

Daiane Cobianchi da Costa

**Investigação do polimorfismo de genes de grupos
sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em
pacientes com hemopatias no Estado de Santa Catarina**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutor em Farmácia na Área de Concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis/SC
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cobianchi da Costa, Daiane
Investigação do polimorfismo de genes de grupos
sanguíneos em doadores voluntários de sangue em pacientes
com hemopatias no Estado de Santa Catarina / Daiane
Cobianchi da Costa ; orientadora, Maria Cláudia Santos da
Silva - Florianópolis, SC, 2016.
104 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Sistemas de grupos sanguíneos. 3.
doadores de sangue. 4. pacientes com hemopatias. 5. estado
de Santa Catarina. I. , Maria Cláudia Santos da Silva. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. III. Título.

**Investigação do polimorfismo de genes de grupos
sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em
pacientes com hemopatias no Estado de Santa Catarina**

POR

Daiane Cobianchi da Costa

Tese julgada adequada e aprovada em sua forma final pela Orientadora e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Thaís Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf (UFSC – Membro Titular)

Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Bazzo (UFSC – Membro Titular)

Dr. Aloisio Benedetti (BENEDETTI LTDA – Membro Titular)

Prof.^a Dr.^a Mariza Aparecida Mota (UFJF – Membro Titular)

Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC - Orientador)

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 30 de março de 2016.

Agradecimentos

À *Profa. Dra. Maria Cláudia Santos Silva* por acreditar em mim, pela sua dedicação, competência científica e orientação dada, e pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao *Everaldo José Schörner e Dr. Rodolfo João Ramos* por acreditarem no futuro desse projeto e contribuir para o meu crescimento profissional e em especial pelos conselhos, críticas, sugestões e apoio de grande contribuição para o desenvolvimento e finalização deste trabalho.

À todos os *pacientes e doadores voluntários de sangue* que colaboraram com este trabalho.

Aos *amigos do LOEH e LBMM* que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando. Obrigada pelo convívio, solidariedade e amizade compartilhadas todo esse tempo.

Às *minhas estagiárias Alessandra e Thaís* por toda a ajuda prestada, pela amizade, pelo encorajamento constante e por termos formado uma equipe agradável, de respeito e sempre prontas para ajudar umas às outras.

Ao *Dr José Eduardo Levi e a Márcia Dezan* (Fundação Pró-Sangue), pelo carinho e atenção com que me receberam e disposição em ajudar a realizar parte do projeto.

Ao *Guilherme* que sempre esteve ao meu lado durante esta caminhada, sempre me incentivando a superar os obstáculos e a lutar pelos meus ideais. Agradeço também pela companhia em todos os momentos, amor, compreensão e paciência.

À *minha amada família*, pelos valores, incentivo, força e encorajamento e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria.

Ao *Tuto* que sou imensamente grata pelo incentivo e fortalecimento através da leitura atenta do inglês dos vários ‘manuscritos.

Aos *colaboradores do HEMOSC e do Banco de Sangue da UFSC* pelo apoio na coleta das amostras de sangue dos pacientes e dos doadores voluntários de sangue, em especial a *Manoela Valmorbida* pelo apoio e incentivo.

Aos *demais colegas de trabalho e amigos* que de uma forma ou de outra contribuíram para a execução desse projeto.

Muito obrigada

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

De acordo com a Nomenclatura da Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), já foram descritos mais de 340 antígenos eritrocitários, distribuídos em 36 sistemas de grupos, coleções e séries. Esses antígenos são codificados por genes altamente polimórficos e a distribuição de alelos varia entre diferentes populações e grupos étnicos. Portanto, o conhecimento e a detecção dos antígenos eritrocitários são essenciais na prática transfusional, pois o desenvolvimento de anticorpos contra esses antígenos pode se tornar um grande problema clínico, principalmente nos casos onde os pacientes são portadores de hemopatias ou em outras doenças que requerem transfusões sanguíneas periódicas. Os métodos moleculares para a identificação dos antígenos de grupos sanguíneos já são aplicados em alguns países e inclusive já existem protocolos de genotipagem de antígenos eritrocitários bem estabelecidos e validados na população brasileira contudo, devido à grande diversidade étnica presente em nosso país, ainda há necessidade de se identificar os polimorfismos dos grupos sanguíneos nas diferentes regiões brasileiras, como, por exemplo, na população do Estado de Santa Catarina, onde não foi publicado nenhum estudo até o presente momento com esse tema. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias politransfundidos no Estado de Santa Catarina. Para avaliar os polimorfismos dos sistemas de grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego em doadores de sangue e pacientes portadores de hemopatias do estado de Santa Catarina foram genotipadas amostras de 373 doadores de sangue de sete regiões do estado que compõem a hemorrede de hemoterapia no estado de Santa Catarina e 31 amostras de pacientes que necessitam de transfusão encaminhadas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) entre agosto de 2011 e março de 2014. Para a identificação do gene *RHD* e alelos *RHCE*C/c*, *RHCE*E/e*, *KEL*01.1/KEL*02*, *FY*01/FY*02*, *FY*02N.01* (mutação GATA), *JK*01/JK*02* e *DI*01/DI*02* foi utilizada a técnica de PCR Multiplex e a reação em cadeia da polimerase seguida da digestão enzimática com enzimas de restrição (PCR-RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), respectivamente. Posteriormente para a

identificação do alelo *SMIMI*64_80del* responsável em homozigose pelo fenótipo Vel- foi utilizada a técnica de PCR em Tempo real aplicada somente na análise de amostras de doadores voluntários de sangue. Na análise dos resultados, foi observada que os genótipos *RHCE*Ee*, *KEL*01.1/KEL*02*, *FY*01/FY*01*, *JK*01/JK*01*, *JK*02/02* foram os mais frequentemente encontrados no estado de Santa Catarina. As frequências genotípicas obtidas neste estudo foram comparadas com diversas populações brasileiras e com populações europeias de outros estudos e diferenças significativas foram encontradas, inclusive entre as populações das diferentes regiões do estado de Santa Catarina o que mostra que, mesmo no interior do estado, há uma população heterogênea. As frequências desse estudo foram similares a de populações caucasianas, italianas e alemãs para os sistemas Kell e Kidd. Os dados obtidos neste trabalho, além de permitir conhecer a população estudada, também possibilitarão criar um banco de dados com os resultados da genotipagem obtidos em doadores, com a finalidade de se melhorar a compatibilidade transfusional para os pacientes que necessitam de transfusão sanguínea.

Palavras-chave: sistemas de grupos sanguíneos, polimorfismos, doadores, pacientes com hemopatias.

ABSTRACT

According to the nomenclature of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), there are more than 340 red cell antigens described in 36 groups of systems, collections and series. Polymorphisms of the blood group systems are highly polymorphic and distribution of alleles varies between different populations and ethnic groups. Therefore, knowledge and detection of red cell antigens are essential in transfusion practice, due to the fact that the development of antibodies against these antigens can become a major clinical problem, especially in cases where patients have blood disorders or other diseases that require periodic blood transfusions. Molecular methods for the identification of blood group antigens are already applied in some countries and there are, in fact, red cell antigens genotyping protocols well established and validated in the Brazilian population. Nevertheless, due to the great miscegenation present in our country, there is still a need to identify polymorphisms of blood group systems in different regions of Brazil; for example, the population of the State of Santa Catarina, which has no study published with the subject up to now. The objective of this study was to investigate the polymorphism of genes of blood group systems in voluntary blood donors and patients with hematological multiple transfusions in the State of Santa Catarina. To evaluate the polymorphisms of blood group systems Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego in blood donors and patients with hematological State of Santa Catarina, were genotyped samples from 373 blood donors from seven regions of the state that make up the Hemotherapy Service Net in the state of Santa Catarina and 31 transfusion-dependent patients forwarded to Experimental Oncology and Hematology Laboratory (LOEH) between August 2011 and March 2014. To identify *RHD* gen and *RHCE**C/c alleles and *RHCE**E/e, *KEL**01.1/*KEL**02, *FY**01/*FY**02, *FY**02N.01 (GATA mutation), *JK**01/*JK**02 and *DI**01/*DI**02 was used the technique Multiplex PCR and polymerase chain reaction followed by enzymatic digestion with restriction enzymes (PCR-RFLP, the restriction Fragment Length Polymorphism), respectively. Posteriorly, to the identification of *SMIMI**64_80 *del* allele responsible in homozygous for Vel-phenotype, was used the PCR technique in real time only applied to the analysis of samples of voluntary blood donors. In analyzing

the results, it was observed that the *RHCE*Ee, KEL*01/KEL*02, FY*01/FY*01, JK*01/JK*01 e JK*02/JK*02* genotypes were the most frequently found in the state of Santa Catarina. The genotypic frequencies obtained in this study were compared with several Brazilian populations and European populations of other studies and significant differences were found even among the populations of the different regions of the state of Santa Catarina, which shows that even inside the state, there is a heterogeneous population. The genotype frequencies were similar to those in Caucasian samples and from Naples-Italy and Zurich-Germany, studied in other groups for the Kell and Kidd Systems. The data obtained in this work, besides allowing to know the studied population also enables to create a database with the genotyping results obtained from donors, in order to improve a secure transfusion compatibility for patients who require blood transfusion.

Keywords: Blood grupo systems, polymorphisms, donos, transfusion-dependent patients

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Sigla	Descrição
AA	Homozigose para o alelo selvagem (alta frequência)
AB	Heterozigose para o alelo selvagem
AHAI	Anemia Hemolítica Auto-Imune
AS-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Alelo-específico
BB	Homozigose para o alelo mutado (baixa frequência)
BLU	Cidade de Blumenau/SC
CPO	Cidade de Chapecó/SC
CRI	Cidade de Criciúma/SC
DHFRN	Doença Hemolítica do Feto e Recém-nascido
<i>DI*01</i>	Alelo A do gene DI do Sistema de grupo sanguíneo Diego
<i>DI*02</i>	Alelo B do gene DI do Sistema de grupo sanguíneo Diego
Dia	Antígeno Dia do Sistema de grupo sanguíneo Diego
Dib	Antígeno Dib do Sistema de grupo sanguíneo Diego
Diego	Sistema de grupo sanguíneo Diego
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Duffy	Sistema de grupo sanguíneo Duffy
FLN	Cidade de Florianópolis/SC
<i>FY*01</i>	Alelo A do gene FY do Sistema de grupo sanguíneo Duffy
<i>FY*02</i>	Alelo B do gene FY do Sistema de grupo sanguíneo Duffy
Fy ^a	Antígeno Fy ^a do Sistema de grupo sanguíneo Duffy
Fy ^b	Antígeno Fy ^b do Sistema de grupo sanguíneo Duffy
GATA	Mutação que inibe a expressão do antígeno Fy(b) na hemácia
<i>GATA -67C</i>	Alelo B para a mutação GATA do Sistema de grupo sanguíneo Duffy
<i>GATA -67T</i>	Alelo A para a mutação GATA do Sistema de grupo sanguíneo Duffy
JOA	Cidade de Joaçaba/SC
JOI	Cidade de Joinville/SC
<i>JK*01</i>	Alelo A do Sistema de grupo sanguíneo Kidd
<i>JK*02</i>	Alelo B do Sistema de grupo sanguíneo Kidd
Jk ^a	Antígeno Jk ^a do Sistema de grupo sanguíneo Kidd
Jk ^b	Antígeno Jk ^b do Sistema de grupo sanguíneo Kidd

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Descrição
K	Antígeno Kell do Sistema de grupo sanguíneo Kell
K	Antígeno celano do Sistema de grupo sanguíneo Kell
<i>KEL*01.1</i>	Alelo A do Sistema de grupo sanguíneo Kell
<i>KEL*02</i>	Alelo B do Sistema de grupo sanguíneo Kell
Kell	Sistema de grupo sanguíneo Kell
Kidd	Sistema de grupo sanguíneo Kidd
LISS	Tampão
LGS	Cidade de Lages/SC
MI	Mililitro
Ng	Nanograma
Pb	Pares de bases
PCR	Reação de cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase seguida de análise de polimorfismo de fragmentos longos de restrição
Rh	Sistema de grupo sanguíneo Rh
RhC	Antígeno RhC do Sistema de grupo sanguíneo Rh
Rhc	Antígeno Rhc do Sistema de grupo sanguíneo Rh
RhD	Antígeno RhD do Sistema de grupo sanguíneo Rh
RhD-	Fenótipo RhD-negativo
RhD+	Fenótipo RhD-positivo
RhD Ψ	Pseudogene RhD
RhE	Antígeno RhE do Sistema de grupo sanguíneo Rh
Rhe	Antígeno Rhe do Sistema de grupo sanguíneo Rh
RTH	Reação Transfusional Hemolítica
TAD+	Teste direto da antiglobulina positivo
Taq DNA	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase
TEB	Tris Borato EDTA
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Título	Página
Tabela 1. Frequência genotípica e alélica em doadores e pacientes para o Sistema Rh.....	58
Tabela 2. Frequência genotípica e alélica em doadores e pacientes para o Sistemas Kell.....	59
Tabela 3. Frequência genotípica e alélica em doadores e pacientes para o Sistemas Duffy.....	60
Tabela 4. Frequência genotípica e alélica em doadores e pacientes para o Sistemas Kidd.....	61
Tabela 5. Frequência genotípica e alélica em doadores e pacientes para o Sistemas Diego.....	62
Tabela 6. Frequência genotípica e alélica em doadores das regiões de Santa Catarina.....	63
Tabela 7. Amostras com resultados discordantes entre a genotipagem e fenotipagem.....	65
Tabela 8. Aloanticorpos de grupos sanguíneos em 5/31 pacientes portadores de hemopatias politransfundidos.....	66
Tabela 9. Frequência genotípica e alélica do Vel em doadores voluntários de sangue de Santa Catarina.....	67
Tabela 10. Comparação das frequências genotípicas para os sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego entre doadores das sete regiões que caracterizam o estado de Santa Catarina....	69
Tabela 11. Comparação das frequências genotípicas entre estados brasileiros.....	71
Tabela 12. Comparação das frequências genotípicas de doadores do estado de Santa Catarina e europeus.....	73

LISTA DE FIGURAS

Título	Página
Figura 1. Inserção dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária	25
Figura 2. Sistemas de grupos sanguíneo e antígenos descritos.....	26
Figura 3. Hemorrede do Estado de Santa Catarina..	42
Figura 4. Fluxograma do processamento das amostras sanguíneas de doadores e pacientes politransfundidos	43
Figura 5. Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação do gene <i>RHD</i>	50
Figura 6. Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação do <i>RHD</i> Ψ	50
Figura 7. Imagem ilustrativa do do gel de poliacrilamida a 12% para identificação dos alelos <i>RHCE</i> * <i>E/e</i>	51
Figura 8. Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação dos alelos <i>DI</i> * <i>01/DI</i> * <i>02</i>	51
Figura 9. Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação dos alelos <i>FY</i> * <i>01/FY</i> * <i>02</i>	52
Figura 10. Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo GATA Normal (-67T/T) e Mutado (-67C/C).....	52
Figura 11. Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação dos alelos <i>KEL</i> * <i>01.1/KEL</i> * <i>02</i>	53
Figura 12. Imagem ilustrativa do gel de poliacrilamida a 12% para identificação dos alelos <i>JK</i> * <i>01/JK</i> * <i>02</i>	53
Figura 13. Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação do alelo <i>SM1MI</i> * <i>64_80 del</i>	54
Figura 14. Imagem da PCR em tempo real qualitativa de amostras com o alelo <i>SM1MI</i> * <i>64_80del</i>	55

LISTA DE QUADROS

Título	Página
Quadro 1. Consequências da aloimunização eritrocitária	34
Quadro 2. Limitações da hemaglutinação	37
Quadro 3. Sequências de oligonucleotídeos e Condições da PCR.....	47
Quadro 4. Sequências de oligonucleotídeos e Condições da PCR.....	48
Quadro 5. Enzimas utilizadas para a fragmentação enzimática dos produtos das PCR-RFLP e tamanho dos fragmentos das reações.....	49

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	23
2.	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.2	Objetivos Específicos.....	27
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	29
4.	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	45
4.1	Amostras utilizadas.....	45
4.1.1	Amostras de doadores de sangue e pacientes.....	45
4.1.2	Fluxograma e processamento das amostras.....	46
4.2	Metodologia.....	47
4.2.1	Fenotipagem eritrocitária.....	47
4.2.2	Extração de DNA.....	48
4.2.3	Genotipagem individual de grupos sanguíneos – Reação em Cadeia da Polimerase.....	48
4.2.4	Genotipagem para a determinação dos polimorfismos <i>FY*01/FY*01</i> , <i>FY*02N.01</i> (mutação <i>GATA</i>), <i>KEL*01.1/KEL*02</i> , <i>JK*01/JK*02</i> , <i>DI*01/DI*02</i> e <i>VEL</i>	49
4.2.5	Genotipagem RHD, RHD Ψ , RHCE*C/c.....	49
4.2.6	Análise por PCR em Tempo Real do alelo <i>SMIM1*64_80del</i>	59
4.2.7	Análise estatística.....	60
5.	RESULTADOS.....	61
5.1	Genotipagem eritrocitária dos polimorfismos de grupos sanguíneos em amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes portadores de hemopatias.....	61
5.1.1	Sistema Rh.....	61
5.1.2	Sistema Kell.....	62
5.1.3	Sistema Duffy.....	63
5.1.4	Sistema Kidd.....	64
5.1.5	Sistema Diego.....	65
5.2	Concordância entre os resultados de fenotipagem e genotipagem.....	69
5.3	Identificação de pacientes Fy(b-) que apresentam a mutação -67T/C.....	71
5.4	Aloimunização nos pacientes portadores de hemopatias.....	66
5.5	Identificação de fenótipos de difícil	66

	caracterização sorológica.....	
5.6	Sistema Vel.....	66
5.7	Estratégia para encontrar doadores de sangue com fenótipos raros.....	67
5.8	Comparação das frequências genotípicas entre as sete regiões do estado de Santa Catarina.....	68
5.9	Comparação das frequências genotípicas entre doadores de estados brasileiros.....	70
5.10	Comparação das frequências genotípicas entre doadores de Santa Catarina e europeus.....	72
6.	DISCUSSÕES.....	75
7	CONCLUSÃO.....	81
8	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXO A- Aprovação do projeto de pesquisa pelo comitê de ética em seres humanos – CEPESH/UFSC.....	99
	ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	101

1. INTRODUÇÃO

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

Grande parte dos centros de coleta e de doação de sangue selecionam doadores a partir de um limitado número de antígenos, em geral apenas unidades compatíveis para ABO e Rh são transfundidos a um paciente (ROZMAN et al., 2000). Geralmente, os demais antígenos dos sistemas Rh, tais como, C, c, E e e, e outros sistemas, Kell, Duffy, Kidd, dentre outros, são avaliados somente nos casos em que os pacientes apresentam aloanticorpos contra esses antígenos. A investigação desses antígenos é realizada pela fenotipagem que é um método clássico para identificação de antígenos de grupos sanguíneos e anticorpos e é baseado no princípio da hemaglutinação (REID, 2009). Apesar de muito utilizada em laboratórios de imuno-hematologia, essa metodologia apresenta algumas limitações técnicas, pois é um procedimento trabalhoso para a determinação de diversos antígenos simultaneamente, depende da disponibilidade de antissoros raros e reagentes de alto custo e a pesquisa de alguns antígenos não é possível pela indisponibilidade de antissoros comerciais. Além disso, os procedimentos de fenotipagem também apresentam restrições, que a tornam algumas vezes inviáveis na rotina transfusional, como por exemplo, a fenotipagem correta de um paciente recentemente transfundido devido à presença de hemácias do doador na sua circulação ou de autoanticorpos (REID et al., 2000a, 2000b).

A utilização de métodos de biologia molecular para identificação de antígenos, tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da imuno-hematologia, o que aumenta a segurança e a eficácia transfusional de pacientes politransfundidos, como os portadores de hemopatias e outras doenças que requerem transfusões sucessivas. Isto pode ser facilmente visualizado com os procedimentos de genotipagem de grupos sanguíneos, nos quais 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 autoanticorpos (ROZMAN et al., 2000; CASTILHO et al., 2002a, 2002b). Outro aspecto relevante, é que enquanto os testes de hemaglutinação avaliam os produtos dos genes de grupos sanguíneos, ou seja, o fenótipo, a genotipagem detecta a sequência do DNA responsável pela expressão dos antígenos eritrocitários, o genótipo. Dessa forma, a genotipagem é uma excelente alternativa e uma das suas principais aplicações clínicas é auxiliar no processo de identificação de anticorpos de pacientes recentemente transfundidos e encontrar o sangue com o fenótipo compatível para os esses pacientes. (REID e LOMAS-FRANCIS, 2002; CASTILHO et al., 2002a).

