

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

5

Vítor Mendonça Alves

**Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em
10 politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba/
Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)**

15

20

**Uberaba-MG
2016**

Vítor Mendonça Alves

5

**Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em
politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba/
Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)**

10

15

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Humana”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

20

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

Co-orientadora: Dra. Lílian Castilho

25

30

Uberaba-MG
2016

Vitor Mendonça Alves

Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

5

Presidente da banca

Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

10

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Sheila Soares Silva

Prof. Dr. André Luiz Pedrosa

Prof. Dr. Dante Mário Langhi Júnior

Dra. Carla Luana Dinardo

15

Membros suplentes

Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira

Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogério

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

20

Dr^a. Marina Lobato Martins

Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Prof^a. Dr^a. Maria Lourdes Barjas-Castro

25

30



ATESTADO DE APROVAÇÃO

Uberaba, 13 de maio de 2016.

Defesa de tese e exame final de **Vitor Mendonça Alves**, candidato (a) ao grau de Doutor (a) em Ciências – Patologia Humana.

A Comissão Examinadora comunica à Coordenadoria do PGCS/UFTM, para os devidos fins, que procedeu, nesta data, ao exame da Tese de Doutorado “ESTUDO DE GENÓTIPO ERITROCITÁRIO EM DOADORES DE SANGUE E EM POLITRANSFUNDIDOS PELO HEMOCENTRO REGIONAL DE UBERABA/FUNDAÇÃO HEMOMINAS E HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO (UFTM)” do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, bem como ao exame final.

O (a) candidato (a) foi considerado (a) APROVADO.

A COMISSÃO:


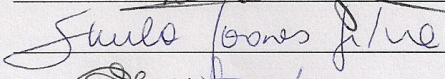
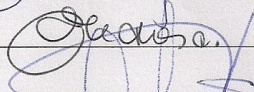
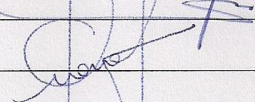
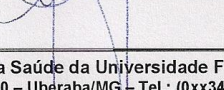
Dr. Hélio Moraes de Souza

Dra. Sheila Soares Silva

Dr. André Luiz Pedrosa

Dr. Dante Mário Langhi Júnior

Dr. Carla Luana Dinardo

5

10

15

20

Este projeto foi desenvolvido com o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – Número do processo: APQ-02318-12) e pelo Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das
25 Universidades Federais (REUNI).

DEDICATÓRIA

Agradeço e dedico este trabalho

Aos meus pais, Romes e Macilda, a minha irmã Andréia e a toda minha família, pelo
companheirismo, amor, compreensão e por todos os momentos de paz e alegria que
5 desfrutamos juntos nesta vida.

A todos os doadores e pacientes incluídos na pesquisa e a seus familiares ou
acompanhantes, pela contribuição, paciência e boa vontade.

10

15

20

25 “Eu tentei 99 vezes e falhei. Mas na centésima tentativa consegui.
Nunca desista de seus objetivos, mesmo que eles pareçam impossíveis.
A próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helio Moraes de Souza (Professor Titular da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM), notável professor, pesquisador e orientador, me auxiliando sempre com suas ideias, observações e críticas construtivas desde o mestrado.

5 À minha co-orientadora, Dra. Lílian Castilho, que me acolheu em seu Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos no Hemocentro da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), para que eu pudesse adquirir experiência nas técnicas de genotipagem eritrocitária e também pelo fornecimento de amostras controle para as reações desenvolvidas neste estudo. Sem dúvidas, vejo esta pesquisadora como uma grande referência para mim, na
10 área de Imuno-hematologia.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Juliano Martins (Professor Associado da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UFTM), orientador do meu trabalho de conclusão do curso de Biomedicina em 2005 e 2006, quando me apresentou a área de Imuno-hematologia (até então praticamente desconhecida por mim), co-orientador de meu mestrado e grande colaborador no
15 doutorado.

À Dra. Luciana Cayres Schmidt, chefe da Central de Imuno-hematologia da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Minas Gerais (HEMOMINAS), no Hemocentro de Belo Horizonte, onde tive a oportunidade de realizar meu treinamento nas técnicas de fenotipagem eritrocitária realizadas neste trabalho.

20 À biomédica e pós-doutora em Ciências da Saúde Fernanda Bernadelli Garcia, pelo auxílio na padronização das técnicas de genotipagem no Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UFTM e pela análise estatística dos resultados encontrados neste estudo.

À Prof.^a Dra. Sheila Soares Silva, Me. Ricardo Aparecido Olivo, Marieta Queluz e
25 todos os funcionários do Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação HEMOMINAS, de um modo geral, pela amizade e diversas colaborações.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento deste trabalho.

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades
30 Federais (REUNI), pela concessão da bolsa de doutorado.

RESUMO

Introdução: Pacientes com hemoglobinopatias, doenças onco-hematológicas e outros politransfundidos estão sujeitos à aloimunização eritrocitária, reações hemolíticas e até

mesmo de óbito, devido à alta quantidade de antígenos eritrocitários que pode resultar em incompatibilidades entre doadores de sangue e pacientes. Tais complicações podem ser minimizadas pela genotipagem eritrocitária que, entretanto, ainda é pouco realizada no Brasil. A frequência dos genótipos eritrocitários varia de acordo com a etnia; porém, estes estudos, comuns em São Paulo e no Paraná, não têm sido realizados em Minas Gerais, onde negros e pardos são mais prevalentes. **Objetivos:** pesquisar e determinar a frequência de genótipos dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd em doadores de sangue e politransfundidos, comparar frequências com relação ao gênero e etnia, avaliar os fenótipos, comparando-os aos genótipos; nos pacientes: verificar o número de transfusões de concentrados de hemácias (CH) (total e nos três meses prévios às coletas sanguíneas), o número de transfusões incompatíveis aos genótipos, a presença de aloanticorpos e o número de transfusões em aloimunizados e não aloimunizados. **Metodologia:** Após consentimento, amostras sanguíneas foram coletadas de 287 indivíduos (170 doadores e 117 pacientes) em tubos com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético), os quais foram centrifugados, separando-se os elementos figurados do plasma. As hemácias foram fenotipadas para os antígenos C, c, E, e (sistema Rh); K, k (Kell); Fy^a, Fy^b (Duffy) e Jk^a, Jk^b (Kidd). Os pacientes foram também submetidos ao Teste da Antiglobulina Direta (TAD). O DNA foi extraído dos leucócitos e submetido à genotipagem eritrocitária (PCR-AS, Multiplex ou RFLP) para os alelos RHD, RHD*Ψ - RHD Pseudogene, RHCE*C/c, E/e (sistema Rh); KEL*1/2 (Kell); FY*A/B, GATA-1 (Duffy) e JK*A/B (Kidd). Dados clínicos e epidemiológicos foram coletados, armazenados e comparados pelos testes Mann-Whitney, Qui-quadrado e Exato de Fisher (nível de significância 5%). **Resultados:** Nos doadores e pacientes, os genótipos mais frequentes foram: sistema Rh (RHD pos., RHD*Ψ neg., RHCE*cc, RHCE*ee); Kell (KEL*2/KEL*2); Duffy (FY*B/FY*B, GATA-67t/t); Kidd (JK*A/JK*B). A mutação GATA-67c/c foi encontrada em 22,22% dos pacientes e 7,65% dos doadores (p = 0,002). Na comparação entre doadores e pacientes com anemia falciforme, o RHD*Ψ foi observado em 4,76% destes últimos e 0% dos doadores (p = 0,027); diferenças significantes também ocorreram na região GATA-1 e sistema Kidd. Quanto ao gênero, nos doadores, GATA-67c/c em 12,94% dos homens e 2,35% das mulheres (p = 0,034). Na população total estudada, os genótipos RHD positivo, RHCE*cc, FY*B/FY*B, GATA-67c/c e JK*A/JK*A foram os mais comuns em negros; RHD negativo, RHCE*Cc, FY*A/FY*A, GATA-67t/t, JK*A/JK*B e JK*B/JK*B nos brancos. Discrepâncias genótipo(s)/fenótipo(s) foram observadas em quatro doadores (2,35%) e 42 pacientes (35,90%); estes indivíduos receberam mais transfusões de CH (total e nos três meses prévios às coletas sanguíneas), incluindo eritrócitos com fenótipos incompatíveis aos seus genótipos, em comparação aos

pacientes sem discrepâncias; diferenças significantes foram observadas em todos estes casos. TAD positivo ocorreu em 50% dos receptores com discrepâncias e em 17,33% dos outros pacientes ($p < 0,001$). Aloimunização foi encontrada em 23 (19,66%) receptores, dentre os quais, 13 (56,52%) apresentaram aloanticorpos do sistema Rh. Dos 42 pacientes com

5 discrepâncias, seis (14,29%) tinham histórico de aloimunização e três (7,14%) apresentaram Teste da Antiglobulina Indireta (TAI) positivo após coleta sanguínea e detecção de discrepâncias. A mediana de transfusões de CH foi nove nos aloimunizados e 7,5 nos não aloimunizados ($p = 0,081$). **Conclusões:** Muitas diferenças genótípicas foram observadas em

10 comparação a outros trabalhos realizados em São Paulo e Paraná, o que reforça a importância deste estudo em diferentes regiões do país. Quanto à mutação GATA-67c/c, sua maior frequência nos pacientes se deve ao maior número de negros neste grupo, o que também pode explicar os maiores percentuais não apenas desta mutação como também de RHD* Ψ e JK*A/JK*A nos portadores de anemia falciforme em relação aos doadores. Nos doadores do gênero masculino, a maior frequência de GATA-67c/c foi possivelmente devido à alta

15 miscigenação no Brasil. A associação entre TAD positivo e as discrepâncias observadas corroboram a necessidade de realização deste teste em todos os politransfundidos submetidos à fenotipagem. O grande número de discrepâncias genótipos/fenótipos nestes indivíduos reforça a importância da definição correta de seus perfis antigênicos através da genotipagem associada à fenotipagem, uma firme e efetiva atuação dos Comitês Transfusionais e de

20 políticas que levam a um aumento das doações sanguíneas no país, reduzindo a transfusão de eritrócitos incompatíveis e consequentemente minimizando os riscos de aloimunização, reação hemolítica pós-transfusional e até mesmo óbito em politransfundidos.

Palavras-chave: Transfusão de sangue; Eritrócitos; Genótipo; Fenótipo; Imunização.

25

ABSTRACT

Introduction: Patients with hemoglobinopathies, onco-hematological diseases and other

30 multitransfused individuals are subject to Red Blood Cell (RBC) alloimmunization, hemolytic reactions and even death because of the high quantity of RBC antigens that might result in incompatibilities between blood donors and patients. These complications can be minimized through RBC genotyping which, however, is not often performed in Brazil. The frequency of RBC genotypes varies according to ethnicity; however, these studies, common in São Paulo

and Paraná, have not yet been carried out in Minas Gerais, where the Afro-descendant populations are more prevalent. **Objectives:** research and determine the frequency of genotypes in the Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in blood donors and multitransfused patients, compare these frequencies concerning gender and ethnicity, evaluate phenotypes by comparing them to genotypes; and in patients: verify the number of RBC transfusions (total and in the three months before blood collections), the number of transfusions incompatible with the genotypes, the presence of alloantibodies and the number of transfusions in alloimmunized and non-alloimmunized individuals. **Methodology:** After consent, blood samples were collected from 287 subjects (170 donors and 117 patients) in EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid) tubes, which were centrifuged, in order to separate the figured elements from the plasma. The RBCs were phenotyped for C, c, E, e antigens (Rh system); K, k (Kell); Fy^a, Fy^b (Duffy) and Jk^a, Jk^b (Kidd). The patients were also subjected to Direct Antiglobulin Test (DAT). DNA was extracted from the leucocytes and submitted to RBC genotyping (AS-PCR, Multiplex or RFLP) for the alleles RHD, RHD*Ψ - RHD Pseudogene, RHCE*C/c, E/e (Rh system); KEL*1/2 (Kell); FY*A/B, GATA-1 (Duffy) and JK*A/B (Kidd). Clinical and epidemiological data were collected, stored and compared using Mann-Whitney, Chi-Square and Fisher Exact Tests (significance level: 5%). **Results:** In donors and patients, the most frequent genotypes were: Rh system (RHD pos., RHD*Ψ neg., RHCE*cc, RHCE*ee); Kell (KEL*2/KEL*2); Duffy (FY*B/FY*B, GATA-67t/t); Kidd (JK*A/JK*B). GATA-67 c/c mutation was found in 22.22% of the patients and 7.65% of the donors (p = 0.002). Comparing donors and patients with sickle cell disease, RHD*Ψ was observed in 4.76% of the latter and 0% of the donors (p = 0.027); significant differences also occurred in the GATA-1 region and Kidd system. As for gender, in the donors, GATA-67c/c was 12.94% in men and 2.35% in women (p = 0.034). In the whole population studied, RHD positive, RHCE*cc, FY*B/FY*B, GATA-67c/c and JK*A/JK*A genotypes were more common in the Afro-descendants; RHD negative, RHCE*Cc, FY*A/FY*A, GATA-67t/t, JK*A/JK*B and JK*B/JK*B in the Caucasians. Genotype/phenotype discrepancies were observed in four donors (2.35%) and 42 (35.90%) patients; these individuals received more RBC transfusions (total and in the three months before blood collections), including RBCs with phenotypes incompatible with their own genotypes, in comparison to the patients without discrepancies; significant differences were observed in all these cases. Positive DAT occurred in 50% of the receptors with discrepancies and in 17.33% of the other patients (p < 0.001). Alloimmunization was found in 23 (19.66%) receptors, among which, 13 (56.52%) presented alloantibodies from Rh system. Out of the 42 patients with discrepancies, six

(14.29%) had a history of alloimmunization and three (7.14%) presented Indirect Antiglobulin Test (IAT) positive after blood collection and also detection of discrepancies. The median of RBC transfusions was nine in the alloimmunized and 7.5 in the non-alloimmunized individuals ($p = 0.081$). **Conclusions:** Several genotypic differences were observed in comparison with other studies carried out in São Paulo and Paraná, reinforcing the importance of the study in different regions of the country. As for GATA-67c/c mutation, its higher frequency in the patients was due to the larger number of Afro-descendants in this group, which may also explain the higher rates not only of this mutation as well as RHD* Ψ and JK*A/JK*A in the individuals with sickle cell disease in relation to the donors. In the male donors, the higher frequency of GATA-67c/c was possibly due to the high miscegenation in Brazil. The association between positive DAT and the discrepancies corroborates the need of this test in all multitransfused patients submitted to phenotyping. The high levels of genotype/phenotype discrepancies in these individuals reinforce the importance of the correct definition of their antigenic profiles through RBC genotyping associated to phenotyping. Moreover, a firm and effective action of the Transfusion Committees and policies that lead to the increase of blood donations in the country is necessary, in order to reduce transfusions of incompatible erythrocytes and thereby minimize risks of alloimmunization, post-transfusion hemolytic reaction and even death in multitransfused patients.

Key words: Blood transfusions. Erythrocytes. Genotype. Phenotype. Immunization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Transfusões heterogrupos no sistema ABO	6
Figura 2 -	Duplicação do gene RH e deleção do gene RHD	10
Figura 3 -	Proteína Rh na membrana eritrocitária	11
Figura 4 -	Complexo proteico Kell/XK	13
Figura 5 -	Representação esquemática da glicoproteína Duffy na membrana do eritrócito	18
Figura 6 -	Esquema da estrutura da proteína transportadora Kidd/ureia na membrana eritrocitária	20
Figura 7 -	Teste da Antiglobulina Direta	23

Figura 8 -	Teste da Antiglobulina Indireta	23
Figura 9 -	Padronização de anotação por cruzes dos diferentes graus de positividade das reações entre hemácias e anticorpos	33
Figura 10 -	Fenotipagem de antígenos C, c, E, e (sistema Rh) e K (Kell ou KEL1 - sistema Kell) com resultado inconclusivo	34
Figura 11 -	Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da PCR-Multiplex de alelos RHD e RHCE*C/c	36
Figura 12 -	Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS de RHD Pseudogene (RHD*Ψ)	37
Figura 13 -	Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS dos alelos E/e (gene RHCE)	38
Figura 14 -	Eletroforese em gel de agarose (3,5%) dos produtos da PCR-RFLP (enzima <i>MnlI</i>) dos alelos E/e (gene RHCE)	39
Figura 15 -	Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS dos alelos KEL*1/2 (Sistema Kell)	39
Figura 16 -	Eletroforese em gel de agarose (2,5%) dos produtos da PCR-RFLP (enzima <i>BsmI</i>) dos alelos KEL*1/2 (Sistema Kell)	40
Figura 17 -	Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS dos alelos FY*A/B (Sistema Duffy)	41
Figura 18 -	Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-RFLP (enzima <i>BanI</i>) dos alelos FY*A/B (Sistema Duffy)	42
Figura 19 -	Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS dos alelos GATA-67t/c (Sistema Duffy)	42
Figura 20 -	Eletroforese em gel de agarose (4,5%) dos produtos da PCR-RFLP (enzima <i>StyI</i>) da região promotora GATA-1 (Sistema Duffy)	43
Figura 21 -	Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS dos alelos JK*A/B (Sistema Kidd)	44
Figura 22 -	Eletroforese em gel de agarose (3,5%) dos produtos da PCR-RFLP (enzima <i>MnlI</i>) dos alelos JK*A/B (Sistema Kidd)	45
Gráfico 1 -	Distribuição dos 117 politransfundidos estudados quanto ao diagnóstico	30
Gráfico 2 -	Distribuição da população estudada quanto ao gênero	46
Gráfico 3 -	Distribuição da população estudada quanto à etnia	47

