias ou outras doenças que requerem transfusões sanguíneas periódicas. A hemaglutinação clássica é a principal técnica utilizada na detecção dos diferentes grupos eritrocitários, contudo, apresenta limitações tornando necessária a implementação de outros protocolos para auxiliarem na detecção desses grupos. A biologia molecular pode ser uma alternativa importante na determinação do perfil antigênico e auxiliar no esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos com as diversas variantes de grupos sanguíneos. Alguns protocolos de genotipagem de grupos sanguíneos já estão bem estabelecidos e validados na população brasileira, contudo, torna-se ainda necessário a realização de estudos em diferentes regiões do Brasil. A proposta desse estudo é implementar a técnica de biologia molecular para investigar o polimorfismo de alguns genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e medula óssea e pacientes politransfundidos do Noroeste do Paraná, região Sul do Brasil e avaliar o polimorfismo desses genes nessa população.

Palavras-chave: Grupos sanguíneos eritrocitários. Polimorfismo. Biologia molecular.

Imunohematologia.

Determination of erythrocytic blood groups in both blood and bone marrow donors and in polytransfused patients of Northwest of Parana, Southern of Brazil

ABSTRACT

Blood red cell antigens are proteins linked to carbohydrates or lipids and are mainly expressed on red blood cells surface. The genes codify these antigens showing polymorphism that are mainly originated by point mutations, mainly the single nucleotide polymorphism (SNPs). The knowledge of Blood red cell antigens is essential for transfusion practice, since the antibody development against these antigens may lead to severe hemolytic situations, especially in hemoglobinopathy patients or any other diseases that depend on periodical transfusions. Classical hemagglutination is the mainly used technique in the detection of the different erythrocytic groups; however it presents some limitations, making it necessary the implementation of some other protocols to aid in the detection of these groups. Molecular biology may be a significant alternative in determining the antigenic profile and help in clarifying the molecular mechanisms involved in the diverse blood groups variables. Some genotyping protocols are already defined and validated for Brazilian population, however, it is necessary that some studies be done in the distinct Brazilian population. The aim of this study was to implement the molecular biology technique to investigate the polymorphism of some blood group genes in blood and bone marrow donors and polytransfused patients from the Northwest of Paraná, Southern Brazil and evaluate this population's genes polymorphism.

Keywords: Erythrocytic Blood Groups. Polymorphism. Molecular biology.

Immunohematology.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* (artigo 1) Disponível em: <http://www.scielo.br/revistas/rbhh/pinstruc.htm> e ao *Journal of Clinical and Laboratory Analysis* (artigo 2) Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/36921/home>.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO.....	9
Sistemas de grupos sanguíneos	10
Sistema Rh.....	14
Sistema Kell.....	16
Sistema Duffy	16
Sistema Kidd	18
Importância da genotipagem eritrocitária	19
Protocolos de genotipagem	20
JUSTIFICATIVAS	21
OBJETIVOS.....	22
Objetivo Geral	22
Objetivos Específicos.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

CAPÍTULO II

ARTIGO 1 “Polimorfismo dos genes <i>RH</i> , <i>KEL</i> , <i>FY</i> e <i>JK</i> numa população da região Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil”.....	28
ARTIGO 2 “Benefits of Blood Group Genotyping in Multi-transfused Patients”.....	41

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES.....	55
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	56

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Os antígenos de grupos sanguíneos são herdados geneticamente e definidos por sequências específicas de aminoácidos que constituem uma proteína, a qual se liga a carboidratos ou a lipídios da membrana eritrocitária. A diversidade dos antígenos de grupos sanguíneos, como para qualquer outro traço biológico, encontra-se no gene. O conhecimento das bases moleculares desses antígenos e sua aplicação na genotipagem de grupos sanguíneos eritrocitários podem oferecer diversas vantagens na prática clínica transfusional, como a identificação do perfil antigênico de pacientes submetidos a transfusões sanguíneas recentes e de pacientes com teste direto da antiglobulina humana (Teste de Coombs) positivo. Também permite determinar os pacientes Fy(b-) que apresentam o alelo *FY*02* e, logo, podem receber sangue positivo para esse antígeno, o que aumenta a oferta de bolsas sanguíneas para esses indivíduos. Além disso, é possível identificar um feto em risco de doença hemolítica perinatal (DHPN), sem fazer uso de métodos invasivos e que podem oferecer risco à saúde fetal, utilizando como fonte de análise o DNA fetal, ou simplesmente conhecendo o genótipo dos pais (REID; YAZDANBAKSHI, 1998).

Como parte integrante da membrana da célula vermelha, os antígenos de grupos sanguíneos são compostos bioquimicamente diferentes e desempenham diversas funções importantes para a célula (transportadores de membrana, canais de proteínas, receptores, ligantes, moléculas de adesão, enzimas, proteínas estruturais). Por exemplo: antígenos A, B e H (sistema ABO) são oligossacarídeos; D, C, c, E, e, C^w (sistema Rh) são proteínas; M, N, S, s (sistema MNS) são sialoglicoproteínas; K, k, J^s^a, J^s^b, K^p^a, K^p^b (sistema Kell); Fy^a, Fy^b (sistema Duffy) e Lu^a, Lu^b (sistema Lutheran) são glicoproteínas; antígenos Jk^a e Jk^b (sistema Kidd) são proteínas e o antígeno P1 (sistema P) é um glicolípido (MAKAROVSKA-

BOJADZIEVA et al., 2009). Uma representação esquemática dos antígenos de grupos sanguíneos conforme as suas funções biológicas pode ser visualizada na **Figura 1**.

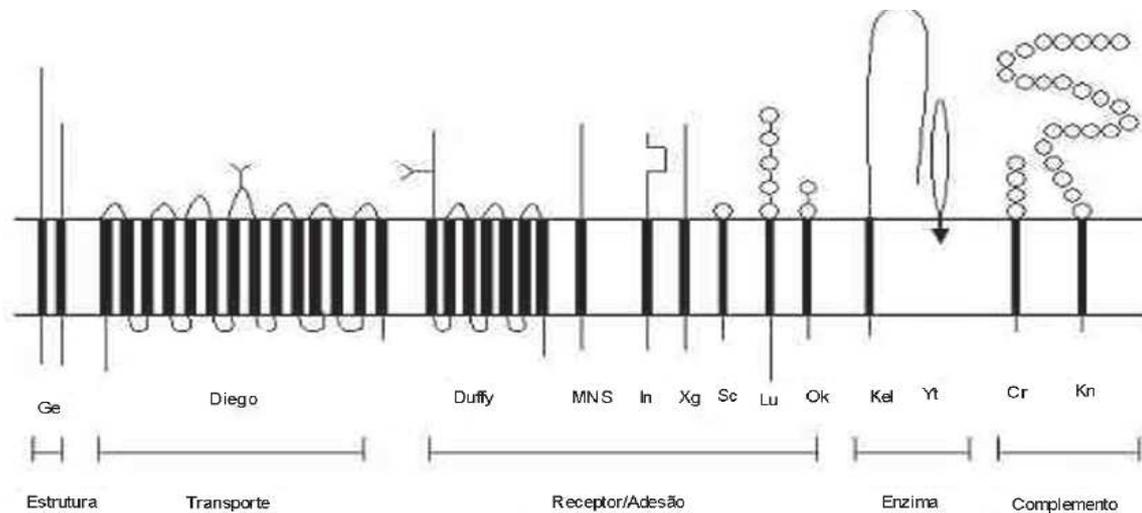


Figura 1. Representação esquemática de antígenos de grupos sanguíneos conforme suas funções biológicas. Fonte: BONIFÁCIO; NOVAETTI (2009).

Sistemas de grupos sanguíneos

Os antígenos de grupos sanguíneos começaram a ser descobertos em 1900, desde então uma variedade de terminologias foram utilizadas para denominá-los. Em 1980, a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (*International Society of Blood Transfusion* - ISBT) estabeleceu um comitê para definir uma nomenclatura numérica baseada na genética dos antígenos de superfície de hemácias. De forma que, todos os antígenos de grupos sanguíneos reconhecidos foram distribuídos em quatro classificações: sistemas, coleções, antígenos de baixa incidência (série 700) e antígenos de alta incidência (série 901) (<http://ibgri.blood.co.uk>).

O sistema de grupo sanguíneo consiste de um ou mais antígenos controlados por um único *locus* gênico ou por dois ou mais genes homólogos com pouca ou nenhuma recombinação entre eles. As coleções são compostas por antígenos relacionados

sorológica, bioquímica ou geneticamente, mas que não se ajustam aos critérios requeridos para sistema. As Séries 700 e 900 incluem os antígenos com incidência menor que 1% e incidência maior que 90%, respectivamente, os quais não atendem aos critérios dos sistemas ou coleções (<http://ibgri.blood.co.uk>).

Existem atualmente, 308 antígenos eritrocitários distribuídos em 30 sistemas de grupos sanguíneos, de acordo com a ISBT (Tabela 1). Esses números não são estáticos e novos antígenos de grupos sanguíneos são identificados a cada ano (DANIELS et al., 2009).

Os polimorfismos de grupos sanguíneos originam-se predominantemente de mutações de ponto, principalmente os polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* - SNP), mas, recombinações gênicas, deleções e inserções também ocorreram ao longo da evolução dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos (DANIELS et al., 2009). Na Tabela 2, estão descritos alguns polimorfismos de grupos sanguíneos gerados a partir de SNPs.

Embora os polimorfismos de grupos sanguíneos geralmente não afetem a função biológica do componente, alguns fenótipos de grupos sanguíneos parecem exercer uma vantagem seletiva. Um exemplo é o fenótipo Fy(a-b-), o qual possui uma vantagem de sobrevivência em áreas onde certas formas de malária são endêmicas (MILLER et al., 1976; HORUK et al., 1993). Outros componentes, por exemplo, CR1 e GPA, podem estar presentes na membrana de hemácias como um meio eficiente de remover microrganismos da circulação e proteger o hospedeiro da infecção (COCKBURN et al., 2004; SINHA et al., 2009; ORLANDI et al., 1992; DURAISINGH et al., 2003; MAYER et al., 2009).

A função primária desses antígenos é o transporte de oxigênio. Os componentes necessários para esse processo são: a hemoglobina, as vias metabólicas que permitem a sobrevivência da célula sem o núcleo e a membrana da célula eritrocitária (LIN et al., 2009).

Tabela 1: Sistemas de grupos sanguíneos.