A aplicação da genotipagem de grupos sanguíneos eritrocitários oferece vantagens na prática clínica transfusional, dentre elas, pode-se destacar a avaliação do perfil antigênico de pacientes submetidos a transfusões sanguíneas recentes e de pacientes com teste direto da antiglobulina positivo (TAD+), a identificação de pacientes com o fenótipo Fy(b-) que apresentam o alelo *FY*02.N01*. Esses pacientes podem ser transfundidos de forma segura com hemácias Fy(b+) sem o risco de desenvolver anticorpos anti-Fy^b (REID e RIOS, 1999; CASTILHO et al., 2000) o que significa um aumento da disponibilidade de bolsas sanguíneas para esses indivíduos. Além disso, a genotipagem possibilita a identificação de um feto em risco de doença hemolítica no feto e no recém-nascido (DHFRN) sem fazer uso de métodos invasivos que podem oferecer risco à saúde fetal. Nessa metodologia utiliza-se o DNA fetal que pode ser extraído do plasma materno, ou simplesmente a partir do conhecimento do genótipo dos pais. Em adição, a genotipagem ainda possibilita identificar doadores quando reagentes para realização de métodos sorológicos não estão disponíveis ou são fracamente reativos (REID, 2009).

Como visto, a biologia molecular pode ser uma alternativa importante para superar as limitações das técnicas sorológicas para a determinação do perfil antigênico dos pacientes, e, portanto, é de fundamental importância realizar estudos que possam contribuir com o aumento da segurança transfusional dos pacientes politransfundidos, com a identificação de novos alelos na população e determinar as frequências genóticas nas diferentes regiões do Brasil.

Os métodos moleculares para a identificação dos antígenos de grupos sanguíneos já são aplicados em alguns países. Inclusive já existem protocolos de genotipagem de antígenos eritrocitários bem estabelecidos e validados na população brasileira, contudo, devido à diversidade étnica presente em nosso país, ainda há necessidade de identificar os polimorfismos dos grupos sanguíneos nas diferentes regiões brasileiras, como, por exemplo, na população do estado de Santa Catarina, onde não tinha sido realizado nenhum estudo com esse tema.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores de sangue e em pacientes portadores de hemopatias e politransfundidos no Estado de Santa Catarina.

2.2. Objetivos específicos

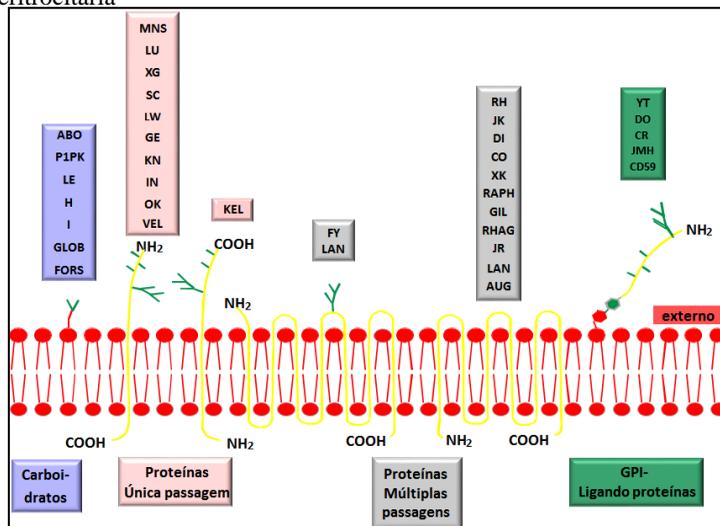
- Validar e implantar a metodologia de genotipagem de grupos sanguíneos para os sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, Diego e Vel na Universidade Federal de Santa Catarina;
- Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos de sistemas de grupos sanguíneos nos doadores de sangue de Santa Catarina e pacientes portadores de hemopatias politransfundidos;
 - Encontrar doadores portadores de fenótipos raros;
 - Investigar os antígenos de grupos sanguíneos envolvidos nas reações transfusionais nos pacientes portadores de hemopatias;
 - Analisar se houve concordância entre os resultados obtidos na fenotipagem e na genotipagem.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados pela presença ou ausência de antígenos na membrana eritrocitária. Esses antígenos fazem parte da composição da membrana eritrocitária com funções biológicas distintas (BONIFÁCIO et al., 2009) e possuem características polimórficas bem definidas (ISSIT e ANSTEE, 1998), como pode ser observado na Figura 1.

Os antígenos de grupos sanguíneos estão direta ou indiretamente codificados por genes de grupos sanguíneos específicos (DENOMME, 2011) e são definidos por sequências específicas de aminoácidos, os quais constituem proteínas que podem ou não estar ligadas a carboidratos ou a lipídios. A diversidade dos antígenos de grupos sanguíneos é herdada dos progenitores assim como qualquer outra característica genética (REID e YAZDANBAKSH, 1998).

Figura 1: Inserção dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária

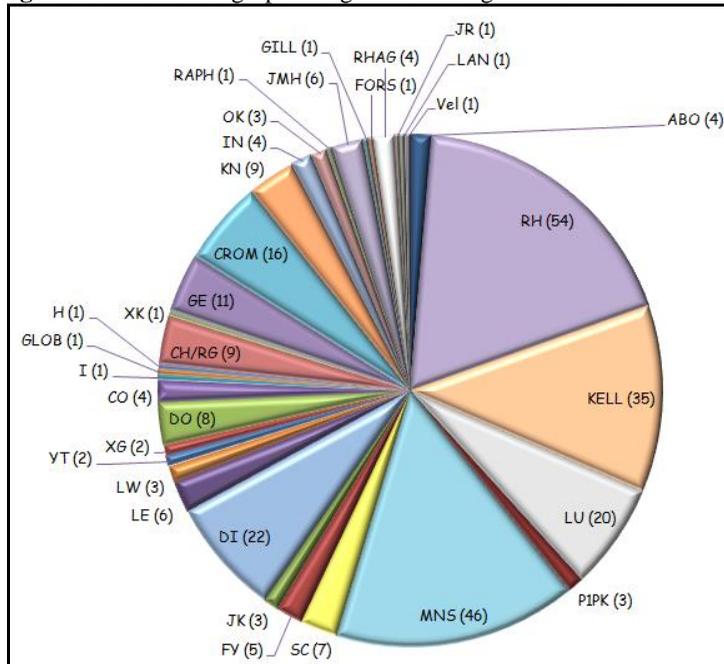


Fonte: REID, 2008, 2009; CASTILHO et al., 2015

De acordo com a Nomenclatura da Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), já foram descritos mais de 340 antígenos eritrocitários, dos quais 296 antígenos estão distribuídos em 36 sistemas de grupos sanguíneos e os

demais antígenos estão organizados em coleções e séries. (Figura 2) (REID, 2008; 2009; STORRY et al., 2014; CASTILHO et al., 2015).

Figura 2: Sistemas de grupos sanguíneos e antígenos descritos



Fonte: AVENT, 2008; STORRY et al., 2014.

Os genes que codificam os 36 sistemas de grupos sanguíneos já foram clonados e sequenciados, e as bases moleculares associadas com a maioria dos antígenos foram determinadas (REID, 2008, 2009; STORRY et al., 2014; CASTILHO et al., 2015).

O mecanismo responsável pelos polimorfismos da maioria dos sistemas de grupos sanguíneos origina-se predominantemente de mutações de ponto, principalmente os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), mas recombinações gênicas, deleções e inserções também ocorreram ao longo da evolução dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos e promovem o desenvolvimento de formas variantes destes genes (DANIELS, 2005; WESTER et al., 2005; DENOMME, 2011). O

conhecimento das bases moleculares dos sistemas de grupos sanguíneos através do estudo de diversas mutações, principalmente SNPs, proporcionaram um meio para deduzir o fenótipo do genótipo (DENOMME, 2011).

Dentre os sistemas de importância clínica, nos quais os polimorfismos já são conhecidos, pode-se destacar o Sistema ABO e Rh, e, posteriormente, Kell, Kidd e Duffy (DENOMME, 2015). Logo abaixo, segue uma breve descrição sobre os sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, Diego e o Vel, o novo sistema de grupo sanguíneo descrito.

Sistema de grupo sanguíneo Rh

O sistema Rh é o mais complexo dos sistemas de grupos sanguíneos e encontra-se composto por 54 antígenos, dos quais os principais são RhD, RhC, Rhc, RhE e Rhe (STORRY et al., 2014). Estes antígenos formam oito complexos gênicos conhecidos como haplótipos de Rh: CDe (R1), cDE (R2), cDe (R0), CDE (Rz), cde (r), Cde (r'), cdE (r''), CdE (ry).

Os principais antígenos do sistema Rh, são codificados por dois loci de genes altamente homólogos, o gene *RHD* que codifica o antígeno RhD e o gene *RHCE* que codifica os antígenos RhC, RhE, Rhc e Rhe (DANIELS, 2013). Esses genes são compostos por 10 éxons cada e estão localizados no braço curto do cromossomo 1 entre as regiões p36.13 e p34.3, na orientação 3'*RHD* 5'- 5'*RHCE* 3' (CARTRON, 1994; COLIN et al., 1991, 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 caracterizados como RhD-positivos e 15% são RhD-negativos. Colin e colaboradores (1991) encontraram que o fenótipo RhD-negativo resulta da homozigotidade 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 do sistema Rh. Em raras exceções, o fenótipo RhD-negativo relaciona-se à presença de alguns éxons do gene *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) inseridas no éxon 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).

A proximidade dos dois genes no cromossomo 1, bem como, o arranjo dos genes *RHD* e *RHCE* no locus RH promove a troca genética que, por sua vez, criou muitos antígenos clinicamente significantes do sistema Rh (WAGNER & FLEGEL, 2000). Dentre esses, é possível destacar as variantes do antígeno RhD conhecidas como D fraco, D parcial e Del. O fenótipo D fraco é caracterizado pela fraca expressão dos antígenos D; doadores de sangue com esse fenótipo podem aloimunizar pacientes RhD negativos. O fenótipo 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 RhDel, outra variante do antígeno RhD é caracterizado por uma significativa redução da expressão do antígeno RhD na membrana eritrocitária, identificada em populações asiáticas. (QUIN et al., 2005). Esse fenótipo é identificado como RhD negativo pelos testes sorológicos rotineiros, mas adsorvem e eluem o anti-D (WAGNER et al., 2001; WESTHOFF, 2007). O grande problema é que doadores de sangue portadores do fenótipo Del podem estimular o desenvolvimento de anti-D em pacientes RhD negativo.

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 *RHCE*E/e* (226Pro→Ala) é mais simples, causada por um SNP no éxon 5 do gene *RHCE* (CARTRON, 1994; NOIZAT-PIRENNE et al., 2002).

Sistema de grupo sanguíneo Kell

O Sistema de grupo sanguíneo Kell é altamente polimórfico e depois dos sistemas ABO e Rh, é o mais importante dos sistemas de grupo sanguíneo para a medicina transfusional, pois alguns dos seus antígenos são potentes imunógenos e os aloanticorpos desenvolvidos podem levar a graves reações transfusionais incompatíveis e doença hemolítica do feto e recém-nascido (DHFRN) (LEE et al., 2007; DENOMME, 2015).

Atualmente, esse sistema compreende pelo menos 36 antígenos, que são carregados em uma glicoproteína transmembrana de 93kDa tipo II e são expressos em eritrócitos, testículos, e em menor quantidade, no tecido cerebral, órgãos linfóides, coração, músculo esquelético e células progenitoras mielóides (WHESTHOFF; REID, 2004; REID, 2012; BOTURÃO-NETO, 2015). A maioria dos antígenos está classificada dentro de seis pares de antígenos antitéticos de alta e baixa frequência, e outros antígenos que se expressam de forma independente (REID, 2012; ARNONI et al., 2013, BOTURÃO-NETO et al., 2015).

Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Kell são codificados a partir de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene *KEL*, o qual é composto por 19 éxons que estão localizados no braço longo do cromossomo 7q33. Os alelos responsáveis pela expressão dos antígenos são herdados de forma codominante; o alelo *KEL**2, que codifica o antígeno de alta frequência *KEL* 2 (k, “Celano”) e o alelo *KEL**1, que codifica o antígeno *KEL*1 (K, “Kell”). Esses alelos resultam do SNP (C578T) no éxon 6 que leva a substituição do aminoácido T193M (REID, 2012; ARNONI et al., 2013).

As frequências antigênicas variam em populações de diferentes origens étnicas e podem ser significativas na medicina transfusional, principalmente entre europeus e afrodescendentes. O antígeno *KEL*1 está presente em 9% dos caucasianos e 2% dos negros, enquanto que o antígeno k (*KEL*2) apresenta frequência de 91% em Caucasianos e 98% em negros (REID & LOMAS-FRANCIS, 2004; BOTURÃO-NETO et al., 2015).

Aloanticorpos contra os antígenos do Sistema de grupo sanguíneo Kell são normalmente da classe IgG, e o de maior importância clínica é o anti-Kell (anti-*KEL*1) (LEE et al., 1993; 2007; DANIELS et al., 2009).

Sistema Duffy

O gene *DARC* ou *FY* que codifica os seis antígenos pertencentes ao sistema Duffy, *Fy*^a, *Fy*^b, *Fy*³, *Fy*⁴, *Fy*⁵ e *Fy*⁶, são expressos nas hemácias e em vários tecidos não eritróides, como o rim, o baço, o coração, o pulmão, os músculos, o duodeno, o pâncreas, a placenta, o cérebro, o intestino, a glândula tireóide e em células de Purkinje do cérebro (YAZDANBAKSHI et al., 2000; JEANS et al., 2005). Esse foi o primeiro gene humano

designado como autossômico. O locus *FY*, localizado no cromossomo 1, na posição 1q22-q23 é caracterizado pelos principais alelos *FY*01 (FY*A)*, *FY*02 (FY*B)* e *FY*02.N01*. Os alelos *FY*01* e *FY*02* são distinguidos por uma mutação de ponto missense no nucleotídeo 125G>A, o que resulta na substituição do aminoácido glicina por um ácido aspártico na posição 42 (Gly42Asp) originando os antígenos antitéticos Fy^a e Fy^b, (JENS et al., 2005; NATHALANG et al., 2015). Esses antígenos são responsáveis pelos fenótipos Fy(a+b+), Fy(a+b-) e Fy(a-b+) cujas frequências variam entre os diferentes grupos étnicos. Além disso, o silencioso alelo *FY*02.N01* é raro em populações caucasianas, mas frequente em negros africanos, e é responsável pelo fenótipo Fy(a-b-) particularmente em área com incidência de malária.

A glicoproteína Duffy, codificada pelo gene *DARC* também é conhecida como 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-) 17 (HADLEY; PEIPER, 1997; 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 (MILLER et al., 1975; HADLEY; PEIPER, 1997).

O fenótipo Fy(a-b-) é o resultado de um SNP na posição -67T>C no promotor eritroide GATA-1 (motivo repetitivo do sítio de ligação no promotor da linhagem eritroide) que impede a transcrição do ntígeno FY02 ou Fy^B nas hemácias, mas não nas demais células onde esse antígeno também é expresso. Indivíduos com esse fenótipo possuem hemácias resistentes à invasão de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium knowlesi*, parasita da malária. O fenótipo Fy(a-b-) identificado em caucasianos é o resultado de alelos silenciosos, *FY*AO* e *FY*BO*. Esses alelos são gerados por quatro diferentes mecanismos associados com um stop códon também causado por um SNP ou por deleção no éxon 2 (MALLINSON et al., 1995; RIOS et al., 2000; JEAS et al., 2005; CASTILHO et al., 2007). Esse fenótipo ainda pode ser decorrente do alelo *FY*X*, resultado de 2 SNPs concomitantes no éxon 2, 265C>T e 298G>A, o qual é responsável pela fraca expressão do

antígeno Fy^b, que na maioria das vezes é erroneamente fenotipado como Fy(b-) (TURLAMINE et al., 1998).

O sistema de grupo sanguíneo Duffy é clinicamente significativo para a medicina transfusional devido ao fato dos anticorpos desenvolvidos contra os antígenos estarem envolvidos em reações transfusionais hemolíticas e doença hemolítica do feto e recém-nascido. Os anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b são da classe IgG, e quando presentes, estão associados a presença de outros anticorpos, principalmente em indivíduos politransfundidos (COTORRUELO et al., 2009).

Sistema Kidd

O sistema sanguíneo Kidd é composto por dois antígenos antitéticos Jk^a e Jk^b e um antígeno de alta incidência, o Jk³. O gene que codifica esses antígenos (*SLC14A1*) possui 11 *éxons* que 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 éxon 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 os alelos diferentes, que codificam o fenótipo *null*, já foram descritos.

Os anticorpos desenvolvidos contra os principais antígenos do sistema Kidd, anti-Jk^a e anti-Jk^b, são geralmente da classe IgG, e, em particular, as subclasses IgG1 e IgG3. Esses anticorpos são capazes de se ligar ao fragmento C3d do complemento, resultando na hemólise intra e extravascular, caracterizadas como reações hemolíticas transfusionais agudas e tardias (DHTRs). Além disso, esses anticorpos estão envolvidos em DHFRN e rejeição de transplantes em pacientes que receberam transplante de órgãos sólidos (VUCELIC et al., 2005; SANFORD et al., 2015).

Sistema Diego

O sistema de grupo sanguíneo Diego é constituído por 22 antígenos localizados na glicoproteína banda 3 da membrana eritrocitária. Compreende quatro antígenos antitéticos Di^a/Di^b , Wt^a/Wt^b e 17 antígenos de baixa incidência populacional. Os polimorfismos DI^*01/DI^*02 resultam da substituição de um único aminoácido na 7ª alça extracelular da banda 3 (Troca do nucleotídeo 2561 (T>C), que leva a substituição do aminoácido Prolina (Di^b) para Leucina (Di^a) na posição 854 no gene *SLC4A1* (POOLE, 1999; REID, 2012; FIGUEROA, 2013). O antígeno Di^a é de baixa frequência em caucasianos, mas pode ser comum entre índios e japoneses. Esse antígeno é considerado um marcador antropológico devido a sua ocorrência quase exclusivamente entre populações mongoloides, incluindo orientais (3 a 6%) e indígenas, com frequência que pode variar de 5 a 54%. Em 2003, no Brasil, foi descrita uma prevalência ainda maior, de 75,7% na tribo indígena Parakanã (BALEOTTI et al., 2003). Por outro lado, o antígeno Di^b é de alta frequência, e é encontrado em quase 100% na população geral. Doadores de sangue portadores do antígeno Di (b-) são considerados raros pela ISBT (Wu, 2002; REID, 2012; FIGUEROA, 2013). Anticorpos contra os antígenos Di^a e Di^b são geralmente IgG e tem sido reportado como responsáveis por doença hemolítica do feto e recém-nascido e também por reações transfusionais hemolíticas (REID, 2012; FIGUEROA, 2013).

Sistema Vel

O antígeno Vel foi descrito inicialmente em 1952 por Sussman & Miller. Investigações recentes sobre as bases moleculares responsáveis pela expressão do antígeno Vel nos eritrócitos resultou na transferência do antígeno Vel, previamente localizado na Coleção 212 para a posição 34ª dos sistemas de grupos sanguíneos (BALLIF et al., 2013; HAER-WIGMAN, 2015; STORRY et al., 2013). O Vel é um antígeno de alta frequência, e é expresso nos eritrócitos da maioria dos indivíduos, mas podem estar ausentes em casos raros (SUSSMAN LN, MILLER EB, 1952; BALLIF et al., 2013). A frequência global

do fenótipo Vel- na população caucasiana é de aproximadamente 0,025% e tem sido descrito em outras populações, tais como negra, asiática e populações indígenas canadenses (REID, 2012; HAER-WIGMAN, 2015).

O principal mecanismo molecular responsável pelo fenótipo Vel- é a deleção de 17 nucleotídeos no éxon 3 do gene *SMIMI* que codifica o sistema de grupo sanguíneo. O *SMIMI* é um gene pequeno com 97 kb, o qual está localizado no cromossomo 1, e, é constituído por 4 éxons. O fenótipo Vel- é transmitido por herança autossômica recessiva, e devido à ausência de triagem, normalmente, só é revelado quando os indivíduos Vel- desenvolvem anti-Vel após a transfusão ou gestação (STORRY; CVEJIC, 2013). Anti-Vel é bem conhecido por sua atividade hemolítica agressiva. Indivíduos com anti-Vel podem sofrer reações transfusionais hemolíticas agudas severas após a transfusão de sangue incompatível. Doadores com fenótipo Vel- são raros, mas sua identificação é necessária para a transfusão segura em apoio a pacientes (BALLIF et al., 2013; HAER-WIGMAN et al., 2015). Transfusão de pacientes com anti-Vel é um desafio, não só devido à raridade de doadores compatíveis, mas principalmente devido à indisponibilidade de reagentes comerciais para triagem sorológica (REID, 2012).