Gráfico 4 -	Distribuição dos 42 politransfundidos com discrepâncias genótipos/fenótipos eritrocitários quanto ao número de discrepâncias identificadas	59
--------------------	--	----

5

10

15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Percentual de fenótipos ABO em diferentes populações	6
Tabela 2 -	Percentuais dos principais fenótipos Rh em diferentes populações ...	8
Tabela 3 -	Percentuais de fenótipos Kell em caucasianos e negros	12
Tabela 4 -	Sistema de grupo sanguíneo Duffy: fenótipos, genótipos e frequências populacionais em caucasianos e negros africanos	16
Tabela 5 -	Principais alelos do sistema Duffy	17
Tabela 6 -	Reatividade dos fenótipos Kidd com antissoros e frequências fenotípicas em asiáticos, negros e caucasianos	19
Tabela 7 -	Percentuais de etnia dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná	25
Tabela 8 -	Percentuais de etnia da cidade de Uberaba-MG e dos estados de São	

	Paulo e Paraná	25
Tabela 9 -	Lista dos primers utilizados na PCR	35
Tabela 10 -	Distribuição da população estudada quanto ao gênero, etnia e idade	47
Tabela 11 -	Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM	48
Tabela 12 -	Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU e 63 politransfundidos com anemia falciforme no HRU e/ou HC/UFTM	49
Tabela 13 -	Frequências de genótipos eritrocitários do sistema Duffy (região GATA-1) de 170 doadores do HRU, quanto ao gênero	50
Tabela 14 -	Frequências de genótipos eritrocitários de 287 indivíduos - 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto à etnia	52
Tabela 15 -	Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU, quanto à etnia	53
Tabela 16 -	Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto à etnia	54
Tabela 17 -	Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 287 indivíduos - 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto à etnia	55
Tabela 18 -	Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 170 doadores do HRU, quanto à etnia	55
Tabela 19 -	Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto à etnia	56
Tabela 20 -	Frequências de fenótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM	57
Tabela 21 -	Comparação entre genótipos e fenótipos eritrocitários de 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM	58
Tabela 22 -	Discrepâncias genótipo/fenótipo eritrocitários encontradas em quatro doadores do HRU	58

Tabela 23 - Discrepâncias genótipo/fenótipo eritrocitários encontradas em 42 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, dentre os quais 40 haviam recebido transfusões recentes.	60
Tabela 24 - Número total de transfusões de concentrados de hemácias recebidas por 117 pacientes no HRU e/ou HC/UFTM	61
Tabela 25 - Número de transfusões recentes de concentrados de hemácias recebidas por 46 pacientes no HRU e/ou HC/UFTM	61
Tabela 26 - Número de transfusões recentes de concentrados de hemácias recebidas por 46 pacientes no HRU e/ou HC/UFTM com fenótipos compatíveis e incompatíveis aos seus respectivos genótipos eritrocitários	62
Tabela 27 - Resultados do Teste da Antiglobulina Direta (TAD) realizado em 117 politransfundidos, com e sem discrepâncias, no HRU e/ou HC/UFTM	62
Tabela 28 - Aloanticorpos antieritrocitários desenvolvidos por 23 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM	63
Tabela 29 - Distribuição de 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, com e sem discrepâncias entre genótipos e fenótipos eritrocitários, quanto à presença ou não de aloanticorpos	63
Tabela 30 - Número de transfusões recebidas por 117 pacientes no HRU e/ou HC/UFTM, aloimunizados e não aloimunizados contra antígenos eritrocitários	64
Tabela 31 - Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM	94
Tabela 32 - Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 170 doadores do HRU e 63 politransfundidos com anemia falciforme no HRU e/ou HC/UFTM	94
Tabela 33 - Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto ao gênero	95
Tabela 34 - Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e	

	Kidd) de 170 doadores do HRU, quanto ao gênero	96
Tabela 35 -	Frequências dos genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto ao gênero	97
Tabela 36 -	Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 287 indivíduos - 170 doadores e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto ao gênero	98
Tabela 37 -	Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 170 doadores de do HRU, quanto ao gênero	98
Tabela 38 -	Frequências dos genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto ao gênero	99
Tabela 39 -	Comparação das frequências de genótipos eritrocitários (em doadores) encontradas neste estudo com as de outros realizados em São Paulo e Paraná	100
Tabela 40 -	Comparação das frequências de genótipos eritrocitários (em doadores) encontradas neste estudo com as de outros realizados em São Paulo	101
Tabela 41 -	Comparação das frequências de genótipos eritrocitários (em politransfundidos) encontradas neste estudo com as de outros realizados em São Paulo e Paraná	102
Tabela 42 -	Comparação das frequências de genótipos eritrocitários (sistema Kell - em politransfundidos) encontradas neste estudo com as de outro realizado em São Paulo	102
Tabela 43 -	Comparação das frequências de genótipos (Rh estendido – em doadores) encontradas neste estudo com as de fenótipos de outro realizado em São Paulo	103

5

10

15

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina

AHAI – Anemia Hemolítica Autoimune

20 Ala – Alanina

Asn – Asparagina

Asp – Ácido aspártico

BanI – Enzima de restrição

BsmI – Enzima de restrição

25 C – Citosina

C.E.P. – Comitê de Ética em Pesquisa

CH – Concentrados de hemácias

Cys – Cisteína

DARC – *Duffy Antigen Receptor Chemokines* (Antígenos Duffy Receptores de Quimiocinas)

30 DHFRN – Doença Hemolítica do Feto e Recém-nascido

DHPN – Doença Hemolítica Perinatal

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTPs – *Deoxynulceotides Triphosphates* (Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos)

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)

- FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
- FDA – *Food and Drug Administration*
- G – Guanina
- GATA-1 – Fator de transcrição eritroide-específico (Sistema sanguíneo Duffy)
- 5 Glu – Ácido glutâmico
- Gly – Glicina
- HC/UFTM – Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
- HELLH – Sítio ativo enzimático de ligação ao zinco da proteína Kell
- HEMOMINAS – Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Minas Gerais
- 10 HGH – Hormônio de crescimento humano
- HRU – Hemocentro Regional de Uberaba-MG
- HUT11 – Proteína transportadora de ureia em humanos
- IAI – Identificação de Anticorpos Irregulares
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- 15 IgG – Imunoglobulina G
- IgM – Imunoglobulina M
- Ile – Isoleucina
- IRC – Insuficiência renal crônica
- ISBT – *International Society of Blood Transfusion* (Sociedade Internacional de Transfusão
- 20 Sanguínea)
- Kb – Kilobases
- KDa – Kilodaltons
- Kpb – Kilopares de bases
- Leu – Leucina
- 25 LISS – *Low Ionic Strength Solution* (Solução Salina de Baixa Força Iônica)
- µl – microlitros
- MnlI* – Enzima de restrição
- NEP – Neutroendopeptidase
- PAI – Pesquisa de Anticorpos Irregulares
- 30 pb – Pares de bases
- PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação de Amplificação em Cadeia ou Reação em Cadeia da Polimerase)
- PCR-AS – *Polymerase Chain Reaction - Allele specific* (Reação de Amplificação em Cadeia ou Reação em Cadeia da Polimerase - Alelo Específica)

PCR-RFLP – *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*

(Reação de Amplificação em Cadeia ou Reação em Cadeia da Polimerase por Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição)

PCR-SSP – *Polymerase Chain Reaction - Single Specific Primers* (Reação de Amplificação

5 em Cadeia ou Reação em Cadeia da Polimerase por Primers Específicos)

Pro – Prolina

REUNI – Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades

Federais

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

10 RPM – Rotações por minuto

Ser – Serina

SNP – *Single Nucleotide Polimorfism* (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)

StyI – Enzima de restrição

T – Timina

15 TAD – Teste da Antiglobulina Direta

TAI – Teste da Antiglobulina Indireta

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TRALI – *Transfusion-Related Acute Lung Injury* (Injúria Pulmonar Aguda Relacionada à Transfusão)

20 Trp – Triptofano

UDP – Uridina Difosfato

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

25

30

5

10

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Antígenos eritrocitários, aloimunização e reações transfusionais hemolíticas	1
1.2 Fenotipagem eritrocitária e suas limitações	2
1.3 Genotipagem eritrocitária	3
1.4 Antígenos eritrocitários – distribuição quanto à etnia e importância de seu estudo em diferentes regiões	4
1.5 Sistema ABO	5
1.6 Sistema Rh	7
1.7 Sistema Kell	12
1.8 Sistema Duffy	15
1.9 Sistema Kidd	19
1.10 Teste da Antiglobulina ou Reação de Coombs	22
2 JUSTIFICATIVA	24
3 HIPÓTESES	27
4 OBJETIVOS	28
5 CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
5.1 Aspectos éticos	29
5.2 Coleta de amostras sanguíneas e dados clínicos e epidemiológicos	29
5.3 Fenotipagem eritrocitária e Teste da Antiglobulina Direta (TAD)	31
5.4 Genotipagem eritrocitária	34
5.4.1 Genotipagem de alelos RHD e RHCE*C/c (Sistema Rh)	36
5.4.2 Genotipagem de pseudogene RHD (RHD*Ψ – Sistema Rh)	36
5.4.3 Genotipagem de alelos E/e (gene RHCE – Sistema Rh)	37
5.4.4 Genotipagem de alelos KEL*1/2 (Sistema Kell)	39

5.4.5 Genotipagem de alelos FY*A/B (Sistema Duffy)	40
5.4.6 Genotipagem dos alelos GATA-67t/c (Sistema Duffy)	42
5.4.7 Genotipagem de alelos JK*A/B (Sistema Kidd)	43
5.5 Armazenamento de dados e análise estatística	45
6 RESULTADOS	46
6.1 Distribuição dos indivíduos quanto ao gênero, etnia e idade	46
6.2 Frequências de genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e receptores	47
6.3 Frequências de genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e receptores, quanto ao gênero	50
6.4 Frequências de genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e receptores, quanto à etnia	51
6.5 Frequência de fenótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e pacientes	56
6.6 Comparação entre genótipos e fenótipos eritrocitários – doadores e pacientes ..	57
6.7 Número de transfusões recebidas pelos pacientes	60
6.8 Teste da Antiglobulina Direta – Pacientes	62
6.9 Aloanticorpos eritrocitários e número de transfusões em pacientes aloimunizados e não aloimunizados	63
7 DISCUSSÃO	65
7.1 Frequências de genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd em doadores e receptores	65
7.2 Frequências de genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd – comparação entre doadores e pacientes	68
7.3 Frequências dos genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e receptores, quanto ao gênero	69
7.4 Frequências dos genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e receptores, quanto à etnia	70
7.5 Comparação entre genótipos e fenótipos eritrocitários – doadores e pacientes ..	73
7.6 Número de transfusões recebidas pelos pacientes	76
7.7 Teste da Antiglobulina Direta – Pacientes	77
7.8 Aloanticorpos eritrocitários nos pacientes e número de transfusões em aloimunizados e não aloimunizados	78
7.9 Transfusões de hemácias incompatíveis com os próprios genótipos eritrocitários – considerações importantes	81
8 CONCLUSÕES	82

REFERÊNCIAS	84
APÊNDICES	94
ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antígenos eritrocitários, aloimunização e reações transfusionais hemolíticas

5 Os antígenos eritrocitários são estruturas localizadas na membrana da hemácia, possuindo natureza proteica, glicoproteica ou glicolipídica e podendo induzir uma resposta imune (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015; NOVARETTI, 2007). Sua descoberta, a partir da primeira metade do século XX, foi considerada um dos avanços mais importantes nas pesquisas da área médica (JENS; PAGLIARINI; NOVARETTI, 2005).

10 Mais de 300 antígenos já foram descobertos e organizados em 36 sistemas sanguíneos, dentre os quais se destacam: ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, P1PK, Lewis e Lutheran (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015).

Uma exposição a eritrócitos alogenícos (estranhos), contendo fenótipo diferente, através de transfusões sanguíneas, gestações e transplantes de órgãos/tecidos ou enxertos pode
15 gerar uma aloimunização eritrocitária, que é uma resposta imunológica por parte do organismo do receptor a esses antígenos, com produção de aloanticorpos específicos. A resposta imune depende ainda de outros fatores como imunogenicidade, dose e via de administração antigênica e predisposição genética do próprio receptor (NOVARETTI, 2007).

Durante a primeira exposição a um antígeno estranho, uma resposta imunológica
20 primária, com produção de anticorpos em baixos títulos, é desencadeada pelo organismo do receptor (LANGHI JÚNIOR; PEREIRA, J. P. M.; PEREIRA, C. M., 2007). Neste tipo de resposta, os anticorpos podem aparecer em semanas ou meses após a exposição antigênica, com seus títulos podendo baixar a níveis indetectáveis (ALVES et al. 2012; LANGHI JÚNIOR; PEREIRA, J. P. M.; PEREIRA, C. M., 2007).

25 Já a segunda exposição ao mesmo antígeno leva a uma resposta imune secundária ou anamnésica (LANGHI JÚNIOR; PEREIRA, J. P. M.; PEREIRA, C. M., 2007; THAKRAL et al., 2008). Esta resposta pode surgir rapidamente, com os anticorpos sendo detectáveis entre 24 a 48 horas após o novo estímulo antigênico (LANGHI JÚNIOR; PEREIRA, J. P. M.; PEREIRA, C. M., 2007). Tais anticorpos são produzidos em altos níveis, por meio de células
30 da memória imunológica clonadas durante a resposta imune primária. Durante essa nova resposta, os aloanticorpos têm maior avidéz pelo antígeno, requerendo doses antigênicas bem menores para a sua produção (LANGHI JÚNIOR; PEREIRA, J. P. M.; PEREIRA, C. M., 2007; MELO, 2007).

A resposta imune secundária pode resultar em graves complicações, como as Reações Transfusionais Hemolíticas (LANGHI JÚNIOR; PEREIRA, J. P. M.; PEREIRA, C. M., 2007; SCHONEWILLE et al., 2006; THAKRAL et al., 2008), as quais são consideradas como uma das causas mais frequentes de óbito relacionado à transfusão sanguínea, segundo relatos do Food and Drug Administration (FDA) (FDA, 2014).

Embora a Injúria Pulmonar Aguda Relacionada à Transfusão (*Transfusion-Related Acute Lung Injury* - TRALI) seja considerada atualmente a principal causa de óbito relacionado à transfusão, as Reações Transfusionais Hemolíticas podem ser tão ou mais graves do que aquelas associadas ao TRALI (DENOMME; FLEGEL, 2008).

A fim de evitar as reações hemolíticas, quando há a identificação de dois ou mais aloanticorpos eritrocitários de significância clínica nos testes pré-transfusionais, a demora na localização de hemácias compatíveis constitui mais um fator prejudicial em indivíduos atendidos em situações de emergência.

O índice de aloimunização eritrocitária em pacientes com anemia falciforme varia entre 18% e 47%; entretanto, frequências inferiores têm sido relatadas em países como Uganda (6,1%), Congo (10%) e Jamaica (2,6%), cujos doadores e pacientes possuem uma grande homogeneidade antigênica racial (MATTEOCCI; PIERELLI, 2014). O mesmo ocorre em pacientes com talassemia em populações mais homogêneas; no entanto, quando há uma maior diversidade étnica, esses números são sensivelmente maiores (GADER; AL GHUMLAS; AL-MOMEN, 2008). Em receptores com doenças onco-hematológicas, são descritas prevalências de 9 a 22% (SCHONEWILLE; DE VRIES, BRAND, 2009) e nos portadores de insuficiência renal crônica (IRC), o percentual pode variar de 6,1% a 13,1% (BABIKER; ELSAYED, 2014).

1.2 Fenotipagem eritrocitária e suas limitações

Na tentativa de minimizar os riscos de aloimunização e, principalmente, de reações hemolíticas em pacientes dependentes de transfusões crônicas de hemácias, a fenotipagem eritrocitária de doadores e receptores para vários sistemas sanguíneos, além dos antígenos eritrocitários ABO e RhD, tem sido aplicada de forma rotineira em vários hemocentros do país, inclusive no Hemocentro Regional de Uberaba (HRU)/Fundação Hemominas, desde 1996.

Nos serviços de hemoterapia do Brasil recomenda-se, quando possível, para os pacientes candidatos a transfusões crônicas de hemácias e/ou que já desenvolveram aloanticorpo(s) eritrocitário(s), a fenotipagem envolvendo os sistemas Rh (antígenos C, c, E, e), Kell (K), Duffy (Fy^a, Fy^b), Kidd (Jk^a, Jk^b) e MNS (S, s), além da transfusão de eritrócitos contendo fenótipos compatíveis (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

No HRU, para os pacientes fenotipados, são recomendadas bolsas compatíveis para os sistemas ABO, Rh (C, c, E, e), Kell (K, k), Kidd (Jk^a, Jk^b) e, quando possível, também para os antígenos Fy^a, Fy^b (sistema Duffy) e S, s (MNS). Caso isso não possa ser feito, recomenda-se a compatibilidade no mínimo para os sistemas ABO, Rh e Kell. Pacientes portadores de fenótipos raros também não devem receber antígenos para os quais são negativos; o mesmo válido para receptores com aloanticorpos eritrocitários identificados. Bolsas que contenham qualquer aloanticorpo não devem ser transfundidas em pacientes portadores do respectivo antígeno (HEMOMINAS, 2013).

Apesar de ser um método que tem contribuído para melhorar a segurança transfusional, a fenotipagem possui algumas limitações, como a presença de hemácias oriundas de doadores na circulação do receptor, em caso de transfusão recente (em até três meses antes da realização do teste). Além disso, alguns antissoros comerciais para a detecção e identificação de antígenos eritrocitários menos conhecidos possuem custo elevado e raramente estão disponíveis no mercado (AVENT, 2008; CASTILHO et al., 2002; DENOMME; FLEGEL, 2008; ROZMAN; DOVC; GASSNER, 2000). Outra limitação é a presença de autoanticorpos antieritrocitários no receptor, podendo levar a resultados falso positivos (CASTILHO et al., 2002; MARTINS, M. L. et al., 2009).