<i>Nº</i>	<i>Nome</i>	<i>Símbolo do sistema^a</i>	<i>Nº de antígenos</i>	<i>Nome(s) do(s) gene(s)^b</i>	<i>Localização Cromossômica</i>
001	ABO	ABO	4	<i>ABO</i>	9q34.2
002	MNS	MNS	46	<i>GYPA, GYPB, GYPE</i>	4q31.21
003	P	P1	1	<i>P1</i>	22q11.2-qter
004	Rh	RH	50	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11
005	Lutheran	LU	19	<i>BCAM</i>	19q13.32
006	Kell	KEL	31	<i>KEL</i>	7q34
007	Lewis	LE	6	<i>FUT3</i>	19p13.3
008	Duffy	FY	6	<i>DARC</i>	1q23.2
009	Kidd	JK	3	<i>SLC14A1</i>	18q12.3
010	Diego	DI	21	<i>SLC4A1</i>	17q21.31
011	Yt	YT	2	<i>ACHE</i>	7q22.1
012	Xg	XG	2	<i>XG, CD99</i>	Xp22.33
013	Scianna	SC	7	<i>ERMAP</i>	1p34.2
014	Dombrock	DO	6	<i>ART4</i>	12p12.3
015	Colton	CO	3	<i>AQP1</i>	7p14.3
016	Landsteiner-Wiener	LW	3	<i>ICAM4</i>	19p13.2
017	Chido/Rodgers	CH/RG	9	<i>C4A, C4B</i>	6p21.3
018	H	H	1	<i>FUT1</i>	19q13.33
019	Kx	XK	1	<i>XK</i>	Xp21.1
020	Gerbich	GE	8	<i>GYPC</i>	2q14.3
021	Cromer	CROM	15	<i>CD55</i>	1q32.2
022	Knops	KN	9	<i>CRI</i>	1q32.2
023	Indian	IN	4	<i>CD55</i>	11p13
024	Ok	OK	1	<i>BSG</i>	19p13.3
025	Raph	RAPH	1	<i>CD151</i>	11p15.5
026	John Milton Hagen	JMH	5	<i>SEMA7A</i>	15q24.1
027	I	I	1	<i>GCNT2</i>	6p24.2
028	Globoside	GLOB	1	<i>B3GALT3</i>	3q26.1
029	Gill	GIL	1	<i>AQP3</i>	9p13.3
030	Rh-glicoproteína associado	RHAG	3	<i>RHAG</i>	6p21-qter

^aSegundo Sociedade Internacional de transfusão sanguínea (ISBT)^bReconhecido por HUGO (Human Genome Organization) <http://www.genenames.org/>Modificado de: <http://ibgri.blood.co.uk> e DANIELS et al. (2009).

Tabela 2: Alguns exemplos de polimorfismos de grupos sanguíneos gerados a partir de SNPs.

<i>Sistema</i>	<i>Gene</i>	<i>Polimorfismo</i>	<i>SNP</i>
ABO	<i>ABO</i>	A/B	526C>G, 703G>A, 796C>A, 803G>C
MNS	<i>GYP A</i>	M/N	59C>T, 71G>A, 72T>G
	<i>GYP B</i>	s/S	143C>T
RH	<i>RHCE</i>	C/c	48C>G, 178A>C, 203G>A, 307T>C
		e/E	676G>C
LU	<i>LU</i>	Lu ^b /Lu ^a	230G>A
		Au ^a /Au ^b	1615A>G
KEL	<i>KEL</i>	k/K	578C>T
		Kp ^b /Kp ^a	841C>T
		Js ^b /Js ^a	1790T>C
FY	<i>FY</i>	Fy ^a /Fy ^b	125G>A
JK	<i>SLC14A1</i>	Jk ^a /Jk ^b	838G>A
DI	<i>SLC14A1</i>	Di ^b /Di ^a	2561C>T
YT	<i>ACHE</i>	Yt ^a /Yt ^b	1057C>A
SC	<i>ERMAP</i>	Sc1/Sc2	169G>A
DO	<i>DO</i>	Do ^b /Do ^a	793G>A
CO	<i>AQP1</i>	Co ^a /Co ^b	134C>T
LW	<i>ICAM4</i>	LW ^a /LW ^b	299A>G
CROM	<i>DAF</i>	Tc ^a /Tc ^b	155G>T
KN	<i>CR1</i>	Kn ^a /Kn ^b	4681G>A
		McC ^a /McC ^b	4768A>G
		Sl ^a /Vil	4801A>G
IN	<i>CD44</i>	In ^b /In ^a	137G>C

Modificado de: DANIELS et al., 2009.

Os sistemas de grupos sanguíneos consistem de numerosos antígenos, cujos principais são os pertencentes aos sistemas ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS. Nessa revisão iremos destacar os sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd.

Sistema Rh

O sistema Rh é o mais complexo dos sistemas de grupos sanguíneos e apresenta 50 antígenos bem definidos, sendo os antígenos **D**, **C**, **c**, **E**, **e**, os principais. Estes antígenos formam oito complexos gênicos conhecidos como haplótipos de Rh: CDe (R_1), cDE (R_2), cDe (R_0), CDE (R_z), cde (r), Cde (r^{\wedge}), cdE ($r^{\wedge\wedge}$), CdE(r_y).

O *locus* RH é composto por dois genes altamente homólogos, *RHD* que codifica o antígeno D e *RHCE* que codifica os antígenos C/c e E/e (Figura 2). Esses genes contêm 10 *exons* cada e estão localizados no cromossomo 1p36.13-p-34.3, na orientação 3'*RHD*5'-5'*RHCE*3' (CARTRON, 1994; COLIN et al., 1991, DANIELS et al., 2009).

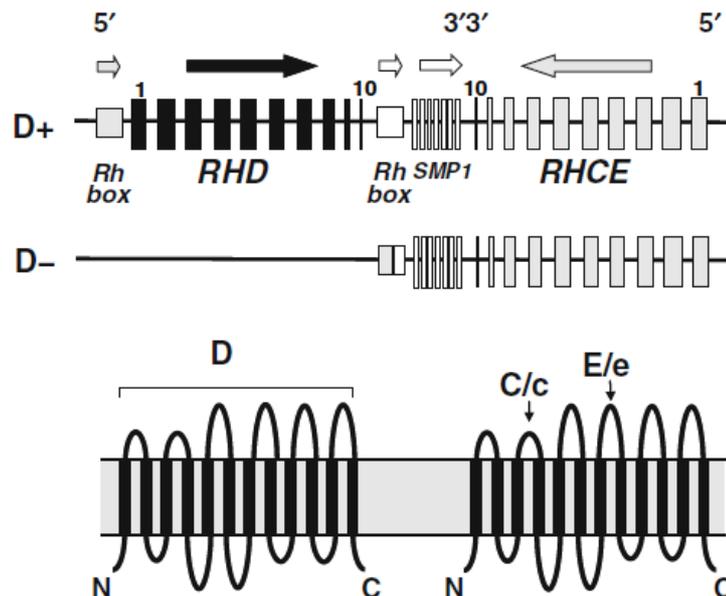


Figura 1. Acima: os genes *RHD* e *RHCE* em orientação oposta no cromossomo. Abaixo: o haplótipo D negativo e um diagrama representando os polipeptídeos D e CcEe (DANIELS et al., 2009).

O polimorfismo Rh mais importante sobre o aspecto clínico é o polimorfismo de D, devido ao seu alto grau de imunogenicidade. Aproximadamente, 85% dos caucasianos são RhD-positivos e 15% são RhD-negativos. Colin et al. (1991) encontraram que o fenótipo RhD-negativo resulta da homozigosidade para completa deleção do gene *RHD* que leva à ausência da proteína RhD na membrana eritroide, o que explica a alta imunogenicidade de D comparado com outros antígenos Rh. Em raras exceções, o fenótipo RhD-negativo relaciona-se à presença de alguns *exons* de *RHD* (YE et al., 2009). Em africanos, o fenótipo RhD-negativo pode ser decorrente da presença do *pseudogene RHD (RHD Ψ)*, que contém uma duplicação de 37 pares de bases (pb) inserida no *exon 4*, que gera um *stop códon* na posição 210. A frequência do pseudogene em negros da África do Sul é de aproximadamente 0,0714, o que corresponde a 66% dos indivíduos RhD-negativos (SINGLETON et al., 2000).

O antígeno D possui variantes conhecidas como D fraco, D parcial e D_{el}. O fenótipo D fraco é caracterizado pela fraca expressão dos antígenos D; doadores de sangue com esse fenótipo podem aloimunizar pacientes RhD negativos. D parcial é caracterizado por alterações ou surgimento de novos epítomos na superfície extracelular da proteína D, que podem gerar proteínas muito distintas do antígeno D; indivíduos com esse fenótipo podem inclusive desenvolver anti-D. O fenótipo D_{el} é caracterizado pela expressão do antígeno D em níveis muito baixos, não identificável por testes sorológicos de rotina (WESTHORF, 2007).

A base genética dos antígenos RhC/c (103Ser→Pro) é complexa e resulta de seis substituições de nucleotídeos no gene *RHCE*, dentre as quais apenas quatro resultam em diferentes aminoácidos. A genética do polimorfismo RhE/e (226Pro→Ala) é mais simples, causada por um *SNP* no *exon 5* do *RHCE* (CARTRON, 1994; NOIZAT-PIRENNE et al., 2002).

Sistema Kell

O sistema sanguíneo Kell é altamente polimórfico e são conhecidos 31 aloantígenos diferentes expressos, incluindo seis pares de antígenos antitéticos. O principal par antitético é o K/k. O antígeno K é o mais imunogênico e é comum a produção de aloanticorpo anti-K em transfusões incompatíveis. Há diferenças raciais quanto à expressão desse antígeno, ele está presente em 9% dos caucasianos e em 2% dos negros (LEE et al., 1993 e 2007; DANIELS et al., 2009). Depois dos sistemas ABO e Rh, Kell é o mais importante grupo sanguíneo para a medicina transfusional, pois alguns dos seus antígenos são potentes imunógenos e os aloanticorpos formados podem causar severas reações em transfusões incompatíveis e incompatibilidade materno-fetal (LEE et al., 2007).

Os antígenos do sistema Kell são carregados em uma glicoproteína de 93kDa tipo II e são codificados por um único gene no cromossomo 7q33 e sua expressão está restrita às células eritróides (LEE et al., 1993).

Sistema Duffy

O gene que codifica os antígenos do sistema Duffy (*DARC* ou *FY*), primeiro gene humano designado como autossômico, é constituído de dois *exons* e seu *locus* foi mapeado no cromossomo 1q22-q23. São seis antígenos pertencentes a esse sistema, Fy^a , Fy^b , Fy^3 , Fy^4 , Fy^5 e Fy^6 , expressos nas hemácias e vários tecidos (YAZDANBAKHSI et al., 2000). Os antígenos Fy^a e Fy^b são antitéticos, codificados pelos alelos codominantes *FY*01* e *FY*02*, que diferem entre si por um SNP no nucleotídeo 125G>A, levando à troca do aminoácido glicina por um ácido aspártico na posição 42 (JENS et al., 2005). Os anti-soros anti- Fy^a e anti- Fy^b definem os fenótipos $Fy(a+b-)$, $Fy(a-b+)$, $Fy(a+b+)$ e $Fy(a-b-)$. A glicoproteína Duffy, também chamada de antígeno receptor de quimiocina Duffy (do inglês, *DARC*), é um receptor de células vermelhas para uma variedade de quimiocinas de ambas as classes CXC e CC, incluindo as quimiocinas angiogênicas CXC (ELR+), mas não as angiostáticas CXC (ELR-)

(HADLEY; PEIPER, 1997; LENTSCH, 2002; PRUENSTER; ROT, 2006). Essa proteína também atua como receptor para o *Plasmodium vivax* e *Plasmodium knowlesi*, agentes responsáveis por diferentes formas da malária no homem e no macaco, respectivamente; assim, hemácias com o fenótipo Fy(a-b-) são resistentes à infecção por esses parasitas (MILLER et al., 1975; HADLEY; PEIPER, 1997).