Importância clínica dos antígenos

Como visto anteriormente, os antígenos de grupos sanguíneos estão ancorados na membrana do eritrócito, mais especificamente na parte externa da membrana eritrocitária e são de extrema importância na medicina transfusional, pois a ausência de um antígeno pode levar à aloimunização de um indivíduo após transfusão de hemácias com o respectivo antígeno, e, dessa forma, aumentar o seu risco transfusional em transfusões subsequentes (REID, 1997; ISSIT e ANSTEE, 1998). Além da fundamental importância na medicina transfusional, os antígenos de grupos sanguíneos têm um papel importante na incompatibilidade materno-fetal, nas anemias auto-imune e nos transplantados de órgãos sólidos e medula óssea (ISSITT e ANSTEE, 1998).

Pacientes em regime de transfusão de sangue crônica como os pacientes portadores de anemia falciforme, podem desenvolver anticorpos contra vários antígenos eritrocitários. A maior causa de aloimunização nesses pacientes é a diferente distribuição dos

antígenos entre doadores de ancestralidade europeia e os pacientes falciformes de ancestralidade africana (CHOU e WESTHOFF, 2009).

Um efeito indesejável grave, diretamente associado às transfusões é aquele que resulta em hemólise do sangue transfundido, devido à presença de anticorpos pré-formados no plasma do receptor. Segundo Poole e Daniels (POOLE e DANIELS, 2007), a aloimunização apresenta consequências negativas aos pacientes politransfundidos (Quadro 1), dentre as quais se destacam o aumento do risco de reação transfusional hemolítica e a redução do número de bolsas de sangue compatíveis para futuras transfusões.

Quadro 1: Consequências da aloimunização eritrocitária

Aumento do risco de reações transfusionais hemolíticas e destruição dos eritrócitos alogênicos
Destruição dos eritrócitos autólogos (Anemia Hemolítica Auto-Imune – AHAI) através da hemólise by standard
Destruição dos eritrócitos do feto (Doença Hemolítica do Feto e Recém-Nascido – DHFRN)
Danos a tecidos e órgãos transplantados
Redução do número de bolsas de sangue compatível
Atraso nos procedimentos transfusionais
Custos adicionais aos serviços

Fonte: POOLE e DANIELS, 2007.

A transfusão de sangue incompatível, que causa reação transfusional hemolítica imediata com destruição intravascular das hemácias transfundidas, pode levar à morte. A grande maioria dos casos está relacionada à incompatibilidade ABO, pois os anticorpos anti-A e anti-B ativam o sistema complemento e estão presentes em altas concentrações no plasma (PETZ, 1989; ISSIT e ANSTEE, 1998). Pacientes que recebem transfusão de sangue e de componentes sanguíneos com antígenos eritrocitários diferentes dos seus podem desenvolver anticorpos contra esses antígenos. Esses pacientes podem apresentar reações transfusionais hemolíticas tardias, com destruição extravascular das hemácias, devido a anticorpos não detectados em testes pré-transfusionais. Os anticorpos mais implicados na reação

transfusional hemolítica tardia são os dirigidos contra antígenos dos sistemas Rh (34%), Kidd (30%), Duffy (14%) e Kell (13%) (MOLISSON et al., 1988). Aloanticorpos desenvolvidos contra outros antígenos eritrocitários ocorrem em menos que 1% da população (GIBLETT, 1961, 1977; SPIELMANN & SEIDL, 1974; HOELTGE et al., 1995; GEIFMAN-HOTZMAN et al., 1997; SCHONEWILLE et al., 1999; CASTILHO, 2008).

O significado clínico dos anticorpos antieritrocitários depende da frequência do antígeno que pode variar de acordo com as diferentes origens étnicas e sua imunogenicidade. A ocorrência de anticorpos irregulares em pacientes politransfundidos estimulou a investigação da frequência da aloimunização em populações distintas, levando-se em consideração as diferenças étnicas existentes entre elas (ISSIT, 1998; CASTILHO, 2008).

Vários trabalhos mostram a frequência da produção de anticorpos irregulares em populações selecionadas de pacientes politransfundidos (ORLINDA et al., 1978; COLES et al., 1981; BLUMBERG et al., 1983; DAVIES et al., 1986; REISNER et al., 1987; COX et al., 1988; VICKINSKY et al., 1990; ROSSE et al., 1990; TALANO et al., 2003; NOIZAT-PIRENNE, 2013). Esses trabalhos mostraram que a prevalência de formação de anticorpos em pacientes com anemia aplástica, leucemia mielóide aguda, insuficiência renal e hemorragia gastrointestinal era similar, 11 a 16% (BLUMBERG et al., 1983; SOOD, et al., 2013). Em pacientes com hemoglobinopatias, o índice de aloimunização encontrado foi o mais alto, 29%, podendo atingir até 36% em pacientes com anemia falciforme (ORLINDA et al., 1978; COLES et al., 1981; DAVIES et al., 1986; REISNER et al., 1987; COX et al., 1988; VICKINSKY et al., 1990; ROSSE et al., 1990; TALANO et al., 2003; NOIZAT-PIRENNE, 2013). Outros trabalhos relatam que é alta a probabilidade de resposta imune a antígenos eritrocitários em pacientes portadores de anemias hemolíticas autoimunes, cirrose hepática e síndromes mielodisplásicas (SALMON et al., 1990; ARRIAGA et al., 1995; STIEGLER et al., 2001; SCHONEWILLE et al., 2009; ZALPURI et al., 2012; SANZ et al., 2013).

Considerando-se as frequências gênicas e a prevalência desses anticorpos em diferentes populações (GIBLETT, 1961), a probabilidade de um indivíduo produzir um ou mais anticorpos antieritrocitários foi estimada em aproximadamente 1% por

unidade de sangue transfundido, e podem ocorrer em 2 a 6% dos pacientes que recebem transfusão sanguínea.

Na prática transfusional, tem-se procurado minimizar as chances de um indivíduo formar aloanticorpos antieritrocitários, devido ao risco associado a transfusões e gestações futuras. Por isso, alguns autores estimulam as transfusões intraraciais em pacientes portadores de anemia falciforme (ORLINDA et al., 1978; ROSSE et al., 1990). Outros recomendam transfusões fenotipicamente compatíveis com os antígenos eritrocitários mais imunogênicos (D, K, E, c, C, e, Fy^a, Jk^a, S) (COLES et al., 1981; SALMON et al., 1990; AYGUN et al., 2002; ZALPURI et al., 2012).

A fenotipagem eritrocitária é essencial para a confirmação de aloanticorpos e auxilia a identificação de anticorpos que podem ser formados no futuro. A fenotipagem é um método para investigar os antígenos de grupos sanguíneos e anticorpos, o qual é baseado no princípio da hemaglutinação. Esta metodologia vem sendo utilizada há mais de século, e é considerada o padrão ouro, pois requer poucos equipamentos e quando executada da forma correta, apresenta especificidade e sensibilidade apropriada para a segurança transfusional da maioria dos pacientes que necessitam de transfusão sanguínea (REID, 2009). No entanto, apesar dessa metodologia ser muito utilizada em laboratórios de imunohematologia, apresenta determinadas limitações técnicas e clínicas que merecem atenção (Quadro 2), pois é um procedimento trabalhoso para a determinação de diversos antígenos simultaneamente e depende da disponibilidade de antissoros raros e reagentes de alto custo. Além disso, a pesquisa de alguns antígenos não é possível pela indisponibilidade de antissoros comerciais, e, é difícil fenotipar corretamente um paciente recentemente transfundido devido à presença de hemácias do doador na sua circulação (HILLYER et al., 2008; REID 2009).

Quadro 2: Limitações da Hemaglutinação

Limitações Técnicas
Teste subjetivo (interpretação subjetiva)
Procedimentos trabalhosos e dispendiosos para a determinação de diversos antígenos
Alto custo dos reagentes, em especial dos antissoros raros
Requer o uso de soros confiáveis
Indisponibilidade de antissoros comerciais para muitos antígenos
Limitações Clínicas
Fenotipagem de pacientes com transfusões recentes
Fenotipagem de hemácias de pacientes com autoanticorpos
Falha na determinação da zigosidade <i>RHD</i>
Dificuldade de transfundir pacientes aloimunizados

Adaptado de: HILLYER et al., 2008.

Em virtude dessas limitações, tem se procurado identificar meios mais seguros para evitar as reações transfusionais em pacientes politransfundidos. Atualmente, as tecnologias baseadas em métodos moleculares, tem sido o método de escolha para os procedimentos de genotipagem molecular (REID et al., 2000a; ROZMAN et al., 2000; CASTILHO et al., 2002a; HILLYER et al., 2008).

Desde a clonagem e o sequenciamento dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos, tem havido um grande progresso no entendimento sobre os mecanismos moleculares que levam à diversidade dos antígenos de grupos sanguíneos. Alguns desses mecanismos são: SNPs (Substituição de Nucleotídeos), deleção, inserção, mecanismos de *splicing* alterados, *crossing over* intragênico, *crossing over* intergênico, conversão gênica e outros rearranjos gênicos. No entanto, a maioria dos polimorfismos de grupos sanguíneos surge de mutações de ponto *missenses*, ou seja, de uma mudança na identidade do aminoácido codificado (AVENT, 1997; REID e YASDANBAKSH, 1998).

A utilização das ferramentas de biologia molecular tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da imunohematologia, principalmente em situações

clínicas mais complexas para melhorar a segurança e a eficácia transfusional para os pacientes politransfundidos. Isso pode ser visualizado durante os procedimentos de genotipagem de grupos sanguíneos, pois as técnicas moleculares suprem a deficiência da técnica de hemaglutinação, principalmente na fenotipagem de pacientes com transfusão recente, quando há hemácias do doador na circulação do receptor e, em pacientes com autoanticorpos, como os portadores de anemia hemolítica autoimune (AHAI) (ROZMAN et al., 2000; CASTILHO et al., 2002a, 2002b). Além disso, as técnicas moleculares podem identificar a presença de genes que codificam antígenos de grupos sanguíneos fracamente expressos na membrana, o que contribui para a prevenção de possíveis reações transfusionais hemolíticas (REID, 2007).

Enquanto os testes de hemaglutinação avaliam os produtos dos genes de grupos sanguíneos, a genotipagem detecta a sequência do DNA responsável pela expressão dos antígenos eritrocitários. Dessa forma, a genotipagem representa uma excelente alternativa para os casos em que os testes de hemaglutinação são insuficientes (DANIELS, 2005; REID e LOMAS-FRANCIS, 2002; CASTILHO et al., 2002a).

Há mais de 10 anos os laboratórios de referência em imunohematologia começaram a implementar métodos moleculares para identificação de SNPs específicos que codificam antígenos de grupos sanguíneos. Dentre os protocolos empregados para a determinação dos antígenos de grupos sanguíneos encontram-se reação em cadeia de polimerase alelo-específico (AS-PCR), PCR seguido por análises dos fragmentos com enzimas de restrição (PCR-RFLP) (REID e YASDANBAKSH, 1998; REID e RIOS, 1999; DENOMME et al., 2000), as técnicas de PCR em tempo real (PCR *Real-Time*) (REID, 2003; NOVARETTI et al., 2010), a técnica de microarranjos (*microarray*) (BEIBOER et al., 2005; HASHMI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009; COSTA et al. 2013) e recentemente, Maldi-Toff (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) (GASSNER et al., 2013; MEYER, et al., 2014).

As principais aplicações clínicas da genotipagem de grupos sanguíneos incluem a confirmação de discrepâncias ABO e RhD (especialmente de antígenos fracamente expressos em hemácias de doadores), determinação de zigozidade do antígeno RhD (principalmente em pais RhD positivos), auxílio no processo

de identificação de anticorpos de pacientes recentemente transfundidos e a busca de sangue com fenótipo compatível para os mesmos. Estudos mostram que a presença de leucócitos nos produtos de sangue transfundidos não interferem na genotipagem de grupos sanguíneos (REID, 1997; REID et al., 2000a; RIOS, 1999; ROZMAN et al., 2000; CASTILHO et al., 2002a). Outra aplicação clínica da genotipagem inclui situações onde as hemácias estão revestidas com anticorpos IgG (teste direto da antiglobulina positivo - TAD+), pois a maioria dos antissoros utilizados para a fenotipagem são reativos pelo teste da antiglobulina (REID et al., 2000a; CASTILHO et al., 2001; HILLYER et al., 2008).

A genotipagem molecular tem sido utilizada para identificar pacientes falciformes com fenótipo Fy(b-), que podem ser transfundidos de forma segura com hemácias Fy(b+), sem o risco de desenvolverem anticorpos anti-Fy^b (REID e RIOS, 1999; CASTILHO et al., 2000). Dois terços da população de origem Africana com fenótipo Fy(a-b-) possuem o gene *FY*B* com uma mutação no promotor eritróide (GATA). Essa mutação quando presente, leva a ausência de expressão da proteína Duffy e, conseqüentemente, do antígeno Fy^b na superfície das hemácias. No entanto, a proteína é expressa em outros tecidos, como por exemplo, nas células do endotélio de vasos sanguíneos (TOURNAMILLE et al., 1995; IWAMOTO et al., 1996; PARASOL et al., 1998).

A genotipagem pode ser empregada na seleção do sangue a ser transfundido em pacientes que apresentam anticorpos dirigidos a antígenos de alta frequência populacional (REID e LOMAS-FRANCIS, 2002). Isto é particularmente útil quando os antissoros não estão comercialmente disponíveis ou apresentam reatividade fraca. Isso pode ser visualizado na genotipagem molecular de pacientes e doadores de sangue para a identificação do antígeno Vel, recentemente descrito (BALLIF et al., 2013). O fenótipo Vel- é um dos mais difíceis de serem identificados em muitos países. Isso pode ser explicado em parte pela raridade do tipo sanguíneo Vel-, mas também pela falta de rastreios em doadores de sangue. Doadores de sangue podem ser erroneamente fenotipados como Vel- devido à baixa expressão do antígeno nas hemácias, e isso pode colocar em risco transfusional pacientes com anti-Vel. O anti-Vel é de grande importância clínica, pois apresenta uma atividade hemolítica agressiva e está

envolvido em reações transfusionais hemolíticas agudas e tardias que podem induzir falência renal (BALLIF et al., 2013).

Pelo exposto, a implantação dos testes moleculares permite uma compatibilidade entre pacientes e doadores mais exata que pode diminuir o risco de reações transfusionais devido a aloanticorpos existentes e prevenir a aloimunização. Além disso, pode proporcionar um aumento na eficácia e na segurança transfusional, reduzindo a necessidade de transfusões e o risco de lesão pulmonar aguda relacionada a transfusão (COSTA et al., 2013). Em adição, a genotipagem também possibilita rastreios em busca de doadores portadores de fenótipos raros, até então limitados devido a indisponibilidade de reagentes comerciais ou fracamente reativos.

Embora alguns protocolos de genotipagem de grupos sanguíneos estejam bem estabelecidos e já validados em algumas populações brasileiras, principalmente em laboratórios de referência em imuno-hematologia, no estado de Santa Catarina a implantação e a validação dessas metodologias se faz necessária.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Amostras utilizadas

4.1.1. Amostras de doadores de sangue e pacientes

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (CEPSH nº2270/2011) e a assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foram coletadas amostras de sangue anticoaguladas com EDTA de 373 doadores voluntários de sangue, atendidos no Hemocentro de Santa Catarina (HEMOSC) no período de agosto de 2011 a abril de 2014 e de 31 pacientes portadores de hemopatias que necessitavam de transfusões e que estavam sendo acompanhados pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina e pelo Hemocentro de Santa Catarina (HEMOSC).

As amostras incluídas nesse estudo foram amostras de doadores de sangue de repetição, tipo sanguíneo O, que tinham doado sangue mais de uma vez, procedentes de sete regiões do estado de Santa Catarina (Florianópolis, Lages, Blumenau, Joaçaba, Criciúma, Chapecó e Joinville), as quais compreendem a hemorrede do estado de Santa Catarina (Figura 4). Desse estudo, foram excluídas amostras de doadores de sangue que já possuíam resultados de fenotipagem eritrocitária, com tipo sanguíneo A, B e AB e procedentes de regiões que não as destacadas acima.

Figura 4: Hemorrede do Estado de Santa Catarina



Fonte: o autor

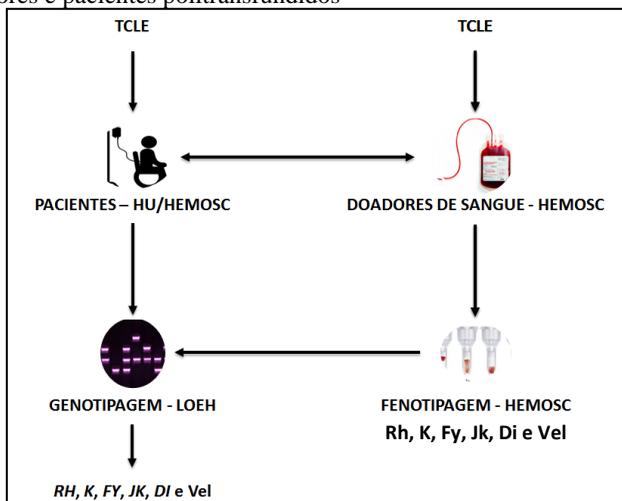
Legenda: Imagem representativa das sete regiões do estado de Santa Catarina que caracterizam o estado de onde foram coletadas as amostras de doadores voluntários de sangue.

4.1.2. Fluxograma e processamento das amostras

Após a coleta, as amostras de sangue dos doadores voluntários foram submetidas a fenotipagem eritrocitária para identificação dos antígenos dos Sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, Diego e Vel no Laboratório de Imuno-hematologia do HEMOSC (Hemocentro de Santa Catarina), e, posteriormente, enviadas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) da UFSC juntamente com as amostras dos pacientes, para serem submetidas à extração do DNA e genotipagem dos polimorfismos dos genes de grupos sanguíneos dos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, Diego e Vel.

O fluxo das amostras de doadores de sangue e pacientes pode ser visualizado no Fluxograma abaixo (Figura 5).

Figura 5: Fluxograma do processamento das amostras sanguíneas de doadores e pacientes politransfundidos



Fonte: o autor

4.2. Metodologia

4.2.1. Fenotipagem eritrocitária

A fenotipagem eritrocitária para os antígenos C, c, E, e (Sistema Rh), K, k (Sistema Kell) Fy^a, Fy^b (Sistame Duffy), Jk^a, Jk^b (Sistema Kidd), Di^a (Sistema Diego) e Vel (Sistema Vel) foi determinada nos doadores de sangue pelo teste de hemaglutinação em gel, utilizando-se cartões ID-Liss/Coombs da Bio-Rad Laboratories, Califórnia, Estados Unidos, no Laboratório de Imuno-hematologia do HEMOSC. O procedimento para a fenotipagem foi realizado conforme instruções do fabricante. Após a identificação dos cartões de fenotipagem (com 6 microtubos em cada cartão), foram preparadas suspensões de hemácias a 0,8% em LISS modificado (Diluyente 2) e 50 µl da suspensão de hemácias foram adicionadas aos microtubos contendo gel e soro antiglobulina humana. A seguir, 25 µl do antissoro diluído, contendo anticorpos específicos ao antígeno a ser estudado, foi adicionado ao mesmo tubo. Após incubação a 37°C durante 15 minutos, os cartões foram centrifugados a 70 g por 10 minutos. A leitura das reações foi realizada de acordo com os padrões de aglutinação do gel teste.

4.2.2. Extração de DNA

Depois de identificadas, todas as amostras de sangue tiveram o DNA genômico extraído de sangue total utilizando-se o kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit da empresa Qiagen® (Chattlesworth, CA, US) de acordo com o recomendado pelo fabricante do Kit de extração utilizado. Foi obtido ao final um volume de 100ul de DNA em solução de cada amostra de sangue coletado.

Após a extração do DNA a qualidade de todos os DNAs extraídos foi analisada no equipamento de espectrofotometria Nanovue Plus da empresa GE Healthcare Life Sciences, avaliando-se a densidade óptica na relação 260/280, onde valores de D.O. entre 1,7 e 1,9 e concentrações maiores que 20ng/uL foram considerados ideais para o sucesso da amplificação.

4.2.3. Genotipagem individual de grupos sanguíneos - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A genotipagem individual (dos mais importantes alelos de sistemas de grupos sanguíneos, descritos no Quadro 3 e 4 foi realizada em doadores voluntários de sangue e em pacientes portadores de hemopatias por meio da reação em cadeia da Polimerase (PCR). Para a reação foi utilizado 200 ng de DNA, 50 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (DNA Brasil) previamente descritos (RIOS et al., 1999; REID et al., 2000; SINGLETON et al., 2000; CASTILHO et al., 2002; BALLEOTI et al., 2003; BALLIF et al., 2013, 2 nmol de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies®, Grand Island, NY, USA), 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Grand Island, NY, USA) e tampão para um volume final de 50 µl. Todas as reações de PCR seguiram um protocolo padrão com variações de temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos e o número de ciclos determinados, conforme Quadro 3. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany). Vale ressaltar que previamente as reações de PCR passaram por padronização após gradiente de temperatura com variações entre 55° e 65°C para os polimorfismos dos Sistemas de grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego e a 65° a 75° para o Sistema Vel, utilizando-se amostras controle com resultados previamente determinados pela fenotipagem.

