UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

JOANA MAIRA VALENTINI ZACARIAS

Genotipagem eritrocitária em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná

Maringá
2013

JOANA MAIRA VALENTINI ZACARIAS

Genotipagem eritrocitária em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná

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

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Ana Maria Sell
Co-Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Jeane Eliete Laguila Visentainer

Maringá
2013

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

Z13g

Zacarias, Joana Maira Valentini
Genotipagem eritrocitária em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná / Joana Maira Valentini Zacarias. -- Maringá, 2013.
44 f. : tabs.

Orientador: Prof.ª Dr.ª Ana Maria Sell.
Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Jeane Eliete Laguila Visentainer.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, 2013.

1. Antígenos de grupos sanguíneos. 2. Doadores de Sangue. 3. Genotipagem - Técnicas. I. Sell, Ana Maria, orient. II. Visentainer, Jeane Eliete Laguila. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia. IV. Título.

CDD 21.ed. 616.0792

GVS-000713

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOANA MAIRA VALENTINI ZACARIAS

Genotipagem eritrocitária em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná

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

COMISSÃO JULGADORA

Prof[a] Dr[a] Ana Maria Sell
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof[a] Dr[a] Tatiana Takahashi Higa
Universidade Estadual de Maringá

Prof[a] Dr[a] Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti
Universidade estadual de Maringá

Prof[a] Dr[a] Lilian Maria de Castilho
Universidade Estadual de Campinas

Prof[a] Dr[a] Karina Antero Rosa Ribeiro
Universidade Estadual de Campinas

Aprovada em: 09 de dezembro de 2013
Local de defesa: Bloco 126, *campus* Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai, pela sabedoria, inspiração e por estar comigo em todos os momentos, me mostrando o rumo certo a tomar.

Aos meus pais, Maria Regina V. Zacarias e José A. Zacarias e meu irmão, Vítor Mateus V. Zacarias, por serem minha base, sempre dispostos a me acolher, aconselhar e me ajudar a conquistar meus sonhos.

Ao meu noivo e amigo de todas as horas, Antonio Fernando C. Santim, pelo incentivo para que pudesse alcançar os meus objetivos.

A minha avó, Elícia, por suas orações que me ajudaram muito ao longo desta caminhada.

A minha orientadora, Prof[a] Dr[a] Ana Maria Sell, pela sua dedicação, companheirismo, amizade, ensinamentos de vida, por me ajudar a trilhar os caminhos da pesquisa e acreditar em minha capacidade. Obrigada por tudo!

A minha co-orientadora, Prof[a] Dr[a] Jeane Eliete Laguila Visentainer, por todo conhecimento transmitido e por estar sempre disposta a ajudar e contribuir para que a pesquisa seja realizada com sucesso.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Imunogenética. Agradeço pela acolhida e por toda amizade construída, que foi fundamental para realização de todo trabalho.

A Ieda Bernadete Volkweis Langer, por ter proposto esta pesquisa junto ao Hemepar e ter aceitado esta parceria de trabalho.

Ao Hemonúcleo de Francisco Beltrão por todo trabalho realizado na coleta e envio das amostras. Obrigada por ter nos abertos as portas e acolhido conosco este projeto.

Aos doadores de sangue que aceitaram fazer parte desta pesquisa.

A toda equipe de mestrandos da imunohematologia, por toda ajuda na extração de DNA, amplificação de amostras e géis de agarose. Sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os meus verdadeiros amigos que estiveram comigo durante os momentos que mais precisei e que muitas vezes compreenderam minha ausência enquanto estava realizando minha pesquisa do mestrado.

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

EPÍGRAFE

Ter fé é assinar uma folha em branco
e deixar que Deus nela escreva o que quiser.
(Santo Agostinho)

Genotipagem eritrocitária em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná.

RESUMO

A prática transfusional tem sido aprimorada com o intuito de minimizar o risco de aloimunização em pacientes politrasnfundidos. Atualmente existem 33 sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários. A distribuição das frequências dos antígenos nestes sistemas varia segundo as diferentes regiões do mundo. O conhecimento e a detecção dos antígenos eritrocitários são essenciais para a prática transfusional, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos contra estes antígenos pode se tornar um grande problema na clínica, principalmente nos casos onde os pacientes requerem transfusões sanguíneas periódicas. Para tanto, técnicas como os testes de hemaglutinação são utilizados na rotina dos bancos de sangue e técnicas como a biologia molecular vem sendo implantadas e aprimoradas para que haja cada vez mais segurança na realização da transfusão sanguínea. Na hemoterapia, a determinação correta do grupo sanguíneo é importante não apenas para prevenir problemas devido a transfusões incompatíveis, mas também para permitir um melhor uso das unidades de hemocomponentes com fenótipos menos frequentes. A genotipagem tem se mostrado eficaz e com vantagens sobre a fenotipagem, pois fornece meios para prever o fenótipo a partir do DNA genômico com um elevado grau de precisão e substitui a fenotipagem onde os anti-soros são raros e de alto custo. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná e mostrou a importância da genotipagem estendida na seleção de bolsas adequadas e alerta à presença de genótipos raros nos doadores de repetição.

Palavras-chave: Doadores de Sangue. Antígenos de grupos sanguíneos. Técnicas de Genotipagem.

The Red cell genotyping in repeat blood donors from Southwestern of Paraná.

ABSTRACT

Blood transfusion has been improved in order to minimize the risk of alloimmunization in the polytrasnfused patients. Presently there are 33 blood group systems. The distributions of the antigens frequency in these systems varies according to the different regions of the world. The knowledge and detection of antigens blood group are essential for blood transfusion, once the development of antibodies against these antigens can become a bigger problem in the clinic, especially in cases where patients require regular blood transfusions. So, techniques such as hemaglutination assays are routinely used in blood banks and molecular biology techniques like has been improved and implemented so that there is increasingly safe practice of blood transfusion. In transfusion medicine, the correct determination of blood group is important not only to prevent problems due to incompatible transfusions, but also to allow better use of units of blood products with less frequent phenotypes. Genotyping has been proven effective and advantages over phenotyping, it provides means to predict the phenotype from genomic DNA with a high degree of precision and replaces phenotyping which antisera are rare and costly. The aim of our research was to evaluate the distribution of allele and genotype frequencies of the Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group systems in repeat blood donors from the southwestern of Paraná and showed the importance of extended genotyping in selection of adequate bags and alert to the presence of rare genotypes in repeat donors.

Keywords: Blood Donors. Antigens blood group. Genotyping Techniques.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: *Blood Transfusion* (artigo 1) Disponível em: http://www.bloodtransfusion.it/Linee.aspx

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I
1.1 Introdução.....10
1.2 História da Hemoterapia.....11
1.3 Sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários.....12
1.4 Aloimunização.....16
1.5 Justificativa.....17
1.6 Objetivos.....18
1.6.1 Geral 18
1.6.2 Específicos.....18
1.7 Referências Bibliográficas.....18
2 CAPÍTULO II
2.1 Artigo: “Genotipagem eritrocitária em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná”.....24
3 CAPÚLO III
3.1 Conclusões.....43
3.2 Perspectivas Futuras.....44

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela I.....35
Tabela II.....36
Tabela III.....37
Tabela IV.....37
Tabela V.....38
Tabela VI.....38
Tabela VII.....39

1 CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A transfusão sanguínea é um evento irreversível que acarreta benefícios e riscos potenciais ao receptor[1]. As indicações de transfusões sanguíneas são embasadas em parâmetros clínicos e laboratoriais que visam trazer benefícios ao paciente. No entanto, portadores de hemoglobinopatias e outras doenças que requerem transfusões frequentes, podem se sensibilizar, ou seja, desenvolver aloanticorpos contra antígenos de superfície das células alogênicas[2]. Estima-se que a probabilidade de um indivíduo produzir um ou mais anticorpos antieritrocitários é de aproximadamente 1% por unidade de sangue transfundida[3,4], porém, em pacientes transfundidos cronicamente, a taxa de aloimunização pode atingir 50%[3,5].

O conhecimento e a detecção dos antígenos eritrocitários são essenciais para a prática transfusional, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos contra estes antígenos pode se tornar um grande problema na clínica, principalmente nos casos onde os pacientes requerem transfusões sanguíneas periódicas. Para tanto, técnicas como os testes de hemaglutinação são utilizados na rotina dos bancos de sangue, e novas técnicas, como a biologia molecular vem sendo implantadas e aprimoradas para que haja cada vez mais segurança na realização da transfusão sanguínea[6-8].

A doação de sangue é, ainda hoje, um problema de interesse mundial, pois não há uma substância que possa substituir o tecido sanguíneo em sua totalidade. Dessa forma, os hemocentros brasileiros, por meio do setor de captação de doadores, criam estratégias para conquistar doadores de sangue. Devido às dificuldades em manter o estoque de sangue para atender às necessidades específicas e emergenciais, os profissionais da captação de doadores planejam, executam, monitoram e avaliam estratégias a fim de sensibilizar, conscientizar e educar a população para a doação voluntária, responsável e habitual[9].

Atualmente 33 sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários foram descritos segundo a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) (http://www.isbtweb.org). Na hemoterapia, a determinação correta do grupo sanguíneo é importante não apenas para prevenir problemas devido a transfusões incompatíveis, mas também para permitir um melhor uso das unidades de hemocomponentes com fenótipos menos frequentes, já que a frequência dos grupos sanguíneos eritrocitários depende da etnicidade da população, da sua imunogenicidade e de situações clínicas específicas[10].