O fenótipo Fy(a-b-) é característico de africanos, resultado de um SNP na posição -33T>C no promotor eritroide GATA-1 (motivo repetitivo do sítio de ligação no promotor da linhagem eritroide) que impede a transcrição do alelo *FY*02* nas hemácias, mas não nas demais células onde esse antígeno também é expresso. O genótipo desses indivíduos é *FY*02/FY*02(-33C/C)*, dessa forma, a produção de anti-Fy^a, mas não de anti-Fy^b é justificada nos indivíduos Fy(a-b-) sensibilizados (TOURNAMILLE et al., 1995).

O fenótipo Fy(a-b-) identificado em caucasianos é resultado de alelos silenciosos, *FY*AO* e *FY*BO*. Esses alelos são gerados por quatro diferentes mecanismos associados com um *stop codon* também causado por um SNP ou por deleção no *exon 2* (MALLINSON et al., 1995 e RIOS et al., 2000, apud CASTILHO et al., 2007) e está representado esquematicamente na **Figura 4**. Esse fenótipo ainda pode ser decorrente do alelo *FY*X*, resultado de 2 SNPs concomitantes no *exon 2*, 265C>T e 298G>A, responsável pela expressão muito baixa do antígeno Fy^b, que é, na maioria das vezes, fenotipado como Fy(b-) (TURLAMINE et al., 1998).

No Brasil, Castilho et al. (2004) descreveram um novo SNP 145G>T no alelo *FY*02*, co-existente com os SNPs 265 C>T e 298G>A, em doadores de sangue não aparentados, um caucasiano e o outro negro, esses indivíduos apresentavam marcada redução na expressão dos antígenos Fy^b, Fy3 e Fy6.

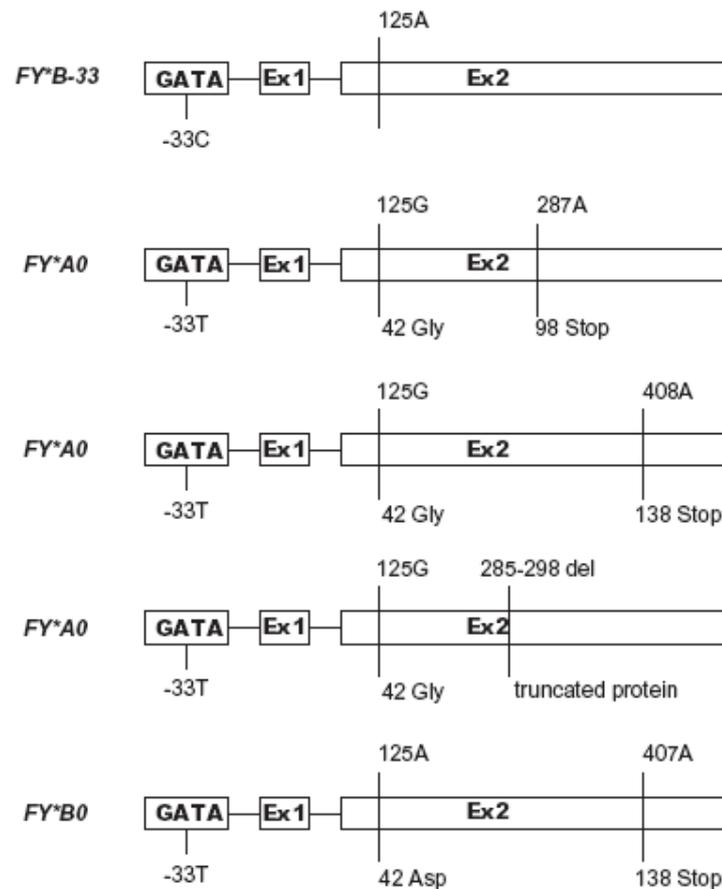


Figura 4. Descrição dos alelos silenciosos do FY.
Fonte: CASTILHO et al. (2007).

Sistema Kidd

O sistema sanguíneo Kidd é composto por dois antígenos antitéticos Jk^a e Jk^b e um antígeno de alta incidência, Jk^3 . O gene que codifica esses antígenos (*SLC14A1*) possui 11 *exons*, dos quais 11 codificam a glicoproteína transmembrana Kidd madura (LOMAS-FRANCIS, 2007). Os três fenótipos comuns [$Jk(a+b-)$, $Jk(a-b+)$ e $Jk(a+b+)$] do sistema de grupo sanguíneo Kidd são codificados por dois alelos co-dominantes, JK^*01 e JK^*02 , no *locus* 18q12.3 (LIN et al., 2009). A diferença entre os dois alelos é a troca do aminoácido Asp280Asn decorrente do SNP 838G>A no *exon* 9. Quando o ácido aspártico está presente no resíduo 280, o antígeno Jk^a é expresso e a substituição pela asparagina na mesma posição

resulta na expressão do antígeno Jk^b (OLIVES et al., 1997). As bases genéticas para o fenótipo Jk(a-b-) são variadas e 8 alelos diferentes que codificam o fenótipo *null* foram descritos. O nucleotídeo 838G do alelo *JK*01* é associado com um sítio de clivagem para enzima de restrição *MnII*, que pode ser utilizada para análise do polimorfismo genético *JK*01/JK*02* pela técnica de PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) para predição do fenótipo Kidd (LOMAS-FRANCIS, 2007).

Importância da genotipagem eritrocitária

Grande parte dos centros de coleta e doação de sangue executam o processo de seleção de doadores pela pesquisa de um limitado número de antígenos, apenas A, B, O e RhD (ROZMAN et al., 2000). Os demais antígenos do sistema Rh e os antígenos dos sistemas Kell, Duffy, Kidd, MNS e outros, somente são avaliados caso o paciente apresente aloanticorpos contra estes antígenos. Esta restrição na pesquisa de antígenos se deve, principalmente, ao alto custo dos reagentes comerciais utilizados na rotina sorológica de imunohematologia, à ausência de bons anticorpos monoclonais para antígenos raros e à intensidade do trabalho laboratorial. Esses são alguns dos fatores que limitam a realização de testes imunohematológicos mais abrangentes, de maneira que pode acarretar em relevante atraso em diversos procedimentos transfusionais, gerar significativos custos adicionais ao serviço transfusional e ainda causar potenciais situações de emergência clínica (FLUIT et al., 1990; SELTSAM et al., 2003).

A utilização das ferramentas de biologia molecular é fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da imunohematologia, aumentando a segurança e eficácia transfusional de pacientes politransfundidos, como os talassêmicos e portadores de anemia falciforme. As técnicas moleculares suprem as deficiências das técnicas de hemaglutinação, principalmente na fenotipagem de pacientes com transfusão recente, quando

há hemácias do doador na circulação do receptor e, em pacientes com auto-anticorpos, como os portadores de anemia hemolítica auto-imune (AHAI) (ROZMAN et al., 2000; CASTILHO et al., 2002a, 2002b).

Além da fundamental importância na medicina transfusional, os antígenos de grupos sanguíneos têm um papel importante na incompatibilidade materno-fetal, nas anemias autoimunes e nos transplantes de órgãos sólidos e medula óssea (ISSITT; ANSTEE, 1998). A presença ou ausência de alguns antígenos de grupos sanguíneos foi implicada também na susceptibilidade ou resistência a certas doenças (GARRATTY, 2000; RIOS; BIANCO, 2000).

Aplicações clínicas da genotipagem molecular de grupos sanguíneos incluem: a confirmação de discrepâncias ABO e Rh (especialmente de antígenos fracos em doadores), determinação de zigozidade do antígeno RhD (principalmente em pais RhD positivos), determinação de um antígeno deprimido, tipagem de tecidos, testes de paternidade, testes forenses, determinação da origem dos leucócitos transplantados em receptores de células hematopoéticas e determinação da origem dos linfócitos em pacientes com doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD) (GASSNER et al., 1996; WAGNER; FLEGEL, 2000).

Protocolos de genotipagem

Os protocolos de técnicas de PCR (*polymerase chain reaction*) mais comumente utilizados na determinação de antígenos de grupos sanguíneos são: PCR alelo-específico (AS-PCR) e PCR seguido por análises dos fragmentos com enzimas de restrição (PCR-RFLP-*restriction fragment length polymorphism*) (REID et al., 2000; DENOMME et al., 2000). Recentemente, a técnica de PCR em tempo real (*Real-Time PCR*) e a técnica de microarranjos (*microarray*) também começaram a ser utilizadas para a análise de genes de grupos sanguíneos (HASHMI et al., 2005, 2007).

Apesar de alguns protocolos de genotipagem de grupos sanguíneos estarem estabelecidos e validados em nossa população, torna-se necessária a implementação dos mesmos na clínica como forma de auxílio direto à identificação dos antígenos de grupos sanguíneos.

JUSTIFICATIVAS

O conhecimento e detecção dos antígenos eritrocitários são essenciais na prática transfusional, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos contra esses antígenos pode se tornar um grande problema clínico, principalmente em casos onde os pacientes são portadores de hemoglobinopatias ou outras doenças que requerem transfusões sanguíneas periódicas.

As técnicas de hemaglutinação utilizadas atualmente apresentam falhas da identificação da variabilidade dos diferentes grupos sanguíneos. A biologia molecular pode ser uma alternativa importante na determinação do perfil antigênico e auxiliar no esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos com as diversas variantes de grupos sanguíneos. Portanto, é de fundamental importância realizar estudos que possam contribuir para assegurar o aumento da segurança transfusional dos pacientes politransfundidos e, inclusive, identificar novos alelos na população brasileira.