Tais circunstâncias dificultam a seleção de hemácias compatíveis aos receptores, pois o fenótipo, nesses casos, não pode ser determinado com precisão. Como consequência, bolsas de concentrados de hemácias contendo antígenos incompatíveis podem ser erroneamente transfundidas, com riscos de aloimunização eritrocitária, hemólise e, em alguns casos, óbito.

1.3 Genotipagem eritrocitária

Por ser um método que supera as limitações da fenotipagem, a genotipagem eritrocitária vem sendo utilizada de forma cada vez mais intensa nos últimos anos. Como as hemácias são células anucleadas e, portanto, não possuem material genético, o método consiste na extração e quantificação de DNA dos leucócitos, com posterior identificação e

amplificação de genes de interesse, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase ou Reação de Amplificação em Cadeia (PCR) (AVENT, 2008; CASTILHO et al., 2002; FLEGEL, 2007a; ROZMAN; DOVC; GASSNER, 2000).

5 A genotipagem permite o entendimento da base genética de quase todos os antígenos eritrocitários de importância clínica (CASTILHO et al., 2002). Além disso, a informação genética do próprio paciente não se altera devido a transfusões de concentrados de hemácias. Embora o DNA possa ser obtido por raspagem bucal e sedimentos urinários, isso não é adequado para receptores de transplante de células progenitoras hematopoiéticas, cujos leucócitos contêm uma informação genética diferente das outras células do organismo (REID
10 et al., 2000).

Já foi demonstrado que o DNA extraído de leucócitos de indivíduos com várias transfusões recentes pode ser utilizado para a determinação de seu genótipo eritrocitário, sem risco de microquimerismo (CASTILHO et al., 2002; REID et al., 2000; ROZMAN; DOVC; GASSNER, 2000; WENK; CHIAFARI, 1997), pois a quantidade de DNA leucocitário do
15 próprio paciente excede a oriunda dos doadores (CASTILHO et al., 2002).

A genotipagem pode ainda auxiliar nos seguintes casos: identificação de aloanticorpo(s) eritrocitário(s) (onde é preciso saber se o paciente é negativo para o(s) respectivo(s) antígeno(s)) e do risco de Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) em gestantes (MARTINS, M. L. et al., 2009). O método tem sido considerado exequível e, em geral,
20 superior à fenotipagem (FLEGEL, 2007a); contudo, ainda não tem sido adotado de forma rotineira na maioria dos serviços de hemoterapia, especialmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil.

25 **1.4 Antígenos eritrocitários – distribuição quanto à etnia e importância de seu estudo em diferentes regiões**

A frequência dos antígenos eritrocitários varia de acordo com a etnia. Citando alguns exemplos, o antígeno K (Kell) é encontrado em 9% dos caucasianos e em 2% dos negros. O
30 antígeno Fy^a (*Duffy a*) possui frequência de até 100% em orientais, porém de 10 a 20% em negros afroamericanos e africanos (LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a etnia varia nas diferentes regiões e estados brasileiros. Minas Gerais apresenta 45,39% de brancos, 44,23%

de pardos e 9,22% de negros, enquanto no estado de São Paulo estas frequências são 63,99%, 26,14% e 5,4%, respectivamente (IBGE, 2010a). Isso pode interferir na frequência dos antígenos eritrocitários em cada região, evidenciando a importância deste estudo nos diversos estados e regiões do país.

5

1.10 Sistema ABO

Foi descoberto por Karl Landsteiner, em 1900, por meio de reações de diferentes amostras de soro com suspensões de hemácias distintas, o que possibilitou a sua classificação em três grupos diferentes (A, B e O) (LANDSTEINER, 1900). Dois anos depois, o grupo AB foi descrito, por Decastello e Struli, colaboradores de Landsteiner (DECASTELLO; STURLI, 1902).

Os anticorpos do sistema surgem em decorrência de estímulos bacterianos da flora intestinal, pois tais microrganismos possuem em suas membranas substâncias semelhantes aos carboidratos que constituem os antígenos A e B (SPRINGER, 1971).

A tipagem ABO deve ser sempre realizada em duas etapas. Na tipagem direta, utiliza-se diferentes reagentes contendo anticorpos anti-A, anti-B e anti-AB, de modo a identificar antígenos A e/ou B. Já a tipagem reversa, confirmatória, consiste na detecção de anticorpos naturais, por meio da reação do soro do indivíduo com eritrócitos contendo antígenos conhecidos A e B.

Os antígenos A e B estão presentes em algumas glicoproteínas e glicolípídeos de membrana. As cadeias de carboidratos são sintetizadas pela ação de glicosiltransferases que catalisam a transferência de monossacarídeos específicos de um substrato doador para um acceptor. O substrato acceptor para as transferases A e B (produtos dos alelos A e B), é uma estrutura denominada antígeno H, que contém o monossacarídeo fucose como resíduo terminal (DANIELS, 2005). O gene *ABO*, responsável pela codificação das transferases A e B, localiza-se no cromossomo 9 (9q34.2), o qual abrange em torno de 18 a 20 kilobases (kb) e está organizado em sete éxons (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015; DANIELS, 2005).

O grupo sanguíneo A se subdivide em A_1 e A_2 . 80% dos indivíduos dos tipos sanguíneos A ou AB são classificados como A_1 ou A_1B , enquanto os 20% restantes são A_2 ou A_2B (FRANCHINI; LIUMBRUNO, 2013); estes últimos podem apresentar o anticorpo anti- A_1 (DANIELS, 2005).

A tabela 1 ilustra os percentuais dos principais fenótipos ABO em diferentes populações.

Tabela 1 – Percentuais de fenótipos ABO em diferentes populações.

Fenótipo	Caucasianos	Negros	Asiáticos	Mexicanos
A ₁	33	19	27	22
A ₂	10	8	Raro	6
B	9	20	25	13
O	44	49	43	55
A ₁ B	3	3	5	4
A ₂ B	1	1	Raro	Raro

5 **Fonte:** CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015.

O antígeno H faz parte de um sistema sanguíneo distinto (sistema H). O gene *H* (ou *FUT1*), localizado no cromossomo 19 (19q13.33), codifica uma enzima denominada 2- α -fucosiltransferase, responsável pela sua biossíntese. Pessoas com alelos *FUT1* inativos (h), em homo ou heterozigose, apresentam o fenótipo H- (Bombay) ou H⁺^w (w – *weak* ou fraco; Para-Bombay). Os anticorpos anti-H (presente em ambos os indivíduos) e anti-HI (nos “Para-Bombay”) podem causar reações transfusionais hemolíticas intravasculares imediatas ou tardias (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015).

15 Embora seja possível, a determinação do grupo sanguíneo ABO por biologia molecular (genotipagem) não é realizada devido à simplicidade e baixo custo da fenotipagem, além da alta complexidade do grupo a nível genético (AVENT, 2008).

O sistema ABO é o de maior significância clínica em medicina transfusional, pois a transfusão de hemácias incompatíveis pode causar graves reações hemolíticas agudas, até mesmo fatais (SAZAMA, 1990). Por tal motivo, deve-se preferencialmente realizar transfusões isogrupos; caso isso não seja possível, as transfusões heterogrupos devem sempre respeitar o seguinte esquema (Figura 1):

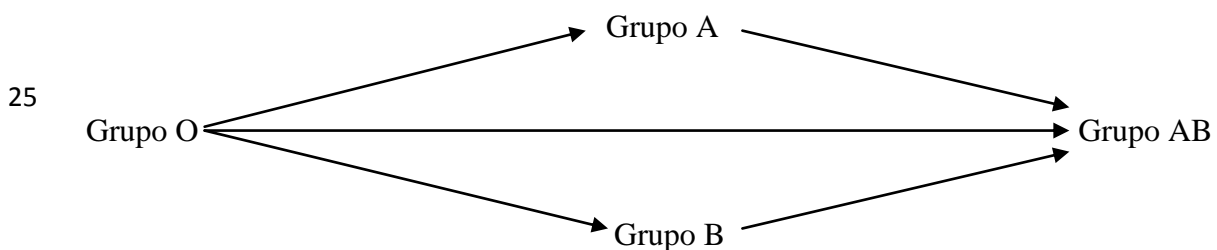


Figura 1 – Transfusões heterogrupos no sistema ABO.

Fonte: MELO; SANTOS, 1996c.

1.11 Sistema Rh

O sistema Rh é o primeiro em complexidade e o segundo em importância clínica, após o ABO (FLEGEL, 2007b), possuindo 54 antígenos (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015). Sua descoberta ocorreu em 1939, ao ser encontrado um anticorpo numa gestante cujo feto desenvolveu Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) e que apresentou reação hemolítica ao ser transfundida com sangue do marido. Diante disso, foi sugerido que o anticorpo fora produzido pela mulher contra um antígeno fetal de origem paterna (LEVINE; STETSON, 1939).

O antígeno D é o principal dentro do sistema, pelo alto grau de imunogenicidade, sendo encontrado apenas nos indivíduos Rh positivos (CASTILHO, 2007). Geralmente, a sensibilização a este antígeno ocorre em 80% das pessoas RhD negativas, no primeiro contato com o mesmo (NARDOZZA et al., 2010). Em pacientes politransfundidos RhD negativos, o percentual de aloimunização anti-D varia de 21 a 33% (DANIELS, 2013). Por estes motivos, exige-se de modo preferencial a transfusão de hemácias RhD negativas em indivíduos com o mesmo tipo; prática rotineira nos serviços transfusionais há várias décadas (GARCÍA GALA et al., 1994).

Há ainda neste sistema outros quatro antígenos de grande importância: C, c, E, e (CASTILHO, 2007). Os cinco antígenos citados são responsáveis por 98 a 99% das intercorrências relacionadas ao sistema (WENDEL NETO, 1998).

Três nomenclaturas existem no sistema Rh: a primeira, de Fisher-Race, envolve três *loci* diferentes e intimamente ligados (C, D, E); a de Wiener (Rh-hr) considera vários alelos em um único *locus*, enquanto a de Rosenfeld e colaboradores adota um número para cada antígeno, segundo a sua ordem de descoberta ou inclusão (CASTILHO, 2007).

Os anticorpos materno-fetais anti-D são a principal causa de DHPN (NARDOZZA et al., 2010); contudo, a introdução rotineira da imunoglobulina anti-D, a partir dos anos 60, associada à imunoprofilaxia pré e pós-parto, no final do século XX, contribuiu para reduzir os índices da doença em mais de 90% (FLEGEL, 2007b). Porém, há outros casos de aloimunização materno-fetal envolvendo os antígenos C, c, E, e, que podem ocorrer, com menor frequência (MELO; SANTOS, 1996b; MONTEIRO et al., 1996).

De 80 a 85% dos caucasianos contêm o antígeno D, enquanto em afrodescendentes este percentual ultrapassa os 90%. Dentre os orientais, mais de 99% são RhD positivos (SINGLETON et al., 2000). Em europeus, os antígenos C e c são encontrados, respectivamente, em 70% e 80% dos indivíduos; nos negros africanos, a frequência de c é de

aproximadamente 99%, enquanto o percentual de *C* é próximo de 17%; já no extremo oriente, quase 100% das pessoas possuem o antígeno *C*. Na maioria das populações, a frequência de *E* está em torno de 30%; porém, o *e* alcança os 98% (DANIELS, 2005).

Os principais fenótipos do sistema estão na tabela 2.

5

Tabela 2 – Percentuais dos principais fenótipos Rh em diferentes populações.

RhD positivo			
Fenótipo	Caucasianos	Negros	Asiáticos
R ₁ R ₁ ; R ₁ r ⁺ (DDCCee; DCCee)	18,5	2	51,8
R ₂ R ₂ ; R ₂ r ⁺ (DDccEE; DccEE)	2,3	0,2	4,4
R ₁ r; R ₁ R ₀ ; R ₀ r ⁺ (DDCcee; DCcee)	34,9	21	8,5
R ₂ r; R ₂ R ₀ ; R ₀ r ⁺ (DccEe; DDccEe)	11,8	18,6	2,5
R ₀ r; R ₀ R ₀ (Dccee; DDccee)	2,1	45,8	0,3
R _Z R _Z ; R _Z r ^y (DDCCEE; DCCEE)	0,01	Raro	Raro
R ₁ R _Z ; R _Z r ⁺ ; R ₁ r ^y (DDCCee; DCCEE)	0,2	Raro	1,4
R ₂ R _Z ; R _Z r ⁺ ; R ₂ r ^y (DDccEE; DCcEE)	0,1	Raro	0,4
R ₁ R ₂ ; R ₁ r ⁺ ; R ₂ r ⁺ ; R _Z r; R ₀ R _Z ; R ₀ r ^y (DDCcEe; DCcEe)	13,3	4	30
RhD negativo			
r ⁺ r (Ccee)	0,8	Raro	0,1
r ⁺ r ⁺ (CCee)	Raro	Raro	0,1
r ⁺ r (ccEe)	0,9	Raro	Raro
r ⁺ r ⁺ (ccEE)	Raro	Raro	Raro
rr (ccee)	15,1	6,8	0,1
r ⁺ r ⁺ ; r ^y r (CcEe)	0,05	Raro	Raro
r ⁺ r ^y ; r ⁺ r ^y ; r ^y r ^y (CCEe; CcEE; CCEE)	Raro	Raro	Raro
r ⁺ s ⁺ r (Ccee)	0	2	0

Fonte: CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015.

10 Existem variações do antígeno D, como o D fraco, onde ocorre o enfraquecimento da expressão do antígeno. A pesquisa deste fenótipo deve ser realizada em todos os doadores de sangue RhD negativos e, uma vez identificado, os mesmos são classificados como RhD positivos e suas hemácias não podem ser transfundidas para pacientes RhD negativos, a fim de evitar aloimunização anti-D e hemólise (CASTILHO, 2007; FLEGEL, 2007b; MORAES-

SOUZA; ALVES, 2015). Entretanto, pacientes portadores de D fraco, em sua grande maioria, ao receberem sangue RhD positivo, não desenvolvem anti-D, embora isso possa ocorrer em casos raros. O fenótipo se origina de substituição de aminoácidos na parte intracelular ou na membrana da hemácia; como consequência, a integração da proteína RHD fica prejudicada, com enfraquecimento quantitativo do antígeno D (FLEGEL, 2007b; SANDLER et al., 2015).
 5 Ocorre em 0,2 a 1% dos indivíduos caucasianos americanos e europeus, sendo os tipos 1, 2 e 3 os mais comuns (SANDLER et al., 2015). Sua identificação é feita por anticorpos monoclonais de alta sensibilidade e, especialmente, por técnicas moleculares (COSTA et al., 2014; MORAES-SOUZA; ALVES, 2015; SCHMIDT et al., 2015).

10 Outra variação é o D parcial. Elucidando o fenótipo, a maioria das hemácias RhD positivas apresentam nove subunidades ou epítomos (epD1 a epD9); em alguns indivíduos RhD positivos, ocorre a falta de uma ou outra dessas subunidades, havendo risco de produção de anticorpos anti-D específicos contra os epítomos ausentes, ao receberem bolsas RhD positivas (CASTILHO, 2007; MELO; SANTOS, 1996b). A identificação sorológica é difícil,
 15 ocorrendo geralmente após a aloimunização anti-D, sendo a análise molecular mais eficiente. Quando isso ocorre, os pacientes devem obrigatoriamente receber sangue RhD negativo, evitando o risco de nova aloimunização e hemólise. O fenótipo decorre da substituição de aminoácidos na região extramembranar da proteína RhD, com perda de alguns epítomos D ou formação de novos antígenos (FLEGEL, 2007b). A categoria DVI é considerada a mais
 20 comum (DANIELS, 2005).

O fenótipo DEL é outra expressão enfraquecida do antígeno D, com mudanças moleculares mais acentuadas em relação ao D fraco. O fenótipo é raro na Europa; no entanto, em orientais, pode atingir os 30% (FLEGEL, 2007b).

25 Uma importante glicoproteína (RhAG) está associada à proteína Rh e outras (banda 3, GPA, GPB, LW e CD47), formando o “complexo Rh”, o qual se liga ao citoesqueleto da membrana eritrocitária via anquirina e proteína 4.2 (NARDOZZA et al., 2010). Este complexo é responsável pela manutenção da integridade da membrana (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015).

30 Os antígenos do sistema Rh são codificados por dois genes (*RHD* e *RHCE*), localizados na posição cromossômica 1p34.1-1p36 (WAGNER; FLEGEL, 2000). Estes genes possuem, cada um, 10 éxons, distribuídos em 69 kpb de DNA em orientação oposta (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015). Enquanto o gene *RHD* expressa o antígeno D, o *RHCE* expressa os antígenos C, c, E, e (SINGLETON et al., 2000).

A maioria dos mamíferos possui apenas o gene *RH*, o qual corresponde ao gene *RHCE* em humanos. Acredita-se que, durante a evolução dos mamíferos, a duplicação do gene *RH* ancestral originou o atual gene *RHD*; entretanto, este acabou sendo deletado em alguns indivíduos (RhD negativos), com a evolução da espécie humana (Figura 2 - FLEGEL, 2007b).