A fenotipagem estendida vem sendo utilizada por alguns centros de coleta e doação de sangue (http://www.sesa.pr.gov.br), que realizam os testes para o sistema de grupo sanguíneo ertitrocitário ABO e também para os principais antígenos eritrocitários dos sistemas de grupos sanguíneos Rh, Kell, Kidd, Lewis, Lutheran, MNS e Duffy. Os testes de fenotipagem apresentam limitações, como, por exemplo, a presença de hemácias do doador na circulação do paciente com transfusão recente[11], pacientes com anemia hemolítica autoimune, pacientes talassêmicos ou pacientes que apresentam múltiplos aloanticorpos, que dificultam a correta identificação do perfil antigênico, impossibilitando a seleção adequada do sangue a ser transfundido e, algumas vezes, até expondo os pacientes a um maior risco da aloimunização. Nestas situações, a genotipagem de grupos sanguíneos tem mostrado ser uma excelente ferramenta adicional para pacientes que precisam ser cronicamente transfundidos, bem como para seleção de doadores destinados a eles, transfundindo, desta forma, hemácias compatíveis para a maioria dos aloantígenos clinicamente importantes[12,13].

1.2 HISTÓRIA DA HEMOTERAPIA

A história da hemoterapia no mundo se deu em duas fases: a empírica, até 1900, que oscilava entre o conhecimento científico e o místico, despertando a atenção de estudiosos da área da saúde para as possibilidades de transfusões e a fase científica, após 1900, porém, as transfusões ainda eram realizadas empiricamente, sem que houvesse exames prévios de compatibilidade sanguínea[14]. A partir do século XX as transfusões de sangue passaram a tomar um caráter de maior conhecimento, sendo a primeira transfusão sanguínea precedida da compatibilidade ABO datada em 1907[9].

A hemoterapia brasileira desde os seus primórdios demonstra a busca por uma organização e modelo característico de nosso país[14]. Desde a criação do primeiro banco de sangue, em 1942, até 1964 não existiam registros de leis nacionais referentes à sua regulamentação técnica. Somente na década de 60, com a criação da Comissão Nacional de Hemoterapia (CNH) surgiram as primeiras regulamentações técnicas da prática hemoterápica no país, sendo a primeira, a Portaria CNH 4/69, que determinava entre outras coisas a obrigatoriedade de realização dos testes de tipagem ABO e RhD nas amostras de sangue do doador e do receptor, visando a redução do risco de reação hemolítica aguda. Os primeiros países a regulamentarem a pratica hemoterápica na América Latina foram Brasil, Argentina, Chile e Costa Rica. Em 1989, com a publicação da Portaria 721/89 são introduzidas na rotina transfusional as provas de compatibilidade, de pesquisa de anticorpos irregulares nas amostras

de sangue dos receptores e dos doadores e a tipagem ABO e RhD da bolsa de hemocomponente à ser transfundida[15].

A medicina transfusional ganhou diversidade e complexidade, e os serviços de hemoterapia foram se adaptando às novas necessidades, adotando alternativas para melhorar a qualidade dos componentes sanguíneos, aliadas a uma criteriosa seleção de seus doadores. Com o intuito de garantia da qualidade para os serviços de hemoterapia no Brasil, a portaria 121/95 estabeleceu algumas medidas que foram introduzidas na rotina dos serviços como o controle de qualidade dos lotes utilizados, a obrigatoriedade na participação de Programas de Proficiência Técnica e a investigação das reações transfusionais, que influenciaram diretamente nos riscos transfusionais, permanecendo como obrigatórias até os dias atuais, uma vez que a referida Portaria permanece em vigor[15].

A hemoterapia brasileira tem sido norteada pela edição de resoluções e portarias de cunho sanitário e técnico a fim de dar suporte às atividades hemoterápicas no País. Atualmente, estão vigentes a Resolução de Diretoria Colegiada da Anvisa nº 57, de 16 de dezembro de 2010, que "Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais" e a Portaria MS/GM nº 1.353, de 13 de junho de 2011, que "Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos"[9,16].

1.3 SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITÁRIOS

Os sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários foram descritos a partir de 1900 e desde então, uma diversidade de terminologias foram utilizadas para denominá-los. Um sistema de grupo sanguíneo eritrocitário consiste de um ou mais antígenos controlados em um único locus gênico ou por dois ou mais genes intimamente ligados de maneira homóloga com pouca ou nenhuma recombinação entre eles. Em 1980 a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (*International Society of Blood Transfusion* – ISBT) estabeleceu um comitê para definir uma nomenclatura numérica embasada na genética dos antígenos de superfície dos eritrócitos. Desde então, todos os antígenos de grupos sanguíneos etritrocitários puderam ser distribuídos em quatro classificações determinadas: sistemas, coleções, série 700 (antígenos de baixa incidência) e série 901 (antígenos de alta incidência)[17] (http://www.isbtweb.org).

Os antígenos de grupos sanguíneos eritrocitários são herdados geneticamente e definidos por sequências específicas de aminoácidos que constituem uma proteína que se liga

a carboidratos ou a lipídios da membrana dos eritrócitos, sendo sua diversidade de caráter genético. São compostos bioquimicamente diferentes e desempenham diversas funções importantes para a célula como transporte de membranas, canais de proteínas, proteínas estruturais, moléculas de adesão, receptores, ligantes e enzimas[18]. Atualmente foram descritos mais de 300 antígenos eritrocitários, e a maioria deles encontra-se distribuída em 33 sistemas de grupos sanguíneos, de acordo com a ISBT[19].

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 eritrocitários[20].

Com relação à transfusão sanguínea, o sistema de grupo sanguíneo eritrocitário ABO é o de maior importância clínica devido à presença de anticorpos naturais anti-A e/ou anti-B no plasma de acordo com o correspondente grupo sanguíneo que o indivíduo pertença. Tais anticorpos raramente causam a doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN). Além desses anticorpos, outros anticorpos como os dos sistemas de grupos sanguíneos eritrocitário Rh, Kell, Duffy e Kidd são de grande importância na medicina transfusional assim como na DHFRN.

O sistema de grupo sanguíneo eritrocitário Rh foi descoberto em 1940, por Karl Landsteiner e Wiener durante experimentos realizados em macacos da espécie *Rhesus*. Este sistema de grupo sanguíneo eritrocitário possui o maior grau de polimorfismo de membrana eritrocitária; consiste de mais de 50 antígenos carreados em duas proteínas (RhD e RhCE), de 417 aminoácidos e doze domínios transmembranas, tendo um amplo número de fenótipos, sendo os antígenos D, C, c, E, e, os mais imunogênicos[21,22]. Este sistema é o segundo sistema de maior importância na prática transfusional após o sistema de grupo sanguíneo eritrocitário ABO devido à imunogenicidade de seus antígenos, como o antígeno D[23-25].

Os antígenos Rh são exclusivamente eritrocitários, não sendo encontrados em leucócitos ou plaquetas, e surgem precocemente em torno da décima semana de vida intrauterina. De acordo com os pesquisadores Landsteiner e Wiener, a presença ou ausência do antígeno D na superfície dos eritrócitos caracteriza um indivíduo como Rh positivo ou negativo. Os anticorpos específicos para os antígenos Rh estão normalmente envolvidos em reações transfusionais hemolíticas, anemias hemolíticas auto-imunes e em casos de DHFRN. Os anticorpos anti-D são clinicamente significativos, reagem otimamente a 37°C e fase de

antiglobulina humana. Quase todos resultam de aloimunização por transfusão ou gravidez, pertencendo geralmente à classe IgG. O antígeno D é altamente imunogênico, e uma vez formado o anti-D, este persiste por muitos anos[26].

Depois dos sistemas ABO e Rh, Kell é o mais importante grupo sanguíneo para a medicina transfusional. O sistema de grupo sanguíneo eritrocitário Kell é altamente polimórfico e são conhecidos 32 aloantígenos diferentes expressos, incluindo seis pares de antígenos antitéticos[21]. O principal par antitético é o K/k. Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo eritrocitário Kell estão expressos na glicoproteína Kell, produto do gene *KEL* localizado no cromossomo 7 [22,27]. Alguns dos seus antígenos são potentes imunógenos e os aloanticorpos formados podem causar severas reações em transfusões incompatíveis e incompatibilidade materno-fetal[28]. 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[20,28,29].

O gene *DARC* (Antígeno Receptor de Quimiocina Duffy), está localizado no locus 1q22-q23, é responsável pela glicoproteína Duffy, expressa em células eritróides e não eritróides. Pertencem a esse sistema seis antígenos: Fy^a, Fy^b, Fy^3, Fy^4, Fy^5 e Fy^6 [22,27,30]. Os antígenos Fy^a e Fy^b são antitéticos, codificados pelos alelos codominantes *FY*01* e *FY*02* e essa variação define os fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+)[31,32].

A glicoproteína Duffy é expressa em diversos tecidos não eritróides como o rim, baço, coração, pulmão, duodeno, pâncreas, placenta, cérebro, intestino, glândula tireóide e em células de Purkinje do cerebelo. As células responsáveis pela expressão de Duffy nesses tecidos são as células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares, exceto no cérebro, onde a expressão Duffy está localizada nas células de Purkinje[31,33-35].

Um dos aspectos interessantes dos antígenos Duffy é sua função de receptor de merozoítas de *Plasmodium vivax* e de *P. knowlesi*, que são respectivamente os agentes responsáveis por diferentes formas de malária no homem e no macaco. Miller et al[36], em 1975 evidenciaram essa função mostrando a resistência dos eritrócitos Fy(a-b-) à invasão de merozoítas de *P. knowlesi* que eram cultiváveis *in vitro* naquela época. Uma mutação pontual *-67T>C* na região promotora do gene *FY*02*, o *GATA*-box, leva a uma interrupção no fator de transcrição eritróide GATA-1, resultando na ausência de expressão do antígeno Fy^b apenas no eritrócito, não alterando a expressão dessa proteína em outros tecidos. Consequentemente, esses indivíduos podem vir a desenvolver anti-Fy^a, mas não anti-Fy^b. Esta mutação é comum em negros e levam a resistência à malária. A presença da mutação *-67T>C* (alelo

*FY*02N.01*) alerta à adequada seleção de bolsas de sangue, pois indivíduos fenotipados como Fy^b negativos e que apresentam a mutação -*67T*>C podem receber bolsas de sangue que expressam o fenótipo Fy(b+). A ausência da expressão do antígeno Fy^b pode também ser decorrente do alelo *FY*X*, (alelo *FY*02M*.01) 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-) [37,38]. Outro polimorfismo de único nucleotídeo (SNP - *single nucleotide polymorphism*) de 145 G>T no alelo *FYB* foi descrito por Castilho et al[39], que foi encontrado juntamente com os SNPs dos nucleotídeos 265 e 298, em dois doadores de sangue brasileiros não aparentados, um caucasiano e outro negro.