4.2.4. Genotipagem para a determinação dos polimorfismos *FY*01/FY*02*, *FY*02N.01*(mutação GATA), *KEL*01.1/KEL*02*, *JK*01/JK*02*, *DI*01/DI*02* e *RHCE*E/e* e *SMIMI*64_80 del*.

A genotipagem convencional foi realizada em amostras de DNA de doadores voluntários de sangue e de pacientes portadores de hemopatias. Para a determinação dos polimorfismos dos sistemas de grupos sanguíneos Rh (*RHCE*E/e*), Duffy, Duffy-GATA, Kell, Kidd, Diego e Vel foi realizada a técnica de PCR-RFLP (PCR seguida por análise de fragmentos com enzimas de fragmentação) com oligonucleotídeos específicos para cada sistema estudado (Quadro 3).

A análise final dos produtos de PCR foi realizada após corrida eletroforética em gel de agarose a 2,0% corados com brometo de etídio. Em seguida, os produtos de PCR amplificados foram digeridos em 12 horas de incubação com as enzimas de fragmentação (New England Biolab Beverly, MA, USA) descritos no Quadro 5, utilizando-se um volume final de 20µl, 10µl do produto de PCR e 10µl da mistura de enzima/tampão, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

A análise do tamanho dos fragmentos obtidos com a fragmentação enzimática foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2% e poliacrilamida 12% por 2 horas na voltagem de 100 volts utilizando marcador de peso molecular. O padrão encontrado nas reações pode ser observado nas Figuras 6 a 14.

4.2.5. Genotipagem *RHD*, *RHDΨ* 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 amplifica os alelos *RHCE*C/c* e avalia a presença de *RHD* pela análise dos éxon 7 e intron 4 desse gene. A detecção da duplicação de 37 pb no gene *RHD*, conhecida como pseudogene *RHD* ou *RHDΨ*, foi realizada utilizando-se o método de PCR-AS (PCR alelo específico), com um par de oligonucleotídeos específicos para essa região gênica e um par de oligonucleotídeos como controle interno (HGH – hormônio do crescimento humano). A análise dos produtos de PCR obtido foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2,0%. As

mutações de ponto associadas a este polimorfismo e as sequências dos oligonucleotídeos que foram utilizados encontram-se no Quadro 4.

Quadro 3. Sequências de oligonucleotídeos e Condições da PCR

Sistema	Oligonucleotídeos	Temperatura de Ciclagem	Referências
Diego	5' TCCCCCTCAACTGAGAACT 3' 5' TTCCTGAAGATGAGCGGCAG 3'	1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, 3 minutos e 30 segundos a 72°C em 32 ciclos.	BALLEOTI et al., 2003
Duffy	5' AAGGCTGAGCCATAACCAGAC 3' 5' AAGGCTGAGCCATAACCAGAC 3' 5' CAAGGCCAGTGACCCCCATA 3' 5' CATGGCACCGTTTGGTTCAG 3'	1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, 1 minuto a 72°C em 35 ciclos.	CASTILHO et al., 2002
Kell	5' AAGCTTGAGGGCTGGCGCAT 3' 5'CCTCACCTGGATGACTGGTG 3'		
Kidd	5'TGAGATCTTGGCTTCCTAGG 3' 5'ATTGCAATGCAGGCCAGAGA 3'		
Vel	5'CTGGAGTGTGCTGGAAGGA 3' 5'AGAGAGGAGGCTGTAGCTG 3'	1 minuto a 95°C, 1 minuto a 62°C 1 minuto a 72°C, 7 minutos a 72°C em 35 ciclos.	BALLIF et al., 2013

Fonte: o autor

Quadro 4. Sequências de oligonucleotídeos e Condições da PCR

Sistema	Oligonucleotídeos	Temperatura de Ciclagem	Referências
Rh	<i>RHCE*E/e</i> 5'GGCAACAGAGCAAGAGTCCA 3' 5'CTGATCTTCCTTTGGGGGTG 3'	20 segundos a 94°C, 20 segundos a 62°C, 20 segundos a 72°C em 35 ciclos.	RIOS et al., 1999; REID et al., 2000
	<i>RHD</i> 5'AGCTCCATCATGGGCTACAA 3' 5' ATT GCCGGCTCCGACGGTATC 3' 5' GGGTTGGCTGGGTAAGCTCT 3' 5'GAACCTGCTCTGTGAAGTGCT 3'	15 segundo a 95°C, 15 segundos a 94°C, 1 minuto a 65,5°C, 3 minutos e 30 segundos a 72°C (30 ciclos); 72°C por 10' e 4°C.	REID et al., 2000, SINGLETO N et al., 2000
	<i>RHCE*C/c</i> 5' CAGGGCCACCACCTTTGAA 3' 5' GAACATGCCACTTCACTCCAG 3' 5'TCGGCCAAGATCTGACCG 3' 5' TGATGACCACCTTCCCAGG 3'	1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, 3 minutos e 30 segundos a 72°C	SINGLETO N et al., 2000
	<i>RHDψ</i> 5'AATAAAACCAGTAAGTTCATGTGG 3' 5'AACCTGGGAGGCAAATGTTT 3'	1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, 3 minutos e 30 segundos a 72°C	SINGLETO N et al., 2000
	HGH 5'TGCCTTCCCAACCATCCCTTA 3' 5'CCACTCACGGATTCTGTGTGTTTC 3'	1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, 3 minutos e 30 segundos a 72°C	SINGLETO N et al., 2000

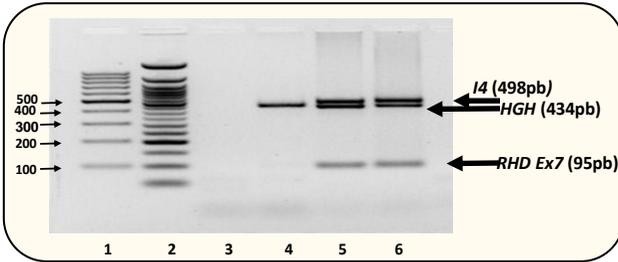
Fonte: o autor

Quadro 5: Enzimas utilizadas para a fragmentação enzimática dos produtos das PCR-RFLP e tamanho dos fragmentos das reações

Sistema/ Alelos	Alelos	Polimorfismo	Enzima fragmentação	Fragmentos (pb)
Diego	<i>DI*01/DI*02</i>	2561 T>C	<i>Msp I</i>	149, 79 e 70
Duffy	<i>FY*01/FY*02</i>	125 G>A	<i>Ban I</i>	306, 210, 96 e 86
	<i>FY*02N.01</i>	- 67 T>C	<i>Sty I</i>	189, 108, 81 e 61
Kell	<i>KEL*01.1/KEL*02</i>	698 T<C	<i>Bsm I</i>	156, 100 e 56
Kidd	<i>JK*01/JK*02</i>	838 G>A	<i>Mnl I</i>	110, 80 e 50
	<i>RHCE*E/e</i>	676 G>C	<i>Mnl I</i>	152 e 115
Rh	<i>RHD</i>			498 e 95
	<i>RHDΨ</i>			250
	<i>RHCE*C/c</i>			320, 177
Vel	<i>SMIMI*64_80 del</i>	17nt deletion	<i>Sty I</i>	1200, 800 e 400

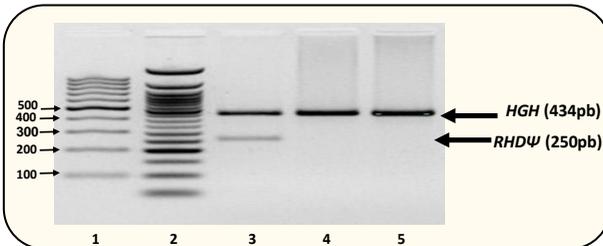
Fonte: o autor

Figura 6: Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação do gene *RHD*



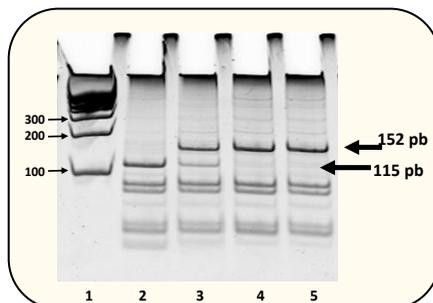
Coluna 1: Marcador de tamanho molecular de 100 pb; Coluna 2: Marcador de tamanho molecular de 50 pb; Coluna 3: Controle negativo; Coluna 4: amostra *RHD* negativo; Colunas 5 e 6: amostras *RHD* positivas.

Figura 7: Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação do *RHD Ψ* (*pseudogene*)



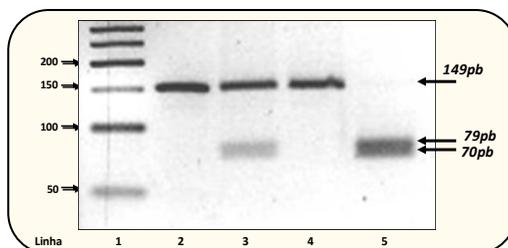
Coluna 1: Marcador de tamanho molecular de 100 pb; Coluna 2: Marcador de tamanho molecular de 50 pb; Coluna 3: Amostra *RHD Ψ* positiva; Coluna 4 e 5: Amostras *RHD Ψ* negativas.

Figura 8: Imagem ilustrativa do gel de poliacrilamida a 12% para identificação dos alelos *RHCE*E/e*



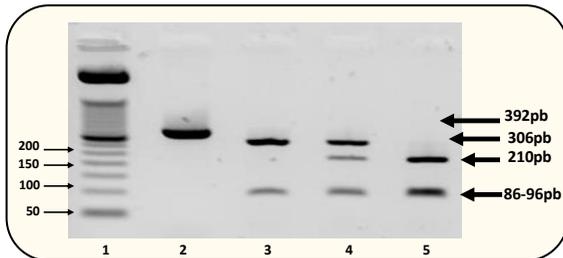
Coluna 1: Marcador de tamanho molecular de 100 pb; Coluna 2: Amostra homocigota para o alelo *RHCE*E* apresentando o genótipo *RHCE*EE*; Coluna 3: Amostra heterocigota para os alelos *RHCE*E* e *RHCE*e* apresentando o genótipo *RHCE*Ee*; Coluna 4 e 5: Amostras homocigotas para o alelo *RHCE*e* apresentando o genótipo *RHCE*ee*.

Figura 9: Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação dos polimorfismos *DI*01/DI*02*



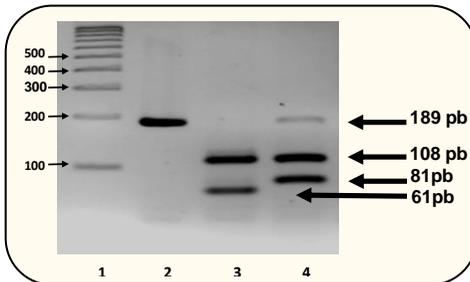
Coluna 1: Marcador de tamanho molecular de 50 pb; Coluna 2: Produto de PCR; Coluna 3: Amostra heterocigota para os alelos *DI*01* e *DI*02* apresentando o genótipo *DI*01/DI*02*; Coluna 4: amostra homocigota para o alelo *DI*01* apresentando o genótipo *DI*01/DI*01* e Linha 5: amostra homocigota para o alelo *DI*02*, com o genótipo *DI*02/DI*02*. Os alelos *DI*01* e *DI*02* correspondem aos antígenos Di^a e Di^b , respectivamente.

Figura 10: Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação dos polimorfismos *FY*01/FY*02*



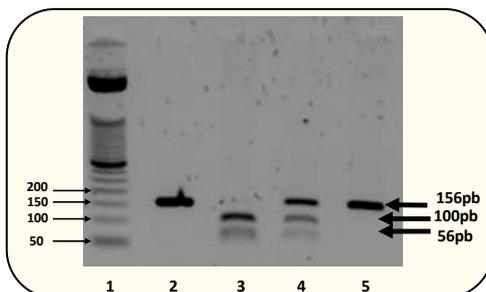
Coluna 1: Marcador de tamanho molecular de 50pb; Coluna 2: Produto da PCR; Linha 3: Amostra homocigota para o alelo *FY*01* apresentando o genótipo *FY*01/FY*01*; Coluna 4: Amostra heterocigota para os alelos *FY*01* e *FY*02* apresentando o genótipo *FY*01/FY*02*; Coluna 5: Amostra homocigota para o alelo *FY*02*, apresentando o genótipo *FY*02/FY*02*. Os alelos *FY*01* e *FY*02* correspondem aos antígenos Fy^a e Fy^b , respectivamente.

Figura 11: Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo *GATA Normal (-67T/T)* e *Mutado (-67C/C)*



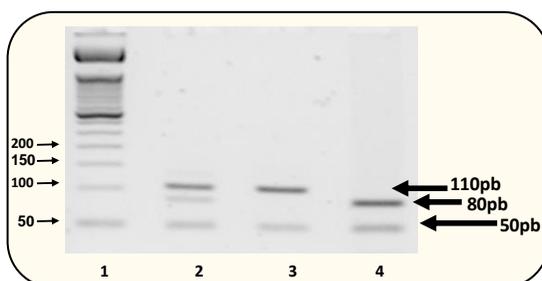
Coluna 1: Marcador de tamanho molecular de 100pb; Coluna 2: Produto de PCR; Coluna 3: Amostra heterocigota para a mutação *GATA -67 C/T*; Coluna 4: Amostra homocigota para o alelo normal, sem a mutação *GATA -67 C/T*, genótipo *GATA -67T/T*.

Figura 12: Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo *KEL*01.1/KEL*02*



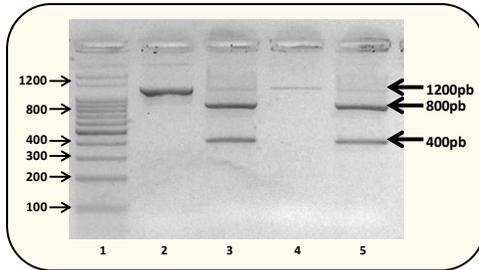
Coluna 1: Marcador de tamanho molecular de 50 pb; Coluna 2: Amostra de PCR; Coluna 3: Amostra homocigota para o alelo *KEL*02* com o genótipo *KEL*02/KEL*02*; Coluna 4: Amostra heterocigota para os alelos *KEL*01.1* e *KEL*02*, com o genótipo *KEL*01.1/KEL*02*; Coluna 5: Amostra homocigota para o alelo *KEL*01.1*, com o genótipo *KEL*01.1/KEL*01.1*. Os alelos *KEL*01.1* e *KEL*02* correspondem aos antígenos K (Kell) e k (celano), respectivamente.

Figura 13: Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo *JK*01/JK*02*



Coluna 1: Marcador de tamanho molecular de 50 pb; Coluna 2: Amostra heterocigota para os alelos *JK*01* e *JK*02* apresentando o genótipo *JK*01/JK*02*; Coluna 3: Amostra homocigota para o alelo *JK*02* apresentando o genótipo *JK*02/JK*02*; Coluna 4: Amostra homocigota para o alelo *JK*01*, apresentando o genótipo *JK*01/JK*01*; Os alelos *JK*01* e *JK*02* correspondem aos antígenos Jk^a e Jk^b, respectivamente.

Figura 14: Imagem ilustrativa do gel de agarose a 2% para identificação do alelo *SMIMI*64_80 del*



Coluna 1: Marcador de tamanho molecular de 100 pb; Coluna 2: Amostra de PCR; Coluna 3: Amostra homocigota para o alelo *Wild type* que caracteriza o fenótipo Vel +; Coluna 4: amostra homocigota para o alelo *SMIMI*64_80 del* que caracteriza o fenótipo Vel-; Coluna 5: Amostra heterocigota *Wild type/SMIMI*64_80 del*.

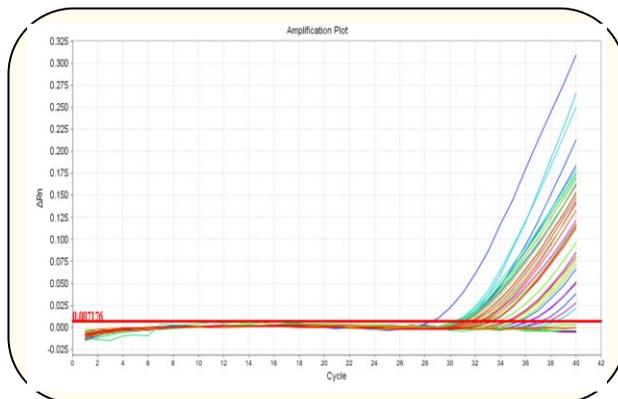
4.2.6. Análise por PCR em tempo real do alelo *SMIMI*64_80 del*

Para a avaliação do alelo *SMIMI*64_80 del* oligonucleotídeos específicos foram desenhados utilizando o software Primer 3⁸ para região 127 pb do éxon 3 do gene *SMIMI*. Uma sonda interna a amplificação foi sintetizada e a extremidade 3' foi desenhada para específica hibridização da sequência de nucleotídeo, a qual existe somente em indivíduos que carregam a deleção de 17pb (GenBank NM_001163724). Todos os oligonucleotídeos e sondas foram previamente descritos por DEZAN et al., 2015.

Os oligonucleotídeos e as sondas foram sintetizados junto com a ferramenta PrimeTime q PCR assay (IDT, USA). A PCR Real-Time foi realizada de acordo com o protocolo previamente descrito por DEZAN et al., (2015) como segue: 10uL de Master Mix (Applied Biosystems®), 1uL de solução de oligonucleotídeos/probes na concentração final de 500nM de primers e 250nM de sonda) e 9uL de DNA extraído de buffy-coat de leucócitos de sangue periférico. Ao final 20uL da reação foi submetida a análise pelo sistema de análise StepOne™ Real Time PCR (Applied Biosystems®) programado para incubação de 50°C de 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguido por 50 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 minuto. Todas as amostras positivas para o alelo pesquisado foram repetidas em triplicata

para confirmar os resultados e a média de Ct observada foi de 32,97.

Figura 15: Imagem obtida da PCR em tempo real qualitativa de amostras com a presença do alelo *SMIMI*64_80 del*



4.2.7. Análise estatística

As frequências genótípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta em planilhas do programa Excel (Microsoft® Office Excel 2007). Foi realizada a comparação das frequências gênicas e alélicas de grupos sanguíneos entre a população de doadores voluntários de sangue do presente estudo e de doadores de sangue do Paraná (GUELSIN et al., 2010), São Paulo (PELLEGRINO et al., 2001; RIBEIRO et al., 2009) e Bahia (COSTA, 2011). A comparação das frequências foi realizada por meio do Teste do Qui-quadrado com correção de Yate's, utilizando o software Openepi (<http://www.openepi.com/v37/twobytwo/twobytwo.htm>) ou teste exato de Fisher, quando adequado, usando uma tabela de contingência 2x2 (SVEJGAARD et al., 1974), utilizando o software *SISA (Simple Interactive Statistical Analysis)*. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Genotipagem eritrocitária dos polimorfismos de grupos sanguíneos em amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes portadores de hemopatias

A genotipagem eritrocitária dos polimorfismos de grupos sanguíneos do Sistema Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego foi realizada em todas as 373 amostras de doadores voluntários de sangue e 31 amostras de pacientes portadores de hemopatias.

Das 373 amostras de doadores de sangue das sete regiões de Santa Catarina, 105 (28,2%) eram de Florianópolis, 47 (12,6%) de Blumenau, 55 (14,7%) de Lages, 36 (9,7%) de Chapecó, 58 (15,5%) de Criciúma, 33 (8,8%) de Joaçaba e 39 (10,5%) de Joinville.

A análise dos resultados da genotipagem de grupos sanguíneos das 373 amostras e 31 amostras de pacientes possibilitou a determinação da frequência genotípica e a frequência alélica dos principais genes de grupos sanguíneos em uma população de doadores voluntários de sangue e pacientes portadores de hemopatias. Os resultados observados, separados por sistemas de grupos sanguíneos, estão descritos abaixo e podem ser visualizados nas Tabelas 1 a 4.

5.1.1. Sistema Rh

5.1.1.1. Doadores voluntários de sangue

Entre as 373 amostras de doadores de sangue analisadas, 159 (42,6%) foram genotipadas como $RHCE^*Cc$, 154 (41,3%) como $RHCE^*cc$ e 60 (16,1%) $RHCE^*CC$. As frequências alélicas encontradas para $RHCE^*C$ e $RHCE^*c$ foram de 0,55 e 0,45, respectivamente. Além disso, 268 (71,8%) amostras foram genotipadas como $RHCE^*ee$, 95 (25,5%) $RHCE^*Ee$, 10 (2,7%) $RHCE^*EE$, e as frequências alélicas obtidas foram 0,15 para o alelo $RHCE^*E$ e de 0,85 para $RHCE^*e$ (Tabela 1).