Os métodos moleculares para identificação dos antígenos de grupos sanguíneos já são aplicados em muitos países, contudo, a maioria das frequências gênicas conhecidas ainda hoje foram calculadas a partir de frequências fenotípicas. Na população brasileira já existem protocolos de genotipagem de antígenos eritrocitários bem estabelecidos e validados, contudo, devido à grande miscigenação que ocorre em nosso país, há ainda a necessidade de serem identificados os polimorfismos dos grupos sanguíneos nas diferentes regiões brasileiras, como, por exemplo, na população da região Sul do país, onde não foi publicado nenhum estudo até o presente momento. Segundo Daniels e colaboradores (2002), as frequências

gênicas para polimorfismos de grupos sanguíneos são sempre marcadores étnicos e precisam ser averiguadas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Este estudo teve por objetivo investigar o polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e medula óssea e em pacientes politransfundidos da região Noroeste do Estado do Paraná, região Sul do Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implantar a metodologia de genotipagem de marcadores genéticos de grupos sanguíneos para os sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd na Universidade Estadual de Maringá;
- Avaliar alguns dos principais polimorfismos genéticos de grupos sanguíneos nos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd em doadores de sangue e de medula óssea e em pacientes politransfundidos da região Noroeste do Estado do Paraná;
 - Calcular as frequências alélicas e genotípicas destes marcadores nessa população;
 - Comparar as frequências encontradas com a frequência de outra população brasileira;
- Estabelecer um protocolo seguro de avaliação genotípica de doadores e receptores de transfusões sanguíneas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reid ME, Yazdanbakhsh K. Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusion. *Curr Opin Hematol* 1998;5(2):93-102.
2. Makarovska-Bojadzieva T, Blagoevska M, Kolevski P, Kostovska S. Optimal blood grouping and antibody screening for safe transfusion. *Prilozi* 2009;30(1):119-28.
3. Bonifácio SL, Novaretti MCZ. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2009;31(2):104-11.
4. Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens. International Society for Blood Transfusion. Disponível em: <<http://ibgrl.blood.co.uk/ibgrl>>. Acesso em: 06 de dezembro de 2009.
5. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet* 2009;126(6):729-42.
6. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976;5;295(6):302-4.
7. Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH. A receptor for the malaria parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993;261(5125):1182-4.
8. Cockburn IA, Mackinnon MJ, O'Donnell A, Allen SJ, Moulds JM, Baisor M, Bockarie M, Reeder JC, Rowe JA. A human complement receptor 1 polymorphism that reduces *Plasmodium falciparum* rosetting confers protection against severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:272-7.
9. Sinha S, Jha GN, Anand P, Qidwai T, Pati SS, Mohanty S, Mishra SK, Tyagi PK, Sharma SK, Venkatesh V, Habib S. CR1 levels and gene polymorphisms exhibit differential association with *falciparum* malaria in regions of varying disease endemicity. *Hum Immunol* 2009;70(4):244-50.
10. Orlandi PA, Klotz FW, Haynes JD. A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal- sequences of glycoporphin A. *J Cell Biol* 1992;116(4):901-9.

11. Duraisingh MT, Maier AG, Triglia T, Cowman AF. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(8):4796-801.
12. Mayer DC, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, Kabat J, Mendoza LH, Miller LH. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(13):5348-52.
13. Lin Y, Pavenski K, Saidenberg E, Branch DR. Blood group antigens and normal red blood cell physiology: a canadian blood services research and development symposium. *Transfus Med Rev* 2009;23(4):292-309.
14. Cartron JP. Defining the Rh blood group antigens. *Biochemistry and molecular genetics. Blood Rev* 1994;8(4):199-212.
15. Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kin C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic Basis of the RhD-Positive and RhD-Negative Blood Group Polymorphism as Determined by Southern Analysis. *Blood* 1991;78(10):2747-52.
16. Ye L, Yue D, Wo D, Ding X, Guo S, Li Q, Guo Z, Zhu Z. Molecular bases of unexpressed *RHD* alleles in Chinese D- persons. *Transfusion* 2009;49:1655-60.
17. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication phenotype and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group. *Blood* 2000;95:12-8.
18. Westhoff CM. Rh complexities: serology and DNA genotyping. *Transfusion* 2007;47:17S-22S.
19. Noizat-Pirenne F, Le Pennec P-Y, Mouro I, Rouzard A-M, Juszczak G, Roussel M, Lauroua P, Krause C, Rouger P, Cartron J-P, Ansart-Pirenne H. Molecular background of *D(C)(e)* haplotypes within the white population. *Transfusion* 2002;42:627-33.
20. Lee S, Zambas ED, Marsh WL, Redman CM. The human Kell blood group gene maps to chromosome 7q33 and its expression is restricted to erythroid cells. *Blood* 1993;81(10):2804-09.
21. Lee S. The value of analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems. *Transfusion* 2007;47:32S-9S.

22. Russo D, Redman C, Lee S. Association of XK and Kell Blood Group Proteins. *J Biol Chem* 1998;273(22):13950-6.
23. Redman CM, Russo D, Lee S. Kell, Kx and McLeod syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999;12(4):621-35.
24. Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A, Reid ME. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion* 2000;40:310-20.
25. Jens E, Pagliarini T, Novaretti MCZ. Sistema de grupo sanguíneo Duffy: Biologia e prática transfusional. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2005;27(2):110-9.
26. Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood* 1997;89:3077-91.
27. Lentsch AB. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) and prostate cancer. A role as clear as black and white? *FASEB J* 2002;16:1093-5.
28. Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajhala P, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, Lomas-Francis C, Chaudhuri A, Reid ME. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* 2005;45:652-3.
29. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest* 2008;55:174-182.
30. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990;345(6272):229-33.
31. Pruenster M, Rot A. Throwing light on DARC. *Biochem Soc Trans* 2006;34:1005-8.
32. Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 1975;189:561-3.
33. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kin C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 1995;10:224-8.
34. Castilho L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion* 2007;47:28S-31S.

35. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Le Pennec PY, Roubinet F, Babinet J, Cartron JP, Colin Y. Arg89Cys Substitution Results in Very Low Membrane Expression of the Duffy Antigen/Receptor for Chemokines in Fy x Individuals. *Blood* 1998;92:2147-56.
36. Castilho L, Rios M, Pellegrino J Jr, Saad ST, Costa FF, Reid ME. A novel FY allele in Brazilians. *Vox Sang* 2004;87:190-5.
37. Lomas-Francis C. The value of DNA analysis for antigens of the Kidd blood group system. *Transfusion* 2007;47:23S-27S.
38. Olivès B, Merriman M, Bailly P, Bain S, Barnett A, Todd J, Cartron JP, Merriman T. The molecular basis of the Kidd blood group polymorphism and its lack of association with type 1 diabetes susceptibility. *Hum Mol Genet* 1997;6(7):1017-20.
39. Rozman P, Dove T, Gassner C. Differentiation of autologous *ABO*, *RHD*, *RHCE*, *KEL*, *JK*, and *FY* blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion* 2000;40(8):936-42.
40. Fluit CR, Kunst VA, Drenthe-Schonk AM. Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. *Transfusion* 1990;30(6):532-5.
41. Seltsam A, Wagner FF, Salama A, Flegel WA. Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study. *Transfusion* 2003;43(11):1563-6.
42. Castilho L, Rios M, Pellegrino J Jr, T O Saad S, F Costa F. Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. *J Clin Lab Anal* 2002a;16(5):216-20.
43. Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino J Jr, Alberto FL, Saad ST, Costa FF. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion* 2002b;42(2):232-8.
44. Issitt PD, Anstee DJ. *Applied blood group serology*. 4th ed. Durham (NC): Montgomery Scientific Publications, 1998.
45. Garratty G. Blood groups and disease: A historical perspective. *Transfus Med Rev* 2000;14(4):291-301.
46. Rios M, Bianco C. The role of blood group antigens in infectious diseases. *Semin Hematol* 2000;37(2):177-85.

47. Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, Schonitzer D. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 1996;88(55):1852-6.
48. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000;95(12):3662-8.
49. Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000;40(1):48-53.
50. Denomme GA, Rios M, Reid ME. *Molecular Protocols in Transfusion Medicine*. San Diego (CA): Academic Press; 2000.
51. Hashmi G. Red blood cell antigen phenotype by DNA analysis. *Transfusion* 2007;47(1Suppl):60S-3S.

CAPÍTULO II

ARTIGO 1: Polimorfismo dos genes *RH*, *KEL*, *FY* e *JK* numa população da região Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil

Polimorfismo dos genes *RH*, *KEL*, *FY* e *JK* numa população da região Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil

RH, KEL, FY and JK gene polymorphisms in a Northwest Brazilian population

Gláucia Andréia Soares Guelsin¹, Viviane Lika Masaki¹, Fabiano Cavalcante Melo¹, Lilian Castilho², Ana Maria Sell¹, Margareth Naomi Hashimoto³, Loide Souza Hirle³, Jeane Eliete Laguila Visentainer¹

¹Laboratório de Imunogenética. Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Maringá, PR, Brazil – CEP 87020-900.

²Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos. Universidade Estadual de Campinas. Cidade Universitária Zeferino Vaz – Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil – CEP 13081-970.

³Hemocentro Regional de Maringá. Universidade Estadual de Maringá, Av. Mandacarú, 1600, Maringá, PR, Brazil – CEP 87080-000.

Endereço para correspondência

Jeane Eliete Laguila Visentainer

Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Av. Colombo, 5790; Maringá, PR, Brazil – CEP 87020-900

Número do telefone: (+55 44) 3011-4864 / Número do FAX: (+55 44) 3011-4931

E-mail address: jelvisentainer@uem.br; jelvisentainer@gmail.com

Resumo

Genes de grupos sanguíneos são altamente polimórficos e a distribuição dos alelos varia entre os diferentes grupos populacionais e étnicos. Nesse estudo, o polimorfismo dos genes dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd foram avaliados numa população da região Noroeste do Estado do Paraná, Brasil. Um total de 400 doadores voluntários de sangue e medula óssea, não aparentados, foram selecionados no período compreendido entre setembro de 2008 a outubro de 2009. As metodologias utilizadas foram PCR-multiplex para genotipagem **RHD** e **RHCE*C/c**, PCR-AS para o gene **RHD Ψ** e PCR-RFLP para a identificação de **RHCE*E/e**, **KEL**, **FY-GATA** e **JK**. Essas técnicas permitiram avaliar as frequências dos polimorfismos de Rh, Kell, Duffy e Kidd na população estudada. Os resultados obtidos foram concordantes com as frequências esperadas para essa região e semelhantes às frequências gênicas encontradas em uma população da região Leste de São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: Frequências. Genótipos. Polimorfismo. Grupos sanguíneos eritrocitários.

Summary

Red blood group genes are high polymorphic and the allele distribution differs among different ethnic population groups. In this study, genetic polymorphisms of Rh, Kell, Duffy and Kidd systems were investigated in the Northwest of Parana, Southern of Brazil. A total of 400 blood bone marrow and donors were enrolled between September 2008 and October 2009. The used techniques were multiplex-PCR for **RHD** and **RHCE*C/c**, AS-PCR for **RHD Ψ** gene and RFPL-PCR for **RHCE*E/e**, **KEL**, **FY-GATA** and **JK** identification. The methodologies had allowed to evaluate the frequencies of the Rh, Kell, Duffy and Kidd polymorphisms in the population evaluated and the gotten results had been concordant with the frequencies waited for this region and like gene frequency founded in a population of East of São Paulo, Brazil.

Keywords: Frequencies. Genotypes. Polymorphisms. Red blood groups.

Introdução

Existem atualmente, 308 antígenos eritrocitários distribuídos em 30 sistemas de grupos sanguíneos, de acordo com a ISBT (*International Society for Blood Transfusion*) (DANIELS et al., 2009), dos quais 270 antígenos estão reunidos em 30 sistemas de grupos sanguíneos. Os genes de todos esses sistemas foram clonados, com exceção de um, o gene responsável pelo polimorfismo de P1/P2 (HELLBERG et al., 2009; TILLEY et al., 2006).

O conhecimento das bases moleculares desses genes possibilitou o desenvolvimento de métodos de tipagem por biologia molecular, a identificação de novas mutações, o entendimento do polimorfismo e a descoberta de novos alelos. Os genes de grupos sanguíneos eritrocitários são altamente polimórficos e a distribuição das frequências alélicas desses sistemas varia entre as diferentes regiões do mundo (YIP, 2002).