5

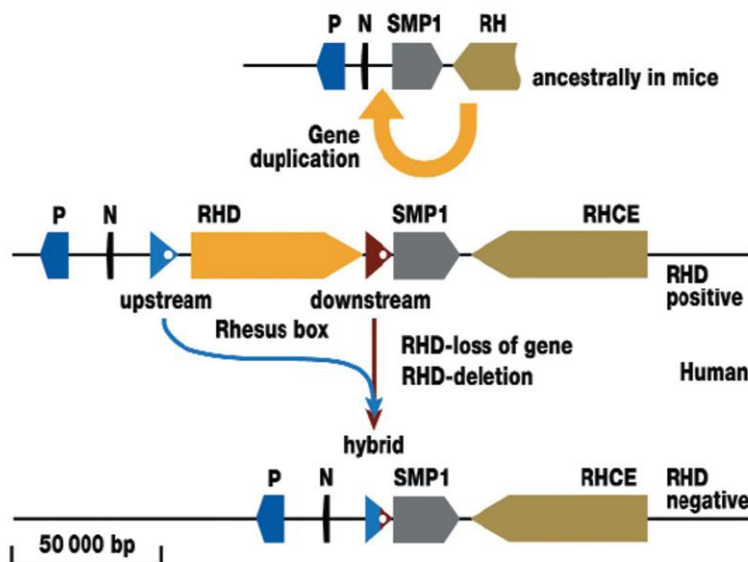


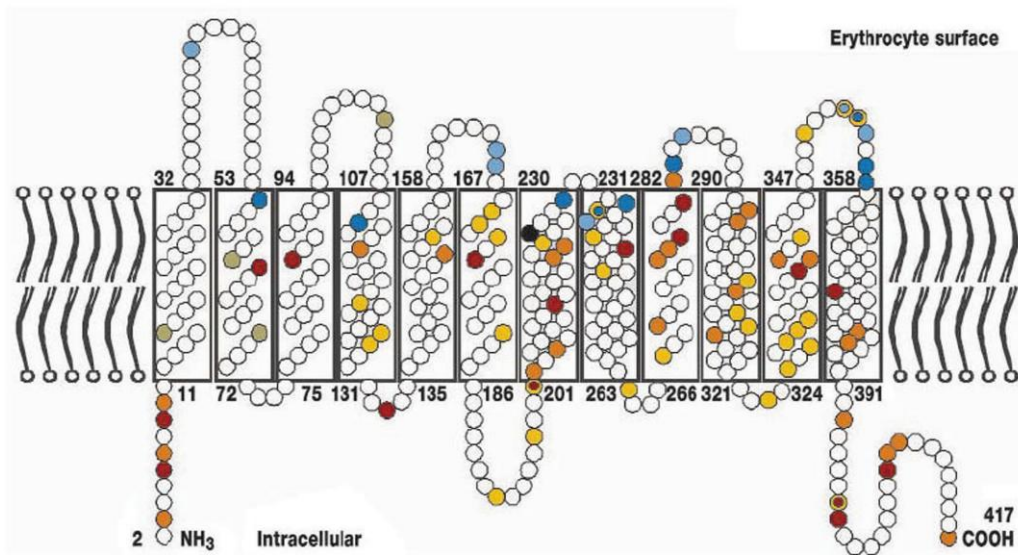
Figura 2 – Duplicação do gene RH e deleção do gene RHD. Em camundongos, o gene ancestral *RH* é adjacente aos genes *SMP1*, *P29 (P)* e *NPD014 (N)*. A duplicação deste gene ancestral gerou o *RHD* na espécie humana, oposto ao *RH* original (*RHCE* em humanos) e localizado entre os genes *N* e *SMP1*. Há ainda dois segmentos de DNA adjacentes ao gene *RHD*, localizados nas posições *upstream* e *downstream*, denominados *Rhesus boxes*. Em alguns humanos (RhD negativos), ocorre a deleção do gene *RHD*, surgindo como consequência um *Rhesus box* híbrido.

Fonte: FLEGEL, 2007b.

Os antígenos *D*, *C*, *c*, *E*, *e* se localizam em duas proteínas expressas na membrana e seus precursores imediatos: RhD (CD240D) e RhCE (CD240CE) (FLEGEL, 2007b; NARDOZZA et al., 2010). Ambas são hidrofóbicas e não glicosiladas, contendo cada uma um peso molecular de 30 a 32 KDa, além de possuírem 417 aminoácidos distribuídos em sete segmentos intracelulares, 12 transmembranosos e seis extracelulares (NARDOZZA et al., 2010). As porções N-terminal e C-terminal estão na região intracelular (FLEGEL, 2007b - Figura 3).

Quatro substituições de aminoácidos na proteína RhCE estão associadas ao polimorfismo C/c. Todas elas se originam de SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único): Cys16Trp, em decorrência de 48C>G; Ile60Leu, devido a 178A>C; Ser68Asn, em decorrência de 203G>A e Ser103Pro, devido a 307T>C. Esta última, localizada no segundo domínio extracelular, é a definitiva para o surgimento dos antígenos C e/ou c. Já o

polimorfismo E/e resulta de Pro226Ala, devido a 676C>G (DANIELS, 2005; FLEGEL, 2007b – Figura 3).



- 5 **Figura 3 - Proteína Rh na membrana eritrocitária.** As diferenças entre as proteínas RhD e RhCE surgem em decorrência dos aminoácidos em amarelo. Na proteína RhCE, os quatro aminoácidos em cinza codificam os antígenos C/c, enquanto o aminoácido em preto codifica os antígenos E/e. Em azul, as substituições de aminoácidos que levam ao fenótipo D parcial; em vermelho, fenótipo D fraco.
Fonte: FLEGEL, 2007b.

10

Para que o antígeno C possa ser expresso, também é necessária uma inserção de 109 pb no íntron 2 do gene RHCE (CARRITT; KEMP; POULTER, 1997).

- Nos caucasianos, o principal mecanismo responsável pela não expressão do antígeno D (fenótipo RhD negativo), é a deleção completa do gene *RHD* (LONDERO et al., 2011).
 15 Quanto aos negros, Singleton et al. (2000) avaliaram doadores de sangue desta etnia provenientes da África e dos Estados Unidos, além de mestiços africanos (todos com fenótipo RhD negativo), verificando que 66% dos negros africanos e 24% dos negros americanos apresentaram uma variação do gene *RHD*, conhecida como pseudogene *RHD* (*RHD* ψ). A deleção total do *RHD* foi encontrada em 54% dos americanos e em 18,29% dos africanos,
 20 enquanto nos demais doadores foi observado um gene híbrido (*RHD-CE-D*).

- O *RHD* ψ surge de uma inserção de 37 pb no éxon 4 do gene *RHD*, levando a uma mutação *nonsense* (sem sentido), com o surgimento de um *stop codon* ou códon de parada prematuro e posterior término da tradução proteica no éxon 6 do gene. Como consequência, não haverá expressão do antígeno D na membrana da hemácia e o indivíduo será fenotipado
 25 como RhD negativo (SINGLETON et al., 2000).

Na determinação do genótipo *RHD* de um indivíduo por técnicas moleculares, a pesquisa de *RHD ψ* deve ser feita para evitar um resultado falso-positivo (CASTILHO; PELLEGRINO JÚNIOR, 2004).

Como se pode depreender, o grande e complexo polimorfismo gênico do sistema Rh pode ser adequadamente avaliado somente através de testes moleculares, sem os quais aumenta a possibilidade de aloimunização em gestantes e politransfundidos. Além disso, como previamente citado, Rh é o segundo sistema sanguíneo em importância clínica (FLEGEL, 2007b). Em sua maioria, os anticorpos do sistema (classe IgG) são clinicamente relevantes em transfusões e gestações, reagindo a 37°C e causando hemólise, que de um modo geral é extravascular (CASTILHO, 2007).

1.7 Sistema Kell

O sistema Kell é altamente polimórfico, possuindo 35 antígenos (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015). Sua descoberta ocorreu em 1946; nesta ocasião, o anticorpo anti-K (anti-Kell ou anti-KEL1) foi identificado em uma gestante, sendo dirigido contra antígenos fetais provenientes do marido. O sobrenome da família (Kelleher) deu origem aos nomes do anticorpo e antígeno envolvidos e, posteriormente, do sistema, com uma pequena modificação (Kell) (COOMBS; MOURANT; RACE, 1946).

O gene *KEL* está localizado no cromossomo 7. Ele é herdado de maneira autossômica dominante, varia de forma considerável em diferentes populações e possui 19 éxons, com tamanho aproximado de 21,5 Kb (LEE, 1997; MATTEOCCI et al., 2014).

A tabela 3 ilustra alguns fenótipos e seus respectivos percentuais em caucasianos e negros.

Tabela 3 – Percentuais de fenótipos Kell em caucasianos e negros.

Fenótipo	Caucasianos	Negros
K-k+	91	98
K+k-	0,2	Raro
K+k+	8,8	2
Kp(a+b-)	Raro	0
Kp(a-b+)	97,7	100
Kp(a+b+)	2,3	Raro
Js(a+b-)	0	1
Js(a-b+)	100	80
Js(a+b+)	Raro	19

Fonte: CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015.

Os antígenos do sistema constituem uma glicoproteína de membrana tipo II de 93 KDa, pertencente à família M13 das zinco-endopeptidases. Possui um domínio N-terminal intracelular e um amplo domínio C-terminal extracelular, a qual contém uma sequência de consenso de pentapeptídeos catalíticos de ligação ao zinco. Além disso, contém cinco possíveis sítios de N-glicosilação e 15 resíduos de cisteína (Cys) no domínio extra (LEE, 2007). A glicoproteína está covalentemente ligada a outra proteína, denominada XK, através de uma ponte única de íons dissulfeto (LEE, 2007; MARTIN-BLANC et al., 2013) (Figura 4).

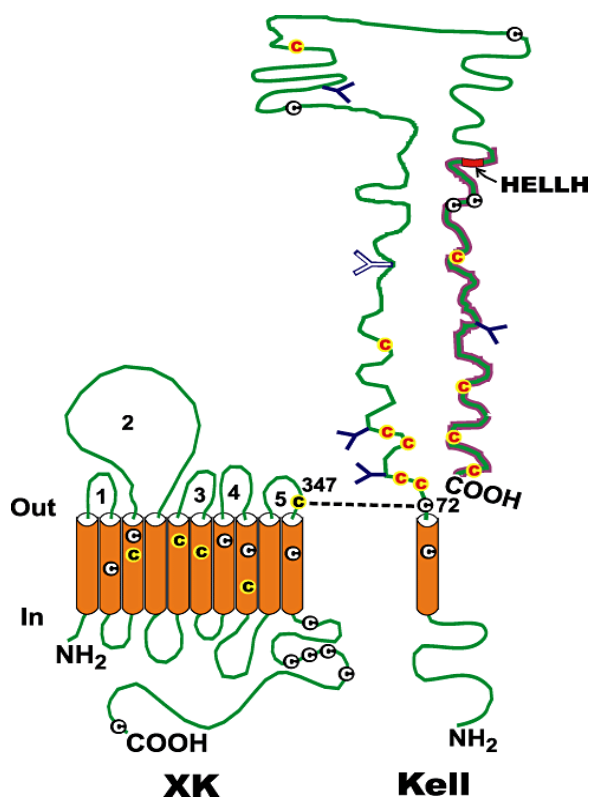


Figura 4 – Complexo proteico Kell/XK. Os domínios transmembrana de ambas as proteínas estão representados por cilindros. Resíduos de cisteína estão marcados como “C” e a ligação dissulfeto entre o resíduo não-conservado Kell Cys-72 e o resíduo conservado XK Cys-347 é mostrado por uma linha pontilhada. As letras “C” nos círculos negros são cisteínas não conservadas. Os cinco possíveis sítios de N-glicosilação sobre a glicoproteína Kell estão marcados como “Y”, enquanto o “Y” vazio é um resíduo de açúcar que está ausente na proteína KEL1. A localização do sítio ativo enzimático de ligação ao zinco da proteína Kell está representada como HELLH. A porção C-terminal de Kell, retratada como uma linha grossa, encontra-se mais conservada na família M13 das zinco-endopeptidases.

Fonte: LEE, 2007.

Existem raros fenótipos, como K_{null} (KELnull ou K_o) e K_{mod} (KELmod); no primeiro caso, não há antígenos Kell na membrana, enquanto no fenótipo K_{mod} os antígenos Kell são fracamente expressos (LEE, 2007).

A glicoproteína Kell é responsável pela conversão de endotelina-3, que tem uma atividade vasoconstrictora (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015; MATTEOCCI, 2014). A ligação entre as proteínas Kell e XK na membrana (Figura 4) sugere que estas constituem um complexo proteico com prováveis funções coordenadas, que envolvem a ativação de endotelina-3 e transporte de membrana (REDMAN; LEE, 2013),
5 embora a proteína XK faça parte de um sistema sanguíneo distinto (sistema XK) (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015).

Os alelos KEL1 e KEL2 se diferenciam por um SNP (578C>T – éxon 6) do gene *KEL*. Na presença de C, será codificado o aminoácido Treonina na posição 193, com o surgimento
10 do fenótipo k (KEL2). Porém, a troca de C por T levará à codificação de Metionina na mesma posição, surgindo o fenótipo K (KEL1) (LEE-STROKA et al., 2008; MATTEOCCI et al., 2014; POOLE et al., 2006). O nucleotídeo T do éxon 6 do gene *KEL*, presente em indivíduos com o alelo KEL1, é o alvo da enzima de restrição *BsmI*, em análises por PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase por Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição),
15 permitindo assim a diferenciação do polimorfismo *KEL*1/KEL*2* (LEE, 2007; POOLE et al., 2006).

No fenótipo selvagem k (K2), a Treonina faz parte de uma sequência consenso de N-glicosilação, porém a troca deste aminoácido por Metionina no fenótipo K (K1) causa interrupção desta sequência, inibindo um dos sítios de N-glicosilação da proteína Kell
20 (DANIELS, 2005; LEE, 2007 – Figura 4). Acredita-se que este seja o motivo da alta imunogenicidade do antígeno K (DANIELS, 2005).

Após os sistemas ABO e Rh, o Kell é considerado o mais importante em transfusões, já que alguns de seus antígenos (como o K) são potentes imunógenos e seus respectivos anticorpos podem causar reações hemolíticas graves (LEE, 2007; MATTEOCCI et al., 2014);
25 em alguns casos, fatais (DANIELS, 2005). Os anticorpos anti-K pertencem à classe IgG e fixam complemento (BORDIN; MOREIRA JÚNIOR, 1996; MARSH; REDMAN, 1990). Já o anticorpo anti-k está envolvido tanto em reações transfusionais hemolíticas quanto em DHPN (MARTIN-BLANC et al., 2013).

A frequência de casos de DHPN por anti-K tem se tornado mais evidente com a
30 instituição rotineira da prevenção da doença por anticorpos anti-D (LEE, 2007). Atualmente, estima-se que 10% dos casos de anemia fetal e neonatal são provocados por anticorpos anti-K (LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007; LEE, 2007). Nestes casos, como a expressão dos antígenos Kell é feita precocemente durante a eritropoiese, esta pode ser suprimida, surgindo uma anemia grave, prolongada e sem sinais de hemólise

(CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015; LEE, 2007). Por tais motivos, em vários países, já é uma prática comum testar todos os doadores de sangue para o antígeno K, a fim de evitar a transfusão de hemácias contendo este antígeno em meninas e mulheres em idade reprodutiva (POOLE et al., 2006).

5

1.8 Sistema Duffy

O sistema tem alta importância fisiológica, transfusional e é alvo de muitas pesquisas (JENS; PAGLIARINI; NOVARETTI, 2005). Foi descrito em 1950 por Cutbush, Mollison e Parkin, pela descoberta do anticorpo anti-Fy^a (anti-Duffy a) no soro de um hemofílico (Sr. Duffy), que apresentou icterícia após a transfusão. No ano seguinte (1951), foi descrito o anticorpo anti-Fy^b (anti-Duffy b), detectado em uma gestante, dois dias após o nascimento de seu terceiro filho; todavia, nenhum dos filhos apresentou sinais de DHPN (IKIN et al., 1951). Já em 1955, Sanger e outros pesquisadores observaram que o fenótipo Fy (a-b-) era o mais comum em afroamericanos, sendo provavelmente produto de um alelo silencioso (*FY*).

Após a descoberta dos antígenos Fy^a e Fy^b, outros foram descritos, como Fy³, Fy⁴, Fy⁵ e Fy⁶, com a descoberta dos respectivos anticorpos (CASTILHO, 1996; JENS; PAGLIARINI; NOVARETTI, 2005). Contudo, Fy^a e Fy^b são os principais antígenos na prática transfusional (LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007). São antitéticos e produzidos por alelos codominantes (FYA e FYB), enquanto os anticorpos correspondentes definem quatro fenótipos: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+) e Fy(a-b-) (CASTILHO, 2007; MENY, 2010).

O gene Duffy (*FY* ou *DARC*) está localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q23.2) e possui dois éxons distribuídos em 1,5 Kpb de DNA (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015). A expressão dos antígenos Fy^a e Fy^b se diferencia por um SNP na posição 125 (G>A). Na presença de G, temos o alelo FYA, havendo codificação do aminoácido glicina (Gly) na posição 42 e expressão do antígeno Fy^a. Porém, na troca por A, surge o alelo FYB, com o ácido aspártico (Asp) sendo codificado e o antígeno Fy^b sendo expresso. O nucleotídeo G (alelo FYA), é o alvo da enzima de restrição *BanI*, em análises por PCR-RFLP, permitindo assim a diferenciação do polimorfismo FYA/FYB (CASTILHO et al., 2004).

A tabela 4 ilustra os fenótipos Duffy, com os respectivos genótipos e percentuais em caucasianos e negros africanos.

Tabela 4 – Sistema de grupo sanguíneo Duffy: fenótipos, genótipos e frequências populacionais em caucasianos e negros africanos.