Os antígenos Duffy foram detectados em eritrócitos de fetos entre seis e sete semanas de vida e estão bem desenvolvidos ao nascimento, e os anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b podem causar reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias e também podem levar à DHFRN[40,41].

Outro sistema que é levado em consideração na transfusão sanguínea é o sistema Kidd. O gene que codifica o sistema de grupo sanguíneo eritrocitário Kidd é o *SLC14A1*, localizado no locus 18q12.3 e é um gene da família de transportadores de uréia. O sistema sanguíneo Kidd é composto por dois antígenos antitéticos Jk^a e Jk^b e um antígeno de alta incidência, Jk^3 [27]. Os anticorpos Kidd são causa comum de reações hemolíticas transfusionais, especialmente do tipo tardia. Embora tenha sido observada a ocorrência de hemólise intravascular em reações graves, é mais frequente que eritrócitos recobertos de anticorpos sejam removidos ao nível extravascular, no fígado e baço. A maioria dos anticorpos Kidd está associada a casos relativamente pouco frequentes e brandos de DHFRN[42].

O anticorpo anti-Di^a foi relatado pela primeira vez por Layrisse e colaboradores em 1955[43], encontrado no soro de uma gestante venezuelana, senhora Diego, o qual havia sido implicado em DHFRN fatal. Este anticorpo encontra-se relacionado à DHFRN assim como à reação transfusional imediata[44]. Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Diego estão localizados na banda 3, a principal e a mais abundante proteína integral na membrana dos eritrócitos e são codificados pelo gene *SLC4A1*, localizado no cromossomo 17q21.31. Dentre os 22 antígenos, dois pares independentes e antitéticos são conhecidos Dia/Dib (codificado pelos alelos *DI*01 e DI*02*) e Wra/Wrb. O Di^a é um antígeno de baixa incidência em caucasianos (0,01%), sendo sua prevalência mais elevada ameríndios (35%) e populações orientais (5-15%), sendo considerado um marcador para estudos antropológicos[45-47]. No Brasil, foi descrita uma prevalência de 75,7% na tribo indígena Parakanã[48]. Como a

frequência de *DI*02/DI*02* é muito alta em nossa população, ou seja, acima de 90%, o uso da bolsa de sangue de doadores que apresentem o fenótipo Di(a+) devem ser considerados com cautela pois incompatibilidade Di^a pode causar reações hemolíticas transfusionais[49].

1.4 ALOIMUNIZAÇÃO

A aloimunização eritrocitária é uma resposta imunológica contra antígenos eritrocitários estranhos, ocorrendo geralmente devido à sensibilização em transfusões de sangue e gestações. Antígenos eritrocitários presentes na superfície das hemácias dos doadores que sejam diferentes dos antígenos do receptor podem causar a aloimunização.

O surgimento de uma aloimunização é diretamente proporcional ao poder sensibilizante do antígeno e também à probabilidade de ser exposto ao mesmo, durante uma transfusão sanguínea ou gestação, sendo dada pela prevalência do antígeno na população. Além da exposição antigênica, a resposta imune depende de outros fatores como imunogeniciade, dose e via de administração dos antígenos e de uma predisposição genética do próprio receptor. Certos indivíduos, ao receberem quantidades mínimas de hemácias alogênicas, já produzem aloanticorpos antieritrocitários, outros, no entanto, não se tornam aloimunizados, mesmo ao serem expostos a eritrócitos estranhos sucessivamente e em alta quantidade. A incidência deste tipo de reação pode ser variável a depender da realização de investigação laboratorial pós-transfusional[50].

Os anticorpos irregulares ocorrem em aproximadamente 0,3 a 2,0% da população em geral. O risco de aloimunização é de aproximadamente 1% por unidade transfundida, porém, em politransfundidos, esse risco é maior (9%)[51,52]. Em um estudo realizado no Hemocentro Regional de Montes Claros[53], Minas Gerais, com 34138 doadores de sangue foi observado que 0,16% destes doadores apresentaram positividade para anticorpos irregulares. Destes, 81,5% apresentaram positividade à temperatura ambiente, ou seja, anticorpos da classe IgM, 6% na fase de coombs (classe IgG) e 7,4% em ambas as fases. Foi relatado um predomínio do anti-M (27,8%). Guelsin e colaboradores encontraram uma incidência de 10% de aloanticorpos ao analisar 79 pacientes politransfundidos. As aloimunizações ocorreram para os antígenos Di^a, Di^b, Kp^b, RhD, RhC, Rhc, RhE, K e Fy^a [54].

Quando ocorre a primeira exposição ao antígeno estranho, há uma aloimunização primária, com produção de anticorpos em baixos títulos, geralmente da classe IgM (Imunoglobulina M). Neste tipo de aloimunização os anticorpos são detectáveis semanas ou

meses após a transfusão, podendo baixar a níveis indetectáveis. A segunda exposição leva a uma reposta imune secundária, com produção de anticorpos da classe IgG (Imunoglobulina G)[55-57]. De acordo com Thakral e colaboradores (2008)[57], o tempo para a aloimunização secundária varia de 48 a 72 horas, atingindo seu pico máximo de sete a 10 dias após a transfusão. Nesta resposta os anticorpos são produzidos em altos níveis, ocorrendo por meio de células da memória imunológica, que foram clonadas durante a aloimunização primária. Durante essa nova resposta imunológica, os aloanticorpos têm maior avidez pelo antígeno, requerendo doses antigênicas bem menores para que sejam produzidos[55].

A aloimunização eritrocitária pode gerar complicações graves, pois os anticorpos formados podem causar importantes reações transfusionais hemolíticas, evento este considerado como a segunda causa de morte relacionada à transfusão sanguínea de acordo com o que foi relatado ao Food and Drug Administration (FDA)[58].

1.5 JUSTIFICATIVA

O efeito indesejável mais grave diretamente associado às transfusões é aquele que resulta em hemólise do sangue transfundido devido a anticorpos pré-formados presentes no plasma do receptor.

A realização da genotipagem de grupos sanguíneos associada à fenotipagem aumenta a segurança dos pacientes transfundidos. A genotipagem é uma ferramenta importante na prática hemoterápica, pois além de determinar os grupos sanguíneos de casos inconclusivos pela fenotipagem, permite também a utilização eficaz de unidades de sangue consideradas como fenótipos raros na população.

Genotipar doadores de sangue cadastrados na unidade de hemoterapia no sudoeste do Paraná é de grande valia para a região para se formar um banco de doadores com fenótipos raroas, pois várias cidades dependem deste serviço para transfusões sanguíneas, seja de pacientes hematologicamente comprometidos, portadores de doenças que requerem transfusões periódicas ou por situações clínicas agudas.

O conhecimento dos antígenos eritrocitários é essencial na prática transfusional para prevenir a aloimunização e permitir um melhor uso das unidades de hemocomponentes, uma vez que a frequência dos grupos sanguíneos depende da etnicidade da população estudada.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 GERAL

Esta pesquisa teve como objetivo realizar a genotipagem dos principais alelos de grupos sanguíneos em doadores de sangue cadastrados em unidade de hemoterapia do sudoeste do Paraná.

1.6.2 ESPECÍFICOS

- Realizar a genotipagem em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná para os principais antígenos dos sistemas de grupo sanguíneo eritrocitário Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego;

- Criar um banco de dados eletrônico com as características genotípicas da população estudada, minimizando os risco e transtornos decorrentes da aloimunização;

- Identificação de antígenos comuns e raros (Programa de hemácias fenotipadas);

1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1) Guia para o uso de hemocomponentes. Ministério da Saúde. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_uso_hemocomponentes.pdf, pdf, “Acesso em 15/09/2013”.

2) Martins PR, Alves VM, Pereira GA, Moraes-Souza H. Frequency of irregular antibodies in multiple-transfused patients at the Regional Blood Bank of Uberaba, from 1997 to 2005. Rev Bras Hematol Hemoter 2008; **30**: 272-6.

3) Santos FWR, Magalhães SMM, Mota, RMS, Pitombeira MH. Post-transfusion red cell alloimmunization in patients with acute disorders and medical emergencies. Rev Bras Hematol Hemoter 2007; **29**: 369-72.

4) Giblett ER. A critique of theoretical hazard of inter vs. intra-racial transfusion. Transfusion 1961;**1**:233-8.

5) Bordin JO. Aloimunização após transfusão de concentrado de hemácias em pacientes atendidos em um serviço de emergência, *Rev. bras. hematol. Hemoter* 2007; **29**: 339-43.

6) Segurança transfusioal: um olhar sobre os serviços de hemoterapia das regiões Norte e Centro Oeste do Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/seguranca_transfusional_hemoterapia_centro_oeste_norte_brasil.pdf, pdf, "Acesso em 15/09/2013".

7) Castilho LM, Rios M, Pellegrino JrJ, et al. Blood group genotyping for the management of patients with "warm" antibody-induced hemolytic anemia (WAIA). Blood 2001; **98**: 62.

8) Castilho L, Pellegrino JrJ. Blood group genotyping. Rev bras hematol hemoter 2004; **26**: 135-40.

9) Técnico em hemoterapia. Ministério da Saúde – Brasil. Disponível em: http://www.hemominas.mg.gov.br/export/sites/default/hemominas/galerias/TEC/publicacoes/publicacoesHematologiaHemoterapia/tecnico_hemoterapia_livro_texto.pdf, doc, "Acesso em 18/09/2013".

10) Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, et al. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigenmatched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang*. 2009; **97:** 147-52.