Os grupos sanguíneos eritrocitários são constituídos por numerosos antígenos, dos quais os principais são: ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS (DANIELS et al, 2009). ABO e Rh são os sistemas mais importantes na medicina transfusional. Outros sistemas de importância na prática transfusional incluem Kell, Duffy e Kidd.

O sistema Rh é o mais complexo dos sistemas de grupos sanguíneos e, atualmente, são conhecidos 50 antígenos bem estabelecidos. Os antígenos desse sistema são codificados por dois genes localizados no cromossomo número 1: *RHD* e *RHCE*.

O sistema Kell consiste de 31 antígenos, incluindo seis pares de antígenos antitéticos. A proteína Kell está associada com outras proteínas sobre a membrana eritrocitária (LEE, 1997).

O antígeno Kell clássico (KEL1) é importante na medicina transfusional: anticorpos anti-K pode causar reações transfusionais severas ou fatais e doença hemolítica perinatal (DHPN). O gene que codifica os antígenos desse sistema (*KEL*) está localizado no cromossomo 7q33 e sua expressão ocorre nas células eritrocitárias e em alguns tecidos como cérebro, órgãos linfóides, coração e músculos (LEE et al., 1993).

O gene Duffy (*FY* ou *DARC*), primeiro gene humano reconhecido como autossômico, é constituído de dois *exons* e, seu *locus* foi localizado no cromossomo número 1q22-q23. Fy^a e Fy^b são codificados pelos alelos *FY*A* e *FY*B* e responsáveis pelos fenótipos $Fy(a+b^-)$, $Fy(a-b^+)$ e $Fy(a+b^+)$ (PRUENSTER; ROT, 2006).

Os fenótipos comuns do sistema de grupo sanguíneo Kidd [$Jk(a+b^-)$, $Jk(a-b^+)$ e $Jk(a+b^+)$] são codificados por dois alelos codominantes: *JK*A* e *JK*B*, localizados na região 18q12,3 (YOU et al., 1993; OLIVÈS et al., 1993, 1995; LIN et al., 2009).

O objetivo do presente estudo foi determinar o polimorfismo dos alelos dos sistemas de grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy e Kidd, numa população da região Noroeste do Estado do

Paraná, Sul do Brasil, para servir de referência em comparações antropológicas, estudos de associações com diferentes doenças, além de estudos com transplantes e transfusão sanguínea.

Materiais e Métodos

Casuística

O sangue periférico foi coletado de doadores voluntários de sangue e medula óssea do Hemocentro Regional de Maringá, localizado na região Noroeste do Estado do Paraná, de forma aleatória, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, atendendo o deferimento do Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá. Nesse estudo, foram incluídos 400 doadores voluntários de sangue e de medula óssea, distribuídos entre 217 do sexo masculino e 183 do sexo feminino, com idade média de $31,16 \pm 11,34$ anos (20 - 42 anos). Os doadores eram de origem étnica mista, com predomínio de descendência caucasiana.

Extração do DNA genômico

Para obtenção do DNA, partiu-se de 5 mL de sangue periférico, coletados com EDTA, após centrifugação (2500 rpm/10 min) para obtenção do creme leucocitário (*buffy-coat*). O DNA foi extraído utilizando-se o kit de extração EZ-DNA (Biological Industries®, Kibbutz Beit Haemek, Israel), segundo protocolo do fabricante.

Genotipagem RHD, RHD Ψ e RHCE*C/c

A genotipagem dos alelos do sistema Rh foi realizada segundo protocolo de Singleton et al. (2000), com modificações. Para amplificação dos alelos *RHCE*C/c* e avaliação da presença do gene *RHD*, foi utilizada a técnica de PCR-multiplex que amplificou os alelos *RHCE*C/c* e avaliou a presença de *RHD* pela análise dos *exon 7* e *intron 4* desse gene. A detecção da duplicação de 37 pb no gene *RHD*, conhecida como pseudogene *RHD* ou *RHD Ψ* , foi realizada utilizando-se a técnica de PCR-AS (*specific allele-polymerase chain reaction*), com 1 par de *primers* específicos para essa região gênica e um par de *primers* como controle interno (HGH – hormônio do crescimento humano). Para ambas as reações, PCR-multiplex e PCR-AS, foram utilizados 200ng de DNA, 50pmol de cada *primer*, 2 nmol de cada dNTP, 1,0U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e tampão em um volume final de 50 μ L. Os ciclos de amplificação da PCR-multiplex foram realizados em um termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e consistiram de: desnaturação a 95⁰C por

15 minutos e 30 ciclos de 1 minuto a 94⁰C, 1 minuto a 65⁰C e 3,5 minutos a 72⁰C, seguidos da extensão de 10 minutos a 72⁰C. Para PCR-AS, os ciclos de amplificação consistiram de: desnaturação a 95⁰C por 5 minutos e 28 ciclos de 1 minuto a 94⁰C, 1 minuto a 60⁰C e 1 minuto a 72⁰C, seguidos da extensão de 7 minutos a 72⁰C. A análise dos produtos de PCR obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com SYBR Green (Invitrogen®) em cuba micro SSP gel System (One Lambda®).

Genotipagem RHCE*E/e, KEL, FY-GATA e JK

As genotipagens *RHCE*E/e*, *KEL*1/KEL*2*, *FY*A/FY*B-GATA* e *JK*A/JK*B* foram realizadas pela técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism-polymerase chain reaction*), segundo protocolos descritos por Rios et al. (1999) e Reid et al. (2000), com modificações. A reação de PCR utilizou 200ng de DNA, 50pmol de cada primer, 2nmol de cada dNTP, 1,0U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e tampão em um volume final de 50µL. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e consistiram de: desnaturação a 95⁰C por 15 minutos e 35 ciclos de 20 segundos a 94⁰C, 20 segundos a 62⁰C e 20 segundos a 72⁰C, seguidos da extensão de 10 minutos a 72⁰C. Os produtos das PCR de *RHCE*E/e*, *KEL*1/KEL*2*, *FY*A/FY*B*, *GATA* e *JK*A/JK*B* foram digeridos *overnight*, com as respectivas enzimas de restrição (MBI Fermentas®): *Mnl I*, *Bsml*, *Ban I*, *Sty I* e *Mnl I*, em volume final de 20µL, utilizando-se 10µL do produto de PCR e 10µL da mistura de enzima/tampão, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A análise da mutação na região *GATA-box* foi realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado com prata. Para avaliação dos demais alelos (*RHCE*E/e*, *KEL*1/KEL*2*, *FY*A/FY*B* e *JK*A/JK*B*), foi utilizado gel de agarose a 3%, corado com SYBR Green (Invitrogen®).

Análise estatística

As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta em planilhas do programa Excel (Microsoft® Office Excel 2003). Foi realizada a comparação das frequências gênicas e alélicas de grupos sanguíneos entre a população de doadores voluntários de sangue e de medula óssea avaliada no presente estudo e uma população de doadores de sangue e medula óssea do Hemocentro da Unicamp, Campinas, Estado de São Paulo, região Sudeste do Brasil, estudada previamente (PELLEGRINO et al., 2001; RIBEIRO et al., 2009). A comparação das frequências foi realizada por meio do Teste do Qui-quadrado ou Teste Exato

de Fisher, quando adequado, usando uma tabela de contingência 2x2 (SVEJGAARD et al., 1974). Para verificar se a distribuição dos genes e dos alelos encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o programa computacional Arlequin versão 3.1, disponibilizado no endereço: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>.

Resultados

O presente estudo é o primeiro a reportar a frequência dos polimorfismos gênicos de *RH*, *KEL*, *FY* e *JK* numa população da região Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil (**Tabela 1**). A população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os genes analisados.

Sistema Rh

Dentre as 400 amostras analisadas, 345 (86,25%) foram *RHD* positivo (presença do gene *RHD*) e 55 (13,75%) *RHD* negativo (ausência do gene *RHD*). O pseudogene *RHD* (*RHD*Ψ) esteve presente em apenas quatro indivíduos (1,0%). Esse gene foi encontrado em heterozigose, portanto, não caracterizou o fenótipo RhD negativo em nenhuma amostra avaliada. As frequências gênicas para o gene *RHCE***C/c* foram: 17,50% para o genótipo *RHCE***CC*; 42,75% para *RHCE***Cc* e 39,75% para *RHCE***cc*. Para o genótipo *RHCE***E/e*, as frequências foram de 2,25% para *RHCE***EE*; 25,75% para *RHCE***Ee* e 72,0% para o genótipo *RHCE***ee*.

Sistema Kell

O genótipo *KEL***2/KEL***2* foi observado em 379 amostras (94,75%); *KEL***1/KEL***2* foi observado em 20 indivíduos (5,0%) e apenas um indivíduo apresentou o genótipo raro *KEL***1/KEL***1* (0,25%).

Sistema Kidd

A distribuição dos genótipos para esse sistema foi de 109 (27,25%) para *JK***A/JK***A*, 192 (48,0%) para *JK***A/JK***B* e 99 (24,75%) para *JK***B/JK***B*.

Sistema Duffy

O genótipo *FY***A/FY***A* foi observado em 50 (12,60%) indivíduos, o genótipo *FY***A/FY***B* em 192 indivíduos (48,0%) e o genótipo *FY***B/FY***B* em 158 (39,50%) indivíduos. A mutação (-33T>C) que ocorre na região promotora eritroide GATA-box e que impede a expressão do

alelo *FY*B* na superfície das hemácias foi avaliada. Para esse polimorfismo, 10 indivíduos (2,5%) foram genotipados como homozigotos (*GATA-33C/C*), 78 (19,5%) como heterozigotos (*GATA-33T/C*) e a maioria, ou seja, 312 (78,0%) indivíduos não apresentaram essa mutação (*GATA-33 T/T*). Todos os homozigotos, *GATA-33C/C*, apresentaram o genótipo *FY*B/FY*B*, o que corresponde ao fenótipo Fy(a-b-), deduzido a partir do genótipo. Dentre os heterozigotos *GATA-33T/C*, 35 (44,87%) foram *FY*A/FY*B*, ou seja, expressaram o fenótipo Fy(a+b-), e 43 (55,13%) foram *FY*B/FY*B*, cujo fenótipo deduzido foi Fy(a-b+), o qual é caracterizado pela redução na expressão do antígeno Fy^b.

As frequências alélicas foram calculadas e os resultados estão reunidos na **Tabela 2**. As frequências gênicas observadas nos doadores voluntários de sangue e medula óssea do Hemocentro Regional de Maringá, avaliadas nesse trabalho foram comparadas com uma população de doadores voluntários do Hemocentro da Unicamp, Campinas, Estado de São Paulo, região Sudeste do Brasil (PELLEGRINO et al., 2001; RIBEIRO et al., 2009) e os resultados foram apresentados na **Tabela 3**. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre as frequências gênicas das duas populações.

Discussão

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo e resultou de cruzamentos inter-étnicos de imigrantes dos três continentes, durante cinco séculos: colonizadores europeus, representados principalmente por portugueses e italianos, escravos africanos e populações locais ameríndias (PARRA et al., 2003; CARVALHO-SILVA et al., 2001).