Fenótipo	Caucasianos		Negros africanos	
	Genótipo	Frequência	Genótipo	Frequência
Fy(a+b-)	Fy^a/Fy^a	20%	Fy^a/Fy^a ou Fy^a/Fy	10%
Fy(a+b+)	Fy^a/Fy^b	48%	Fy^a/Fy^b	3%
Fy(a-b+)	Fy^b/Fy^b	32%	Fy^b/Fy^b ou Fy^b/Fy	20%
Fy(a-b-)		0%	Fy/Fy	67%

Fonte: DANIELS, 2005.

5 O fenótipo Fy(a-b-) é o mais comum em negros e muito raro em caucasianos (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015; MENY, 2010). Tais indivíduos são homozigotos para um alelo Fy^b (ou FYB) contendo uma mutação em um sítio de ligação para o fator de transcrição eritroide-específico GATA-1, na região promotora do gene Duffy (*FY*). Tal mutação (-67 t>c), provoca uma desregulação no referido sítio (MENY, 2010).

10 Descrevendo a mutação de forma mais específica, existe uma sequência consenso para o sítio de ligação GATA-1 (TTATCT), a qual está presente em alelos Fy^a (FYA) e Fy^b (FYB) ativos; porém, no alelo Fy^b mutado e inativo, conhecido como *Fy* (Tabela 5), a referida mutação (-67t>c), localizada na região *upstream* no códon de início da tradução proteica (que codifica o aminoácido metionina) converte a sequência TTATCT em TTACCT (Tabela 5), a qual é incompatível com o sítio de ligação GATA-1 (DANIELS, 2005). Isso faz com que a glicoproteína Duffy não esteja presente nas hemácias (já que GATA-1 é eritroide-específico), porém seja expressa normalmente em outros tecidos contendo o gene Duffy (DANIELS, 15 2005; MENY, 2010). Dentre estes outros tecidos, estão: células endoteliais dos vasos capilares e pós-capilares, células epiteliais dos dutos coletores do rim, alvéolos pulmonares e células de Purkinge do cerebelo (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015).

A tabela 5 mostra os alelos Duffy, com a sequência do sítio de ligação GATA-1, o resíduo de aminoácido na posição 42, antígenos expressos nas hemácias e ocorrência populacional.

25

30

Tabela 5 - Principais alelos do sistema Duffy.

Alelos (com símbolos alternativos)			Sequência do sítio de ligação GATA-1	Resíduo de aminoácido 42	Antígeno expresso nas hemácias	Ocorrência
<i>Fy^a</i>	<i>FY*1</i>	<i>FYA</i>	TTATCT	Gly	<i>Fy^a</i>	Maioria da população
<i>Fy^b</i>	<i>FY*2</i>	<i>FYB</i>	TTATCT	Asp	<i>Fy^b</i>	Maioria da população
<i>Fy</i>	<i>FY*0</i>	<i>FYB^{ES}</i>	TTACCT	Asp	Nenhum	Africanos
<i>Fy</i>		<i>FYA0</i>	TTACCT	Gly	Nenhum	Papua-Nova Guiné

Fonte: DANIELS, 2005.

Experimentos com merozoítas do gênero *Plasmodium*, responsáveis pela malária no homem e em primatas, sugeriram que antígenos Duffy atuam como receptores para o parasita, ao ser observado que os eritrócitos *Fy* (a-b-) eram resistentes à invasão por *P. knowlesi* e *P. vivax in vitro* (BARNWELL; NICHOLS; RUBINSTEIN, 1989; MILLER; MASON; DVORAK, 1975). Tais achados provavelmente explicam o alto índice do alelo *Fy* (com mutação na região GATA-1) em africanos e ausência da expressão dos antígenos Duffy em suas hemácias. O fenótipo *Fy*(a-b-), oriundo desta mutação, promoveria uma resistência aos agentes causadores da malária, havendo uma pressão seletiva por parte do parasita (DANIELS, 2005; MENY, 2010).

O alelo *FYA0* ou *FYA* nulo (Tabela 5) tem sido descrito não apenas em Papua Nova-Guiné, como também em outras regiões endêmicas para a malária causada pelo *P. vivax*, como a Amazônia (LANGHI JÚNIOR et al., 2004).

Um estudo em 28 pacientes com fenótipo *Fy^b* negativo verificou que 25 apresentaram a mutação na região GATA-1, os quais receberam uma mediana de 6,5 componentes sanguíneos *Fy^b* positivos e foram acompanhados em um período de seis meses a um ano; porém, nenhum deles produziu anticorpos anti-*Fy^b* ou anti-*Fy3* (CASTILHO, 2007).

Os antígenos Duffy também atuam como receptores multiespecíficos de quimiocinas. Ao ser observado que os dois éxons *FY* estão organizados da mesma forma que os genes de outros receptores de quimiocinas, estes antígenos passaram a ser também denominados DARC (*Duffy Antigen Receptor Chemokines* ou Antígenos Duffy Receptores de Quimiocinas) (CHAUDHURI et al., 1994; NEOTE et al., 1994).

Um alelo correlacionado com a expressão enfraquecida do antígeno *Fy^b*, resultando no fenótipo *Fy^b* fraco (*Fy^x*) foi descrito em 1965 no locus *FY*, sendo denominado *Fy^x* (CHOWN; LEWIS; KAITA, 1965). O antígeno em questão reage fracamente com anticorpos anti-*Fy^b*,

podendo ser detectado somente por técnicas sorológicas de adsorção e eluição, as quais, entretanto, nem sempre são eficazes na sua identificação (JENS; PAGLIARINI; NOVARETTI, 2005).

Os determinantes antigênicos do sistema se localizam em uma glicoproteína ácida, a qual atravessa sete vezes a membrana da hemácia e possui um domínio N-terminal na porção extracelular e um domínio C-terminal na porção intracelular (CASTILHO, 2007; MENY, 2010 – Figura 5).

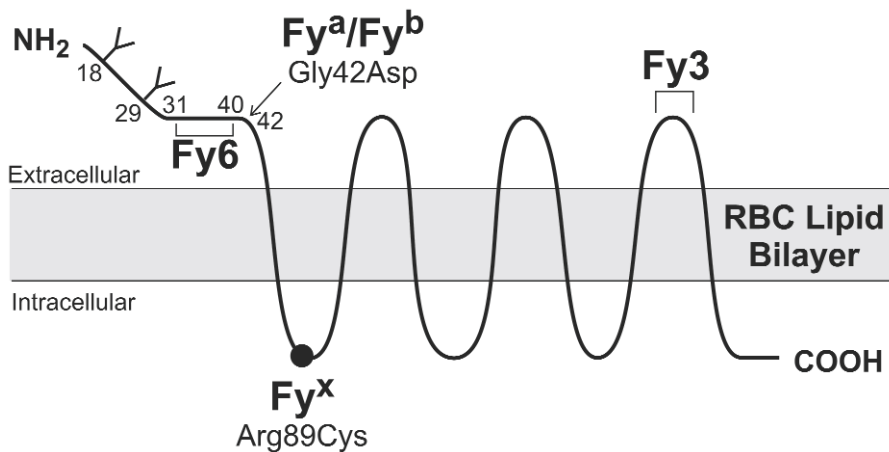


Figura 5 – Representação esquemática da glicoproteína Duffy na membrana do eritrócito. Na figura, estão representados seus sete domínios transmembranares. Mudanças de aminoácidos responsáveis pelo polimorfismo Fy^a/Fy^b , mutação Fy^x e regiões $Fy3$ e $Fy6$ estão indicadas.
Fonte: MENY, 2010.

Os anticorpos Duffy são predominantemente da subclasse IgG1 e 50% deles ligam complemento (MENY, 2010). Como os antígenos do sistema possuem imunogenicidade moderada e os anticorpos baixam seus títulos em pouco tempo, os mesmos dificilmente são detectados na rotina transfusional (CASTILHO, 1996). Contudo, possuem grande importância clínica, reagindo a 37°C e causando hemólise pós-transfusional e DHPN (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015; LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007). A severidade das reações hemolíticas varia de moderada a grave, podendo ser imediata ou tardia (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015).

1.9 Sistema Kidd

O sistema Kidd foi descoberto em 1951, em um caso onde um anticorpo responsável por DHPN foi encontrado no soro da Sra. Kidd, daí o nome do sistema. O antígeno e anticorpo em questão ficaram conhecidos como Jk^a (Kidd a) e anti-Jk^a (anti-Kidd a), respectivamente; estas iniciais (Jk) vieram do nome do neonato (John Kidd) (ALLEN; DIAMOND; NIEDZIELA, 1951). O antígeno e anticorpo antitéticos (Jk^b e anti-Jk^b) foram identificados dois anos depois, em um caso de reação hemolítica pós-transfusional (PLAUT et al., 1953).

De acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), apenas três antígenos são reconhecidos (Jk^a, Jk^b e Jk3) (ISBT, 2015), sendo este último encontrado nas hemácias contendo os antígenos Jk^a e Jk^b, de maneira isolada ou concomitante (LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007).

A tabela 6 mostra as frequências dos fenótipos Kidd em asiáticos, negros e caucasianos, juntamente com a reatividade de cada fenótipo do sistema com diferentes antissoros.

Tabela 6 – Reatividade dos fenótipos Kidd com antissoros e frequências fenotípicas em asiáticos, negros e caucasianos.

Fenótipo eritrocitário	Reatividade com Anti-			Prevalência		
	Jka	Jkb	Jk3	Asiáticos	Negros	Caucasianos
Jk(a+b-)	+	0	+	23,2%	51,1%	26,3%
Jk(a-b+)	0	+	+	26,8%	8,1%	23,4%
Jk(a+b+)	+	+	+	49,1%	40,8%	50,3%
Jk(a-b-)	0	0	0	0,9%	Raro	Raro
				(polinésios)		

Fonte: LOMAS-FRANCIS, 2007.

Quanto ao antígeno Jk3, este é encontrado em mais de 99% dos caucasianos (MONTALVO et al., 2004).

O raro fenótipo Jk(a-b-) (Jk_{null}) é normalmente herdado de forma homozigota para o alelo JK silencioso, com várias mutações deste tipo de alelo encontradas em diferentes populações (INTHARANUT et al., 2013). O antígeno Jk3 também está ausente nestes indivíduos (LOMAS-FRANCIS, 2007; TOYODA et al., 2014).

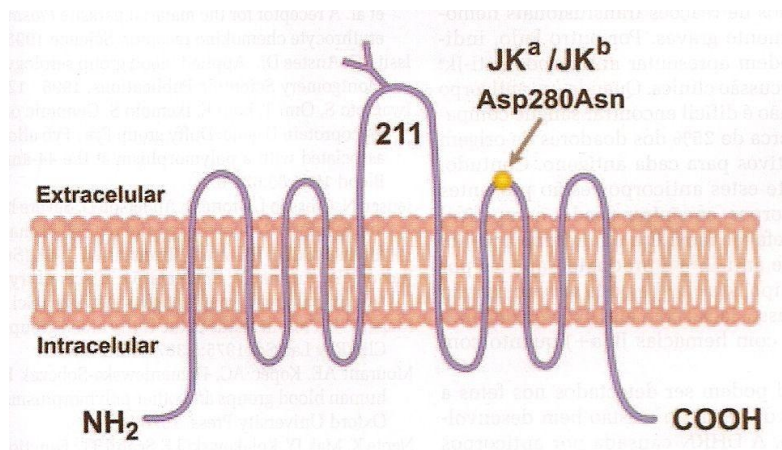
O gene Kidd (*JK*) se localiza no cromossomo 18 (18q11-q21), sendo organizado em 11 éxons distribuídos em mais de 30 Kpb de DNA (GEITVIK et al., 1987). Este gene também

é denominado *SLC14A* ou *HUT1*, pois foi descoberto que ele codifica a proteína transportadora de ureia em humanos, HUT11 (GUO et al., 2013; LOMAS-FRANCIS, 2007).

A glicoproteína JK madura, a qual apresenta 389 aminoácidos, é codificada pelos éxons 4 a 11, com o início da tradução proteica localizada no éxon 4 (LUCIEN et al., 1998).

5 Trata-se de uma proteína transmembrana, com 10 passagens através da mesma (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015; LOMAS-FRANCIS, 2007). Sua expressão ocorre não somente nos eritrócitos, como também nas células endoteliais da medula renal (LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007).

10 A figura 6 mostra um esquema da proteína transportadora Kidd/uréia na membrana do eritrócito.



15 **Figura 6** – Esquema da estrutura da proteína transportadora Kidd/uréia na membrana eritrocitária. Está indicado o polimorfismo responsável pelos antígenos Kidd e um sítio de glicosilação (Asn211 - Y).

Fonte: LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007.

Os antígenos Jk^a e Jk^b são produtos de dois alelos (JK^*A (JK^*01) e JK^*B (JK^*02)), herdados de forma codominante. O polimorfismo JK^*A/JK^*B (838 G>A - éxon 9) resulta em
 20 uma substituição Asp280Asn, daí surgindo os três fenótipos mais comuns dentro do sistema: $Jk(a+b-)$, $Jk(a-b+)$ e $Jk(a+b+)$, respectivamente (LOMAS-FRANCIS, 2007; TOYODA et al., 2014). Tal polimorfismo está localizado na quarta volta extracelular da glicoproteína Kidd (Figura 6) (LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007; LOMAS-FRANCIS, 2007).

25 O nucleotídeo 838G, do alelo JK^*A , está associado à presença de um sítio de clivagem reconhecido pela enzima de restrição *MnlI*, na análise molecular do polimorfismo JK^*A/JK^*B por PCR-RFLP (LOMAS-FRANCIS, 2007).

Neste sistema, os anticorpos possuem grande importância clínica, reagindo a 37°C e estando envolvidos em DHPN e reações hemolíticas pós-transfusionais (LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007; LOMAS-FRANCIS, 2007), as quais podem ser imediatas e tardias (LOMAS-FRANCIS, 2007). Quanto à DHPN, sua severidade pode variar, mas com tendência a ser branda (INTHARANUT et al., 2013; LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007; LOMAS-FRANCIS, 2007). Normalmente, estes anticorpos são imunes (IgG), com capacidade elevada de fixação do complemento, consequentemente induzindo hemólise *in vivo* e *in vitro*. Além disso, estão envolvidos em um terço de todos os casos de reações transfusionais hemolíticas tardias, as quais são geralmente graves (LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007; LOMAS-FRANCIS, 2007). Tais reações podem inclusive ser fatais; no entanto, há relatos de indivíduos previamente aloimunizados que, ao receberem hemácias indevidas, não manifestaram qualquer consequência negativa (LOMAS-FRANCIS, 2007).

A seleção de hemácias antígeno-negativas para um paciente que já desenvolveu algum anticorpo Kidd não é difícil, pois aproximadamente 25% dos doadores caucasianos são negativos para cada antígeno (Tabela 6). No entanto, como estes anticorpos normalmente surgem associados a outros, a compatibilidade transfusional estendida a diversos sistemas sanguíneos geralmente não é fácil para tais indivíduos (LANGHI JÚNIOR; BOTURÃO NETO; CARVALHO, 2007; LOMAS-FRANCIS, 2007).

Como no sistema Duffy, os anticorpos do sistema Kidd normalmente estão em baixos títulos, tendendo a diminuir sua concentração com grande facilidade; por estes motivos, também são dificilmente detectados (MELO; SANTOS, 1996a). Dentre outros fatores que dificultam sua detecção, podemos citar: fraca reação nos testes de triagem (em sua maioria) e a possibilidade de efeito de dose; ou seja, eles podem não reagir ou reagir fracamente com hemácias heterozigotas, contendo apenas uma única dose de cada antígeno (Jk(a+b+)), o que exige a utilização de hemácias Jk (a+b-) e Jk (a-b+) na sua pesquisa. Ademais, tais anticorpos, após serem produzidos, rapidamente caem a níveis indetectáveis *in vivo* e muitas vezes se deterioram *in vitro* (LOMAS-FRANCIS, 2007). Tais fatos reforçam, uma vez mais, a importância da genotipagem eritrocitária para a adequada identificação de doadores compatíveis.

1.10 Teste da Antiglobulina ou Reação de Coombs

O Teste da Antiglobulina ou Reação de Coombs foi introduzido em 1945 por Coombs, Mourant e Race, com a finalidade de detectar anticorpos “incompletos”, que se ligam às hemácias, porém são incapazes de provocar aglutinação. Isso ocorre, dentre outras situações, em casos de DHPN e onde há suspeita de reação hemolítica pós-transfusional causada por anticorpos não pertencentes ao sistema ABO.

Este é o princípio do teste: ao reagir um soro contendo anticorpos incompletos com hemácias suspensas em solução salina, caso estas possuam o antígeno eritrocitário correspondente aos anticorpos, ocorre uma retenção destes na superfície das células, as quais ficam então sensibilizadas. Posteriormente, ao juntar um soro anti-IgG, também conhecido como Antiglobulina Humana, ocorre aglutinação das hemácias, resultando em positividade do teste (COOMBS; MOURANT; RACE, 1945).

De um modo geral, os anticorpos incompletos são do tipo IgG, enquanto a maior parte dos anticorpos IgM são completos, ou seja, promovem aglutinação espontânea das hemácias suspensas em meio salino, sem necessidade de adição da antiglobulina (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015; LORENZI, 2006).

A Reação de Coombs vem sendo aplicada rotineiramente nos laboratórios de Imunohematologia até os dias atuais. Entretanto, Robin Coombs não apoiava a denominação “Reação de Coombs” ou “Teste de Coombs”, já que Mourant e Race também foram fundamentais na descoberta do teste (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015).