11) Haas M, Van Der Schoot CE, Maaskant-van Wijk PA. Higt-troughput genotyping for red cell and platelet blood group antigens by DNA Micro-Arrays. Transfusion Medicine 2006; **16**: 5.

12) Veldhuisen B, van der Schoot CE, de Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang 2009;* **97**: 198-206.

13) Anstee DJ. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood 2009;* **114**: 248-56.

14) Junqueira PC, Rosenblit J, Hamerschlak N. História da hemoterapia no Brasil. Rev bras hematol hemoter 2005; **27**: 201-7.

15) Hemovigilância: manual técnico para investigação das reações transfusionais imediatas e tardias não infecciosas. ANVISA. Avaliable at: http://www.uel.br/hu/hemocentro/pages/arquivos/manual_tecnico_hemovigilancia_08112007.pdf, pdf, "Acesso em 23/10/2013".

16) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 57, de 16 de dezembro de 2010. Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 dez. 2010a. Seção 1. p. 119.

17) Blood group terminology. ISBT. International Society of Blood Transfusion. Available at: http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/blood-group-terminology/, “Acesso em 20/10/2013”.

18) Makarovska-Bojadzieva T, Blagoevska M, Kolevski P, Kostovska S. Optimal blood grouping and antibody screening for safe transfusion. Prilozi 2009; **30**: 119-28.

19) Blood group terminology. ISBT. International Society of Blood Transfusion. Available at: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/Table_of_blood_group_systems_v3.0_121028.pdf, pdf, “Acesso em 20/10/2013”.

20) Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. Hum Genet 2009; **126**: 729-42.

21) Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. Transfusion and Apheresis Science 2011; **44**: 81-91.

22) Blood group terminology. ISBT. International Society of Blood Transfusion. Available at: http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/blood-group-terminology/blood-group-allele-terminology/, “Accessed 20/10/2013”.

23) Singleton BK, Green CA, Avent ND, *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**: 12-8.

24) Simsek S, Jong CAM, Cujipers H T M, et al. Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNAs coding for Rh polypeptides and demonstration of E/e and C/c polymorphisms. Vox Sanguinis 1994; **67**: 203-9.

25) Flegel WA. The genetics of the Rhesus blood group system. Blood Transfus 2007; **5**: 50-7.

26) Westhoff CM. The structure and function of the Rh antigen complex. Sem Hematol 2007; **44**: 42-50.

27) Bonifácio SL, Novaretti MCZ. Biological functions of blood group antigens. Rev Bras Hematol Hemoter 2009; **31**: 104-11.

28) Lee S. The value of DNA analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems. Transfusion 2007; **47**: 32S-9S.

29) 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**: 2804-09.

30) Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. Transfusion 2000; **40**: 310-20.

31) Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo AO. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in non-erythroid tissues in Duffy-negative individuals. Blood 1995; **85**: 615-21.

32) Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, et al. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/Fyb blood group polymorphism. Hum Genet 1995; **95**: 407-10.

33) Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. Blood 1997; **89**: 3077-91.

34) Hesselgesser J, Horuk R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. J Neurovirol 1999; **5**: 13-26.

35) Jens E, Pagliarini T, Novaretti MCZ. Sistema de grupo sanguíneo Duffy: Biologia e prática transfusional. Rev Bras Hematol Hemoter 2005; **27**: 110-9.

36) Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, et al Erythrocyte receptors for (Plasmodium knowlesi) malaria: Duffy blood group determinants. Science 1975; **189**: 561-3.

37) Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim 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.

38) Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, et . Arg89Cys Substitution Results in Very Low Membrane Expression of the Duffy Antigen/Receptor for Chemokines in Fy x Individuals. Blood 1998; **92**: 2147-56.

39) Castilho L, Rios M, Pellegrino J Jr, et al. A novel FY allele in Brazilians. Vox Sang 2004; **87**: 190-5.

40) Daniels G, Poodle J, de silva M, et al. The clinical significance of blood group antibodies. Transfus Med 2002; **12**: 287-95.

41) Kim HH, Park TS, Oh SH, et al. Delayed hemolytic transfusion reaction due to anti-Fy^b caused by a primary imune response: a case study and a reviwe of the literature. Immunohematol 2004; **20**: 184-6.

42) Melo L de, SANTOS JA dos. Sistema Kidd. In: STD: imunohematologia eritrocitária. Belo Horizonte: IEA Ed. SBHH 1996.

43) Layrisse M, Arrends T, Dominguez SR. Nuevo grupo sanguíneo encontrado em descendientes de indios. Acta Med Venezoelana 1955; **3**: 132-8.

44) Daniels, G.L. *Diego Blood Group System*. In: DANIELS G. Human blood groups. Oxford: Blackwell Science, 1995.

45) Layrisse M, Arends T. The Diego blood factor in Chinese and Japanese. Nature 1956; **177**: 1083-1084.

46) Junqueira P, Wishart PJ, Ottensooser F, et al. The Diego blood factor in Brazilian Indians. Nature 1956; **177**: 41.

47) Neel JV, Salzano MF. A prospectus for genetc studies of the American Indian, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol 1964; **29**: 85-98.

48) Baleotti W Jr, Rios M, Reid ME, et al. A novel DI*A allele without the band 3-Memphis mutation in Amazonian Indians. Vox Sang 2003: **84**: 326-30.

49) Race RR, Sanger R. *Blood Groups in Man*. 6th edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.

50) García Gala JM, Pabon MV, Vicente PR, et al. Aloinmunización en pacientes politransfundidos. Utilidad de seleccionar hematíes compatibles para antígenos diferentes al ABO y D. Sangre 1994; **39**: 417-21.

51) Schonewille H, Haak HL, Zijl AM. Alloimunization after blood transfusion in pacients with hematologic and oncologic diseases. Transfusion 1999; **39**: 763-71.

52) Mural M, Viana MB, Risk factors alloimmunization by patients with sickle cell disease. Braz. J. Med. Biol. Res 2005; **38**(5): 675-682.

53) Aguiar KM, Maia CN, Teles LF, et al. Identificação de anticorpos irregulares no Hemocentro Regional de Montes Claros, MG. Disponível em: http://www.efdeportes.com/efd176/identificacao-de-anticorpos-irregulares-no-hemocentro.htm, "Acesso em 01/11/2013".

54) Guelsin GAS, Sell AM, Castilho L, et al. Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. J Clin Lab Anal 2010; **24**: 311-16.

55) Langhi Júnior DM, Pereira JPM, Pereira CM. *Reações Transfusionais Hemolíticas*. In: Bordin JO, Langhi Júnior DM, Covas DT. Hemoterapia: fundamentos e prática. Atheneu, 2007.

56) Melo, L. de. Testes de Compatibilidade Sanguínea. In: Bordin JO, Langhi Júnior DM, Covas DT. Hemoterapia: fundamentos e prática. Atheneu, 2007.

57) Thakral B, Saluja K, Sharma RR, Marwaha N. Red cell alloimmunization in a transfused patient population: a study from a tertiary care hospital in north India. Hematology 2008; **13**: 313-18.

58) USA. Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research. Fatalities reported to the FDA following blood collection and transfusion: annual summary for fiscal year 2007. Bethesda (MD): U.S. Food and Drug Administration. Disponível em:

http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/ucm118316.htm, “Acesso em 20/01/2014”.

2 CAPÍTULO II

2.1 Artigo: "Genotipagem eritrocitária em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná."

Título: Genotipagem eritrocitária em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná

Joana Maira Valentini Zacarias[1], Ana Maria Sell[2*]

[1] Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. Av. Colombo, 5790, Maringa, PR, Brasil,

[2]Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. Av. Colombo, 5790, Maringa, PR, Brasil.

Palavras-chave: Doadores de Sangue, Antígenos de grupos sanguíneos, Técnicas de Genotipagem.

* Autor para correspondência: Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Avenida Colombo, 5790, Maringá, Paraná, Brasil, CEP 87030200. Email: anamsell@gmail.com; amsell@uem.br.

Formatado de acordo com as normas da revista Bloodtransfusion.

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego em doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná.

Materiais e métodos: A genotipagem foi realizada em 251 doadores de sangue escolhidos aleatoriamente e conforme a prática de doação espontânea ao Hemonúcleo. As metodologias utilizadas para genotipagem foram: PCR-multiplex para *RHD* e *RHCE*C/c,* PCR-AS para *RHD*04N.01* (*RHDΨ*) e PCR-RFLP para *RHCE*E/e, KEL*01.1/KEL*02, FY*01/FY*02*, *FY*2N.01* (mutação GATA-1), *JK*01/JK*02* (gene *SLC14A1*) e *DI*01/DI**02 (gene *SLC4A1*). As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta. Para comparar as frequências entre populações, realizou-se o teste do Qui-quadrado.

Resultados: As frequências observadas foram relacionadas à população específica, ou seja, de doadores de sangue de repetição e diferente da população brasileira em geral. A frequência do alelo *RHD*01N.01* (fenótipo RhD negativo) foi maior que a esperada (36,78% vs 13,75%, p<0,0001) e a frequência do genótipo *RHCE*Cc*, menor que o esperado (32,18% vs 42,75%, *P=0,0222*); consequentemente, as frequências dos fenótipos deduzidos também foram diferentes do esperado: os fenótipos *dccee* e *dCcee* apresentaram frequências maiores e os fenótipos Dccee e DCcee apresentaram frequências menores que a esperada. Diferenças significativas foram observadas para o genótipo *FY*01/FY*01* (19,52% *vs* 12,5%, *P*=0,0205) e para a mutação *-67TT* (95,22% *vs* 78%, *P*<0,0001) e *-67TC* (4,38% *vs* 19,5%, *P*<0,0001). Dois indivíduos apresentaram o genótipo raro *KEL*01.01/KEL*01.01* e um indivíduo apresentou genótipo raro *DI*01/DI*01*.

Discussão: Os resultados obtidos demonstraram o direcionamento na escolha de doadores, a importância da genotipagem estendida na seleção de bolsas adequadas e alerta à presença de genótipos raros nos doadores de repetição.