5.1.1.2. Pacientes

O genótipo mais frequente observado nos pacientes foi $RHCE^*Cc$ em 16 (51,6%), seguido de $RHCE^*CC$ em 9 (29,0%) e $RHCE^*cc$ em 6 (19,4%) amostras. Além disso, foram encontradas 24 (71,8%) amostras com o genótipo $RHCE^*ee$, 6 (19,4%) $RHCE^*Ee$ e uma (3,2%) $RHCE^*EE$. As frequências

observadas para os alelos $RHCE^*C$, $RHCE^*c$, $RHCE^*E$ e $RHCE^*e$ foram de 0,55, 0,45, 0,13 e 0,87, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Frequência genotípica e alélica em doadores e pacientes para o Sistema Rh

Fenótipo	Genótipo	Doadores		Pacientes	
		n	f(%)	n	f(%)
C+ c-	$RHCE^*CC$	60	16,1	9	29,0
C+ c+	$RHCE^*Cc$	159	42,6	16	51,6
C- c+	$RHCE^*cc$	154	41,3	6	19,4
E+ e-	$RHCE^*EE$	10	2,7	1	3,2
E+ e+	$RHCE^*Ee$	95	25,5	6	19,4
E- e+	$RHCE^*ee$	268	71,8	24	77,4
Antígeno	Alelos	Frequência			
C	$RHCE^*C$	0,37		0,55	
C	$RHCE^*c$	0,63		0,45	
E	$RHCE^*E$	0,15		0,13	
e	$RHCE^*e$	0,85		0,87	

5.1.2. Sistema Kell

5.1.2.1. Doadores voluntários de sangue

Na análise dos resultados das amostras de doadores para o Sistema Kell, o genótipo mais frequente foi KEL^*02/KEL^*02 observado em 350 (94,0%) amostras, seguido do genótipo $KEL^*01.1/KEL^*02$ presente em 23 (6,0%) amostras. O genótipo $KEL^*01.1/KEL^*01.1$ não foi observado em nenhuma amostra. A frequência do alelo $KEL^*01.1$ foi 0,03 e do KEL^*02 , 0,97 (Tabela 2).

5.1.2.2. Pacientes

O genótipo mais frequente observado nas amostras de pacientes foi KEL^*02/KEL^*02 , presente em 28 (90%) amostras, seguido do genótipo $KEL^*01.1/KEL^*02$ em duas (6%) amostras e $KEL^*01.1/KEL^*01.1$ em uma (3%) amostra. A frequência do alelo $KEL^*01.1$ foi 0,03 e do KEL^*02 , 0,97 (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência genotípica e alélica em doadores e pacientes para o Sistema Kell

Fenótipo	Genótipo	Doadores		Pacientes	
		n	f(%)	N	f(%)
K+ k-	<i>KEL*01.1/KEL*01.1</i>	0	0	1	3
K+ k+	<i>KEL*01.1/KEL*02</i>	23	6,0	2	6
K- k+	<i>KEL*02/KEL*02</i>	350	94,0	28	90
Antígeno	Alelos	Frequência			
K	<i>KEL*01.1</i>	0,03		0,03	
K	<i>KEL*02</i>	0,97		0,97	

5.1.3. Sistema Duffy

5.1.3.1. Doadores voluntários de sangue

O genótipo mais frequente nas amostras de doadores para o Sistema Duffy foi *FY*01/FY*01*, presente em 176 (47,2%) amostras, seguido do genótipo *FY*02/FY*02*, presente em 107 (28,7%) amostras e *FY*01/FY*02* em 57 (15,3%) amostras. A mutação *-67T/C* que ocorre no promotor eritroide e previne a expressão do antígeno FY:2 (Fy^b) na membrana do eritrócito também foi avaliada. Assim, do total de amostras analisadas, 26 (7,0%) apresentaram o genótipo GATA *-67T/C*, sete (2,0%) GATA *-67C/C* e 340 (91,0%) amostras GATA *-67T/T*, ou seja, não apresentaram a mutação. Todas as amostras homocigotas para a mutação, genótipo GATA *-67C/C*, apresentaram o genótipo *FY*02N.01/FY*02N.01*, que corresponde ao fenótipo Fy(a-b-). Do total das amostras heterocigotas para a mutação GATA *-67T/C*, 12(3,2%) apresentaram o genótipo *FY*01/FY*02N.01* que corresponde ao fenótipo Fy(a+b-), e 14 (3,8%), o genótipo *FY*02/FY*02N.01*, que corresponde ao fenótipo Fy(a-b+). Esse fenótipo é caracterizado pela redução da expressão do antígeno Fy^b na membrana do eritrócito. A frequência dos alelos *FY*01*, *FY*02* e *FY*02N.01* foi de 0,41, 0,54 e 0,05, respectivamente, (Tabela 3).

5.1.3.2. Pacientes

Na análise das frequências genotípicas nas amostras de pacientes para o Sistema Duffy, foi observado maior frequência do genótipo *FY*02/FY*02*, presente em 12 (38,7%) amostras, seguido do genótipo *FY*01/FY*02*, em 11 (3,5%) amostras e *FY*01/FY*01*, em três (9,7%) amostras. Na análise realizada em

relação à mutação $-67T/C$, foi possível identificar somente 5 (16,1%) amostras com o genótipo $FY*01/FY*02N.01$ que corresponde ao fenótipo $Fy(a+b-)$. A frequência alélica observada foi de 0,35 para o alelo $FY*01$, 0,57 para o alelo $FY*02$ e 0,08 para o alelo $FY*02N.01$ (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência genotípica e alélica em doadores e pacientes para o Sistema Duffy

Fenótipo	Genótipo	Doadores		Pacientes	
		N	f(%)	N	f(%)
Fy(a+b+)	$FY*01/FY*02$	176	47,2	11	35,5
Fy(a+b-)	$FY*01/FY*01$	57	15,3	3	9,7
	$FY*01/FY*02N.01$	12	3,2	5	16,1
Fy(a-b+)	$FY*02/FY*02$	107	28,7	12	38,7
	$FY*02/ FY*02N.01$	14	3,8	0	0
Fy(a-b-)	$FY*02N.01/ FY*02N.01$	7	1,8	0	0
Antígeno	Alelos	Frequência			
Fy ^a	$FY*01$	0,41		0,35	
Fy ^b	$FY*02$	0,54		0,57	
	$FY*02N.01$	0,05		0,08	

5.1.4. Sistema Kidd

5.1.4.1. Doadores voluntários de sangue

O genótipo mais frequente observado para o Sistema Kidd foi o $JK*01/JK*02$, presente em 156 (46,3%) amostras, seguido do genótipo $JK*01/JK*01$ observado em 104 (30,9%) amostras e $JK*02/JK*02$ em 77 (22,8%) amostras. As frequências alélicas observadas foram 0,54 para o alelo $JK*01$ e 0,46 para o alelo $JK*02$ (Tabela 4).

5.1.4.2. Pacientes

Na análise dos resultados das amostras de pacientes foi observada que o genótipo $JK*01/JK*02$ foi o mais frequente, presente em 18 (58%) amostras, seguido do genótipo $JK*01/JK*01$, presente em 10 (32%) amostras e $JK*02/JK*02$ em três (10%) amostras. As frequências dos alelos $JK*01$ e $JK*02$ foram de 0,61 e de 0,39, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência genotípica e alélica em doadores e pacientes para o Sistema Kidd

Fenótipo	Genótipo	Doadores		Pacientes	
		n	f(%)	N	f(%)
Jk(a+b+)	<i>JK*01/JK*02</i>	176	47,2	18	58
Jk(a+b-)	<i>JK*01/JK*01</i>	110	29,5	10	32
Jk(a-b+)	<i>JK*02/JK*02</i>	87	23,3	3	10
Antígeno	Alelos	Frequência			
Jk ^a	<i>JK*01</i>	0,54		0,61	
Jk ^b	<i>JK*02</i>	0,46		0,39	

5.1.5. Sistema Diego

5.1.5.1. Doadores voluntários de sangue

Nas análises das frequências genotípicas das amostras de doadores para o Sistema Diego, o genótipo *DI*02/DI*02* foi o mais frequente, presente em 352 (94,4%) amostras, seguido pelo genótipo *DI*01/DI*02* presentes em 21 (5,6%) amostras. O genótipo *DI*01/DI*01* não foi encontrado. A frequência alélica observada foi de 0,03 para o alelo *DI*01* e de 0,97 para o alelo *DI*02* (Tabela 5).

5.1.5.2. Pacientes

O genótipo mais frequente observado foi *DI*02/DI*02*, presente em 27 (87,1%) amostras, seguido do genótipo *DI*01/DI*02*, presente em quatro (12,9%) amostras. O genótipo *DI*A/DI*A* não foi observado em nenhuma amostra. A frequência alélica observada foi de 0,06 para o alelo *DI*01* e de 0,94 para o alelo *DI*02* (Tabela 5).

Tabela 5: Frequência genotípica e alélica em doadores e pacientes para o Sistema Diego

Fenótipo	Genótipo	Doadores		Pacientes	
		n	f(%)	N	f(%)
Di(a+b+)	<i>DI*01/DI*02</i>	21	5,6	4	12,9
Di(a+b-)	<i>DI*01/DI*01</i>	0	0	0	0
Di(a-b+)	<i>DI*02/DI*02</i>	352	94,4	27	87,1
Antígeno	Alelos	Frequência			
Di ^a	<i>DI*01</i>	0,03		0,06	
Di ^b	<i>DI*02</i>	0,97		0,94	

As frequências genotípicas e alélicas dos doadores de sangue das sete regiões de Santa Catarina também foram determinadas separadamente e podem ser visualizadas na Tabela 6.

Tabela 6: Frequência genotípica e alélica em doadores das regiões de Santa Catarina

Sistema	Genótipos/Alelos	FLN N105	BLU N47	LGS N55	CPO N36	CRI N58	JOA N33	JOI N39
Rh	<i>RHCE*CC</i>	0,14 (15)	0,15 (7)	0,16 (9)	0,19 (7)	0,10 (6)	0,24 (8)	0,21 (8)
	<i>RHCE*Cc</i>	0,49 (50)	0,36 (17)	0,42 (23)	0,50 (18)	0,33 (19)	0,43 (14)	0,46 (18)
	<i>RHCE*cc</i>	0,38 (40)	0,49 (23)	0,42 (23)	0,31 (11)	0,57 (33)	0,33 (11)	0,33 (13)
	<i>RHCE*C</i>	0,39	0,33	0,33	0,44	0,27	0,45	0,44
	<i>RHCE*c</i>	0,61	0,67	0,64	0,56	0,73	0,55	0,56
	<i>RHCE*EE</i>	0 (0)	0,02 (1)	0,04 (2)	0,06 (2)	0,09 (5)	0,06 (2)	0 (0)
	<i>RHCE*Ee</i>	0,26 (27)	0,30 (14)	0,29 (16)	0,28 (10)	0,24 (14)	0,82 (27)	0,25 (10)
	<i>RHCE*ee</i>	0,74 (78)	0,68 (32)	0,67 (37)	0,67 (24)	0,67 (39)	0,12 (4)	0,74 (29)
<i>RHCE*E</i>	0,13	0,17	0,18	0,19	0,21	0,47	0,13	
<i>RHCE*e</i>	0,87	0,83	0,82	0,81	0,79	0,53	0,87	
Kell	<i>KEL*01.1/KEL*01.1</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>KEL*01.1/KEL*02</i>	0,08 (8)	0,09 (4)	0,13 (7)	0,03 (1)	0,02 (1)	0,03 (1)	0,03 (1)
	<i>KEL*02/KEL*02</i>	0,92 (97)	0,91 (43)	0,87 (48)	0,97 (35)	0,98 (57)	0,97 (32)	0,97 (38)
	<i>KEL*01.1</i>	0,04	0,04	0,06	0,01	0,01	0,01	0,01
	<i>KEL*02</i>	0,96	0,96	0,97	0,99	0,99	0,99	0,99
Duffy	<i>FY*01/FY*01</i>	0,11 (12)	0,15 (7)	0,11 (6)	0,22 (8)	0,16 (9)	0,16 (5)	0,23 (9)
	<i>FY*01/FY*02</i>	0,50 (52)	0,47 (22)	0,45 (25)	0,50 (18)	0,47 (27)	0,39 (13)	0,49 (19)
	<i>FY*01/FY*02.N01</i>	0 (0)	0,04 (2)	0,07 (4)	0,03 (1)	0,07 (4)	0,03 (1)	0 (0)
	<i>FY*02/FY*02</i>	0,32 (34)	0,30 (14)	0,31 (17)	0,19 (7)	0,26 (15)	0,33 (11)	0,26 (10)
	<i>FY*02/FY*02.N01</i>	0,06 (6)	0,02 (1)	0,04 (2)	0,06 (2)	0,03 (2)	0,03 (1)	0 (0)
	<i>FY*02.N01/FY*02.N01</i>	0,01(1)	0,02 (1)	0,02 (1)	0 (0)	0,01 (1)	0,06 (2)	0,02(1)
	<i>FY*01</i>	0,36	0,40	0,37	0,49	0,42	0,36	0,47
	<i>FY*02</i>	0,60	0,54	0,55	0,47	0,51	0,55	0,50
<i>FY*02.N01</i>	0,04	0,06	0,08	0,04	0,07	0,09	0,03	
Kidd	<i>JK*01/JK*01</i>	0,26 (27)	0,49 (22)	0,31 (17)	0,19 (7)	0,31 (18)	0,30 (10)	0,23 (9)
	<i>JK*01/JK*02</i>	0,51 (54)	0,33 (16)	0,49 (27)	0,61 (22)	0,38 (22)	0,45 (15)	0,51 (20)
	<i>JK*02/JK*02</i>	0,23 (24)	0,18 (9)	0,20 (11)	0,20 (7)	0,31 (18)	0,24 (8)	0,26 (10)
	<i>JK*01</i>	0,51	0,64	0,55	0,50	0,50	0,53	0,49
	<i>JK*02</i>	0,49	0,36	0,45	0,50	0,50	0,47	0,51
Diego	<i>DI*01/DI*01</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>DI*01/DI*02</i>	0,06 (6)	0,09 (4)	0,05 (3)	0,11 (4)	0,02 (1)	0,03 (1)	0,05 (2)
	<i>DI*02/DI*02</i>	0,94 (99)	0,91 (43)	0,95 (52)	0,89 (32)	0,98 (57)	0,97 (32)	0,95 (37)
	<i>DI*01</i>	0,03	0,04	0,03	0,06	0,01	0,02	0,03
	<i>DI*02</i>	0,97	0,96	0,97	0,94	0,99	0,98	0,97

5.2 Concordância entre os resultados da fenotipagem e genotipagem

Os resultados encontrados na genotipagem para os sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego neste estudo foram concordantes para a maioria das amostras de doadores e pacientes analisadas com os fenótipos determinados pelo método de fenotipagem baseado no princípio da hemaglutinação. No entanto, para o sistema Rh foram encontradas discordâncias em seis amostras de doadores, fenotipadas inicialmente com RhC+c+ e genotipadas como *RHCE*cc* que corresponde ao fenótipo RhC-c+. Além disso, para o sistema Kidd, oito amostras foram fenotipadas como Jk(a+b-) e genotipadas como *JK*01/JK*02*, três amostras fenotipadas como Jk(a+b+) e genotipadas como *JK*01/JK*01* e outras duas amostras como Jk(a-b+) e genotipadas como *JK*01/JK*02*.

Para o sistema Duffy, foram observadas 20 discrepâncias entre os resultados de fenotipagem e de genotipagem (Tabela 7). Essas discrepâncias estão relacionadas aos polimorfismos GATA-67T/C, os quais são responsáveis pela ausência da expressão do antígeno Fy^b nos eritrócitos. As amostras foram genotipadas como *FY*02 (FY*B)* e fenotipadas como Fy(b-), dessas 17 eram amostras de doadores e três de pacientes.

Tabela 7: Amostras com resultados discordantes entre a genotipagem e fenotipagem para o Sistema Duffy

Sistema	N. Amostras		Fenótipo	Genótipo	
	Doadores	Pacientes			
Rh	5	0	Rh(C+c+)	<i>RHCE*cc</i>	
Kidd	8	0	Jk(a+b-)	<i>JK*01/JK*02</i>	
	3	0	Jk(a+b+)	<i>JK*01/JK*01</i>	
	2	0	Jk(a-b+)	<i>JK*01/JK*02</i>	
Duffy				<i>FY</i>	GATA-67T>C
	10	3	Fy(a+b-)	<i>FY*01/FY*02</i>	TC
	7	0	Fy(a-b-)	<i>FY*02/FY*02</i>	CC
Total	17	3			

5.3. Identificação de pacientes Fy(b-) que apresentaram a mutação -67T/C

Na análise dos resultados para o sistema Duffy, dos 31 pacientes que necessitaram de transfusão estudados, cinco (16,1%) pacientes portadores de anemia falciforme apresentaram o fenótipo Fy(b-), que teoricamente poderiam receber sangue Fy(b+) pois apresentam a mutação -67T/C no promotor eritroide GATA (alelo *FY*02.N01*).

5.4. Aloimunização nos pacientes portadores de hemopatias

Dos 31 pacientes participantes desse estudo, somente cinco amostras apresentaram a identificação dos anticorpos irregulares e estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8: Aloanticorpos de grupos sanguíneos em 5/31 pacientes portadores de hemopatias politransfundidos

Nº Pacientes	Anticorpos identificados
2	Anti-c, E, K
1	Anti-E
1	Anti-Fy ^a , Jk ^a
1	Anti-E, K
5	Total

Esses resultados observados corroboraram a dados da literatura que relatam que esses anticorpos estão mais envolvidos no aloimunização de pacientes politransfundidos.

5.5. Identificação de fenótipos de difícil caracterização sorológica

A partir da análise dos resultados da genotipagem das amostras de doadores e pacientes, foi possível detectar a presença de 25 amostras portadoras do fenótipo de difícil caracterização sorológica Di(a+b+). Esse fenótipo é de difícil caracterização sorológica, devido à ausência de antissoros comerciais para identificação do antígeno de alta frequência Di^b.

5.6. Sistema Vel

Das 448 amostras de DNA analisadas de doadores voluntários de sangue de sete regiões que caracterizam o estado

de Santa Catarina, 10 (2,23%) foram positivas para a deleção de 17pb (*64_80del*) do gene *SMIM1* em pelo menos um alelo (10/448 = 2,23%).

As dez amostras positivas para a deleção foram caracterizadas como heterozigotas para o alelo *SMIM1*64_80 del* usando PCR-RFLP como descrito por BALLIF et al., (2013). As frequências alélicas e genóticas estão na Tabela 9.

Tabela 9: Frequência genotípica e alélica do Vel em doadores voluntários de sangue de Santa Catarina

Frequência alélica		Frequência genotípica	
<i>Wild type</i>	98,88%	<i>SMIM1*64_80 del / SMIM1*64_80 del</i>	0%
<i>SMIM1*64_80 del</i>	1,12%	<i>Wild type / SMIM1*64_80 del</i>	2,23%
		<i>Wild type / Wild type</i>	97,77%

Todas as 10 amostras heterozigotas para o alelo *SMIM1*64_80del* pela PCR-RFLP foram submetidas a análises sorológicas. As análises foram realizadas utilizando-se um antissoro anti-Vel humano e foi observado reatividade, a qual variou de uma a três cruces, o que demonstra variações na expressão do antígeno nas hemácias.

5.7. Estratégia para encontrar doadores de sangue com fenótipos raros

Foram criadas estratégias para encontrar doadores de sangue raros com o objetivo de suprir a necessidade de alguns pacientes que requerem unidades de sangue Di(b-), diante da presença de aloanticorpos anti-Di^b. Para isso, foram fenotipadas 1.931 amostras de doadores voluntários de sangue para o antígeno Di^a do Sistema de grupo sanguíneo Diego. Dessas, 56 (2,9%) apresentaram resultados positivos na fenotipagem eritrocitária, e dessa forma, foram submetidas para genotipagem de grupos sanguíneos para os alelos *DI*01 (DI*A)* e *DI*02 (DI*B)*. Do total das 56 (98,2%) amostras genotipadas, 55 amostras apresentaram resultados na genotipagem *DI*01/DI*02(DI*A/DI*B)* que determina o fenótipo Di(a+b+) e

uma amostra (1,8%) $DI*01/DI*01(DI*A/DI*A)$ que determina o fenótipo raro Di(a+b-).