Quando a finalidade é detectar hemácias sensibilizadas por anticorpos *in vivo*, utiliza-se o Teste da Antiglobulina Direta – TAD (Figura 7). Um TAD positivo pode estar associado a diversas situações, como: (I) reações transfusionais, onde o aloanticorpo do receptor sensibiliza as hemácias provenientes do doador ou anticorpos transfundidos deste se fixam aos eritrócitos do receptor; (II) DHPN ou DHFRN (Doença Hemolítica do Feto e Recém-nascido), em que anticorpos maternos são produzidos e dirigidos contra antígenos eritrocitários específicos do feto, sensibilizando estas células; (III) AHAI (Anemia Hemolítica Autoimune), onde anticorpos são produzidos contra as próprias hemácias do paciente (autoanticorpos), também sensibilizando os eritrócitos; (IV) interações de medicamentos ou complexos droga-anticorpo com as hemácias do paciente (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015).

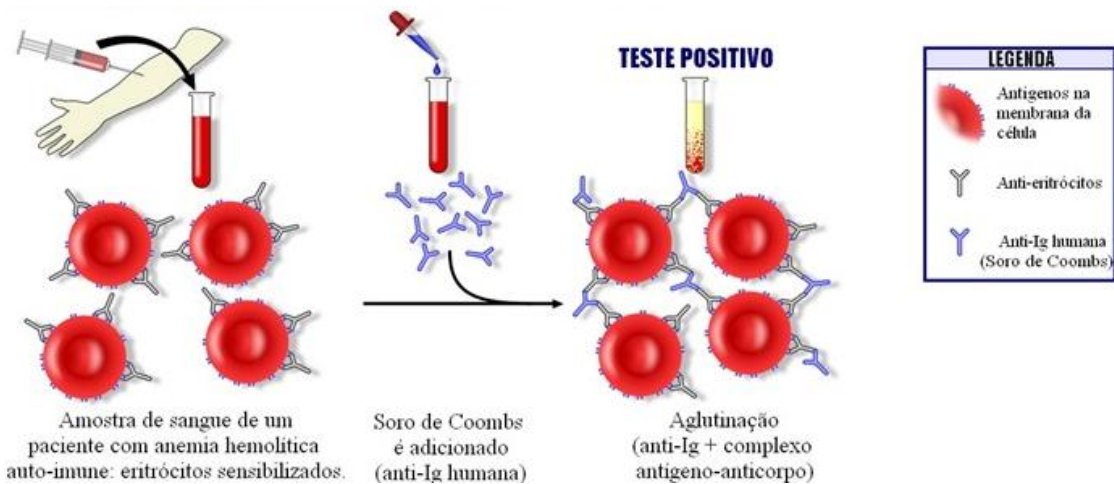


Figura 7 – Teste da Antiglobulina Direta.

Fonte: <http://www.biomedicinapadrao.com.br/2010/11/teste-de-coombs-direto.html>.

- 5 O Teste da Antiglobulina também é utilizado para detecção de hemácias sensibilizadas *in vitro*, como na determinação de antígenos eritrocitários (fenotipagem), pesquisa e identificação de diversos anticorpos eritrocitários e em provas de compatibilidade entre doadores e receptores de concentrados de hemácias, recebendo nestes casos a denominação “Teste da Antiglobulina Indireta” (TAI) (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015)
- 10 (Figura 8).

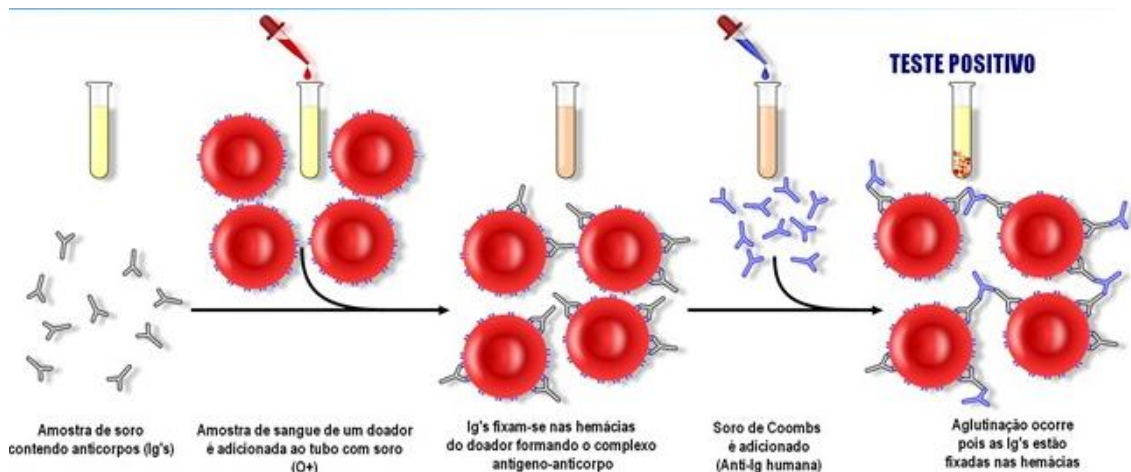


Figura 8 – Teste da Antiglobulina Indireta.

Fonte: <http://www.biomedicinapadrao.com.br/2011/02/teste-de-coombs-indireto.html>.

2. JUSTIFICATIVA

Como demonstrado, existem diversos polimorfismos envolvendo antígenos eritrocitários de vários sistemas sanguíneos. Estes polimorfismos resultam em numerosas diferenças antigênicas entre os indivíduos, incluindo doadores de sangue e receptores de transfusões de concentrados de hemácias. Tais diferenças, por sua vez, aumentam a possibilidade de uma exposição destes pacientes a antígenos não próprios, com consequentes riscos de aloimunização eritrocitária, reação transfusional hemolítica e, em alguns casos, óbito, os quais são ainda maiores em indivíduos que requerem transfusões crônicas, como os portadores de hemoglobinopatias, leucemias agudas e insuficiência renal crônica.

Na tentativa de minimizar estes riscos, aumentando a compatibilidade antigênica entre doadores e receptores, a fenotipagem eritrocitária tem sido adotada em diversos hemocentros; contudo, o método possui várias limitações (previamente demonstradas). Estas limitações são superadas pela genotipagem eritrocitária, a qual, todavia, ainda é utilizada de forma bastante restrita nos países em desenvolvimento, como o Brasil.

Outro fator muito importante, também já mencionado, mas que requer destaque, é a diferença na frequência de diversos antígenos eritrocitários com relação às etnias. Sabe-se, como demonstrado no último censo demográfico realizado no Brasil pelo IBGE em 2010, que existem diferenças consideráveis com relação aos percentuais étnicos em diferentes estados brasileiros e até mesmo num mesmo estado, como Minas Gerais e, ainda, nos diferentes estratos populacionais de uma mesma região. De acordo como o censo, Minas Gerais possui 45,39% de indivíduos brancos, 44,28% de pardos e 9,22% de negros. Em São Paulo, estes mesmos percentuais são: 63,91%, 29,11% e 5,52%, enquanto no Paraná as diferenças são ainda maiores (70,32%, 25,09% e 3,17%, respectivamente) (IBGE, 2010a) (Tabela 7). Segundo o mesmo censo, a população de Uberaba era composta de 61,88% de brancos, 27,96% de pardos e 9,11% de negros (IBGE, 2010a) (Tabela 8). Na comparação dos percentuais étnicos de Minas Gerais e Uberaba com os referidos estados, há diferenças estatisticamente significantes (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 – Percentuais de etnia dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná.

Etnia	Minas Gerais (n = 19.597.330)		São Paulo (n = 41.262.199)		p	Paraná (n = 10.444.526)		p
	n	%	n	%		n	%	
Branços	8.894.547	45,39	6.824.668	63,91		7.344.122	70,32	
Pardos	8.677.745	44,28	3.433.218	29,11		2.620.378	25,09	
Negros	1.806.541	9,22	736.083	5,52	<0,001*	330.830	3,17	<0,001*
Amarelos	187.119	0,95	246.244	1,35		123.205	1,18	
Indígenas	31.112	0,16	12.977	0,10		25.915	0,25	
Sem declaração	266	0,001	127	0,006		76	0,000 7	

*Teste Qui-quadrado.

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010a).

5 **Tabela 8** – Percentuais de etnia da cidade de Uberaba-MG e dos estados de São Paulo e Paraná.

Etnia	Uberaba (n = 295.988)		São Paulo (n = 41.262.199)		p	Paraná (n = 10.444.526)		p
	n	%	n	%		n	%	
Branços	183.150	61,88	6.824.668	63,91		7.344.122	70,32	
Pardos	82.757	27,96	3.433.218	29,11		2.620.378	25,09	
Negros	26.976	9,11	736.083	5,52	<0,001*	330.830	3,17	<0,001*
Amarelos	2.700	0,91	246.244	1,35		123.205	1,18	
Indígenas	405	0,14	12.977	0,10		25.915	0,25	
Sem declaração	0	0	127	0,006		76	0,0007	

*Teste Qui-quadrado.

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010a).

10 Também em Uberaba, um estudo realizado em recém-nascidos de um hospital universitário, que atende prioritariamente sua população mais carente da cidade e região de abrangência, classificou os indivíduos em: ancestralidade africana (negros, pardos, caucasianos com antecedentes negros e mistos), ancestralidade européia (caucasianos com ancestralidade caucasiana) e ancestralidade desconhecida, evidenciando os seguintes índices: 91,2%, 7,6% e 1,2%, respectivamente (SOUZA et al., 2015).

15 Estes dados reforçam a importância de estudar a frequência dos antígenos eritrocitários em diferentes estados e regiões do país; porém, isso tem sido realizado com frequência em São Paulo (BOTURÃO-NETO et al., 2008; NOVARETTI; DORLHIAC-LLACER; CHAMONE, 2000; PELLEGRINO JÚNIOR et al., 2001; RIBEIRO et al., 2009) e Paraná (GUELSIN et al., 2010; GUELSIN et al., 2011), enquanto em Minas Gerais nenhum
20 trabalho foi identificado.

Diante de tais fatos, o presente estudo se propõe a investigar a frequência de genótipos eritrocitários de doadores de sangue e receptores de concentrados de hemácias (CH), transfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba (HRU)/Fundação Hemominas e/ou

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC/UFTM), numa região onde este perfil não é conhecido e cuja distribuição étnica populacional difere da observada em outros estados onde estes trabalhos já têm sido realizados. Além disso, reforçar a importância e os benefícios da genotipagem eritrocitária em pacientes politransfundidos, a fim de aumentar a segurança transfusional, por meio de uma melhor seleção de bolsas compatíveis, consequentemente minimizando os riscos de aloimunização eritrocitária, reação transfusional hemolítica e, em alguns casos, até mesmo de óbito nestes indivíduos.

10

15

20

25

30

3. HIPÓTESES

O presente estudo levantou as seguintes hipóteses:

- 5
- 1) A frequência dos genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd de doadores de sangue e politransfundidos no HRU e HC/UFTM difere da observada em estudos realizados em outros estados brasileiros, em decorrência das diferentes composições étnicas;
 - 2) Pacientes politransfundidos no HRU e HC/UFTM recebem alto número de transfusões
- 10 de hemácias incompatíveis, pelo fato da fenotipagem não apresentar resultados confiáveis nestes indivíduos e o emprego da genotipagem ser inexpressivo na rotina do HRU.

15

20

25

30

4. OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi pesquisar e determinar a frequência dos genótipos eritrocitários dos sistemas sanguíneos Rh, Kell, Duffy e Kidd em doadores de sangue e 5 pacientes politransfundidos no HRU/Fundação Hemominas e/ou HC/UFTM, inclusive comparando os percentuais entre doadores e receptores.

Como objetivos específicos:

- 1) Determinar e comparar as frequências dos referidos genótipos em diferentes 10 categorias epidemiológicas (gênero e etnia);
- 2) Pesquisar os fenótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd, comparando-os aos respectivos genótipos, em todos os indivíduos da pesquisa;
- 3) Verificar o número de transfusões recebidas por cada paciente (total e nos três 15 meses anteriores à coleta da amostra sanguínea para realização dos testes de genotipagem e fenotipagem), comparando estes números entre receptores com e sem discrepâncias genótipo(s)/fenótipo(s);
- 4) Verificar, nos receptores com e sem discrepâncias entre genótipo(s) e fenótipo(s), 20 o número de transfusões de concentrados de hemácias recebido nos últimos três meses com fenótipos compatíveis e incompatíveis aos seus respectivos genótipos;
- 5) Determinar a frequência de aloanticorpos eritrocitários nos pacientes e a sua 25 especificidade, bem como o número de transfusões em receptores aloimunizados e não aloimunizados. 30

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

5 O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) (protocolo número 2226) (Anexo) e Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Minas Gerais (HEMOMINAS) (protocolo número 341) (Anexo).

10

5.2 Coleta de amostras sanguíneas e dados clínicos e epidemiológicos

No período de agosto de 2013 a agosto de 2015, foram coletadas amostras sanguíneas em tubos contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), por meio de
15 punção venosa, de 287 indivíduos, incluindo 170 doadores de sangue com mediana de seis doações prévias no HRU (1-80) e 117 pacientes (adultos e menores de idade) que receberam no mínimo três transfusões de concentrados de hemácias (CH) no HRU e/ou HC/UFTM, após a obtenção da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice). Caso o paciente não estivesse em condições de ler e/ou assinar o termo, isso foi
20 feito por algum familiar ou acompanhante do mesmo, autorizando a realização do procedimento. No caso de menores de idade, foi obtido o consentimento e assinatura dos pais ou responsáveis. As coletas das amostras foram feitas no HRU e/ou HC/UFTM.

Dentre os 117 receptores, 66 (56,41%) eram portadores de hemoglobinopatias (63 – 53,85% - anemia falciforme), 30 (25,64%) de doenças onco-hematológicas, quatro (3,42%) de
25 anemia aplásica (04), dois (1,71%) de aplasia eritroide e 15 (12,82%) de insuficiência renal crônica (Figura 9).

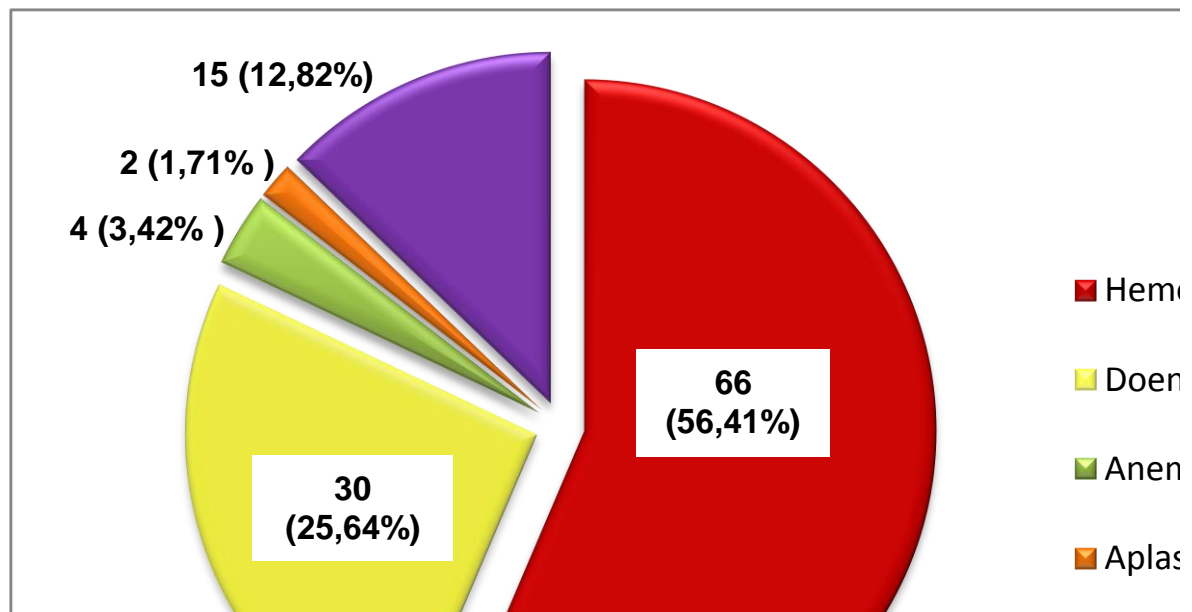


Gráfico 1 – Distribuição dos 117 politransfundidos estudados quanto ao diagnóstico.

5 Como critérios de inclusão, foram selecionados doadores de sangue com no mínimo uma doação prévia no HRU, previamente fenotipados (em sua maioria), pareados quanto ao gênero e pacientes adultos e menores de idade, também de ambos os gêneros, portadores dos referidos diagnósticos, que receberam no mínimo três transfusões de CH no HRU e/ou HC/UFTM. Como critérios de exclusão, não foram selecionados doadores de sangue de
10 primeira vez e receptores não crônicos (ou esporádicos) de CH.

Os doadores foram abordados e convidados a participar do estudo minutos antes da doação, após terem sido considerados aptos à triagem clínica e suas amostras sanguíneas foram coletadas ao final da doação, juntamente com outras coletas para a realização de exames sorológicos e imuno-hematológicos de rotina. Já os pacientes e/ou familiares dos
15 mesmos foram abordados no ambulatório do HRU e/ou HC/UFTM, com as coletas sanguíneas sendo feitas juntamente com outras para exames de rotina (previamente agendados). Todos os indivíduos foram esclarecidos quanto à importância do estudo, no sentido de aumentar ainda mais a segurança transfusional e minimizar o risco de reação hemolítica pós-transfusional.

20 O cálculo amostral não foi feito; contudo, baseando-nos na experiência do serviço quanto ao perfil étnico de nossa população de doadores e receptores e em estudos anteriores de prevalência de aloimunização, bem como em dados da literatura, estimamos estudar aproximadamente 120 pacientes e 150 a 200 doadores, na dependência dos resultados encontrados.