Palavras-chave: Doadores de Sangue, Antígenos de grupos sanguíneos, Técnicas de Genotipagem.

INTRODUÇÃO

A transfusão sanguínea é um evento irreversível que acarreta benefícios e riscos potenciais ao receptor[1]. As indicações de transfusões sanguíneas são embasadas em parâmetros clínicos e laboratoriais que visam trazer benefícios ao paciente. No entanto, portadores de hemoglobinopatias e outras doenças que requerem transfusões frequentes, podem se sensibilizar, ou seja, desenvolver aloanticorpos contra antígenos de superfície das células alogênicas[2]. Estima-se que a probabilidade de um indivíduo produzir um ou mais anticorpos antieritrocitários é de aproximadamente 1% por unidade de sangue transfundida[3,4], porém, em pacientes transfundidos cronicamente a taxa de aloimunização pode atingir 50%[3,5].

Atualmente 33 sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários foram descritos segundo a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) (http://www.isbtweb.org). Na hemoterapia, a determinação correta do grupo sanguíneo é importante não apenas para prevenir problemas devido a transfusões incompatíveis, mas também para permitir um melhor uso das unidades de hemocomponentes com fenótipos menos frequentes, uma vez que a frequência dos grupos sanguíneos depende da etnicidade da população, da sua imunogenicidade e de situações clínicas específicas[6].

A fenotipagem estendida é recomendada segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Portaria 1353 de 2011) para os principais antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários Rh (D, E, e, C e c), Kell (K), Duffy (Fya e Fyb), Kidd (Jka e Jkb) e MNS (S e s). Alguns centros de coleta têm realizado fenotipagem estendida para os principais antígenos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Kidd, Lewis, Lutheran, MNS e Duffy (http://www.sesa.pr.gov.br), além de ABO. A fenotipagem eritrocitária apresenta limitações, como, por exemplo, a presença de hemácias do doador na circulação do paciente com transfusão recente[7] ou pacientes portadores de anemia hemolítica autoimune, que dificulta a correta identificação do perfil antigênico, impossibilitando a seleção adequada do sangue a ser transfundido e, algumas vezes, até expondo os pacientes a um maior risco da aloimunização. Nestas situações, a genotipagem de grupos sanguíneos tem mostrado ser uma excelente ferramenta adicional para pacientes que precisam ser cronicamente transfundidos, bem como para doadores destinados a eles, transfundindo, desta forma, hemácias compatíveis para a maioria dos aloantígenos clinicamente importantes[8,9].

Os genes de grupos sanguíneos eritrocitários são polimórficos e a distribuição de alelos varia entre diferentes populações e grupos étnicos. O conhecimento das bases moleculares do polimorfismo de grupos sanguíneos fornece meios para prever o fenótipo a

partir do DNA genômico com um elevado grau de precisão[10] e substitui a fenotipagem onde os antisoros são raros e de alto custo, como é o caso do anti-Di[11].

Devido à importância de se criar um banco de doadores de sangue genotipados para ajudar a encontrar hemácias correspondentes para pacientes com fenótipos raros, bem como selecionar unidades de sangue adequadas para os pacientes politransfundidos, esta pesquisa teve por objetivo realizar a genotipagem dos grupos sanguíneos eritrocitários Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego em doadores de sangue de repetição cadastrados em uma unidade de hemoterapia do sudoeste do Paraná.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

Este estudo foi realizado em 251 doadores de sangue de repetição, previamente fenotipados, do Hemonúcleo da cidade de Francisco Beltrão, na região sudoeste do estado do Paraná, sul do Brasil, no período de setembro de 2012 a julho de 2013. Homens e mulheres com idade entre 18 e 64 anos, classificados segundo a etnia como brancos, negros e pardos, doadores voluntários de sangue, foram convidados a assinar o termo de consentimento para participação pesquisa. A participação dos indivíduos ocorreu de acordo com as normas recomendadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá.

Extração de DNA genômico

A extração de DNA foi realizada a partir do creme leucocitário obtido de 4 mL de sangue periférico coletado em EDTA por meio de centrifugação (210 g durante 15 minutos) utilizando o método de *salting-out*. A concentração e a qualidade do DNA foram analisadas por densidade óptica no aparelho Thermo Scientific Nanodrop 2000® (Wilmington, EUA).

*Genotipagem dos alelos RHD, RHCE*C/c, RHCE*E/e, KEL*01.1/KEL*02, FY*01/FY*02, FY*02N.01, JK*01/JK*02* e *DI*01/DI*02*

Os iniciadores e as condições de amplificação foram realizados segundo Castilho et al[12,13].

A técnica de PCR-Multiplex foi realizada para amplificação dos alelos *RHCE*C/c* e avaliação da presença ou ausência do gene *RHD*. A análise do pseudogene *RHD* foi realizada pela

detecção da duplicação de 37 pares de base no gene *RHD,* utilizando a técnica de PCR-AS (Reação em Cadeia da Polimerase – Alelo Específica), com um 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 50ng de DNA, 50pmol de cada *primer*, 1 nmol de cada dNTP, 2,5U e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), respectivamente, e tampão em um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram realizados em termocicladores PCR System 9700 e Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para amplificação da PCR-Multiplex os ciclos para amplificação consistiram de: desnaturação a 95ºC por 15 minutos e 30 ciclos de 1 minuto a 94ºC, 1 minuto a 65ºC e 3,5 minutos a 72ºC, seguidos da extensão de 10 minutos a 72ºC. Para PCR-AS, os ciclos de amplificação consistiram de: desnaturação a 95ºC por 5 minutos e 28 ciclos de 1 minuto a 94ºC, 1 minuto a 60ºC e 1 minuto a 72ºC, seguidos da extensão de 7 minutos a 72ºC. A análise dos produtos de PCR foi realizada em gel agarose a 2%, corado com SYBR Greeen (Invitrogen®) em cuba micro SSP gel System (One Lambda®).

A genotipagem para *RHCE*E/e, KEL*01.1/KEL*02, FY*01/FY*02, FY*02N.01* (mutação GATA-1), *JK*01/JK*02* e *DI*01/DI*02* foi realizada pela técnica RFLP-PCR (Fragmento de Restrição da Reação em Cadeia da Polimerase) descrita por Rios et al, Reid et al e Baleotti et al[14-16]. As técnicas de genotipagem foram realizadas segundo Guelsin et al[17]. Para reação de PCR foi utilizado 50ng de DNA, 50pmol de cada primer, 2nmol de cada dNTP, 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e tempão em volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram realizados em termocicladores PCR System 9700 e Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e consistiram de: desnaturação a 95ºC por 15 minutos e 35 ciclos de 20 segundos a 94ºC, 20 segundos a 62ºC e 20 segundos a 72ºC, seguidos da extensão de 10 minutos a 72ºC. Os produtos da PCR *KEL*01.1/KEL*02, FY*01/FY*02, FY*02N.01*, *JK*01/JK*02* e *DI*01/DI*02* foram digeridos *overnight*, a 37ºC com a as respectivas enzimas de restrição (MBI Fermentas®): *Bsml, Ban I, Sty I, Mnl I* e *Hpal I* , e o produto da PCR para o gene *RHCE*E/e* foi digerido pela enzima *MNL I* por 4 horas a 37ºC. O volume final para digestão enzimática foi de 20µL, utilizando 10µL do produto de PCR e 10µL de enzima/tampão, conforme o protocolo recomendado pelo fabricante. Para avaliação do PCR-RFLP foi realizado gel de agarose a 2% para *KEL*01.1/KEL*02, FY*01/FY*02*, gel de agarose a 3% para *RHCE*E/e* e *JK*01/JK*02* e gel de agarose a 3,5% para análise na região GATA-box. Todos os géis de agarose foram corados com SYBR Green (Invitrogen®).

Os primes utilizados para as reações de PCR-Multiplex, PCR-AS e PCR-RFLP estão demostrados na Tabela I.

Análise estatística

As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta em planilhas do programa Excel (Microsoft® Office Excel 2010). As frequências observadas para o grupo de doadores de sangue de repetição da região sudoeste do Paraná foram comparadas a um estudo populacional (doadores de sangue e medula óssea, não aparentados) da região norte/noroeste do Paraná[17], e outras populações, e as diferenças na frequência entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste Qui-quadrado com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher, software Graphpad (http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm San Diego, CA). Valores de $P<0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Do total de 251 indivíduos doadores de sangue de repetição, 51% eram do sexo masculino e 49% do sexo feminino, com idades entre 18 e 64 anos (34,35 anos ±10,41). Destes, 88 % se autodeclararam brancos, 4% pardos, 1% negro e 7% não declararam a etnia.

Em relação à distribuição das frequências, houveram diferenças significativas quando comparadas com a população brasileira mista da região Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil[17]. As distribuições das frequências genotípicas e alélicas comparadas com a população mista da região Sul do Brasil encontram-se na Tabela II.

Para o sistema Rh, a ocorrência do alelo *RHD*01N.01* (fenótipo RhD negativo) foi maior (36,65% *vs* 13,75%, $P<0,0001$), assim como para o genótipo *RHCE*cc* (48,21% *vs* 39,75%, $P=0,0413$) e *RHCE*ee* (79,68% *vs* 72,0%, $P=0,0350$) e os genótipos *RHCE*Cc* e *RHCE*Ee* apresentaram frequências menores (31,07% *vs* 42,75%, $P=0,0037$ e 17,93% *vs* 25,75%, $P=0,0263$, respectivamente). As demais frequências gênicas e alélicas para *RHCE* foram semelhantes à esperada: *RHCE*CC* igual a 20,72% e *RHCE*EE*, 2,39%. As frequências dos fenótipos deduzidos também foram avaliadas e diferenças significativas foram observadas ao se comparar com uma população de doadores de sangue do estado de São Paulo, região sudeste do Brasil[18] (Tabela III).