5.8. Comparação das frequências genotípicas entre as sete regiões do estado de Santa Catarina

Foram realizadas comparações das frequências genotípicas observadas entre doadores de sangue das sete regiões do estado de Santa Catarina que compreendem, representam o estado. Diferenças significativas foram observadas para os genótipos $RHCE*Cc$, $RHCE*cc$, $RHCE*EE$, $RHCE*Ee$, $RHCE*ee$, $KEL*01.1/02$, $KEL*02/02$, $FY*01/FY*02.N01$, $FY*02/FY*02$, $JK*01/JK*01$, $JK*01/02$. Destaca-se que as frequências dos genótipos $RHCE*Ee$ e $RHCE*ee$ foram diferentes das outras seis regiões do estado. As diferenças significativas encontradas a partir das análises estão destacados na Tabela 10.

Tabela 10: Comparação das frequências genótípicas para os sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego entre doadores das sete regiões que caracterizam os estados de Santa Catarina

Genótipos	FLN	BLU	LGS	CPO	CRI	JOA	JOI
Alelos	N373	N47	N55	N36	N58	N33	N39
Sistema Rh							
<i>RHCE*Cc</i>					0,33 (19) ^a		
<i>RHCE*cc</i>					0,57 (33) ^{a,d}	0,33 (11) ^e	0,33 (13) ^e
<i>RHCE*EE</i>					0,09 (5) ^a		
<i>RHCE*Ee</i>						0,82 (27) ^{a,b,c,d,e}	0,25 (10) ^f
<i>RHCE*ee</i>						0,12 (4) ^{a,b,c,d,e}	0,74 (29) ^f
Sistema Kell							
<i>KEL*01.1/KEL*02</i>					0,02 (1) ^c		
<i>KEL*02/KEL*02</i>					0,98 (57) ^c		
Sistema Duffy							
<i>FY*01/FY*02.N01</i>			0,07 (4) ^a		0,07 (4) ^a		
<i>FY*02/FY*02</i>				0,19 (7) ^a			
Sistema Kidd							
<i>JK*01/JK*01</i>		0,49 (22) ^a		0,19 (7) ^b			0,23 (9) ^b
<i>JK*01/JK*02</i>		0,33 (16) ^a		0,61 (22) ^{ab}	0,38 (22) ^d		

^a Diferença significativa na comparação das frequências genótípicas de Florianópolis (FLN) e as 6 regiões do estado de Santa Catarina

^b Diferença significativa na comparação das frequências genótípicas de Blumenau (BLU) e as outras 5 regiões do estado de Santa Catarina

^c Diferença significativa na comparação das frequências genótípicas de Lages (LGS) e as outras 4 regiões do estado de Santa Catarina

^d Diferença significativa na comparação das frequências genótípicas de Chapecó (CPO) e as outras 3 regiões do estado de Santa Catarina

^e Diferença significativa na comparação das frequências genótípicas de Criciúma (CRI) e as outras 2 regiões do estado de Santa Catarina

^f Diferença significativa na comparação das frequências genótípicas de Joaçaba (JOA) e Joinville (JOI)

N = número de sujeitos estudados; *p < 0,05.

5.9. Comparação das frequências genotípicas entre doadores de estados brasileiros

Foram realizadas comparações das frequências genotípicas observadas entre doadores de Santa Catarina e outros estados brasileiros como Paraná, São Paulo e Bahia (GUELSIN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2009; PELLEGRINO et al., 2001 e COSTA et al., 2011 “dados não publicados” (Tabela 11).

Diferenças significativas foram obtidas a partir das análises entre as populações comparadas. Entre os estados de Santa Catarina e Paraná, somente polimorfismos do Sistema Duffy apresentaram diferenças significativas (Tabela 11).

Na análise das frequências genotípicas entre os estados de Santa Catarina e São Paulo muitas foram as diferenças. Os genótipos mais prevalentes no estado de Santa Catarina foram *RHCE*cc*, *RHCE*Ee*, *RHCE*ee*, *KEL*01.1/KEL*02*, *FY*01/FY*01*, *JK*01/JK*01*, *JK*01/02* e *JK*02/02* enquanto que na população do estado de São Paulo, os genótipos mais frequentes foram *RHCE*Cc*, *FY*01/FY*02*, *FY*01/FY*02.N01*, *FY*02/FY*02*, *FY*02/FY*02.N01*, *FY*02.N01/FY*02.N01*.

Tabela 11: Comparação das frequências genotípicas entre estados brasileiros

Sistema	Genótipos	SC N373	PR N400	SP-POP1 N948	SP-POP2 N250	SP-POP3 N308	BA N196
	Alelos						
<i>Rh</i>	<i>RHCE*CC</i>	0,16 (60)	0,18 (72)	0,17 (161)	0,09 (22)	0,18 (57)	0,10 (20)*
	<i>RHCE*Cc</i>	0,43 (159)	0,42 (172)	0,49 (465)*	0,33 (82)	0,40 (123)	0,40 (78)*
	<i>RHCE*cc</i>	0,41 (154)	0,40 (160)	0,34 (322)	0,58 (146)*	0,42 (128)	0,50 (98)*
	<i>RHCE*EE</i>	0,03 (10)	0,02 (8)	0,02 (19)	0,02 (6)	0,02 (7)	0,02 (4)*
	<i>RHCE*Ee</i>	0,25 (95)	0,26 (104)	0,26 (246)	0,10 (25)*	0,20 (61)*	0,19 (37)*
	<i>RHCE*ee</i>	0,72 (268)	0,72 (288)	0,72 (683)	0,88 (219)*	0,78 (240)*	0,79 (155)*
<i>Kell</i>	<i>KEL*01.I/KEL*02</i>	0,06 (23)	0,04 (20)	0,05 (47)	0,09 (23)	0,03 (7)*	0,04 (7)
<i>Duffy</i>	<i>FY*01/FY*01</i>	0,47 (176)	0,12 (50)*	0,12 (114)*	0,14 (34)*	0,12 (36)*	0,05 (9)*
	<i>FY*01/FY*02</i>	0,15 (57)	0,40 (157)*	0,45 (426)*	0,27 (68)*	0,34 (105)*	0,22 (43)*
	<i>FY*01/FY*02.N01</i>	0,03 (12)	0,08 (35)*	0,03 (29)*	0,11 (28)*	0,08 (25)*	0,18 (36)
	<i>FY*02/FY*02</i>	0,29 (107)	0,26 (105)	0,38 (362)*	0,33 (82)	0,27 (83)	0,10 (19)*
	<i>FY*02/FY*02.N01</i>	0,04 (14)	0,10 (43)*	0,84 (8)*	0,01 (3)*	0,12 (36)*	0,22 (43)*
	<i>FY*02.N01/FY*02.N01</i>	0,02 (7)	0,02 (10)	0,01 (9)	0,14 (35)*	0,08 (23)*	0,23 (46)*
<i>Kidd</i>	<i>JK*01/JK*01</i>	0,29 (110)	0,27 (109)	0,28 (265)	0,22 (54)*	0,34 (105)	0,38 (74)*
	<i>JK*01/JK*02</i>	0,47 (176)	0,48 (192)	0,52 (493)	0,64 (161)*	0,46 (143)	0,48 (94)
	<i>JK*02/JK*02</i>	0,24 (87)	0,25 (99)	0,20 (190)	0,14 (35)*	0,20 (60)	0,14 (28)*

*p<0,05

SC: População do estado de Santa Catarina, sul do Brasil (referência)

PR: População do estado do Paraná, sul do Brasil - GUELSIN et al., 2010.

SP (POP1, POP2 e POP3): População do estado de São Paulo, sudeste do Brasil – RIBEIRO et al., 2009. PELLEGRINO et al., 2001; COSTA et al., 2011 "unpublished data".

BA: População do estado da Bahia, nordeste do Brasil - COSTA et al., 2011. "unpublished data".

5.10. Comparação das frequências genotípicas entre doadores de Santa Catarina e europeus

Quando as frequências genotípicas foram comparadas com europeus estudados por outros grupos (POLIN et al., 2008; HASHMI et al., 2007; MEYER et al., 2014; BELSITO et al., 2015), somente os polimorfismos *RHCE*EE*, *RHCE*ee*, *KEL*01.1/KEL*01.1*, *JK*01/JK*01* e *DI*01/DI*01* não apresentaram diferenças significativas entre as populações. Foi possível observar similaridades entre as frequências obtidas em Santa Catarina, Nápoles, Zurique e Caucasianos para o Sistema Kell e Kidd (Tabela 12).

Tabela 12: Comparação das frequências genotípicas dos doadores do estado de Santa Catarina e europeus

Sistema	Genótipos/ Alelos	SC (N373)	Austria (N109)	Napoles (N225)	Zurique (N4000)	Caucasianos (N1243)
Rh	<i>RHCE*CC</i>	0,16 (60)	-	0,31 (69)*	-	-
	<i>RHCE*cc</i>	0,41 (154)	-	0,21 (47)*	-	-
	<i>RHCE*C</i>	0,37		0,44		
	<i>RHCE*c</i>	0,63		0,56		
	<i>RHCE*Ee</i>	0,25 (95)	-	0,18 (42)*	-	-
	<i>RHCE*E</i>	0,15		0,12		
	<i>RHCE*e</i>	0,85		0,88		
Kell	<i>KEL*01,1/KEL*02</i>	0,06 (23)	0,08 (17) *	0,03 (7)	0,05 (196)	0,05 (62)
	<i>KEL*02/KEL*02</i>	0,94 (350)	0,45 (91)*	0,97 (218)	0,95 (3795)	0,95 (1181)
	<i>KEL*01.1</i>	0,03	0,05	0,02	0,03	0,03
	<i>KEL*02</i>	0,97	0,95	0,98	0,97	0,97
Duffy	<i>FY*01/FY*01</i>	0,47 (176)	0,20 (40) *	0,18 (40)*	0,18 (703)*	0,18 (224)*
	<i>FY*01/FY*02</i>	0,15 (57)	0,36 (72)*	0,43 (98)*	0,47 (1862)*	0,43 (534)*
	<i>FY*01/FY*02.N01</i>	0,03 (12)	0 (0)	0,02 (5)	0,01 (52)*	
	<i>FY*02/FY*02</i>	0,29 (107)	0,44 (88)*	0,36 (82)*	0,32 (1311)	0,39 (485)*
	<i>FY*02/FY*02.N01</i>	0,04 (14)	0 (0)*	0 (0)*	0,01 (71)*	
	<i>FY*02.N01/FY*02.N01</i>	0,02 (7)	0 (0)	0 (0)*	0 (1)*	
	<i>FY*01</i>	0,41	0,38	0,41	0,42	0,41
<i>FY*02</i>	0,54	0,62	0,58	0,56	0,59	
<i>FY*02.N01</i>	0,05	0	0,01	0,02		
Kidd	<i>JK*01/JK*02</i>	0,47 (176)	0,48 (97)*	0,52 (116)	0,50 (2001)	0,44 (547)
	<i>JK*02/JK*02</i>	0,24 (87)	0,28 (56)*	0,24 (54)	0,24 (946)	0,26 (323)
	<i>JK*01</i>	0,54	0,48	0,50	0,51	0,52
	<i>JK*02</i>	0,46	0,52	0,50	0,49	0,48
Diego	<i>DI*01/DI*02</i>	0,05 (21)	-	0 (0)*	-	0 (0)*
	<i>DI*02/DI*02</i>	0,94 (352)	-	1,0 (225)*	-	1,0 (1243)*
	<i>DI*01</i>	0,03		0		0
	<i>DI*02</i>	0,97		1,00		1,00

* $P < 0,05$ SC: População do estado de Santa Catarina, sul do Brasil (referência); Austria: POLIN et al., 2008; Napoles, Itália: BELSITO et al., 2015; Zurique, Alemanha: MEYER et al., 2014; Caucasianos: HASHMI et al., 2007

6. DISCUSSÃO

O conhecimento dos polimorfismos de sistemas de grupos sanguíneos tem sido de interesse em diversas áreas, principalmente na medicina transfusional e na antropologia (BRECHER, 2005). Diversos estudos têm demonstrado as frequências genótípicas em várias populações em diversos países (HASHMI et al., 2007; THAKRAL et al., 2010; KAPPLER-GRATIAS et al., 2010; TANAKA et al., 2011; MEYER et al., 2014; BELSITO et al., 2015), inclusive no Brasil (PELLEGRINO et al., 2001; RIBEIRO, et al., 2009; GUELSIN et al., 2010; FLÓRES et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015). Embora as frequências genótípicas de diversas regiões do Brasil já tenham sido avaliadas, outras regiões, como Santa Catarina, eram desconhecidas até então.

A população brasileira é caracterizada por apresentar uma grande heterogeneidade genética e um nível de miscigenação significativo e progressivo (ORLANDO et al., 2000). De acordo com Manta e colaboradores (2013), a população do estado de Santa Catarina é predominantemente de origem europeia (79,7%), com contribuição de africanos (11,4%) e indígenas (8,9%). Assim, como os antígenos de grupos sanguíneos são definidos geneticamente, a diversidade genotípica na população brasileira é muito grande, e, por isso, é difícil para a medicina transfusional encontrar compatibilidade entre doadores e receptores de componentes sanguíneos. Esse obstáculo pode ser contornado se conhecermos as frequências de antígenos de sistemas de grupos sanguíneos. Assim, neste estudo foi investigado o polimorfismo dos genes que codificam antígenos dos sistemas grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias politransfundidos no Estado de Santa Catarina. Quando as frequências genótípicas dos doadores de Santa Catarina, das sete regiões do estado, foram comparadas, foi possível observar diferenças significativas para os genótipos *RHCE*Cc*, *RHCE*cc*, *RHCE*EE*, *RHCE*Ee*, *RHCE*ee*, *KEL*01.1/02*, *KEL*02/02*, *FY*01/FY*02.N01*, *FY*02/FY*02*, *JK*01/JK*01*, *JK*01/JK*02* (Tabelas 14). Essas diferenças podem ser explicadas pela grande influência europeia na constituição da população do estado de Santa Catarina. O estado foi colonizado predominantemente por europeus, e cada região possui influência de um ou outro grupo étnico. De acordo com dados do IBGE, a população de Florianópolis possui influência de populações portuguesa, alemã, italiana, polonesa, sueca, australiana e espanhola, Blumenau, Joaçaba e Lages possui influência de

populações alemã e italiana e Chapecó possui influência de populações italiana, alemã, polonesa, portuguesa e africana.

As frequências genotípicas da população de Santa Catarina também comparadas com populações de outros estados brasileiros, apresentaram diferenças significativas (Tabela 15). As frequências genotípicas dos estados de Santa Catarina e Paraná (GUELSIN et al., 2010) apresentaram similaridades para os polimorfismos dos Sistemas Rh, Kell, Kidd e Diego o que pode ser explicada pela similaridade genética entre essas duas populações, devido a um padrão semelhante de miscigenação. Segundo Probst e colaboradores (2000) a população do estado do Paraná, assim como em Santa Catarina, também é predominantemente europeia (80,5%), com pequena influência africana (12,5%) e indígena (7,0%). Apesar disso, diferenças significativas foram observadas para o Sistema Duffy o que demonstram que embora haja similaridade, os estados podem ter sido sujeito a uma maior influência de um ou outro grupo étnico (PROBST et al., 2000; MANTA et al., 2013).

As frequências genotípicas do estado de Santa Catarina quando comparadas com outros estados brasileiros (RIBEIRO et al., 2009; PELLEGRINO et al., 2001; COSTA et al., 2011 “dados não publicados) também apresentaram diferenças significativas. As diferenças observadas entre os estados de Santa Catarina e São Paulo podem ser explicadas pela forte influência da imigração no estado de São Paulo e também pela sua alta densidade populacional e por continuamente receber imigrantes do Nordeste do Brasil. Assim, os doadores dessa região constituem uma amostra representativa de uma população heterogênea. Um estudo realizado por Manta e colaboradores (2013) demonstrou que a constituição da população do estado de São Paulo é composta por influências de populações européias (61,9%), africanas (25,5%) e indígenas (11,6%). Essa percentagem de africano (25,5%) poderia explicar a diferença observada entre os estudos para os genótipos $FY*01/FY*02.N01$, $FY*02/FY*02.N01$ e $FY*02.N01/FY*02.N01$. O alelo $FY*02.N01$ é raramente encontrado entre populações caucasianas e asiáticas, mas é comum em negros africanos (TOURNAMILLE et al., 1995; IWAMOTO et al., 1996; PARASOL et al., 1998). Além disso, foram realizadas comparações com as frequências genotípicas de uma população de doadores de sangue de Salvador/BA, nordeste do Brasil. O objetivo dessa comparação foi mostrar a diferença das frequências genotípicas obtidas no sul com as do nordeste do Brasil, população esta caracterizada como afrodescendente (MACHADO, 2008) e, buscar por uma maior

compatibilidade para os pacientes portadores de anemia falciforme, uma vez que nesse estudo 35,5% dos pacientes eram portadores de anemia falciforme, doença genética frequente em populações afrodescentes. Embora fosse esperado uma maior compatibilidade para esses pacientes em doadores de sangue afrodescentes, diferenças significativas foram encontradas para os genótipos *RHCE*CC*, *RHCE*cc*, *FY*01/FY*01*, *FY*02/FY*02*, *FY*02/FY*02N.01*, *FY*02N.01/FY*02N.01*, *JK*A/JK*A*, *DI*01/DI*02* e *DI*02/DI*02*.

Apesar disso, dos dez pacientes portadores de anemia falciforme estudados e que necessitavam de transfusão, seis (60%) pacientes apresentaram o fenótipo Fy(b-), que teoricamente poderiam receber sangue Fy(b+) pois apresentam a mutação -67T/C no promotor eritroide GATA. Essa mutação é frequente em afrodescentes leva a ausência da expressão do antígeno Fy^b nas hemácias, mas não em outros tecidos, como por exemplo, nas células do endotélio dos vasos sanguíneos (RIBEIRO et al., 2009; CASTILHO, 2007). Pacientes com genótipo *FY*02* com GATA mutado (alelo *FY*02.N01*) podem ser transfundidos com hemácias Fy(b+), isso significa que a disponibilidade de sangue compatível para estes pacientes aumenta consideravelmente.

Além disso, outras comparações também foram realizadas para avaliar a similaridade das frequências genotípicas do sul do Brasil com europeus de outros estudos (MAASKANT-VAN et al., 1998; HASHMI et al., 2007; BELSITO et al., 2015; MEYER et al., 2014) (Tabela 21). As frequências genotípicas do estado de Santa Catarina apresentaram-se similares com as populações de Naples (Itália), Zurick (Alemanha) e Caucasianos estudados por Hashmi e colaboradores, (2007) para os sistemas Kell e Kidd. A diferença encontrada principalmente para o sistema de grupo sanguíneo Diego pode ser explicada pela influência indígena na população brasileira (BALLEOTI et al., 2003). De acordo com um estudo genético publicado por Manta e colaboradores (2013), o estado de Santa Catarina apresenta composição genética de 8,9% indígena. O antígeno Di(a) é dificilmente encontrado em caucasianos e negros (frequência de 1,0%), mas pode ser encontrado em certos grupos indígenas do norte e sul americano (frequência maior que 30%) e asiáticos (frequência de 6 a 15 %)(JUNQUEIRA et al. 1956; POOLE, 1999; KOMATSU et al., 2004).

Pelo fato de nesse estudo ter sido encontrado uma frequência considerável de 3% do alelo *DI*01* nos doadores do estado de Santa Catarina, foram criadas estratégias, estendida a doadores além dos incluídos no estudo, com o objetivo de encontrar doadores de sangue com o fenótipo Di(a+b-). Esse fenótipo raro é deduzido do genótipo

*DI*01/DI*01* e é importante para suprir a necessidade de alguns pacientes que requerem unidades de sangue Di(b-), diante da presença de aloanticorpos anti-Di^b. Em nosso estudo encontramos 1 (1,8%) doador portador do fenótipo raro Di(a+b-) que apresenta frequência menor que 1% em populações caucasianas (REID; LOMAS-FRANCIS, 2004). As técnicas de biologia molecular permitem a identificação de seqüências de DNA responsáveis pela expressão de antígenos raros que são difíceis de fenotipar por métodos sorológicos devido a falta de reagentes. Além disso, possibilita a inclusão desses fenótipos raros em painéis de hemácias auxiliando assim a identificação de anticorpos raros e ainda auxilia na resolução de problemas imunohematológicos complexos.