Tanto dos doadores quanto dos pacientes, foram obtidos os seguintes dados: gênero, etnia (inclusive dos pais e avós maternos e paternos), data de nascimento e tipo sanguíneo ABO/RhD. Para identificação da etnia, foram adotados os critérios empregados pelo IBGE, que classifica os indivíduos em brancos, negros, amarelos, pardos e indígenas, de acordo com um questionário aplicado aos mesmos, o qual se encontra disponível no site do instituto (IBGE, 2010c). Este método foi utilizado em virtude do fato de que 96% dos entrevistados sabem fazer sua autotipagem corretamente no que diz respeito à cor ou raça (PORTAL BRASIL, 2011). Ademais, durante o questionamento da etnia, verificamos concordância da classificação étnica informada com a observada pelo entrevistador através das características morfológicas (cor da pele, a conformação do crânio e do rosto, o tipo de cabelo, etc).

Somente dos receptores, coletamos os seguintes dados: diagnóstico, número total de transfusões recebidas no HRU e/ou HC/UFTM e número de transfusões recentes (nos três meses anteriores à coleta das amostras sanguíneas para a realização dos testes de genotipagem e fenotipagem eritrocitárias). Dos doadores: número total de doações prévias no HRU. A fonte para obtenção dos dados foram informações fornecidas pelo próprio doador ou paciente, além de dados dos arquivos do hemocentro ou dos prontuários do Hospital de Clínicas da UFTM ou do Hemocentro Regional de Uberaba/HEMOMINAS.

Em todos os sujeitos da pesquisa, os resultados entre fenotipagem e genotipagem eritrocitária foram comparados. Nos pacientes com transfusão recente, verificamos os fenótipos dos respectivos doadores.

Dentre os pacientes, foi levantado ainda o histórico de aloimunização eritrocitária, bem como o desenvolvimento ou não de novos aloanticorpos após a coleta das amostras sanguíneas, incluindo a especificidade dos mesmos, observando os resultados de Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) e Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI) realizados em transfusões subsequentes, por meio de dados disponíveis nos arquivos dos Serviços de Fracionamento e Prova Cruzada do HRU.

5.3 Fenotipagem eritrocitária e Teste da Antiglobulina Direta (TAD)

30

Os tubos EDTA com as amostras sanguíneas foram centrifugados, separando-se os elementos figurados (hemácias e leucócitos) do plasma. As hemácias foram submetidas ao método da fenotipagem, com todos os reagentes adquiridos da empresa DiaMed-BioRad® (Lagoa Santa-MG, Brasil), seguindo-se as recomendações do fabricante. A técnica utilizada

(ID-Perfil - DiaMed), consiste em uma metodologia de aglutinação em colunas gel-teste dispostas em cartões; cada coluna (microtubo) possui anticorpos monoclonais específicos para determinado antígeno eritrocitário.

Tanto em doadores como nos pacientes, os sistemas pesquisados foram: Rh (antígenos C, c, E, e); Kell (antígenos K e k); Duffy (antígenos Fy^a e Fy^b) e Kidd (antígenos Jk^a e Jk^b). Na fenotipagem dos antígenos C, c, E, e, K, k, Jk^a e Jk^b, foram pipetados 10 microlitros de suspensão das hemácias a serem pesquisadas em cada microtubo dos cartões; no caso do sistema Rh e antígeno K, a suspensão foi preparada a 5% em solução LISS (Solução Salina de Baixa Força Iônica - DiaMed-BioRad[®]); para o sistema Kidd, uma suspensão também a 5%, porém em solução de Bromelina (DiaMed-BioRad[®]), com as hemácias sendo diluídas nesta substância e mantidas em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. Após isso, as suspensões foram pipetadas nos cartões, os quais foram centrifugados a 1.000 RPM por 10 minutos em centrífuga específica (ID-Centrífuga 12 S II - DiaMed-BioRad[®]). Por fim, procedeu-se à leitura e anotação dos resultados, observando-se a presença ou não de aglutinação nos microtubos. Em caso de reação dos anticorpos presentes nos cartões com as hemácias do indivíduo, estas ficam retidas na superfície do microtubo ou presas ao longo do gel, indicando positividade para o antígeno em questão; o que não ocorre em caso de negatividade, onde as hemácias se depositam totalmente no fundo do microtubo, significando que não houve reação destas com os anticorpos.

Na fenotipagem dos antígenos S e s (sistema MNS) e Fy^a e Fy^b (sistema Duffy), foram utilizados cartões ID-LISS/Coombs (DiaMed-Biorad[®]) contendo Antiglobulina humana (Anti-IgG) nos microtubos, pois os respectivos antissoros de cada antígeno (Anti-S, Anti-s, Anti-Fy^a e Anti-Fy^b - DiaMed-Biorad[®]) vêm dispostos separadamente. Neste caso, foi preparada uma suspensão de hemácias a 1% em solução LISS (DiaMed-BioRad[®]), com 50 µl da suspensão sendo pipetados em cada microtubo do referido cartão. Em seguida, 50 µl de cada antissoro foram adicionados em cada microtubo; os cartões foram deixados em repouso na bancada, à temperatura ambiente, por 10 minutos, com posterior centrifugação a 1.000 RPM por 10 minutos em centrífuga específica (ID-Centrífuga 12 S II - DiaMed-BioRad[®]).

A intensidade de positividade destas reações foi anotada por cruces, variando de w+ (weak – reação fraca) até 4+ (aglutinação máxima) (Figura 9).

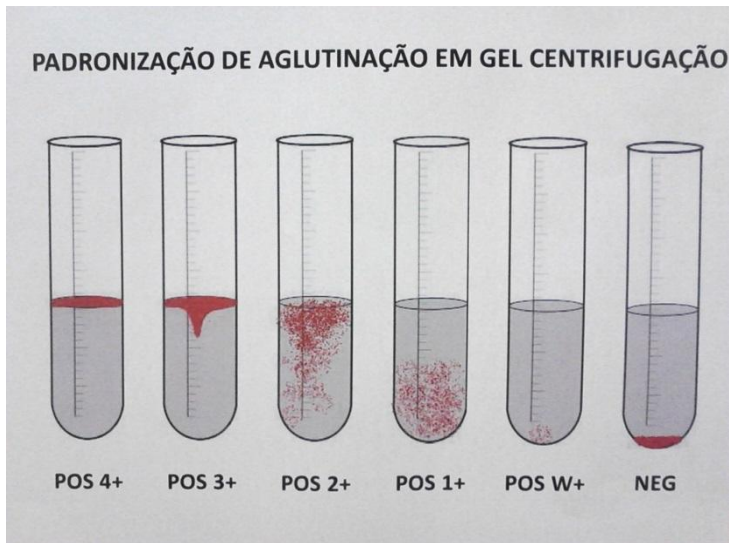


Figura 9 – Padronização de anotação por cruzes dos diferentes graus de positividade das reações entre hemácias e anticorpos.

Fonte: Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação HEMOMINAS.

5

Nos pacientes, resultados de fenotipagem com dupla população de células, uma que aglutinou e outra que não aglutinou, após a centrifugação dos cartões (algo comum em receptores com transfusão recente, devido à presença de hemácias do doador na circulação), foram considerados inconclusivos (Figura 10).

10

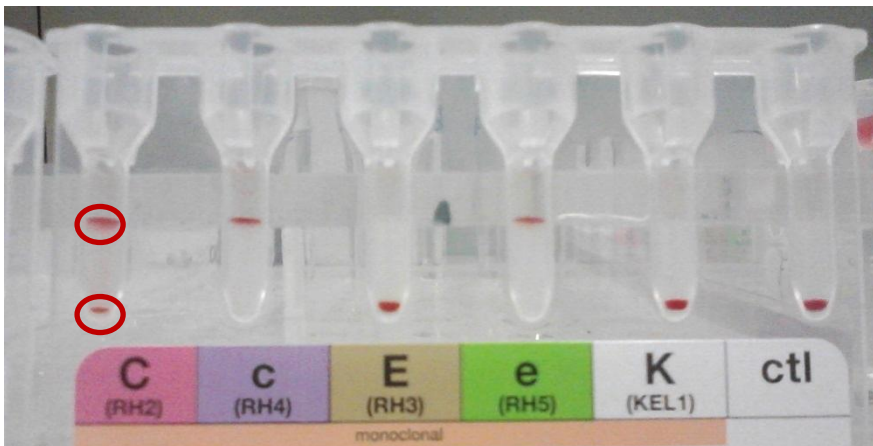


Figura 10 - Fenotipagem de antígenos C, c, E, e (sistema Rh) e K (Kell ou KEL1 - sistema Kell) com resultado inconclusivo. No antígeno C, os dois círculos vermelhos evidenciam uma dupla população de hemácias (uma que aglutinou – na superfície do gel e outra que não aglutinou – no fundo); portanto, o resultado foi considerado inconclusivo para este antígeno (C?c+E-e+; K-).

15

Fonte: Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação HEMOMINAS.

Em todos os pacientes pesquisados, também foi realizado o Teste da Antiglobulina Direta (TAD), para a detecção de possíveis autoanticorpos ou outros fatores que interferem no teste da fenotipagem, provocando resultados falso-positivos. Para isso, foram utilizados

20

novamente os cartões ID-LISS/Coombs pois, como citado acima, eles contêm Antiglobulina humana (Anti-IgG) nos microtubos. O TAD feito nestes cartões é considerado simples, bastando apenas a pipetagem de 50 µl de suspensão de hemácias a 1% em solução salina de cada indivíduo em cada microtubo, com estas células devendo ser lavadas antes do procedimento. Em caso de positividade, os eritrócitos ficam retidos no gel do microtubo durante a centrifugação do cartão; caso contrário, quando todas as hemácias se depositam no fundo do mesmo, temos um resultado negativo (Figura 10).

10 5.4 Genotipagem eritrocitária

Os DNAs foram extraídos a partir dos leucócitos totais separados por centrifugação dos tubos com EDTA, por meio do Kit FlexiGene (Qiagen[®] - São Paulo-SP, Brasil), seguindo-se as recomendações do fabricante. Após isso, quantificados em espectrofotômetro (Jenway Genova Nano - Marconi[®] - Piracicaba-SP, Brasil) e congelados à temperatura de – 20°C, até serem submetidos à análise molecular (genotipagem) por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase ou Reação de Amplificação em Cadeia) - AS (Alelo específica) ou Multiplex para detecção e amplificação de determinadas regiões genômicas de interesse dos sistemas Rh (RHD; RHD*Ψ – RHD Pseudogene; alelos C/c, E/e – gene RHCE), Kell (KEL*1/2), Duffy (FY*A/B; região promotora GATA-1) e Kidd (JK*A/B). A detecção ocorreu por meio de primers específicos (50 pmol) (Tabela 9). Além dos primers e DNA (100-200 ng), foram utilizados dNTPs (desoxirribonucleotídeos – 2 nmol), enzima Taq DNA polimerase (adição dos nucleotídeos) (1.0U), buffer (solução tampão) e água pura estéril, em um volume final de 30 a 50 µl (CASTILHO et al., 2002; GUELSIN et al., 2010; GUELSIN et al., 2011). A reação transcorreu no Termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems[®] – Foster City-CA, EUA), em diferentes ciclos e temperaturas.

30

35

Tabela 9 – Lista dos primers utilizados na PCR.

Primers	Seqüência (sentido: 5' – 3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do produto (pb)
RHD			
Ex7/for	AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA	65,5°C	95
Ex7/rev	ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC	65,5°C	
Intron 3/for 1	GGG TTG GGC TGG GTA AGC TCT	65,5°C	498
Intron 4/rev	GAA CCT GCT CTG TGA AGT GCT	65,5°C	
*RHD*Ψ			
HGH-S	TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A	60°C	434
HGH-AS	CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC	60°C	
Intron 3/for 2	AAC CTG GGA GGC AAA TGT T	60°C	250
Intron 4 ins/rev	AAT AAA ACC CAG TAA GTT CAT GTG G	60°C	
RHCE*C/c			
C/for	CAG GGC CAC CAC CAT TTG AA	65,5°C	320
C/rev	GAA CAT GCC ACT TCA CTC CAG	65,5°C	
c/for	TCG GCC AAG ATC TGA CCG	65,5°C	177
c/rev	TGA TGA CCA CCT TCC CAG G	65,5°C	
RHCE*E/e			
CEI 4	GGC AAC AGA GCA AGA GTC CA	62°C	474
CEX 5	CTG ATC TTC CTT TGG GGG TG	62°C	
KEL*1/2			
KEL S	AAG CTT GGA GGC TGG CGC AT	62°C	156
KEL R	CCT CAC CTG GAT GAC TGG TG	62°C	
FY*A/B			
FYAB1	TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC	62°C	392
FYAB2	AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC	62°C	
GATA-1			
FYN1	CAA GGC CAG TGA CCC CCA TA	62°C	189
FYN2	CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG	62°C	
JK*A/B			
JKABF	CCC ACC CTC AGT TTC CTT CC	62°C	168
JKABR	GCG CCA TGA ACA TTG CTC CC	62°C	

*RHD Pseudogene

Fontes: REID et al., 2000; RIOS et al., 1999; SINGLETON et al., 2000.

5

No caso dos alelos RHCE*E/e, KEL*1/2, FY*A/B, GATA-67t/c e JK*A/B, os produtos resultantes da amplificação foram então digeridos com enzimas de restrição a 37°C (*MnlI*, *BsmI*, *BanI*, *StyI*) (PCR-RFLP), para diferenciação dos mesmos (CASTILHO et al., 2002; GUELSIN et al., 2010; GUELSIN et al., 2011).

10

Os reagentes e materiais necessários para as reações de genotipagem foram adquiridos das empresas Uniscience[®], Life Tech[®], Ciencor[®] e Invitrogen[®], de São Paulo-SP, Brasil.

Os produtos da amplificação e digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose em diferentes concentrações, preparado com brometo de etídio. As bandas com

tamanhos distintos de pares de bases (pb) foram visualizadas e fotografadas em um Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX (Loccus[®] – Cotia, SP – Brasil).

5 5.4.1 Genotipagem de alelos RHD e RHCE*C/c (Sistema Rh)

Esta genotipagem foi realizada em conjunto, por meio da PCR-Multiplex, nas seguintes condições: 95°C (15 min.); 30 ciclos de: 94°C (1 min.), 65,5°C (1 min.) e 72° C (3 min.); 72°C (10 min.). A eletroforese dos produtos da amplificação foi realizada em um gel de agarose a 2% (120V por 30 minutos) (Figura 11).

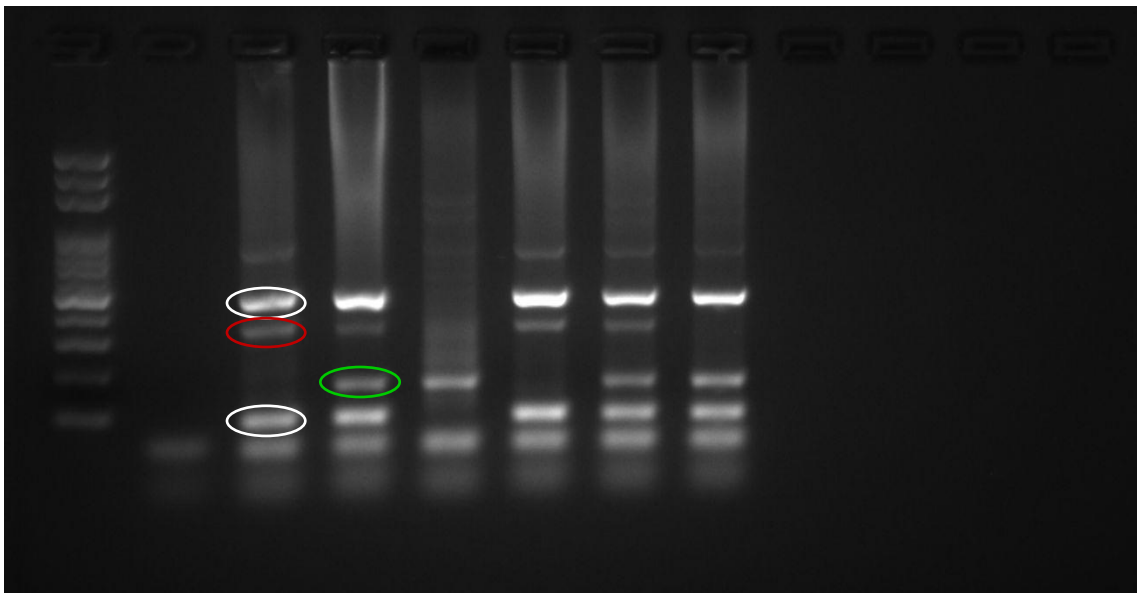


Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da PCR-Multiplex de alelos RHD e RHCE*C/c. Da primeira à última coluna, temos: marcador (100 pb); branco (controle negativo); controles da reação (RHD pos./RHCE*CC; RHD pos./RHCE*Cc; RHD neg./RHCE*cc) e indivíduos pesquisados (RHD pos./RHCE*CC; RHD pos./RHCE*Cc; RHD pos./RHCE*cc).

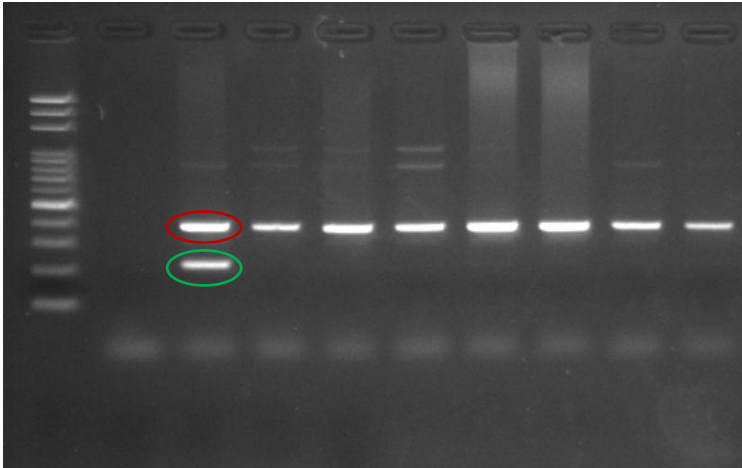
Legendas: círculo branco superior (íntron 4 – gene RHD – 498 pb); branco inferior (éxon 7 – gene RHD – 95 pb); vermelho (alelo C – gene RHCE – 320 pb); verde (alelo c – gene RHCE – 177 pb).