No sistema de grupo sanguíneo eritrocitário Duffy, diferenças foram observadas entre as frequências alélicas e genotípicas: alelos *FY*01* (43,63% *vs* 36,5%, $P=0,0123$) e *FY*02*

(56,37% *vs* 63,5%, *P*=0,0123); e genótipo *FY*01/FY*01* (19,52% *vs* 12,5%, *P*=0,0205). O alelo *FY*02N.01* (*-67TC*) apresentou frequência de 4,38% (*vs* 19,50%, *P*<0,0001).

Para os sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários Kell, Kidd e Diego, diferenças nas frequências não foram observadas. No entanto, com relação ao sistema de grupo sanguíneo eritrocitário Diego, foi observada a presença do alelo raro *DI*01* em dez doadores de sangue de repetição (2,2%) e, dentre estes, um doador apresentou o genótipo *DI*01/DI*01*.

A dedução do fenótipo a partir do genótipo também foi realizada para os sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários Duffy, Kell, Kidd e Diego e as frequências observadas estão demonstradas na Tabela IV. A Tabela V reúne a combinação de fenótipos deduzidos menos frequentes na população brasileira. Dentre estes se destacam os fenótipos K+k- e Di(a+b-) encontrados em alguns indivíduos. Na Tabela VI estão representados os alelos raros para Rh, Kell e Diego.

A fenotipagem eritrocitária foi realizada para os sistemas de grupos sanguíneos ABO, Rh, Kell, Kidd, P1PK, Lewis, Lutheran, MNS e Duffy. A comparação da fenotipagem com a genotipagem Rh, Kell, Kidd e Duffy apresentou discrepâncias para Rh, Kidd e Duffy (Tabela VII) entre 11 doadores de sangue, dos quais cinco eram do sexo feminino e seis do sexo masculino. Quanto ao sistema Rh, discrepâncias foram observadas para o gene *RHCE*C/c* em cinco doadores e para o gene *RHCE*E/e* em três doadores de sangue. Para o sistema de grupo sanguíneo eritrocitário Kidd e Duffy foram observadas duas e quatro discrepâncias, respectivamente.

Dois doadores de sangue fenotipados apresentaram teste de PAI (Pesquisa de Anticorpos Irregulares) positivo.

DISCUSSÃO

A amostra deste estudo foi constituída por doadores de sangue de repetição que espontaneamente procuraram o Hemonúcleo de Francisco Beltrão, região Sudoeste do Estado do Paraná e, desta forma, este estudo não foi considerado um estudo populacional. Sendo assim, critérios de exclusão de amostras não foram definidos e aplicados, porém cada doador foi analisado uma única vez.

As características demográficas dos indivíduos selecionados neste estudo foram semelhantes às reportadas na literatura[17,19,20].

A população brasileira apresenta grande diversidade étnica e no estado do Paraná foi classificada como sendo predominantemente de origem europeia (80,5%), com uma pequena,

mas significativa, contribuição de africanos (12,5%) e ameríndios (7,0%)[21]. A população deste estudo foi constituída, em sua maioria, por indivíduos que se autodeclararam brancos (88% *vs* 80,5%, *P*=0,0058); negros e pardos representaram 5% dos doadores de sangue de repetição (*vs* 12,5%, *P*<0,0001). A região sudoeste do Paraná contou com a migração de descendentes de italianos, alemães e poloneses que habitavam as regiões de Rio Grande do Sul e Santa Catarina[22], justificando a grande prevalência de caucasianos na região.

Dentre os doadores de sangue de repetição, foi observada uma frequência alta de indivíduos com o fenótipo deduzido Rh negativo (alelo *RHD*01N.01*, 36,65%) diferente do esperado, ou seja, 12 a 18%[23]. Como foi observada diferença para *RHCE*, além de *RHD*, as frequências dos fenótipos deduzidos também foram diferentes do esperado: os fenótipos deduzidos R_0R_0 (Dccee) e R_0R_1 (DCcee) apresentaram frequências menores que as frequências observadas em outra população brasileira caucasiana[18] (2,79% *vs* 8,45%, *P*=0,0036; e 19,92% *vs* 38,07%, *P*<0,0001, respectivamente), enquanto que os fenótipos deduzidos rr (dccee) e r'r (dCcee) apresentaram frequências maiores (33,47% *vs* 10,40%, *P*<0,0001; 2,79% *vs* 0,49%, *P*=0,0051, respectivamente). Este fato se deve ao estímulo aos portadores de fenótipos menos frequentes a se tornarem doadores fiéis e que se apresentem com maior periodicidade à doação[11,24]. Entre 45-75% dos indivíduos Rh negativos tornam-se aloimunizados quando expostos a hemácias Rh positivas[25]. O fenótipo Rh negativo para todos os doadores foi originado de deleção completa do gene *RHD* em ambos os cromosomos[26]. A presença de pseudogene (*RHD*04N.01*), comum em indivíduos de origem negra[27], não foi detectada.

Com relação ao grupo sanguíneo Duffy, a presença da mutação *-67T>C* alerta à adequada seleção de bolsas de sangue, pois indivíduos fenotipados como Fy^b negativos e que apresentam a mutação *-67C* (alelo *FY*02N.01*) podem receber bolsas de sangue que expressam o fenótipo Fy(b+). Segundo Tournemille *et al.*[28] esta mutação ocorre na região promotora GATA-box do gene *FY*02* e silencia a expressão do antígeno nas hemácias mas não em outros tecidos; é comum em negros e levam a resistência à malária pois a glicoproteína Duffy é um receptor ao *Plasmodium*. A menor frequência observada do alelo *FY*02N.01* na população deste estudo foi relacionada à menor frequência de negros.

Em relação aos grupos sanguíneos Kell, Kidd e Diego, diferenças não foram observadas nas distribuições dos alelos e genótipos. No entanto, o alelo raro *DI*01* foi encontrado em dez doadores de sangue de repetição, dos quais um foi homizogoto, genótipo *DI*01/DI*01*.

O alelo *DI*01* (antígeno Di^a) é encontrado em baixa frequência entre caucasianos (0,01%) e é mais frequente entre ameríndios (35%) e populações orientais (5-15%), sendo considerado um marcador para estudos antropológicos[29-32]. Como a frequência do genótipo *DI*02/DI*02* é muito alta em nossa população, ou seja, acima de 90%, o uso das bolsas de sangue destes doadores que possuem o alelo *DI*01* deve ser considerado com cautela, pois incompatibilidade Di^a pode causar reações hemolíticas transfusionais[33]. Aloanticorpos anti-Di^a ou anti-Di^b são estáveis e persistentes e foram detectados após 30 anos de histórico de sensibilização[34].

Com relação à Kell, dois indivíduos homozigotos foram definidos (*KEL*01.01/ KEL*01.01* ou K+k-). Os alelos *KEL*02* e *DI*02* estão presentes em alta prevalência em populações com predominância caucasiana e sua ausência caracteriza indivíduos portadores de fenótipos raros. Os doadores de sangue que apresentaram os alelos *KEL*01.01* e a *DI*01*, principalmente em homozigose possuem genótipo raro e suas bolsas de sangue devem ser consideradas com cautela para não serem transfundidas em pacientes que possuam os antígenos de alta prevalência para estes sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários e sejam sensibilizados.

A definição e o conhecimento da distribuição dos antígenos eritrocitários em diferentes populações se justificam, sobretudo, em populações miscigenadas como a brasileira, pois eles variam com o grupo étnico e populacional. Muitos antígenos que constituem fenótipos raros ou de baixa frequência são imunogênicos e são responsáveis pela aloimunização. Os portadores de fenótipos raros são aqueles indivíduos que são negativos para os antígenos de alta prevalência ou negativo para vários antígenos comuns na população. Como os fenótipos raros estão relacionados com a etnia, alguns considerados como raro em um país pode não ser em outro (http://www.redcrossblood.org). O Brasil se destaca por ser um país multiétnico e contar com diferentes tipos de sangue raros, decorrente das combinações de antígenos que podem ocorrer em cada indivíduo. Assim, é de grande importância que a identificação do antígeno Di^a seja realizada como rotina nos bancos de sangue, com o intuito de minimizar os riscos de aloimunização nos receptores e para a inclusão do fenótipo Di(a+b) em um banco de sangue de doadores raros.

A genotipagem tem se mostrado eficaz e com vantagens sobre a fenotipagem, pois fornece meios para prever o fenótipo a partir do DNA genômico com um elevado grau de precisão[10] e substitui a fenotipagem onde os antisoros são raros e de alto custo, como o anti-Di^a[11] que não está presente nos reagentes sorológicos utilizados nas rotinas dos bancos de

sangue. Porém ambas as técnicas devem ser realizadas para se determinar o fenótipo tanto de doadores de sangue quanto de pacientes.

Algumas discrepâncias foram observadas ao se comparar a fenotipagem com a genotipagem. Duas das discrepâncias que ocorreram para o sistema de grupo sanguíneo eritrocitário Duffy podem estar relacionadas à mutação *265C>T* e *298G>A* (alelo *FY*02W.01*), responsável pela expressão muito baixa do antígeno Fy^b na superfície das hemácias[35,36], o que pode resultar negativo nos testes sorológicos.

Os anticorpos irregulares ocorrem em aproximadamente 0,3 a 2,0% da população em geral[37,38]. Nos doadores de repetição deste estudo, PAI positivo ocorreu em 0,8%. Este resultado foi semelhante à de outro registro brasileiro, no qual foram avaliados 34138 doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, cuja frequência de aloanticorpos foi de 0,16%[39] e de numa população chinesa, cuja frequência de foi de 0,28%[40]. No entanto, quando comparado com uma população indiana[41] PAI positivo foi mais frequente em nossa população (0,8% vs 0,05%, P=0,0021).