Este estudo populacional representa uma mistura inter-racial caracterizada por Europeus, Africanos e Ameríndios oriundos do Estado do Paraná, região Sul do Brasil, uma região predominantemente formada por imigrantes europeus (80,5%), com uma pequena, mas significativa contribuição de genes de africanos (12,5%) e ameríndios (7,0%) (PROBST et al., 2000).

Em um trabalho realizado em uma população da Amazônia, região Norte do Brasil (CAVASINI et al., 2007), a frequência do alelo *FY*A* foi de 0,365, de *FY*B* (somando-se as frequências dos alelos *FY*B* e *FY*B-33*) foi de 0,62 e de *FY*X* de 0,014. Essas frequências alélicas foram semelhantes às encontradas na população avaliada no presente estudo.

Quando comparadas as frequências gênicas observadas na população avaliada nesse estudo, com uma população estudada na região de Campinas, Sudeste do país, não houve diferença estatisticamente significativa. Um estudo realizado por Visentainer *et. al* (2008) comparou o polimorfismo de genes de citocinas entre grupos de indivíduos dessas duas regiões e também

demonstrou não haver diferenças estatísticas entre as duas populações para os genes avaliados. A semelhança genética observada entre essas duas populações pode ser decorrente de um padrão semelhante de miscigenação. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (<http://www.ibge.gov.br/>), o Estado de São Paulo é uma população predominantemente de origem europeia (70,0%) e africana (28,0%). A população do Paraná é predominantemente de origem europeia (80,5%), com uma pequena, mas significativa contribuição de genes africanos (12,5%) e ameríndios (7,0%) (PROBST et al., 2000). Ambas as populações podem ser consideradas de origem étnica mista, porque segundo Parra *et al.* (2003), no Brasil, a cor da pele, determinada pela avaliação física, é um pobre preditor da estimativa genômica de ancestralidade africana estimada por marcadores moleculares.

As técnicas de genotipagem eritrocitária utilizadas permitiram avaliar a frequência gênica dos polimorfismos de Rh, Kell, Duffy e Kidd em uma população da região Sul do Brasil e os resultados obtidos podem ser usados para comparações antropológicas, assim como, para estudos de associações com diferentes doenças. A metodologia utilizada pode ser empregada, seguramente, como alternativa na resolução de complicações transfusionais, nas quais as técnicas imunohematológicas convencionais apresentam limitações.

Conflito de interesse

Os autores declaram que eles não possuem conflitos de interesse em relação ao conteúdo de seu manuscrito.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (LIG-UEM). Este trabalho teve suporte financeiro da Fundação Araucária e UEM, Estado do Paraná, Brasil.

Referências Bibliográficas

1. Daniels G, Castilho L, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, *et al.* International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens: Macao report. *Vox Sang.* 2009;96(2):153-6.
2. Hellberg A, Chester MA, Olsson ML. Two previously proposed P1/P2-differentiating and nine novel polymorphisms at the A4GALT (Pk) locus do not correlate with the presence of the P1 blood group antigen. *BMC Genet.* 2005;6:49-60.
3. Tilley L, Green C, Daniels G. Sequence variation in the 5' untranslated region of the human A4GALT gene is associated with, but does not define, the P1 blood group polymorphism. *Vox Sang.* 2006;90(3):198-203.
4. Yip SP. Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet.* 2002;66(Pt1):1-27.
5. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet.* 2009;126(6):729-42.
6. Lee S. Molecular Basis of Kell Blood Group Phenotypes. *Vox Sang.* 1997;73(1):1-11.
7. Lee S, Zambas ED, Marsh WL, Redman CM. The human Kell blood group gene maps to chromosome 7q33 and its expression is restricted to erythroid cells. *Blood.* 1993;81(10):2804-9.
8. Pruenster M, Rot A. Throwing light on DARC. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt6):1005-8.
9. Lin Y, Pavenski K, Saidenberg E, Branch DR. Blood group antigens and normal red blood cell physiology: a Canadian blood services research and development symposium. *Transfus Med Rev.* 2009;23(4):292-309.
10. Olivès B, Neau P, Bailly P, Hediger MA, Rousselet G, Cartron JP, *et al.* Cloning and functional expression of a urea transporter from human bone marrow cells. *J Biol Chem.* 1994;269(50):31649-52.
11. Olivès B, Mattei M-G, Huet M, Neau P, Martial S, Cartron J-P, *et al.* Kidd blood group and urea transport function of human erythrocytes are carried by the same protein. *J Biol Chem.* 1995;270(26):15607-10.
12. You G, Smith CP, Kanai Y, Lee W-S, Stelzner M, Hediger MA. Cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter. *Nature.* 1993;365(6449):844-7.
13. Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science.* 1975;189(4202):561-3.

14. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, *et al.* The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication phenotype and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group. *Blood*. 2000;95(1):12-8.
15. Rios M, Cash K, Strupp A, Uehlinger J, Reid ME. DNA from urine sediment or buccal cells can be used for blood group molecular genotyping. *Immunohematology*. 1999;15(2):61-5.
16. Reid ME, Rios M, Yazdanbakhsh K. Applications of molecular biology techniques to transfusion medicine. *Semin Hematol*. 2000;37(2):166-76.
17. Svejgaard A, Jersild C, Nielsen S, Bodmer WF. HLA and disease statistical genetic consideration. *Tissue Antigens*. 1974;4:95-105.
18. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(1):177-82.
19. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J of Hum Genet*. 2001;68(1):281-6.
20. Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, Dalalio MMO, Visentainer JEL, Tsuneto, LT, *et al.* HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol*. 2000;72(4):597-617.
21. Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, Moretti LJ, *et al.* Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J*. 2007;6:167-74.
22. Pellegrino J Jr, Castilho L, Rios M, De Souza CA. Blood group genotyping in a population of highly diverse ancestry. *J Clin Lab Anal*. 2001;15(1):8-13.
23. Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, Costa FF, Pellegrino J Jr, 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.
24. Visentainer JEL, Sell AM, da Silva GC, Cavichioli AD, Franceschi DS, Lieber SR, *et al.* TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. *Int J Immunogenet*. 2008;35(4-5):287-93.

Tabela 1 Distribuição das frequências gênicas observadas para os sistemas Rh, Duffy, Kidd e Kell numa população de doadores voluntários de sangue e medula óssea da região Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil.

<i>Genótipo</i>	<i>Doadores (N=400)</i>	
	Frequência	N
Sistema Rh		
<i>RHD</i> ψ+	0,0100	4
<i>RHD</i> ψ-	0,9900	396
<i>RHD</i> +	0,8625	345
<i>RHD</i> -	0,1375	55
<i>RHCE</i> *CC	0,1750	70
<i>RHCE</i> *Cc	0,4275	171
<i>RHCE</i> *cc	0,3975	159
<i>RHCE</i> *EE	0,0225	9
<i>RHCE</i> *Ee	0,2575	103
<i>RHCE</i> *ee	0,7200	288
Sistema Duffy		
<i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *A	0,1250	50
<i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B	0,4800	192
<i>FY</i> *B/ <i>FY</i> *B	0,3950	158
GATA-33 T/T	0,7800	312
GATA-33 C/C	0,0250	10
GATA-33 T/C	0,1950	78
Sistema Kidd		
<i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A	0,2725	109
<i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B	0,4800	192
<i>JK</i> *B/ <i>JK</i> *B	0,2475	99
Sistema Kell		
<i>KEL</i> *1/ <i>KEL</i> *1	0,0025	1
<i>KEL</i> *1/ <i>KEL</i> *2	0,0500	20
<i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2	0,9475	379

Tabela 2. Frequências alélicas observadas para os genes dos sistemas Rh, Duffy, Kidd e Kell em doadores voluntários de sangue e medula óssea de uma população da região Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil.

<i>Genótipo</i>	<i>RHCE*C/c</i>		<i>RHCE*E/e</i>		<i>FY*A/FY*B</i>		<i>GATA-33 T/C</i>		<i>JK*A/JK*B</i>		<i>KEL*1/KEL*2</i>	
Alelos (N=800)	C	c	E	e	FY*A	FY*B	T	C	JK*A	JK*B	KEL* 1	KEL* 2
N	311	489	121	679	292	508	702	98	410	390	22	778
Frequências	0,388	0,611	0,151	0,848	0,365	0,635	0,877	0,122	0,512	0,487	0,027	0,972
	8	2	2	8	0	0	5	5	5	5	5	5

Tabela 3. Comparação das frequências genótípicas dos sistemas de grupos sanguíneos Rh, Duffy, Kidd e Kell entre doadores voluntários de sangue e medula óssea de populações das regiões Noroeste do Paraná e Leste de São Paulo, Brasil.

<i>Genótipo</i>	<i>Frequência População do Noroeste do Paraná</i>	<i>Frequência População do Leste de São Paulo</i>
Sistema Rh		
<i>RHD+</i>	0,86	0,83
<i>RHD-</i>	0,14	0,17
<i>RHCE*CC</i>	0,18	0,17
<i>RHCE*Cc</i>	0,43	0,49
<i>RHCE*cc</i>	0,40	0,34
<i>RHCE*EE</i>	0,02	0,02
<i>RHCE*Ee</i>	0,26	0,26
<i>RHCE*ee</i>	0,72	0,72
Sistema Duffy		
<i>FY*A/FY*A</i>	0,13	0,12
<i>FY*A/FY*B</i>	0,48	0,48
<i>FY*B/FY*B</i>	0,39	0,40
GATA-33 T/T	0,78	0,69
GATA-33 C/C	0,03	0,06
GATA-33 T/C	0,19	0,25
Sistema Kidd		
<i>JK*A/JK*A</i>	0,27	0,28
<i>JK*A/JK*B</i>	0,48	0,52
<i>JK*B/JK*B</i>	0,25	0,20
Sistema Kell		
<i>KEL *1/KEL *1</i>	0	0
<i>KEL *1/KEL *2</i>	0,05	0,05
<i>KEL *2/KEL *2</i>	0,95	0,95

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências comparadas das duas populações.

ARTIGO 2: “Benefits of Blood Group Genotyping in Multi-transfused Patients”**Benefits of Blood Group Genotyping in Multi-transfused Patients**

Gláucia Andréia Soares Guelsin¹, Viviane Lika Masaki¹, Fabiano Cavalcante Melo¹, Lilian Castilho², Ana Maria Sell¹, Margareth Naomi Hashimoto³, Tatiana Takahashi Higa³, Loide Souza Hirle³, Jeane Eliete Laguila Visentainer^{1*}

¹Laboratório de Imunogenética. Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Maringá, PR, Brazil – CEP 87020-900.

²Laboratório de Pesquisa em Hemoterapia. Universidade Estadual de Campinas. Cidade Universitária Zeferino Vaz – Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil – CEP 13081-970.

³Hemocentro Regional de Maringá. Universidade Estadual de Maringá, Av. Mandacaru, 1,600, Maringá, PR, Brasil – CEP 87080-000.