Ainda nesse estudo, a partir do conhecimento prévio das bases genéticas responsáveis pela expressão do antígeno Vel por diversos autores (BALLIF et al., 2013; STORRY, 2014; HAER-WIGMAN et al., 2015) foi possível pela primeira vez determinar a frequência do alelo *SMIM1*64_80 del* que em homozigose, corresponde ao fenótipo Vel-1, -2 ou em heterozigose ao fenótipo Vel-. A frequência obtida para o alelo *SMIM1*64_80 del* foi de 1,12% e para o genótipo *Wild Type/SMIM1*64_80 del*, 2,23. Segundo a literatura, a frequência do fenótipo Vel- ou homozigose para *SMIM1*64_80 del* em caucasianos é de 0,025% (REID, 2012). Estima-se que para encontrar este fenótipo deve-se analisar 5.000 amostras de doadores de sangue (HAER-WIGMAN et al., 2015). Neste estudo foi observada uma frequência de 1,12%, do alelo *SMIM1*64_80 del* em doadores voluntários de sangue em Santa Catarina. Esse valor é superior a frequência de 0,22% observada entre doadores de sangue no estado de São Paulo, sudeste do Brasil (DEZAN et al., 2015) que pode ser explicada pela forte influência da imigração em São Paulo, que recebe continuamente imigrantes afrodescendentes. Estudos realizados em negros africanos apresentaram uma frequência de 0,56% desse alelo (STORRY et al., 2013; HAER-WIGMAN et al., 2015). Em estudo com populações caucasianas da Holanda também foi observado alta frequência (1,46%) desse alelo, a qual foi similar a encontrada no presente estudo (HAER-WIGMAN et al., 2015). Essa similaridade entre as frequências pode ser explicada pela semelhança da composição étnica das populações caucasianas estudadas. A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, sendo composto por etnias de três continentes ao longo de um período de cinco séculos, como os colonizadores europeus, principalmente de Portugal e da Itália, os escravos africanos, e as populações indígenas locais (CARVALHO-SILVA et al., 2001; PARRA et al., 2003; GUELSIN et al., 2010). De

acordo com Manta e colaboradores (2013), conforme já foi mencionado, a população do estado de Santa Catarina é predominantemente de origem europeia (79,7%), com uma contribuição dos africanos (11,4%) e ameríndios (8,9%). Além disso, a frequência observada neste estudo também foi superior à de outras populações descritas na literatura onde relataram a frequência de 0,09% em afro-americanos, 0,56% em negros africanos e 0,60% em populações chinesas (STORRY et al., 2013; HAER-WIGMAN et al., 2015).

Embora os dados do presente estudo contribuam grandemente para caracterizar o fenótipo Vel em uma população no Brasil, mais estudos com um número maior de amostras são necessários para determinar a frequência em outros estados, principalmente do fenótipo Vel-, que não foi encontrado neste trabalho. Estes estudos são muito importantes para o fornecimento de unidades de sangue compatível para pacientes portadores de fenótipos raros. Esses pacientes necessitam de unidades de sangue fenótipo compatíveis, pois o aloanticorpo anti-Vel, desenvolvido contra o antígeno Vel é de importância clínica e é responsável por reações transfusionais hemolíticas agudas ou tardias graves que podem induzir insuficiência renal com risco de vida, e estão associados com doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DANIELS, 2002; VAN GAMEREN et al., 2008). Os pacientes com anticorpos dirigidos ao antígeno Vel e que necessitam de transfusão de sangue têm um risco de transfusão em uma situação de emergência. Quando um paciente com anti-Vel é transfundido com hemácias Vel uma reação transfusional hemolítica imediata grave pode ocorrer devido a hemólise intravascular (HAER-WIGMAN et al., 2015). Esses pacientes são caracterizados pelo seu fenótipo após contato prévio com o antígeno e a partir daí há o desenvolvimento de anticorpos contra o antígeno de alta frequência Vel. Colaboradores deste trabalho, detectaram a presença de anticorpos anti-vel em um paciente que necessitava de transfusão. Porém, como não haviam bolsas de sangue Vel negativo e o paciente estava em boas condições clínicas, foi indicado a transfusão autóloga, que foi bem-sucedido. No entanto, quando esse procedimento não é possível, esforços intensos são necessários para o fornecimento de bolsas de sangue compatíveis com o fenótipo do paciente. Em geral é necessário auxílio de bancos de sangue raros nacionais ou internacionais (NANCE, 2009).

Esses problemas podem ser evitados com a introdução da triagem de doadores para fenótipos raros nos Serviços de bancos de sangue, bem como o estudo de famílias com potenciais doadores heterozigotos identificados, usando ferramentas moleculares. O conhecimento dos

mecanismos moleculares do sistema de grupo sanguíneo Vel possibilitará esse estudo, anteriormente limitados por ensaios sorológicos com resultados não confiáveis devido a variações na expressão do antígeno Vel e à indisponibilidade de reagentes comerciais.

Os resultados desse estudo deixam claro que os conhecimentos das bases moleculares dos sistemas de grupos sanguíneos possibilitam o estudo de diferentes populações de diversos países, principalmente na população brasileira. Além disso, dados obtidos nesses estudos, de frequências genotípicas, são úteis para a medicina transfusional, para criar um banco de doadores com genótipos conhecidos, o que facilita na seleção de um hemocomponente adequado aos pacientes, e também para descobrir novos alelos e encontrar doadores com fenótipos raros.

7. CONCLUSÃO

Considerando os objetivos do presente trabalho e as condições em que foi realizada a genotipagem de grupos sanguíneos utilizando testes de biologia molecular em amostras de doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias poliransfundidos, podemos concluir que:

- Foi possível padronizar e validar a genotipagem de grupos sanguíneos na identificação dos polimorfismos de sistemas de grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy, Kidd e Diego em amostras de DNA de doadores voluntários de sangue e de pacientes portadores de hemopatias no estado de Santa Catarina.

- Os resultados da genotipagem obtidos possibilitaram o cálculo das frequências genotípicas e alélicas e o conhecimento das frequências dos polimorfismos estudados na população do estado de Santa Catarina, população que até então não havia sido estudada.

- Neste trabalho foi encontrado uma frequência de 3% do alelo *DI*01* em amostras de doadores voluntários de sangue do estado de Santa Catarina, e devido a essa considerável frequência, foram criadas estratégias que permitiram a identificação de um doador de sangue com o fenótipo raro, Di(a+b-).

- A utilização da genotipagem possibilitou neste estudo a padronização de metodologias que permitem a identificação de fenótipos até então não identificados por técnicas imunohematológicas convencionais devido a indisponibilidade de reagentes comerciais ou variações na expressão do antígeno como é o caso do Sistema de grupo sanguíneo Vel.

- Comparações antropológicas foram realizadas com outras populações europeias e observou-se similaridades entre as frequências do estado de Santa Catarina e a população de Nápoles (Itália), Zurique (Alemanhã) e Caucasianos para o Sistema Kell e Kidd.

- Esse estudo foi útil para identificação de polimorfismos de sistemas de grupos sanguíneos na população do estado de Santa Catarina, e a metodologia utilizada apesar de convencional é uma alternativa para suprir limitações das convencionais técnicas imunohematológicas.

- Os resultados obtidos nesse estudo, além de permitir conhecer a população do estado de Santa Catarina, também possibilitaram a criação

de um banco de dados com os resultados da genotipagem nos doadores, a fim de melhorar a compatibilidade entre pacientes que necessitam de transfusão e doadores de sangue. Uma vez ampliada a compatibilidade, a tendência é a redução das reações transfusionais e melhoria da qualidade de vida desses pacientes, pois ampliará o intervalo entre as transfusões e diminuirá o número de transfusões.

8. REFERÊNCIAS

- ARNONI, C.P.; GAZITO, D.; MUNIZ, J.G.; PERSON, R.M.; BRANDÃO, F.; MARQUES, M.G.A.; BARRETO, J.A.; CASTILHO, L.; LATINI, F.R.M. Two novel alleles encoding K₀ phenotypes in Brazilians. *Transfusion*, v.54, n.8, p.2128-9, 2014.
- ARRIAGA, F.; BONANAD, S.; LARREA, L.; DE LA RUBIA, J.; LÓPEZ, F.; SANZ, M.A.; SANZ, G.; MARTY, M.L. Immunohematologic study in 112 patients with myelodysplastic syndromes: 10-year analysis. **Sangre (Barc)**, v.40, p.177-80, 1995.
- AVENT N. Large-scale blood group genotyping - clinical implications. **British Journal of Haematology**, v.144, p.3-13, 2008.
- AVENT, N. Human erythrocyte antigen expression: its molecular bases. **British Journal of Biomedical Science**, v.54, n.1, p.16-37, 1997.
- AYGUN, B.; PADMANABHAN, S.; PALEY, C.; CHANDRASEKARAM, V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. **Transfusion**, v.42, p.37-43, 2002.
- BALEOTTI, W.Jr.; RIOS, M.; REID, M.E.; FABRON, A.Jr.; PELLEGRINO, J.Jr.; SAAD, S.T.O.; CASTILHO, L. A novel *DI*^A* allele without the band 3-Memphis mutation in Amazonian Indians. **Vox Sang**, v.84, p.326-330, 2003.
- BALLIF, B.A.; HELIAS, V.; PEYRARD, T.; MENANTEAU, C.; SAISON, C.; LUCIEN, N.; BOURGOUIN, S.; LE GALL, M.; CARTON, J.-P.; ARNAUD, L. Disruption of SMIM1 causes the Vel blood type. **EMBO Mol Med**, v.5, p.751-761, 2013.
- BEIBOER, S.H., WIERINGA-JELSMA, T., MAASKANT-VAN WIJK, P.A., VAN DER SCHOOT, C.E., VAN ZWIETEN, R., ROOS, D.; DEN DUNNEN, J.T.; DE HAAS, M. Rapide genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. **Transfusion**, v.45, n.5, p. 667-79, 2005.
- BELSITO, A.; COSTA, D.; FIORITO, C.; DE IORIO, G.; CASAMASSIMI, A.; PERROTTA, S.; NAPOLI, C. Erythrocyte

genotyping for transfusion-dependent patients at the Azienda Universitaria Policlinico of Naples. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 52, p.72–77, 2015.

-BLUMBERG N, PECK K, ROSS K, AVILA E. Immune response to chronic red blood cell transfusion. **Vox Sang**, v.44, p. 212-17, 1983.

-BONIFÁCIO SL, NOVARETTI MCZ. Biological functions of blood group antigens. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.31, n.2, p.104-111, 2009.

-BOTURÃO-NETO, E.; YAMAMOTO, M.; CHIBA, A.K.; KIMURA, E. Y.S.; DE OLIVEIRA, M.C.V.C.; BARRETO, C.L.M.; NUNES, M.M.A.; ALBUQUERQUE, S.B.L.; SANTOS, M.D.D; BORDIN, J.O. Molecular Basis of KELnull Phenotype in Brazilians. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v.42, p. 52-58, 2015.

-BRECHER ME. Technical manual, 15th ed, Bethesda: American Association of Blood Banks, 2005.

-CARTRON, J.P. Defining the Rh blood group antigens. Biochemistry and molecular genetics. **Blood Ver**, v.8, n.4, p.199-212, 1994.

-CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA, S.D. The phylogeography of Brazilian Ychromosome lineages. **Am J Hum Genet**, v.68, p.281-286, 2001.

-CASTILHO, L. The future of red cell alloimmunization. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.30, n.4, São José do Rio Preto July/Aug, 2008.

-CASTILHO, L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. **Transfusion**, v.47, p.28S-31S, 2007.

-CASTILHO, L.; RIOS, M.; BIANCO, C.; ANGELINI, M.T.; ALBERTO, F.L.; SAAD, S.T.O. High prevalence of FYB-RBC-silent alleles among sickle cell disease patients in Brazil, In: Annual Meeting of the American Association of Blood Banks, v,116S, 2000.

-CASTILHO, L.; RIOS, M.; BIANCO, C.; PELLEGRINO, J.Jr.; ALBERTO, F.L.; SAAD S.T.; COSTA, F.F. DNA-based typing of

blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. **Transfusion**, v.42, n.2, p.232-38, 2002a.

-CASTILHO, L.; RIOS, M.; PELLEGRINO, J.Jr.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Blood group genotyping facilitates transfusion of B-thalassemia patients. **J Clin Lab Anal**, v.16, n.5, p.216-20, 2002b.

-CASTILHO, L.; RIOS, M.; RODRIGUES, A.; PELLEGRINO, J.Jr.; COSTA, F.F. Blood group genotyping for the management of patients with "warm" antibody-induced hemolytic anemia. **Transfusion Clinique and Biologique**, v.8, n. S, p.166S, 2001.

-CHOU, S.T.; WESTHOFF, C. Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.178-84, 2009.

-COLES, S.M.; KLEIN, H.G.; HOLLAND, P.V. Alloimmunization in two multitransfused patient populations. **Transfusion**, v.21, p.462-6, 1981.

-COLIN, Y.; CHÉRIF-ZAHAR, B.; LE VAN KIN, C.; RAYNAL, V.; VAN HUFFEL, V.; CARTRON, J.P. Genetic Basis of the RhD-Positive and RhD-Negative Blood Group Polymorphism as Determined by Southern Analysis. **Blood**, v.78, n.10, p.2747-52, 1991.

-COSTA, D.C. Genotipagem de grupos sanguíneos no suporte transfusional para pacientes com anemia falciforme.2011. Dissertação Mestrado em Clínica Médica – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2011.

-COSTA, D.C.; PELLEGRINO J. Jr.; GUELSIN, G.A.; RIBEIRO, K.A.; Gilli, S.C.; Castilho L. Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.35, n.1, p.35-8, 2013.

-COTORRUELO, C.; BIONDI, C.; RACCA, L.; BORRÁS, S.G.; RACCA, A. Duffy genotyping facilitates transfusion therapy. **Clin Exp Med**, v.9, p.249-251, 2009.

-COX, J.V.; STEANE, E.; CUNNINGHAM, G.; FRENKEL, E.P. Risk of alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in

patients with sickle cell disease. **Arch Intern Med**, v.148, p.2485-9, 1988.

-CVEJIC, A.; HAER-WIGMAN, L.; STEPHENS, J.C.; KOSTADIMA, M.; SMETHURST, P.A.; FRONTINI, M.; VAN DEN AKKER, E.; BERTONE, P.; BIELCZYK-MACZYŃSKA, E.; FARROW, S.; FEHRMANN, R.S.; GRAY, A.; DE HAAS, M. HAVER, V.G.; JORDAN, G.; KARJALAINEN, J.; KERSTENS, H.H.; KIDDLE, G.; LLOYD-JONES, H.; NEEDS, M.; POOLE, J.; SOUSSAN, A.A.; RENDON, A.; RIENECK, K.; SAMBROOK, J.G.; SCHEPERS, H.; SILLJÉ, H.H.; SIPOS, B.; SWINKELS, D.; TAMURI, A.U.; VERWEIJ, N.; WATKINS, N.A.; WESTRA, H.J.; STEMPLE, D.; FRANKE, L.; SORANZO, N.; STUNNENBERG, H.G.; GOLDMAN, N.; VAN DER HARST, P.; VAN DER SCHOOT, C.E.; OUWEHAND, W.H.; ALBERS, C.A. SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. **Nat Genet**, v.45, n.5, p.542-5, 2013.

-DANIELS G. Human blood groups. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 2002.

-DANIELS, G. Human blood groups. 3rd ed. Blackwell Science; 2013.

-DANIELS, G. The molecular genetics of blood group polymorphism. **Transpl Immunol**, v.14, n.3-4, p.143-53, 2005.

-DANIELS, G.; CASTILHO, L.; FLEGEL, WA.; FLETCHER, A.; GARRATTY, G.; LEVENE, C.; LOMAS-FRANCIS, C.; MOULDS, J.M.; MOULDS, J.J.; OLSSON, M.L.; OVERBEEKE, M.; POOLE, J.; REID, M.E.; ROUGER, P.; VAN DER SCHOOT, E.; SCOTT, M.; SISTONEN, P.; SMART, E.; STORRY, J.R.; TANI, Y.; YU, L.C.; WENDEL, S.; WESTHOFF, C.; YAHALOM, V.; ZELINSKI, T. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens Macao report. **Vox Sanguinis**, v.96, p.153-6, 2009.

-DAVIES SC, MCWILLIAN AC, HEWITT E, DEVENISH A, BROZOVIC. Red cell alloimmunization in sickle cell disease. **Br J Haematol**, v.63, p.241-5, 1986.

-DENOMME, G.; RIOS, M.; REID, M.E. Molecular Protocols in Transfusion Medicine. San Diego CA: Academic Press, 2000.

-DENOMME, G.A. Kell and Kx blood group systems.

Immunoematology, v.31, n.1, p. 14-9, 2015.

-DENOMME, G.A. Molecular basis of blood group expression.

Transfus Apher Sci, v.44, p. 53–63, 2011.

-DEZAN, M.R.; DINARDO, C.L.; BONIFACIO, S.L.; VEGA, S.; SALLES, N.A.; MENDRONE, A.J.R.; LEVI, J.E. High-throughput strategy for molecular identification of Vel-negative blood donors using leftover nucleic acids extracted from plasma pools used for viral NAT screening. **Transfusion in press**, 2016.

FIGUEROA, D. The Diego blood group system: a review.

Immunoematology, v.29, p.73–81, 2013.

-FLÔRES, M.A.L.R.; VISENTAINER, J.E.L.; GUELSIN G.A.S.; FRACASSO, A.S.F.; DE MELO, F.C.; HASHIMOTO, M.N.; SELL, A.M. Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group system polymorphism in Brazilian Japanese descendants. **Transfus Apher Sci**, v.50, n.1, p.123-8, 2013.

-GASSNER, C.; SCHMARDA, A.; NUSSBAUMER, W.; SCHONITZER, D. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. **Blood**, v.88, n.55, p.1852-6, 1996.

-GEIFMAN-HOLTZMAN, O.; WOJTOWYCZ, M.; KOSMAS, E.; ARTAL, R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. **Obstet Gynecol**, v.89, n.2, p.272-5, 1997.

-GIBLETT, E. A critical of theoretical hazard of inter vs. Intra-racial transfusion. **Transfusion**, v.1, p.233-8, 1961.

-GIBLETT, E. Blood group alloantibodies: An assessment of some laboratory practices, **Transfusion**, v.4, p.299-408, 1977.

-GUELSIN, G.A.; SELL, A.M.; CASTILHO, L.; MASAKI, V.L.; MELO, F.C.; HASHIMOTO, M.N.; HIRLE, L.S.; VISENTAINER, J.E.L. Genetic polymorphisms of Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in a population from the State of Parana, southern Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.33, n.1, 2010.

-HADLEY, T.J.; PEIPER, S.C. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. **Blood**, v.89, p.3077-91, 1997.

-HAER-WIGMAN, L.; STEGMANN, T.C.; SOLATI, S.; SOUSSAN, A.A.; BECKERS, E.; VAN DER HARST, P.; VAN HULST-SUNDERMEIJER, M.; LIGTHART P, VAN RHENEN, D.; SCHEPERS H, HAAS M, VAN DER SCHOOT, C.E. Impact of genetic variation in the SMIM1 gene on Vel expression levels. **Transfusion**, v.55, n.6, p. 1457-1466, 2015.

-HASHMI, G.; SHARIFF, T.; SEUL, M.; VISSAVAJHALA, P.; HUE-ROYE, K.; CHARLES-PIERRE, D; LOMAS-FRANCIS, C.; CHAUDHURI, A.; REID, M.E. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. **Transfusion**, v. 45, p.680-8, 2005.

-HASHMI, G.; SHARIFF, T.; ZHANG, Y.; CRISTOBAL, J.; CHAU, C.; SEUL, M.; VISSAVAJHALA, P.; BALDWIN, C.; HUE-ROYE, K.; CHARLES-PIERRE, D.; LOMAS-FRANCIS, C.; REID, M.E. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. **Transfusion**, v.47, p.736-747, 2007.

HILLYER, C.D.; SHAZ, B.H.; WINKLER, A.M.; REID, M. Integrating molecular technologies for red blood cell typing and compatibility testing into blood centers and transfusion services. **Transf Med Ver**, v.22, p.117-132, 2008.

-HOELTGE, G.A.; DOMEN, R.E.; RYBICKI, L.A.; SCHAFFER, P.A. Multiple red cell transfusions and alloimmunization: experience with 6996 antibodies detected in a total of 159, 262 patients from 1985 to 1993. **Arch Pathol Lab Med**, v.119, p.42-5, 1995.

-ISSIT, P.D.; ANSTEE, D.J. Applied Blood Group serology. Durhan NC: Montgomery Scientific Publications, 1998.

-IWAMOTO, S.; LI, J.; SUGIMOTO, N.; OKUDA, H.; KAJII, E. Characterization of the Duffy gene promotor, Evidence for tissue-specific abolishment of expression in Fy(a-b-) of black individuals. **Biochem Biophys Res Commun**, v.222, p.852-9, 1996.

-JEANS, E.; PAGLIARINI, T.; NOVARETTI, M.C.Z. Duffy blood group system: biology and transfusion practice. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.27, n.2, p.110-119, 2005.

-JUNQUEIRA, P.C.; WISHART, P.J.; FERNANDEZ, P.L.; KALMUS H, The Diego blood factor in Brazilian Indians. **Nature**, v.177, n.4497, p.41, 1956.

-KAPPLER-GRATIAS S, PEYRARD T, ROUGER P, LE PENNEC PY, PHAM, BN, High throughput approaches Blood group genotyping by high-throughput DNA analysis: Application to the French panel of RBC reagentes. **Transfus Clin Biol**, v.17, p.165–167, 2010.