As frequências alélicas e genotípicas para os sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego puderam ser determinadas a partir das técnicas de genotipagem. A realização da genotipagem em doadores pode contribuir para o aumento do estoque de sangue fenotipado, aumentando assim a disponibilidade de sangue para os pacientes politransfundidos e aloimunizados. Os resultados encontrados demonstraram ser de grande importância na segurança transfusional, considerando, sobretudo, a identificação de genótipos e alelos raros. A seleção de bolsas adequadas para pacientes multitransfundidos podem ser direcionadas. Destaca-se a importância da identificação dos antígenos Di^a em nossa população.

Tabela I - Iniciadores utilizados para caracterização molecular dos sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego.

Reação	Gene	Primer	Sequência
PCR-Multiplex	*RHD*	Exon 7/for	5' AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA 3'
		Exon 7/ver	5' ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC 3'
		Intron 3/for 1	5' GGG TTG GGC TGG GTA AGC TCT 3'
		Intron 4/ver	5' GAA CCT GCT CTG TGA AGT GCT 3'
	*RHCE*Cc*	C/for	5' CAG GGC CAC CAC CAT TTG AA 3'
		C/ver	5' GAA CAT GCC ACT TCA CTC CAG 3'
		c/for	5' TCG GCC AAG ATC TGACCG 3'
		C/ver	5' TGA TGA CCA CCT TCC CAG G 3'
PCR –AS	*RHD Ψ*	Intron 3/for 2	5' AAC CTG GGA GGC AAA TGT T 3'
		Exon 4 insert/rev	5' AAT AAA ACC CAG TAA GTT CAT GTG G 3'
PCR-RFLP	*RHCE*E/e*	CEI4	5' -GGC AAC AGA GCA AGA GTC CA -3'
		CEX5	5' -CTG ATC TTC CTT TGG GGG TG -3'
	*KEL*01.01/KEL*02*	KELS	5' -AAG CTT GGA GGC TGG CGC AT -3'
		KELR	5' -CCT CAC CTG GAT GAC TGG TG -3'
	*FY*01/FY*02*	FYAB1	5' -TCC CCC TCA ACT GAG AACTC -3'
		FYAB2	5' -AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC -3'
	Mutação -67T>C	FYN1	5' - CAA GGC CAG TGA CCC CCA TA -3'
		FYN2	5' -CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG -3'
	*JK*01/JK*02*	JKABF	5' CCC ACC CTC AGT TTC CTT CC 3'
		JKABR	5' GCG CCA TGA ACA TTG CTC CC 3'
	*DI*01/DI*02*	EX18S	5' - TGG CGC ATG CAC TTA TTC AC -3'
		EX18R	5' -TTC CTG AAG ATG AGC GGC AG -3'

Tabela II - Frequências genotípicas e alélicas para os sistemas de grupo sanguíneo Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego em doadores de sangue da região Sudoeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil, comparadas com outra população do Sul do Brasil (N=251).

Genótipos e Alelos	Doadores de repetição[1] (%)	n	Estudo populacional[2] (%)	n	Valores de *P*
Sistema Rh					
*RHD*01*	63,35	159	86,25	345	<0,0001
*RHD*01N.01*	36,65	92	13,75	55	<0,0001
*RHD*04N.01*	0	0	1	4	
*RHCE*CC*	20,72	52	17,5	70	
*RHCE*cc*	48,21	121	39,75	159	0,0413
*RHCE*Cc*	31,07	78	42,75	171	0,0037
*RHCE*EE*	2,39	6	2,25	9	
*RHCE*ee*	79,68	200	72	288	0,0350
*RHCE*Ee*	17,93	45	25,75	103	0,0263
C	36,25	182	38,88	311	
c	63,75	320	61,12	489	
E	11,35	57	15,12	121	
e	88,65	445	84,88	679	
Sistema Duffy					
*FY*01/FY*01*	19,52	49	12,5	50	0,0205
*FY*01/FY*02*	48,21	121	48	192	
*FY*02/FY*02*	32,27	81	39,5	158	
-67 T/T	95,22	239	78	312	<0,0001
-67 C/C	0,4	1	2,5	10	
-67 T/C	4,38	11	19,5	78	<0,0001
*FY*01*	43,63	219	36,5	292	0,0123
*FY*02*	56,37	283	63,5	508	0,0123
-67T	97,41	441	87,75	702	0,0001
-67C	2,59	61	12,25	98	0,0001
Sistema Kell					
*KEL*01.01/KEL*01.01*	0,8	2	0,25	1	
*KEL*01.01/KEL*02*	7,17	18	5	20	
*KEL*02/KEL*02*	92,03	231	94,75	379	
*KEL*01.01*	4,38	22	2,75	22	
*KEL*02*	95,62	480	97,25	778	
Sistema Kidd					
*JK*01/JK*01*	25,5	64	27,25	109	
*JK*01/JK*02*	49,4	124	48	192	
*JK*02/JK*02*	25,1	63	24,75	99	
*JK*01*	50,2	252	51,25	410	
*JK*02*	49,8	250	48,75	390	
Sistema Diego					
*DI*01/DI*01*	0,4	1	0	0	
*DI*01/DI*02*	3,59	9	2,4	5	
*DI*02/DI*02*	96,01	241	97,6	209	
*DI*01*	2,2	11	1,17	5	
*DI*02*	97,8	491	98,83	423	

[1]População de doadores de sangue de repetição da região Sudoeste do Estado do Paraná;
[2]População da região norte/noroeste do Estado do Paraná (N=400)[17].

Tabela III - Fenótipos deduzidos para o sistema de grupo sanguíneo Rh em doadores de sangue de repetição da região Sudoeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil (N=251).

Sistema Rh Fenótipo deduzido (Fisher Race)	Fenótipo deduzido (Winer)	Doadores de repetição[1] (%)	n	População Caucasóide[3] (%)	n	Valores de *P*
Dccee	R_0R_0	2,79	7	8,45	69	0,0036
DCcee	R_0R_1	19,92	50	38,07	311	<0,0001
DccEe	R_0R_2	9,96	25	14,2	116	
DCCee	R_1R_1	20,32	51	15,06	123	
DCcEe	R_1R_2	7,97	20	10,65	87	
DccEE	R_2R_2	1,99	5	2,45	20	
DCcEE	R_2R_Z	0,4	1	0,24	2	
dccee	rr	33,47	84	10,4	85	<0,0001
dCcee	r'r	2,79	7	0,49	4	0,0051
dCCee	r'r'	0,4	1	0	0	

[1]População de doadores de sangue de repetição da região Sudoeste do Estado do Paraná; [3]População de doadores de sangue caucasoides da cidade de São Paulo (N=817)[18].

Tabela IV – Frequência dos genótipos e fenótipos deduzidos para os sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários Duffy, Kell, Kidd e Diego (N=251).

Genótipo	Fenótipo deduzido	Frequência (%)	n
Sistema Duffy			
*FY*01/FY*01*	Fy(a+b-)	19,52	49
*FY*01/FY*02*	Fy(a+b+)	45,82	115
*FY*02/FY*02*	Fy(a-b+)	29,88	75
*FY*01/FY*02N.01*	Fy(a+b-)	2,39	6
*FY*02/FY*02N.01*	Fy(a-b+)	1,99	5
*FY*02N.01/FY*02N.01*	Fy(a-b-)	0,4	1
Sistema Kell			
*KEL*01.01/KEL*01.01*	K+k-	0,8	2
*KEL*01.01/KEL*02*	K+k+	7,17	18
*KEL*02/KEL*02*	K-k+	92,03	231
Sistema Kidd			
*JK*01/JK*01*	Jk(a+b-)	25,5	64
*JK*01/JK*02*	Jk(a+b+)	49,4	124
*JK*02/JK*02*	Jk(a-b+)	25,1	63
Sistema Diego			
*DI*01/DI*01*	Di(a+b-)	0,4	1
*DI*01/DI*02*	Di(a+b+)	3,59	9
*DI*02/DI*02*	Di(a-b+)	96,01	241

Tabela V – Frequência dos fenótipos estendidos deduzidos encontrados na população de doadores de sangue de repetição da região Sudoeste do Paraná (N=40).

RH (Winer)	FY	KEL	JK	DI	n	Frequência (%)
rr	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a-b+)	Di(a-b+)	8	3,19
rr	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a-b+)	Di(a+b+)	1	0,40
rr	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a+b-)	Di(a-b+)	2	0,80
rr	Fy(a+b+)	K-k+	Jk(a-b+)	Di(a+b+)	1	0,40
rr	Fy(a+b+)	K-k+	Jk(a+b-)	Di(a+b+)	1	0,40
rr	**Fy(a+b+)**	**K+k-**	**Jk(a+b+)**	**Di(a-b+)**	**1**	**0,40**
rr	Fy(a+b-)	K-k+	Jk(a-b+)	Di(a-b+)	2	0,80
rr	Fy(a+b-)	K-k+	Jk(a+b-)	Di(a-b+)	4	1,59
R_2R_z	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a+b+)	Di(a-b+)	1	0,40
R_2R_2	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a-b+)	Di(a-b+)	1	0,40
R_1R_1	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a-b+)	Di(a-b+)	3	1,20
R_1R_2	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a-b+)	Di(a+b+)	1	0,40
R_0R_1	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a+b-)	Di(a+b+)	1	0,40
R_0R_2	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a+b-)	Di(a+b+)	1	0,40
R_1R_1	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a+b+)	Di(a+b+)	1	0,40
R_1R_1	Fy(a-b+)	K-k+	Jk(a+b-)	Di(a-b+)	3	1,20
R_1R_1	Fy(a+b+)	K-k+	Jk(a-b+)	Di(a+b+)	1	0,40
R_1R_1	Fy(a+b+)	K+k+	Jk(a-b+)	Di(a+b+)	1	0,40
R_1R_1	**Fy(a+b+)**	**K-k+**	**Jk(a+b+)**	**Di(a+b-)**	**1**	**0,40**
R_1R_2	**Fy(a+b+)**	**K+k-**	**Jk(a+b-)**	**Di(a-b+)**	**1**	**0,40**
R_1R_1	Fy(a+b-)	K-k+	Jk(a-b+)	Di(a-b+)	3	1,20
R_1R_1	Fy(a+b-)	K-k+	Jk(a+b-)	Di(a-b+)	1	0,40

Tabela VI - Genótipos raros e de baixa frequência e seus respectivos fenótipos deduzidos para os sistemas de antígenos eritrocitários Rh, Kell e Diego(N=51).