Running title: Blood Group Genotyping

*Corresponding author:

Jeane E. L. Visentainer

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Avenida Colombo, 5790

CEP 87020-900 - Maringá, PR, Brazil

Telephone: (+55 44) 3011-4864 / Número do FAX: (+55 44) 3011-4931

E-mail: jelvisentainer@uem.br; jelvisentainer@gmail.com

This study was supported by Fundação Araucária and Universidade Estadual de Maringá, from Paraná, Brazil

Abstract

We evaluated the usefulness of blood group genotyping as a supplement to hemagglutination to determine the red blood cell antigen profile of polytransfused patients with hematological diseases and renal failure.

Seventy nine patients were selected. They all, received more than 3 units of blood and 8 (10%) had already clinical significant alloantibodies.

DNA was prepared from blood samples and *RHCE*E/e*, *KEL*01/KEL*02*, *FY*01/FY*02* and *JK*01/JK*02* alleles were determined by PCR-RFLP. *RHD*/RHD*Ψ* and *RHCE*C/c* were tested by multiplex PCR.

Discrepancies for Rh, Kell, Duffy and Kidd systems were found between the phenotype and genotype-derived phenotype in 16 of the 38 chronically transfused patients. The genotypes of these patients were confirmed by another method.

Genotyping was very important for determination of the true blood groups of the polytransfused patients, helped in the identification of suspected alloantibodies and in the selection of antigen-negative red blood cells for transfusion.

Keywords: Genotyping assays, Blood group antigens, hemagglutination, transfusion

Introduction

Programs to prevent alloimmunization to red blood cell (RBC) antigens have been designed and implemented to provide antigen-matched RBC transfusions to patients who are alloimmunized and/or in need of chronic transfusion support (1-5). This is usually done by classical serology techniques which can also identify alloantibodies. However, accurate phenotyping of polytransfused patients is often complicated by either the presence of transfused donor RBCs in the recipient's circulation, by positive direct antiglobulin tests or by the lack of available direct agglutinating antibodies.

Blood group genotyping assays have been employed as an alternative for problems encountered by serology and are being used for assessing the risk of hemolytic disease in newborns (6-12). Although the use of peripheral blood leukocytes for the genotyping of polytransfused patients has generated some concerns because of the theoretical risk of contamination of the specimen having been tested with donor leukocytes (13-16), several reports show that blood samples from transfused patients can be safely used for DNA typing

of blood groups because the amount of DNA of the patient exceeds by far that of contaminating donor leukocytes (9,16,17).

In order to achieve safe red cell transfusions DNA-analysis for minor blood group typing plays a support role in transfusion medicine, especially to provide antigen-matched blood for chronically transfused patients (18-20).

This study evaluated the contribution of DNA genotyping of red blood cell antigens as a tool for the management of polytransfused patients in order to overcome the limitations of hemagglutination assays and to compare the phenotype results with the genotyping done by PCR-RFLP in 38 polytransfused patients with different pathologies. We observed that genotype is more accurate than phenotype for determination of blood groups in these polytransfused patients.

Material and Methods

Patients

Seventy-nine patients with hematological diseases and renal failure who received multiple transfusions agreed to participate in this study by signing an IRB approved informed consent. Thirty-eight of these 79 patients were previously phenotyped for ABO, Rh (D, C, c, E, e), K/k, Fy^a/Fy^b, and Jk^a/Jk^b. All the patients had received three or more units of RBCs.

Donors

Four hundreds blood donors served as controls of our procedure. They also were used to determine the genotype frequencies in this population. This control group was representative of the ethnic background of the patients.

Agglutination tests

Phenotypes were determined by hemagglutination in gel cards following the manufacturer's instructions (Diamed AG, Morat, Switzerland).

DNA preparation

Genomic DNA was extracted from 200µL aliquots of whole blood by EZ-DNA kit (Biological Industries®, Kibbutz Beit Haemek, Israel) according to the instructions of the manufacturer and eluted into 100µL of buffer.

PCR amplification

Primers and amplification conditions used were the same as previously published (9,10). Briefly, PCR was performed with 100-200ng of DNA, 50pmoles of each primer, 2nmoles of each dNTP, 1.0U *Taq* DNA polymerase and buffer in a final volume of 50 μ L.

Multiplex PCR

*RHCE**C/c genotyping was performed by a multiplex assay which detects the presence of *RHD** intron 4 and exon 7, differentiates *RHCE**C/c and identifies *RHD** Ψ (21). Identification of partial D was also performed by a multiplex assay which detects several hybrid alleles (22).

RFLP analysis

For RFLP analyses, PCR amplified products were digested overnight with the appropriate restriction enzymes (MBI Fermentas, Amherst, NY or New England Biolab, Beverly, MA) in a final volume of 20 μ L using 10 μ L of amplified product and enzyme in 1X buffer according to the manufacturer's instructions. *MnII* enzyme was used to determine *RHCE**E/e polymorphism while the enzymes *BsmI*, *MnII*, *BanI*, *StyI*, *MspAI* were used to determine, respectively, *KEL**01/*KEL**02 (698C>T), *JK**01/*JK**02 (838A>G), *FY**01/*FY**02 (125G>A), *GATA* (-33T>C) and *FY**X (265C> T).

Results

Genotype frequencies

The genotype frequencies observed in the two studied groups (patients and blood donors) are shown in Table 1. No significant differences were observed.

Patients

Of the 79 patients selected 8 (10%) had alloantibodies. There were 13 alloantibodies, occurring alone or in combination (Table 2). One of these patients became immunized to the Di^a antigen, 1 to Kp^a, 1 to RhD, 1 to RhE, 2 to RhC and RhE, 1 to RhE, K and Di^b, 1 to Rhc and Fy^a antigens.

Correlation between phenotype and genotype of 38 polytransfused patients

Phenotype and genotype results from the transfused patients are shown in Table 3. We found discrepancies on Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in 16 of 38 patients chronically transfused. The genotype of these patients was confirmed by another method. These patients had been receiving transfusion more frequently than those who did not present discrepancies, and were the only ones that had received transfusion within the previous three months.

Rh system

Presence or absence of *RHD*

Agreement between phenotype and genotype was observed for RhD on 36 samples. Thirty-one samples were both phenotyped and genotyped as RhD-positive (had amplified product from both *RHD* and *RHCE*) and five samples phenotyped and genotyped as RhD-negative (had amplified product from *RHCE* but not from *RHD*). Two samples phenotyped as RhD-positive presented discrepancies between intron 4 and exon 7 analyses of *RHD*. One sample was further genotyped as partial D category V and another one as partial D category DIIIc. The patient with partial D category V had anti-D in his serum.

*RHCE**C/c

Thirty-six of 38 samples agreed between phenotype and genotype. Two discrepant samples were phenotyped as RhCc and genotyped as *RHCE**CC.

*RHCE**E/e

Thirty-four samples had concordant phenotype and genotype. Two discrepant samples were phenotyped as RhE/e and genotyped as *RHCE**e/e. One sample was phenotyped as RhEe and genotyped as *RHCE**EE and one sample was phenotyped as Rhee and genotyped as *RHCE**Ee.

Kell, Kidd and Duffy systems

Kell

There was agreement between phenotype and genotype results for Kell on 37 samples. One discrepant sample was phenotyped as K-k+ and genotyped as *KEL**01/*KEL**02.

Kidd

In the Kidd system, phenotype/genotype did not correlate in 3 of the 38 samples. Two were phenotyped as Jk(a+b+) and were genotyped as *JK*02/JK*02* and one sample was phenotyped as Jk(a+b-) and genotyped as *JK*01/JK*02*.

Duffy

Twenty-six samples agreed between phenotype and genotype. Two discrepant samples were phenotyped as Fy(a+b+) and genotyped as *FY*01/FY*01* and two samples were phenotyped as Fy(a+b-) and genotyped as *FY*02/FY*02*. The other eight discrepant samples occurred due to the presence of mutated GATA box and/or the SNP 265T responsible for the Fy^{bw} phenotype (*FY*X*) (Table 3). The correlation between Duffy phenotype and genotype confirmed previous observations showing that a substantial number of individuals with *FY*02* genotype do not express this antigen on the surface of their RBCs. Thus, appropriate correlation between genotype and phenotype required complete analysis of the *FY* polymorphisms 125G>A (*FY*01/FY*02*), 265C>T (associated with Fy^{bw} phenotype), and analysis of mutation in the GATA box (-33T>C). In this study, 14 of 34 samples with *FY*B* genotype had mutated GATA box, one sample Fy(a+b-) was *FY*A/FY*B* normal GATA but had 265T (*FY*X*) and one sample Fy(a-b-) was *FY*02/FY*02* heterozygous GATA mutation and heterozygous 265C/T.

Discussion

This study shows the relevance of performing molecular analysis for the determination of blood group in transfusion dependent patients such as patients with hematological diseases and renal failure. By employing PCR-RFLP assays we have shown that there are mistyping when hemagglutination is performed to determine blood group of patients who have been recently transfused with multiple units of donor RBCs (9,10).

As observed in genotype and phenotype results correlation of the 38 transfused studied patients the discrepancies were found in 16 cases. Eight of the discrepancies occurred in the Rh system, one in the Kell system, three in the Kidd system and four in the Duffy system.

The relevance of genotype determination of blood groups for the management of multiply transfused patients has been demonstrated by allowing the determination of the true blood group genotype, and by assisting in the identification of suspected alloantibodies and the selection of antigen-negative RBCs for transfusion.

Our data also show that PCR can be used to find RBC compatible units for patients by selecting regional blood donors based on the ABO/Rh phenotype because we did not find significant differences on the donors and patients genotype frequencies, although the patients were diverse and each one needed a different phenotype.

In a previous *FY* genotyping study in Brazilians it was verified that 36% of the *FY*02* genes were not phenotypically expressed due to mutations in the *FY*02* allele. In Brazilian population Fy(b+) blood has a prevalence of 65% whereas Fy(b-) has a prevalence of 35% as demonstrated by serological testing (23).

The genotyping for *FY* for 38 transfused patients showed that in 8 of these patients, *FY*02* was not phenotypically expressed due to the GATA mutation and/or mutations in *FY* gene responsible for the Fy^{bw} phenotype (Table 3). This study illustrates the relevance of molecular testing.

Fy^{bw} is characterized by weak expression of *FY*02* that can only be detected using potent anti-Fy^b reagents. Unfortunately, reagents capable of detecting Fy^{bw} are not available. Taking into consideration the expression of *FY*01* allele, 2 in 5 patients phenotyped as Fy(a+b-) require Fy(a+b-) blood component, and 3 of 5 could receive Fy(a+b+), Fy(a+b-) and Fy(a-b+). If we take in consideration the absence of Fy^b expression, 8 of 10 Fy(b-) could receive Fy(b+) blood component because of the presence of Fy^{bw} or Fy^b in nonerythroid cells (when GATA mutation is involved). Since these transfusion dependent patients are at risk of alloimmunization and most of them already have existing alloantibodies against RBC antigens. As they were transfused with antigen-matched blood units, the possibility to select Fy(b+) units can increase the availability of blood to them.

The contribution of genotyping to the management of polytransfused patients is also illustrated by the two patients' samples phenotyped as RhD-positive but genotyped as partial D. Patients with partial D are at risk for anti-D alloimmunization and would benefit from receiving D-negative RBCs for transfusion. Current D typing reagents in use in transfusion services may have difficulty in determining partial D individuals, so the genotyping leads to improved patient care and presumed less D alloimmunization.