-KOMATSU, F.; HASEGAWA, K.; YANAGISAWA, Y.; KAWABATA, T.; KANEKO, Y., WATANABE, S.; MIYAGI, S.; SAKUMA, M.; KAGAWA, Y.; KAJIWARA, M. Prevalence of Diego blood group Dia antigen in mongolians: comparison with that in Japanese. **Transfus Apher Sci**, v.30, n.2, p. 119–24, 2004.

-LEE, S. The value of DNA analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems. **Transfusion**, v.47, p.32S–39S, 2007.

-LEE, S.; ZAMBAS, E.D.; MARSH, W.L.; REDMAN, C.M. The human Kell blood group gene maps to chromosome 7q33 and its expression is restricted to erythroid cells. **Blood**, v.81, n.10, p.2804-09, 1993.

-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 Ver**, v.23, n.4, p.292-309, 2009.

-LOMAS-FRANCIS, C. The value of DNA analysis for antigens of the Kidd blood group system. **Transfusion**, v.47, n.1, p.23S-7S, 2007.

-MAASKANT-VAN WIJK, P.A.; FAAS, B.H.; DE RUIJTER, J.A.; OVERBEEKE, M.A.; VON DEM BORNE, A.E, VAN DER SCHOOT, C.E. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. **Transfusion**, v.38, p. 1015–1021, 1998

-MACHADO, T. M. B. Ancestralidade em Salvador - BA. 2008. 86 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2008.

-MALLINSON, G.; SOO, K.S.; SCHALL, T.J.; PISACKA, M.; ANSTEE, D.J. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. **Br J Haematol**, v.90, n.4, p.823-9, 1995.

-MANTA, F.S.N.; PEREIRA, R.; VIANNA, R.; BEUTTENMÜLLER, A.R.R.; GITAÍ, D.L.G.; SILVA, D.A.; VARGAS WOLFGRAMM, E.V.; PONTES, I.M.; AGUIAR, J.I.; MORAES, M.O.; CARVALHO, E.F.; GUSMÃO, L. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. **Plosone**, v.8, n.9, 2013.

-MEYER, S.; VOLLMERT, C.; TROST, N.; BRÖNNIMANN, C.; GOTTSCHALK, J.; BUSER, A.; FREY, B.M.; GASSNER, C. High-throughput Kell, Kidd, and Duffy matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping of 4000 donors shows close to full concordance with serotyping and detects new alleles. **Transfusion**, v.54, n.12, p.3198-207, 2014.

-MILLER, L.H.; MASON, S.J.; DVORAK, J.A.; MCGINNISS, M.H.; ROTHMAN, I.K. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. **Science**, v.89, p.561-3, 1975.

-MOLISSON PL, ENGELFRIET CP, CONTRERARS M. Blood Transfusion in Clinical Medicine. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988.

-NANCE, S.T. How to find, recruit and maintain rare blood donors. **Curr Opin Hematol**, v.16, p.503-508, 2009.

-NATHALANG O, INTHARANUT K, SIRIPHANTHONG K, NATHALANG S, KUPATAWINTU P. Duffy Blood Group Genotyping in Thai Blood Donors. **Ann Lab Med**, v.35, v.6, p.618-23, 2015.

-NOIZAT-PIRENNE, F. Relevance of blood groups in transfusion of sickle cell disease patients. **C R Biol**, v. 336, n.3, p.152-8, 2013.

-NOIZAT-PIRENNE, F.; LE PENNEC, P-Y.; MOURO, I.; ROUZAUD, 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**, v.42, p.42:627-33, 2002.

-NOVARETTI, M.C.Z; RUIZ, A.S.; DORLHIAC-LLACER, P.E.; CHAMONE, D.A.F. Application of real-time PCR and melting curve analysis in rapid Diego blood group genotyping. **Immunohematology**, v.26, n.2, 2010.

-OLIVÈS, B.; MERRIMAN, M.; BAILLY, P.; BAIN, S.; BARNETT, A.; TODD, J.; CARTRON, J.P.; MERRIMAN, T. The molecular basis of the Kidd blood group polymorphism and its lack of association with type 1 diabetes susceptibility. **Hum Mol Genet**, v.6, n.7, p.1017-20, 1997.

-ORLANDO, G.M.; NAOUM, P.C.; SIQUEIRA, F.A.M.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev Bras Hematol Hemot**, v. 22, p.111-21, 2000.

-ORLINDA, A.R.; UNGER, P.J.; KOSHY, M. Post-transfusion alloimmunization in patients with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v.5, p.101-6, 1978.

-PARASOL, N.; REID, M.E.; RIOS, M.; CASTILHO, L.; HARARI, I.; KOSOWER, N.S. A novel mutation in the coding sequence of the FY*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. **Blood**, v.92, n.7, p. 2237-43, 1998.

-PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D.J. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.1, p.177-182, 2003.

-PELLEGRINO, J. JR.; CASTILHO, L.; RIOS, M.; DE SOUZA, C.A. Blood group genotyping in a population of highly diverse ancestry. **J Clin LabAnal**, v.15, n.1, p.8-13, 2001.

-PETZ, L. Clinical practice of Transfusion Medicine, Churchill Livingstone, 1989.

-POLIN, H.; DANZER, M.; PRÖLL, J.; HOFER, K.; HEILINGER, U.; ZOPF, A.; GABRIEL, C. Introduction of a real-time based blood group genotyping approach. **Vox Sanguinis**, v.95, p.125–130, 2008.

-POOLE, J. The Diego blood group system – an update. **Immunohematology**, v.15, n.4, p.135–43, 1999.

-POOLE, J.; DANIELS, G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. **Transfusion medicine reviews**, v.21, p.58-71, 2007.

-PROBST, C.M.; BOMPEIXE, E.P.; PEREIRA, N.F.; DALALIO, M.M.O.; VISENTAINER, J.E.L.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Human Biol**, v.72, n.4, p.597–617, 2000.

-PRUENSTER, M.; ROT, A. Throwing light on DARC. **Biochem Soc Trans**, v.34, p.1005-8, 2006.

-QUIN X.; GROOTKERK-TAX, M. G. H. M.; MAASKANT-VAN WIJK, P. A.; VAN DER SCHOOT, C. E. Systemic analysis and zigosity determination of the RHD gene in a D negative Chinese Han population reveals a novel D- negative RHD gene. **Vox Sang**, v.88, p.35-40, 2005.

-REID, M.; RIOS, M. Applications of molecular genotyping to immunohematology. **Br J Biomed Sci**, v.56, n.2, p. 145-52, 1999.

-REID, M.E. Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. **Transfusion**, v.43, n.12, p.1748-57, 2003.

-REID, M.E. From DNA to blood groups. **Immunohematology**, v.24, p.166-9, 2008.

-REID, M.E. Molecular basis for blood groups and function of carrier proteins, in: Molecular and Functional Aspects of Blood Group Antigens, Arlington VA: American Association of Blood Banks, 1997.

-REID, M.E. Overview of molecular methods in immunohematology. **Transfusion**, v.47, p.10S-6S, 2007.

-REID, M.E. Transfusion in the age of molecular diagnostics. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v.1, p.171-7, 2009.

-REID, M.E.; LOMAS-FRANCIS, C. Molecular approaches to blood group identification. **Current Opinion in Hematology**, v.9, p.152-59, 2002.

-REID, M.E.; LOMAS-FRANCIS, C. The Blood Group Antigen Facts Book, Second edition. New York: Elsevier Academic Press; 2004.

-REID, M.E.; LOMAS-FRANCIS, C.; OLSSON, M.L. The blood group antigen facts book. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2012.

-REID, M.E.; RIOS, M.; POWELL, V.I.; CHARLES-PIERRE, D.; MALAVADE, V. DNA from blood samples can be used to genotype patients how have recently received a transfusion. **Transfusion**, v.40, p.1-6, 2000a.

-REID, M.E.; RIOS, M.; YAZDANBAKHSK, K. Applications of molecular biology techniques to transfusion medicine. **Semin Hematol**, v.37, p.166-76, 2000b.

-REID, M.E.; YASDANBAKHSK, K. Molecular insights into blood and implications for blood transfusions. **Current Opinion in Hematology**, v.5, p.93-102, 1998.

-REISNER, E.G.; KOSTYU, D.D.; PHILIPS, G. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. **Tissue Antigens**, v.30, p.161-6, 1987.

-RIBEIRO, K.R.; GUARNIERI, M.H.; COSTA, D.C.; COSTA, F.F.; 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 Sanguinis**, v.83, p.147-52, 2009.

-RIOS, M.; BIANCO, C. The role of blood group antigens in infectious diseases. **Semin Hematol**, v.37, n.2, p.177-85, 2000.

- RIOS, M.; CASH, K.; STRUPP, A.; UEHLINGER, J.; REID, M.E. DNA from urine sediment or bucal cells can be used for blood group molecular genotyping. **Immunohematology**, v.15, p.61-5, 1999.
- RODRIGUES, E.S.; DE MACEDO, M.D.; DE MELO, F.U.; ROCHA-JUNIOR, M.C.; DE DEUS, A.; TOLEDO, V.M.R.; UBIALI, E.M.A.; BRUNETTA, D.M.; COVAS, D.T.; KASHIMA, S. Rapid blood group genotyping by allelic discriminative real-time PCR in multiply-transfused patients. **Transfusion Medicine**, v.25, n.2, p. 111-114, 2015.
- ROSSE, W.F.; GALLAGHER, D.; KINNEY, T.R. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease, The cooperative study of sickle cell disease. **Blood**, v.76, p.1431-37, 1990.
- 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**, v.40, p.936-42, 2000.
- SALMON, C.H.; CARTRON, J.P.; ROUGER, P.H. Les Groups Sanguinis, Chez l'Homme, p.371-93,1990.
- SANFORD, K.W.; BOURIKIAN, S.; MCCLAIN, A.; CURTIS, K. Development and Detection of Kidd Antibodies. **Lab Med**, v.46, n.3, p. 235-40, 2015.
- SANZ, C.; NOMDEDEU, M.; BELKAID, M.; MARTINEZ, I.; NOMDEDEU, B.; PEREIRA, A. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. **Transfusion**, v.53, n.4, p.710-715, 2013.
- SCHONEWILLE, H.; DE VRIES, R.R.; BRAND, A. Alloimmune response after additional red blood cell antigen challenge in immunized hematooncology patients. **Transfusion**, v.49, p. 453-7, 2009.
- SCHONEWILLE, H.; HAAK, H.L.; VAN ZIJL, A.M. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. **Transfusion**, v.39, n.7, p.763-71, 1999.
- SINGLETON, B.K.; GREEN, C.A.; AVENT, N.D.; MARTIN, P.G.; SMART, E.; DAKA, A.; NARTER-OLAGA, E.G.; HAWTHORNE,

L.M.; DANIELS, G. The presence of on RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh-negative blood group phenotype. **Blood**, v.95, n.1, p.12-18, 2000.

-SOOD, R.; MAKROO R.N.; RIANA, V., ROSAMMA, N.L. Detection of alloimmunization to ensure safer transfusion practice. **Asian J Transfus Sci**, v.7, n.2, p.135-139, 2013.

-SOUSA, T.N.; SANCHEZ, B.A.M.; CERÁVOLO, I.P.; CARVALHO, L.H.; BRITO, C.F.A. Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the Plasmodium vivax invasion receptor. **Vox Sanguinis**, v.92, p.373-80, 2007.

-SPIELMANN, W.; SEIDL, S. Prevalence of irregular red cell antibodies and their significance in blood transfusion and antenatal care. **Vox Sang**, v.26, n.6, p.551-9, 1974.

-STIEGLER, G.; SPERR, W.; LORBER, C.; FABRIZII, V.; HÖCKER, P.; PANZER, S. Red cell antibodies in frequently transfused patients with myelodysplastic syndrome. **Ann Hematol**, v.80, p. 330-3. 2001.

-STORRY, J.R.; CASTILHO, L.; DANIELS, G.; FLEGEL, W.A.; GARRATTY, G.; DE HAAS, M.; HYLAND, C.; LOMAS-FRANCIS, C.; MOULDS, J.M.; NOGUES, N.; OLSSON, M.L.; POOLE, J.; REID, M.E.; ROUGER, P.; VAN DER SCHOOT, E.; SCOTT, M.; TANI, Y.; YU, L.C.; WENDEL, S.; WESTHOFF, C.; YAHALOM, V.; ZELINSKI T. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Cancun report (2012). **Vox Sang**, v.107, n.1, p.90-6, 2014.

-STORRY, J.R.; JOUD, M.; CHRISTOPHERSEN, M.K.; THURESSON, B.; AKERSTROM, B.; SOJKA, B.N.; NILSSON, B.; OLSSON, M.L. Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype. **Nat Genet**, v.45, p. 537-41, 2013.

-SUSSMAN, L.N.; MILLER, E.B. Un nouveau facteur sanguin "Vel". **Revue Hémat**, v.7, p. 368-371, 1952.

-SVEJGAARD, A.; JERSILD, C.; NIELSEN, S.; BODMER, W.F. HLA and disease, Statistical genetic consideration. **Tissue Antigens**, v.4, n.2, p.95-105, 1974.

TALANO, J.A.; HILLERY, C.A.; GOTTSCHALL, J.L.; BAYLERIAN, D.M.; SCOTT, J.P. Delayed hemolytic transfusion reaction/hyperhemolysis syndrome in children with sickle cell disease. **Pediatrics**, v.111, n.6, p.661-5, 2003.

-TANAKA, M.; TAKAHAHI, J.; HIRAYAMA, F.; TANI, Y. High-resolution melting analysis for genotyping Duffy, Kidd and Diego blood group antigens. **Leg Med**, v.13, p. 1–6, 2011.

-THAKRAL, B.; SALUJA, K.; SHARMA, R.; MARWAHA, N. Phenotype frequencies of blood group systems (Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, P, Lewis, and Lutheran) in north Indian blood donors. **Transfus Apher Sci**, v.43, p.17–22, 2010.

-TOURNAMILLE, C.; COLIN, Y.; CARTRON, J.P.; LE VAN KIM, C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nature Genet**, v.10, p.224-28, 1998.

-TOURNAMILLE, C.; COLIN, Y.; CARTRON, J.P.; LE VAN KIN, C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nat Genet**, v.10, p.224-8, 1995.

-VAN GAMMEREN, A.J.; OVERBEEKE, M.A.; IDEMA, R.N.; VAN BEEK, R.H.; TEN KATE-BOOIJ, M.J.; ERMENS, A.A. Haemolytic disease of the newborn because of rare anti-Vel. **Transfus Med**, v.18, p.197–198, 2008.

-VICKINSKY, E.P.; EARLES, A.; JOHNSON, R.A. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion racially unmatched blood. **N Engl J Med**, v.322, p.1617-21, 1990.

-VUCELIC, D.; SAVIC, N.; DJORDJEVIC, R. Delayed hemolytic transfusion reaction due to anti-Jka. **Acta Chir Iugosl**, v.52, p.111–115, 2005.

-WAGNER, F.F.; FLEGEL, W.A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. **Blood**, v.95, p. 3662–3668, 2000.

-WAGNER, F.F.; FROHMAJER, A.; FLEGEL, W.A. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. **BMC Genet**, v.2., p. 10, 2001.

-WESTER, E.; STORRY, J.R.; SCHNEIDER, K.; SOJIKA, B.N.; POOLE, J.; MARTIN, O. Genetic basis of the K0 phenotype in the Swedish population. **Immunohematology**, v.45, p.545-9, 2005.

-WESTHOFF, C.M. Rh complexities: serology and DNA genotyping. **Transfusion**, v.47, p.17S-22S, 2007.

-WESTHOFF, C.M.; REID, M.E. Review: The Kell, Duffy, and Kidd blood group systems, **Immunohematology**, v.20, n.1, p.37-49, 2004.

-WU, G.G.; SU Y-Q.; YU, Q.; JIN S-Z; ZHAO, T-M. Development of a DNA-based genotyping method for the Diego blood group system. **Transfusion**, V.42, P.1553-1556, 2002.

-YAZDANBAKHSH, K.; RIOS, M.; STORRY, J.R.; KOSOWER, N.; PARASOL, N.; CHAUDHURI, A.; REID, M.E. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. **Transfusion**, v.40, p.310-20, 2000.

-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**, v.49, p.1655-60, 2009.

-ZALPURI, S.; ZWAGINGA, J.J.; LE CESSIE, S.; ELSHUIS, J.; SCHONEWILLE, H.; VAN DER BOM, J.G. Red-blood-cell alloimmunization and number of red-blood-cell transfusions. **Vox Sang**, v.102, p. 144-9, 2012.

ANEXO A: Aprovações do projeto de pesquisa pelo comitê de ética de pesquisa em seres humanos – CEPESH/UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pr-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 2270

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584 GR.99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPESH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPESH, CERTIFICA que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 2270 FR: 470499

TÍTULO: Investigação do Polimorfismo de genes de grupos sanguíneos e antígenos plaquetários em doadores voluntários de sangue e em pacientes com Hemopatias Malignas no Estado de Santa Catarina

AUTOR: Maria Cláudia Santos Silva, Daiane Cobianchi da Costa

FLORIANÓPOLIS, 28 de Novembro de 2011.

Coordenador do CEPESH/UFSC

Prof. Washington Portela de Souza
Coordenador do CEPESH/UFSC

ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Departamento de Análises Clínicas - CCS
Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil
Tel: (048) 3721 8146

Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva - e-mail: maclau@ccs.ufsc.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da pesquisa: Investigação do polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no Estado de Santa Catarina.

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita, como suas informações serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família e com o seu médico, para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

1. QUAL OBJETIVO DESTE ESTUDO E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS?

Este estudo será realizado no Laboratório de Pesquisas Oncológicas Experimental e Hemopatias, situado no Hospital Universitário (HU-UFSC) e a pesquisadora envolvida é a aluna do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Daiane Cobianchi da Costa, sob a orientação da professora Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva.

O objetivo principal desta pesquisa é identificar polimorfismos de grupos sanguíneos e nos pacientes que necessitam de transfusões e potenciais doadores de sangue para garantirmos uma compatibilidade sanguínea mais exata no momento da transfusão. Assim, vamos analisar os grupos sanguíneos do seu sangue através de exames de DNA. Isto ajudará os pesquisadores a encontrar na população brasileira doadores compatíveis para cada paciente com hemopatias que precisar de

transfusão de sangue, garantindo uma transfusão mais segura e eficiente.

A amostra de DNA só poderá ser utilizada neste estudo mediante prévia autorização do Comitê de Ética e será descartada após sua utilização.

2. EU TENHO QUE PARTICIPAR?

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Mesmo que o(a) senhor(a) não queira participar do estudo, o senhor(a) não terá nenhuma desvantagem, inclusive em relação ao tratamento médico e aos cuidados que o(a) senhor(a) tenha direito de receber. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber.

3. O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU PARTICIPAR?

A pesquisa será feita a partir de uma amostra de sangue enviada até nós pelo seu(a) médico(a) hematologista. Sendo assim, não haverá nenhum contato pessoal (do tipo avaliação física ou entrevistas efetuadas pela pesquisadora), pois será feita apenas a análise da sua amostra sanguínea afim de investigação diagnóstica.

4. QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Você não irá sentir nenhum constrangimento pois não haverá avaliação física ou entrevista, apenas análise da sua amostra de sangue. O único desconforto será a coleta da amostra de sangue, sendo que este procedimento é extremamente comum e necessário para o acompanhamento e tratamento de patologias.

5. O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS DADOS PESSOAIS DO SENHOR(A) SERÃO UTILIZADOS?

Informo que seus dados serão mantidos sob sigilo absoluto e privado, de posse somente pelo pesquisador e orientador desta

pesquisa. Também não serão tiradas fotos, nem realizadas filmagens. E a divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão. A divulgação das informações no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa, sendo que o(a) senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

6. QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração.

7. QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Espera-se, com esta pesquisa, estabelecer um protocolo seguro para garantir uma compatibilidade sanguínea mais exata no momento da transfusão para pacientes que necessitam de múltiplas transfusões, tais como pacientes portadores de hemopatias, reduzindo assim as complicações clínicas graves, como aloimunização e reações transfusionais hemolíticas tardias. Pode ser que o(a) senhor(a) não tenha nenhum benefício com o estudo. Entretanto, as informações que obtivermos poderão nos ajudar a encontrar uma estratégia para garantir a compatibilidade sanguínea mais exata para pessoas que necessitam de transfusão sanguínea.

8. COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva
Fone: (48) 3721-8146

(Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias) e-mail:
maclau@ccs.ufsc.br

Pesquisadora: Daiane Cobianchi da Costa Fone: (48) 3721-8146

(Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias) e-mail:
maclau@ccs.ufsc.br

Eu, (nome do paciente ou responsável legal em letras de
forma).....

.....confirmando que:

1. recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa.
2. Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo.
3. Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos serem utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura do participante

Nome do participante

Assinatura do entrevistador

Nome do entrevistador

Data: / /