Genótipo			Fenótipo deduzido	n	Frequência (%)
Rh					
*RHD*01N.01*	*RHCE*CC*	*RHCE*ee*	r'r'	1	0,4
*RHD*01N.01*	*RHCE*Cc*	*RHCE*ee*	r'r	7	2,79
*RHD*01*	*RHCE*Cc*	*RHCE*EE*	R_2R_z	1	0,4
*RHD*01*	*RHCE*cc*	*RHCE*EE*	R_2R_2	5	1,99
*RHD*01*	*RHCE*cc*	*RHCE*ee*	R_0R_0	7	2,79
Kell					
*KEL*01.01/KEL*01.01*			K+k-	2	0,8
*KEL*01.01/KEL*02*			K+k+	18	7,17
Diego					
*DI*01/DI*01*			Di(a+b-)	1	0,4
*DI*01/DI*02*			Di(a+b+)	9	3,59

Tabela VII – Discrepâncias observadas entre a fenotipagem e a genotipagem para os sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários Rh, Kidd e Duffy.

Fenotipagem		Genotipagem
Sistema Rh		
Antígenos C/c		
C	c	
4+	4+	*RHCE*CC*
Neg	4+	*RHCE*Cc*
1+	4+	*RHCE*cc*
4+	4+	*RHCE*cc*
Neg	Neg	*RHCE*cc*
Antígenos E/e		
E	e	
4+	Neg	*RHCE*Ee*
2+	4+	*RHCE*ee*
3+	4+	*RHCE*ee*
Sistema Kidd		
Jk^a	Jk^b	
Neg	4+	*JK*01/JK*02*
Neg	4+	*JK*01/JK*02*
Sistema Duffy		
Fy^a	Fy^b	
4+	4+	*FY*02/FY*02*
Neg	1+	*FY*01/FY*02*
3+	Neg	*FY*01/FY*02*
2+	Neg	*FY*01/FY*02*

Neg: Negativo para teste sorológico;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) Guia para o uso de hemocomponentes. Ministério da Saúde. Availble at: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_uso_hemocomponentes.pdf, pdf, “Accessed on 15/09/2013”.
2) Martins PR, Alves VM, Pereira GA, Moraes-Souza H. Frequency of irregular antibodies in multiple-transfused patients at the Regional Blood Bank of Uberaba, from 1997 to 2005. Rev Bras Hematol Hemoter 2008; **30**: 272-6.
3) Santos FWR, Magalhães SMM, Mota, RMS, Pitombeira MH. Post-transfusion red cell alloimmunization in patients with acute disorders and medical emergencies. Rev Bras Hematol Hemoter 2007; **29**: 369-72.
4) Schonewille H, Haak HL, Zijl AM. Alloimunization after blood transfusion in pacients with hematologic and oncologic diseases. Transfusion 1999; **39**: 763-71.

5) Bordin JO. Aloimunização após transfusão de concentrado de hemácias em pacientes atendidos em um serviço de emergência, *Rev. bras. hematol. Hemoter* 2007; **29**: 339-43.

6) Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, et al. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigenmatched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang*. 2009; **97:**147-52.

7) Haas M, Van Der Schoot CE, Maaskant-van Wijk PA. Higt-troughput genotyping for red cell and platelet blood group antigens by DNA Micro-Arrays. Transfusion Medicine 2006; **16**: 5.

8) Veldhuisen B, van der Schoot CE, de Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang 2009;* **97**: 198-206.

9) Anstee DJ. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood 2009;* **114**: 248-56.

10) Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. Hum Genet 2009; **126**: 729-42.

11) Aygun B, Padmanabhan S, Paley C, Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. Transfusion 2002; **42**:37-43.

12) Castilho L, Rios M, Bianco C, et al. DNA-based typing for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. Transfusion 2002; **42:** 232-38.

13) Castilho L, Rios M, Pellegrino J Jr, et al. Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients *J Clin Lab Anal* 2002; **16**: 216-20.

14) Rios M, Cash K, Strupp A, Uehlinger J, et al. DNA from urine sediment or buccal cells can be used for blood group molecular genotyping. *Immunohematology* 1999; **15**: 61-5.

15) Reid ME,Rios M, Yazdanbakhsh K. Applications of molecular biology techniques to transfusion medicine. *Semin Hematol* 2000; **37**: 76-166.

16) Baleotti W Jr, Rios M, Reid ME, et al. A novel DI*A allele without the band 3-Memphis mutation in Amazonian Indians. *Vox Sang* 2003: **84**: 326-30.

17) Guelsin GA, Sell AM, Castilho L, 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**: 21-33.

18) Novaretti MCZ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasoides e negroide na cidade de São Paulo. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000; **22**: 23-32.

19) Orlando GM, Naoum PC, Siqueira FAM, Bonini-Domingos CR.Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. Rev.bras.hematol.hemoter 2000*;* **22**: 111-121.

20) Cosechen VS, Pittner E, Khalil NM, et al. Frequência de aglutininas anti-A e anti-B nos doadores de de sangue do grupo "O" do Hemonúcleo de Guarapuava (Pr), Revista Salus-Guarapuava 2006; **3**: 15-22.

21) Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, 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**: 597-617.

22) Briskieviczi M. Territorialidade e identidade: a migração dos descendentes de italianos no município de Francisco Beltrão – Parana. Sistema de Bibliotecas UNIOESTE 2012; 1-236.

23) Daniels, G. Human Blood Groups. Blackwell Science 2nd ed. Oxford, 2002.

24) Giacomini L, Filho WDL. Estratégias para fidelização de doadores de sangue voluntários e habituais, *Acta Paul Enferm* 2010; **23**: 65-72.

25) Melo L, Santos JÁ. *Sistema Rh*. STD 5, Belo Horizonte, 1996.

26) Flegel WA, Wagner FF. *RHD* gene deletion occurred in the Rhesus box. Blood. 2000; 95:3662-68.

27) Singleton BK, Green CA, Avent N D, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans duplication and a nonsense mutation in Africans duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD negative blood group phenotype. Blood 2000; **95**: 12-18.

28) Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim 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.

29) Layrisse M, Arends T. The Diego blood factor in Chinese and Japanese. Nature 1956; **177**: 1083-1084.

30) Junqueira P, Wishart PJ, Ottensooser F, et al. The Diego blood factor in Brazilian Indians. Nature 1956; **177**: 41.

31) Neel JV, Salzano MF. A prospectus for genetc studies of the American Indian, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol 1964; **29**: 85-98.

32) Flôres MA, Visentainer JE, Guelsin GA, et al. Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group system polymorphism in Brazilian Japanese descendants. Transfus Apher Sci 2013; In Press.

33) Race RR, Sanger R. *Blood Groups in Man*. 6th edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.

34) Moretto FA, Souza AC, Azevedo PR, et al. The persistence of Diego blood group alloantibodies. Rev Bras Hematol Hemoter 2013; **35**(Supl.1): 295-406.

35) Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, et al. 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) Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, et al. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. Br J Haematol 1998; **103**: 1184-91.

37) Schonewille H, Haak HL, Zijl AM. Alloimunization after blood transfusion in pacients with hematologic and oncologic diseases. Transfusion 1999; **39**: 763-71.

38) Mural M, Viana MB, Risk factors alloimmunization by patients with sickle cell disease. Braz. J. Med. Biol. Res 2005; **38**(5): 675-682.

39) Aguiar KM, Maia CN, Teles LF, et al. Identificação de anticorpos irregulares no Hemocentro Regional de Montes Claros, MG. Disponível em: http://www.efdeportes.com/efd176/identificacao-de-anticorpos-irregulares-no-hemocentro.htm, "Accessed on 01/11/2013".

40) Zhu JY, Lan JC, Luo HQ. Screening analysis of irregular antibodies from random donor population in shaoguan área. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2007; **15**(3): 630-1.

41) Pahuja S, Kushwaha S, Seth N, et al. Screening of blood donos for erythrocyte alloantibodies. Hematology 2012; **17**(5): 302-5.

3 CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSÕES

O estudo realizado em doadores voluntários de sangue de repetição da região sudoeste do estado do Paraná permitiram algumas conclusões:

- As frequências alélicas e genotípicas para os sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários Rh, Kell Duffy, Kidd e Diego foram determinadas, demonstrando confiabilidade e reprodutibilidade das técnicas de biologia molecular.
- A Genotipagem estendida nos doadores de repetição mostrou ser de grande importância na segurança transfusional, considerando a identificação de genótipos e alelos raros, somadas à miscigenação racial brasileira.
- Os resultados obtidos demonstraram a possibilidade de um direcionamento adequado na escolha de bolsas daquele hemonúcleo.

3.2 **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Ainda não há uma estimativa de quanto tempo levará e se haverá possibilidades em um futuro próximo para que a genotipagem faça parte dos procedimentos de rotina realizados em todos os bancos de sangue juntamente com as técnicas de hemaglutinação, porém em parceria com universidades e laboratórios dispostos a realizarem tal pesquisa, futuramente bancos de doadores de repetição previamente genotipados poderão existir com maior frequência e auxiliar na prática da transfusão sanguínea, com a expectativa de redução da aloimunização em pacientes politrasnfundidos.

O conhecimento e a detecção dos antígenos eritrocitários são essenciais para a prática transfusional. A genotipagem molecular dos sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários clinicamente significantes para doadores de sangue se apresenta como uma importante ferramenta para essa prática, pois sua realização em conjunto com hemaglutinação muda a gama de possibilidades nos procedimentos transfusionais aumentando assim a segurança dos pacientes transfundidos e atuando principalmente para o direcionamento de bolsas de sangue para pacientes que apresentem fenótipos raros.