As previously discussed, the seriousness of the alloimmunization problem has led to recommendations that hematological patients be transfused with blood of donors whose RBC antigens are more closely matched to those of the recipients (3-5). However, accurate antigen typing in transfused patients is a major problem due to the presence of donor RBCs in patient's circulation. Based on these and previous results (9,10,20) and under the test

conditions we established, we recommend the addition of blood group genotyping for transfused patients to provide antigen-matched RBC transfusions.

The possibility to have an alternative to hemagglutination tests to determine the patient's antigen profile should be considered for patients who need repeated transfusion therapy. As automated procedures attain higher and faster throughput at lower cost, blood group genotyping is likely to become more widespread.

The implementation of automated platforms allows all donors to be genotyped, expanding the blood donor extended antigen database and the reduction of extended phenotype testing (24-26). With this additional tool, more donors presenting with rare and uncommon antigens are discovered, which improves the likelihood that patients requiring frequent transfusions will be provided with antigen-specific blood.

Acknowledgements

We thank Daiane C. Costa, Daphne R Amaral, and Débora C Credidio for technical assistance.

References

1. Perkins HA. 1992. The safety of the blood supply: making decisions in transfusion medicine. In: Nance SJ, ed. Blood safety: current challenges. Bethesda: American Association of Blood Banks 125-150.
2. Coles SM, Klein HG, Holland PV. 1981. Alloimmunization in two multitransfused patient populations. *Transfusion* 21:462-466.
3. Michail-Merianou V, Pamphili-Panouspoulou L, Piperi-Lowes L, Pelegrinis E, Karaklis A. 1987. Alloimmunization to red cell antigens in thalassemia: comparative study of usual versus better-match transfusion programmes. *Vox Sang* 52:95-98.
4. Tahhan RH, Holbrook CT, Braddy LR, Brewer LD, Christie JD. 1994. Antigen-matched donor blood in the transfusion management of patients with sickle cell disease. *Transfusion* 34:562-569.

5. Ambruso DR, Githens JH, Alcorn R, et al. 1987. Experience with donors matched for minor blood group antigens in patients with sickle cell anemia who are receiving chronic transfusion therapy. *Transfusion* 27:94-98.
6. Avent ND. 2009. Large-scale blood group genotyping clinical implications. *Br J Haematol* 144:3-13.
7. Pellegrino J Jr, Castilho L, Rios M, de Souza CA. 2001. Blood group genotyping in a population of highly diverse ancestry. *J Clin Lab Anal* 15:8-13.
8. Legler TJ, Eber SW, Lakomek M, et al. 1999. Application of *RHD* and *RHCE* genotyping for correct blood group determination in chronically transfused patients. *Transfusion* 39:852-855.
9. Castilho L, Rios M, Bianco C, et al. 2002. DNA-based typing for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion* 42:232-238.
10. Castilho L, Rios M, Pellegrino JJr, Saad STO, Costa FF. 2002. Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. *J Clin Lab Anal* 16:216-220.
11. Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. 2004. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 87:225-232.
12. Daniels G, Finning K, Martin P, Summers J. 2006. Fetal blood group genotyping. Present and future. *Ann NY Acad Sci* 1075:88-95.
13. Lee TH, Donegan E, Slichter S, Bush MP. 1995. Transient increase in circulating donor leucocytes after allogeneic transfusions in Immunocompetent recipients compatible with donor cell proliferation. *Blood* 85:1207-1014.
14. Adams PT, Davenport RD, Rcardon DA, Roth MS. 1992. Detection of circulating donor white blood cells in patients receiving multiple transfusions. *Blood* 80:551-555.

15. Lee TH, Paglieroni T, Ohro H, Holland PV, Bush MP. 1996. Long-term multi-lineage chimerism of donor leucocytes in transfused trauma patients. *Blood* 88(S):265a.
16. Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V. 2000. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 40:48-53.
17. Rozman P, Dovc T, Gassner C. 2000. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion* 40:936-942.
18. Veldhuisen B, van der Schoot CE, de Haas M. 2009. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang* 97:198-206.
19. Anstee DJ. 2009. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood* 114:248-256.
20. Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, Costa FF, Pellegrino J Jr, Castilho L. 2009. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang* 97:147-152.
21. Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. 2000. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 95:12-18.
22. Maaskant-van Wijk PA, Faas BH, de Ruijter JA, et al. 1998. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion* 38:1015-1021.
23. Castilho L. 2007. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion* 47:28S-31S.
24. Denomme GA, Van Oene M. 2005. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion* 45:660-666.

25. Hashmi G, Shariff T, Seul M, et al. 2005. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* 45:680-688.
26. Hashmi G, Shariff T, Zhang Yi, et al. 2007. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion* 47:736-747.

Table 1. Observed genotype frequencies in blood donors and patients

Genotype	Donors (n=400)		Patients (n=79)	
	Frequency	N	Frequency	N
Rh System				
<i>RHD*</i> Ψ ₊	0.0100	4	0	79
<i>RHD*</i> Ψ ₋	0.9900	396	1	0
<i>RHD*</i> ₊	0.8625	345	0.8734	69
<i>RHD*</i> ₋	0.1375	55	0.1266	10
<i>RHCE*</i> CC	0.1750	70	0.1772	14
<i>RHCE*</i> Cc	0.4275	171	0.4051	32
<i>RHCE*</i> cc	0.3975	159	0.4177	33
<i>RHCE*</i> EE	0.0225	9	0.0253	2
<i>RHCE*</i> Ee	0.2575	103	0.3291	26
<i>RHCE*</i> ee	0.7200	288	0.6456	51
Duffy System				
<i>FY*01/FY*01</i>	0.1260	50	0.1646	13
<i>FY*01/FY*02</i>	0.4800	192	0.4177	33
<i>FY*02/FY*02</i>	0.3950	158	0.4177	33
GATA-33T/T	0.7800	312	0.6962	55
GATA-33C/C	0.0250	10	0.0633	5
GATA-33T/C	0.1950	78	0.2405	19
Kidd System				
<i>JK*01/JK*01</i>	0.2725	109	0.2785	22
<i>JK*01/JK*02</i>	0.4800	192	0.5190	41
<i>JK*02/JK*02</i>	0.2475	99	0.2025	16
Kell System				
<i>KEL*01/KEL*01</i>	0.0025	1	0	0
<i>KEL*01/KEL*02</i>	0.0500	20	0.0886	7
<i>KEL*02/KEL*02</i>	0.9475	379	0.9114	72

Table 2: Blood group alloantibodies detected in 8/79 patients who received multiple transfusions

Antibodies	Number of patients
Anti-D	1
Anti-E	1
Anti-Di ^a	1
Anti-Kp ^a	1
Anti-C, -E	2
Anti-E, -K, -Di ^b	1
Anti-c, -Fy ^a	1
Total	8

Table 3: Phenotyping and genotyping discrepancies found for 16 patients

Genotype	Phenotype			
Rh System	RhD+	RhD-		
<i>RHD</i> *+	31			
Partial <i>RHD</i> *	2			
<i>RHD</i> *-		5		
	Rh C+c-	Rh C+c+	Rh C-c+	
<i>RHCE</i> * <i>CC</i>	3	2		
<i>RHCE</i> * <i>Cc</i>		18		
<i>RHCE</i> * <i>cc</i>			15	
	Rh E+e-	Rh E+e+	Rh E-e+	
<i>RHCE</i> * <i>EE</i>	2	1		
<i>RHCE</i> * <i>Ee</i>		10	1	
<i>RHCE</i> * <i>ee</i>		2	22	
Kell System	K+k-	K+k+	K-k+	
<i>KEL</i> *01/ <i>KEL</i> *01				
<i>KEL</i> *01/ <i>KEL</i> *02		3	1	
<i>KEL</i> *02/ <i>KEL</i> *02			34	
Kidd System	Jk(a+b-)	Jk(a+b+)	Jk(a-b+)	
<i>JK</i> *01/ <i>JK</i> *01	9			
<i>JK</i> *01/ <i>JK</i> *02	1	21		
<i>JK</i> *02/ <i>JK</i> *02		2	5	
Duffy System	Fy(a+b-)	Fy(a+b+)	Fy(a-b+)	Fy(a-b-)
<i>FY</i> *01/ <i>FY</i> *01 (T/T)	2	2		
<i>FY</i> *01/ <i>FY</i> *02 (T/T)		12		
<i>FY</i> *01/ <i>FY</i> *X (T/T)	1*			
<i>FY</i> *01/ <i>FY</i> *02 (T/C)	2*			
<i>FY</i> *02/ <i>FY</i> *02 (T/T)		2	5	
<i>FY</i> *02/ <i>FY</i> *02 (T/C)			7	
<i>FY</i> *02/ <i>FY</i> *02 (C/C)				4*
<i>FY</i> *02/ <i>FY</i> *X (T/C)				1*

*FY***B* was not phenotypically expressed due to the GATA mutation and/or mutations in *FY* gene responsible for the *Fy*^{bw} phenotype (*FY***X*)

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Neste estudo, a genotipagem eritrocitária de doadores de sangue e medula óssea e de pacientes politransfundidos de uma população da região Noroeste do Paraná, Sul do Brasil, permitiram algumas conclusões:

- A metodologia de genotipagem para os sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd na Universidade Estadual de Maringá foi implantada, demonstrando que as técnicas empregadas para sua realização são técnicas de simples execução e reprodutíveis.
- Os principais polimorfismos genéticos de grupos sanguíneos dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd foram avaliados nos grupos de indivíduos saudáveis e pacientes politransfundidos e o cálculo das frequências genotípicas observadas, entre ambos os grupos, não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre eles;
- As frequências genotípicas desses grupos sanguíneos nos doadores de sangue e de medula óssea da população estudada, foram comparadas com as frequências genotípicas de outra população brasileira e os resultados demonstraram não haver diferenças populacionais para os polimorfismos gênicos avaliados;
- As metodologias de genotipagem empregadas nesse estudo podem ser utilizadas como protocolo seguro para avaliação genotípica de antígenos de grupos sanguíneos em doadores e receptores de transfusões sanguíneas, contribuindo na resolução de problemas e nas situações em que as técnicas imunohematológicas convencionais apresentam limitações.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora seja improvável que a genotipagem molecular substitua totalmente a hemoaglutinação no futuro, juntas essas técnicas possuem um valor substancial na resolução de problemas na clínica laboratorial e, conseqüentemente, na qualidade de vida do paciente.

A aplicação de tecnologias avançadas de genotipagem de grupos sanguíneos significa que todos os doadores e pacientes poderiam ser testados para polimorfismos mais significantes clinicamente. A expectativa é que se reduzam as aloimunizações e, como consequência, as reações transfusionais hemolíticas. Novas metodologias, envolvendo a Biologia Molecular, foram desenvolvidas com este propósito. Elas incluem as tecnologias de microarranjos, as quais detectam centenas de alelos de grupos sanguíneos usando *chips* de DNA e aquelas que envolvem a aplicação de *microbeads* de diferentes cores que carregam diferentes sondas de oligonucleotídeos.