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

5.4.2 Genotipagem de pseudogene RHD (RHD*Ψ – Sistema Rh)

A genotipagem de pseudogene RHD (RHD*Ψ) foi realizada por meio de PCR-SSP (*single specific primers*) ou PCR-AS (alelo específica), nas seguintes condições: 95°C (5 min.); 28 x (94°C (1 min.), 60°C (1 min.) e 72°C(1 min.)); 72°C (7 min.). A eletroforese dos

produtos da amplificação ocorreu em um gel de agarose a 2%, a 150V por 40 minutos (Figura 12).



- 5 **Figura 12** - Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS de RHD Pseudogene (RHD*Ψ). Da primeira à última coluna, temos: marcador (100 pb); branco (controle negativo); controles da reação (RHD*Ψ pos.; RHD*Ψ neg.) e indivíduos pesquisados (todos RHD*Ψ neg.).
Legendas: círculo vermelho (HGH – hormônio de crescimento humano – 434 pb); círculo verde (RHD*Ψ – 250 pb).
- 10 **Fonte:** Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Os alelos RHCE*E/e; KEL*1/2; FY*A/B; GATA-67t/c e JK*A/B foram todos amplificados por PCR-AS, a qual ocorreu nestas condições: 95°C (5 min.); 35x (94°C (20 seg.), 62°C (20 seg.) e 72° C (20 seg.)); 72°C (10 min.). Como previamente citado, os produtos da amplificação tiveram que ser posteriormente colocados para reagir com enzimas de restrição específicas (PCR-RFLP), a fim de diferenciar os alelos.

Segue-se a descrição dos procedimentos para cada um dos pares de alelos.

20

5.4.3 Genotipagem de alelos E/e (gene RHCE – Sistema Rh)

A eletroforese dos produtos da amplificação destes alelos por PCR-AS ocorreu em um gel de agarose a 2%, a 120V por 25 minutos, com alguns resultados na figura 13.

25

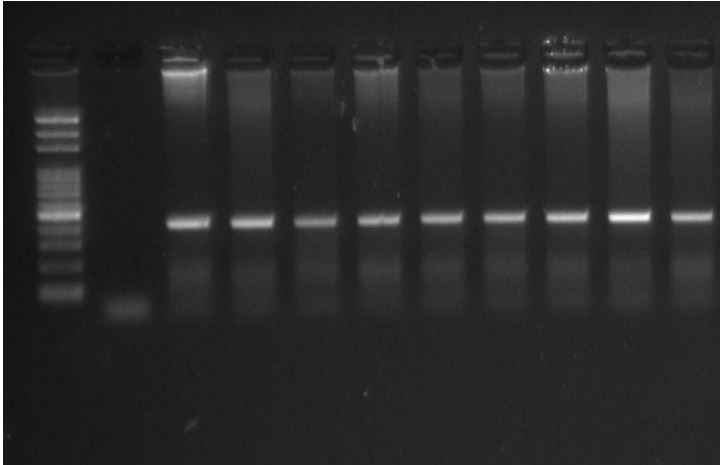


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS dos alelos E/e (gene RHCE). Da esquerda para a direita, temos: marcador (100 pb); branco (controle negativo); controles da reação e indivíduos pesquisados. Em todos os casos, houve amplificação (produto de 474 pb), exceto no branco, indicando que não houve contaminação.

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

10 Após a confirmação de amplificação por meio de visualização das bandas no gel de
 agarose, os produtos da PCR-AS foram digeridos com uma enzima de restrição específica
 (*MnlI*) (PCR-RFLP), misturando-se 10 µl de cada produto da amplificação com um coquetel
 (mistura) envolvendo 0,5 µl da enzima, 2 µl de buffer (solução tampão) e 7,5 µl de água em
 15 microtubo específico. A digestão pela enzima ocorreu no termociclador a 37°C, por quatro
 horas. Neste processo, a *MnlI* reconhece uma região genômica específica responsável pelo
 polimorfismo E/e, na posição 676C>G.

Os produtos da digestão foram colocados para migração por eletroforese em gel de
 agarose a 3,5% (80V por 50 minutos) (Figura 14).

20

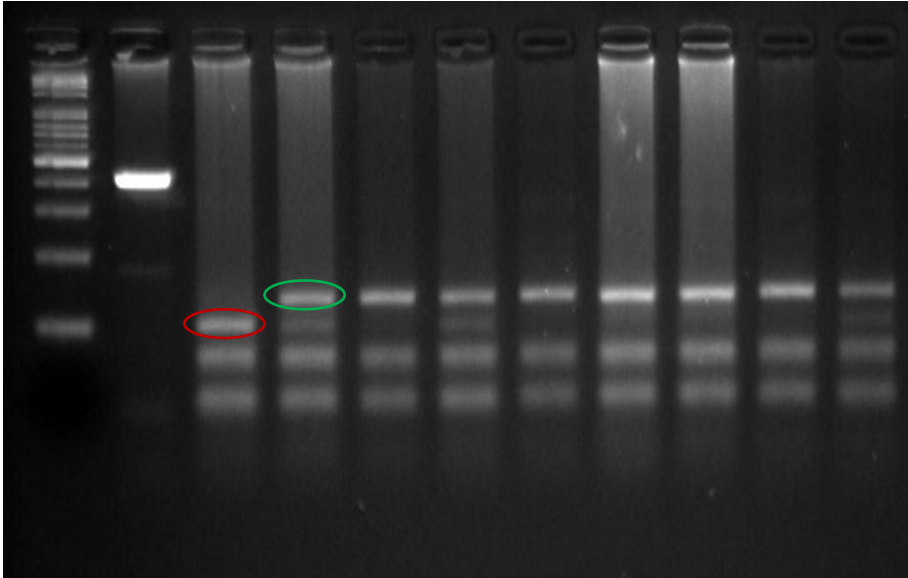


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose (3,5%) dos produtos da PCR-RFLP (enzima *MnlI*) dos alelos E/e (gene RHCE). Da esquerda para a direita, temos: marcador (100 pb); controle da PCR (474 pb); controles da digestão (RHCE*EE; RHCE*Ee; RHCE*ee) e indivíduos pesquisados (RHCE*ee – 7^a à 10^a coluna; RHCE*Ee – 6^a e 11^a colunas).

Legendas: círculo vermelho (alelo E – 115 pb); verde (alelo e – 152 pb).

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

5

5.4.4 Genotipagem de alelos KEL*1/2 (Sistema Kell)

A eletroforese dos produtos da amplificação dos alelos KEL*1/2 ocorreu em um gel de agarose a 2% (120V por 25 minutos) (Figura 15).

10

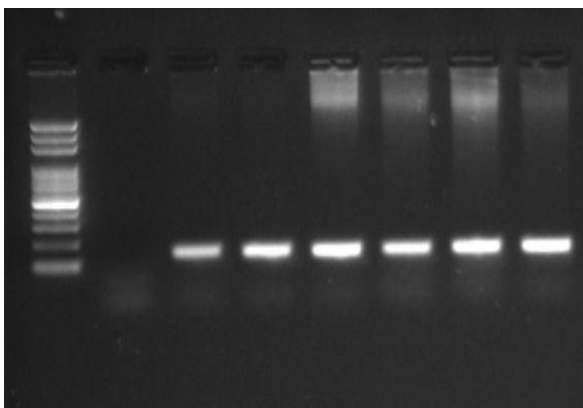


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS dos alelos KEL*1/2 (Sistema Kell). Da esquerda para a direita, temos: marcador (100 pb); branco (controle negativo); controles da reação e indivíduos pesquisados. Em todos os casos, houve amplificação (produto de 156 pb), exceto no branco, indicando que não houve contaminação.

15

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

20

Após a confirmação de amplificação por meio de visualização das bandas no gel de agarose, os produtos da PCR-AS foram digeridos com uma enzima de restrição específica (*BsmI*) (PCR-RFLP), misturando-se 10 µl de cada produto da amplificação com um coquetel envolvendo 0,5 µl da enzima, 2 µl de buffer e 7,5 µl de água. A digestão pela enzima ocorreu no termociclador a 37°C, por 12 horas. A *BsmI* reconhece o nucleotídeo T na posição 598 (éxon 6 do gene KEL), o qual está presente em indivíduos contendo o alelo KEL*1, realizando uma clivagem nesta região, dando origem a dois fragmentos: 100 pb e 56 pb. Na ausência do nucleotídeo citado (alelo KEL*2), não há digestão e o fragmento original obtido na amplificação (156 pb) é mantido. Os produtos da digestão foram colocados para migração por eletroforese em gel de agarose a 2,5% (80V por 50 minutos) (Figura 16).

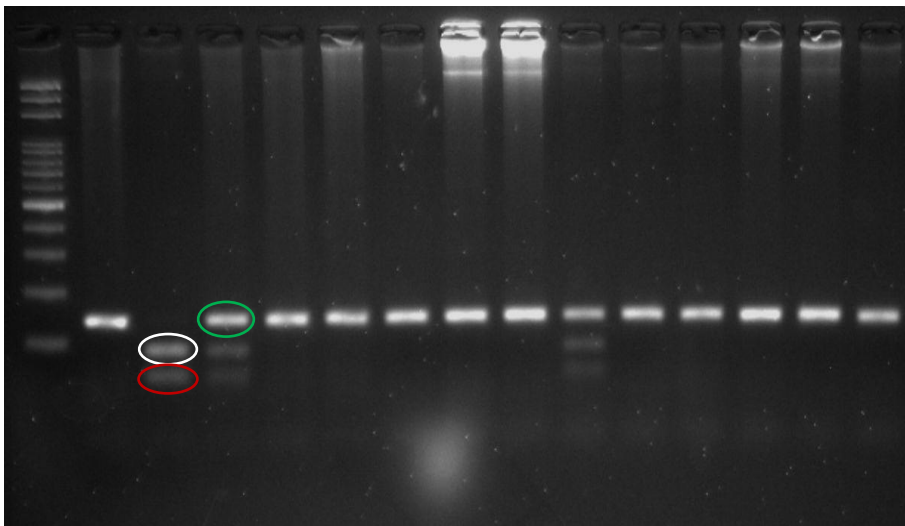


Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose (2,5%) dos produtos da PCR-RFLP (enzima *BsmI*) dos alelos KEL*1/2 (Sistema Kell). Da esquerda para a direita, temos: marcador (100 pb); controle da PCR (156 pb); controles da digestão (KEL*1/KEL*1; KEL*1/KEL*2; KEL*2/KEL*2); indivíduos pesquisados (KEL*1/KEL*2 – 10ª coluna; KEL*2/KEL*2 – 6ª à 9ª coluna e 11ª à 15ª coluna).

Legendas: círculos branco e vermelho (100 pb e 56 pb, respectivamente – alelo KEL*1); verde (156 pb – alelo KEL*2).

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

5.4.5 Genotipagem de alelos FY*A/B (Sistema Duffy)

A eletroforese dos produtos da amplificação destes alelos foi feita em um gel de agarose a 2%, a 150V por 15 minutos (Figura 17).

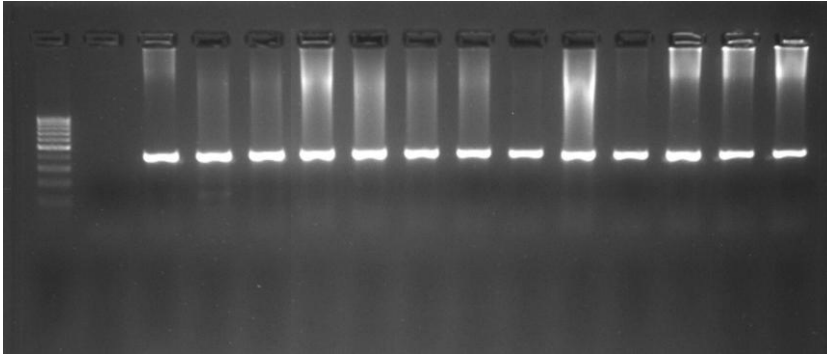


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS dos alelos FY*A/B (Sistema Duffy). Da esquerda para a direita, temos: marcador (100 pb); branco (controle negativo); controles da reação e indivíduos pesquisados. Em todos os casos, houve amplificação (produto de 392 pb), exceto no branco, indicando que não houve contaminação.

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

A fim de diferenciar os alelos FY*A e FY*B, a reação de PCR-RFLP foi realizada adicionando a enzima *BanI*, que possui como alvo o nucleotídeo G do alelo FY*A na posição 125. Foram misturados 10 µl de cada produto da amplificação com um coquetel envolvendo 0,5 µl da enzima, 2 µl de buffer e 7,5 µl de água. A digestão ocorreu no termociclador a 37°C, por 12 horas, sendo obtidos os seguintes produtos: 210 pb, 96 pb e 86 pb (FY*A); 306 pb e 86 pb (FY*B).

Os produtos da digestão foram colocados para migração por eletroforese em gel de agarose a 2% (80V por 60 minutos) (Figura 18).

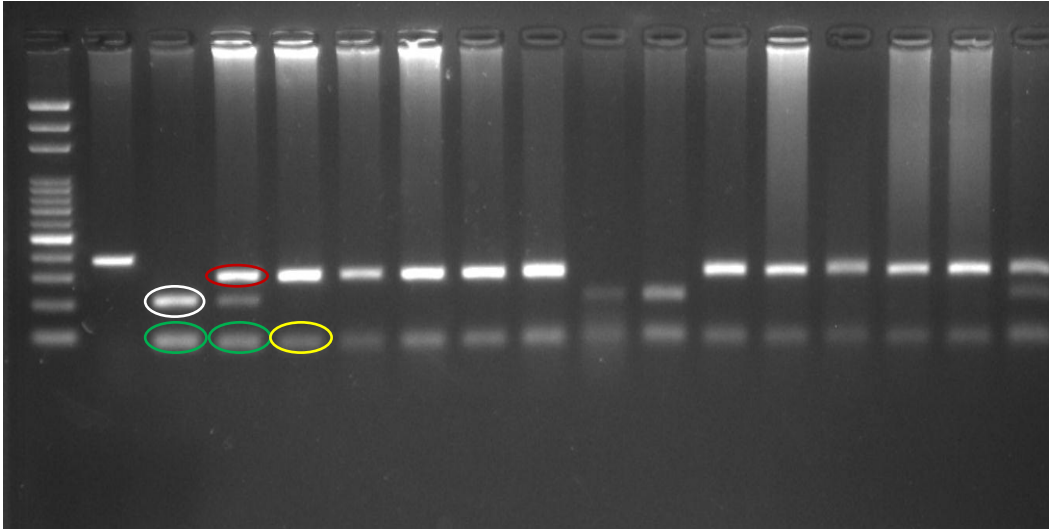


Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-RFLP (enzima *BanI*) dos alelos FY*A/B (Sistema Duffy). Da esquerda para a direita, temos: marcador (100 pb); controle da PCR (392 pb); controles da digestão (FY*A/FY*A; FY*A/FY*B; FY*B/FY*B); indivíduos pesquisados (FY*A/FY*A – 10^a e 11^a colunas; FY*A/FY*B – 17^a coluna; FY*B/FY*B – 6^a à 9^a coluna e 12^a à 16^a coluna).

Legendas: círculo branco (210 pb – alelo FY*A); verde (86-96 pb – alelo FY*A); vermelho (306 pb – alelo FY*B); amarelo (86 pb – alelo FY*B).

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

5.4.6 Genotipagem dos alelos GATA-67t/c (Sistema Duffy)

A eletroforese dos produtos da amplificação ocorreu em um gel de agarose a 2% (150V por 15 minutos) (Figura 19).

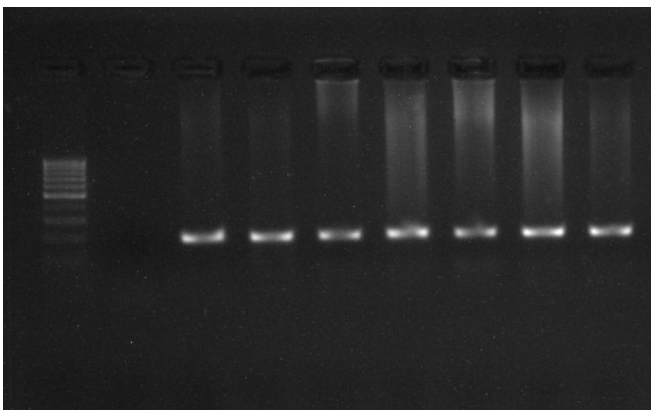


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS dos alelos GATA-67t/c (Sistema Duffy). Da esquerda para a direita, temos: marcador (100 pb); branco (controle negativo); controles da reação e indivíduos pesquisados. Em todos os casos, houve amplificação (produto de 189 pb), exceto no branco, indicando que não houve contaminação.

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

A fim de identificar a presença ou não de mutação nesta região promotora, foi feita a digestão dos produtos da amplificação com a enzima *StyI*. Foram misturados 10 µl de cada produto da amplificação com um coquetel envolvendo 0,5 µl da enzima, 2 µl de buffer e 7,5 µl de água. A digestão ocorreu no termociclador a 37°C, por 12 horas, surgindo os seguintes produtos: 130 pb e 108 pb (GATA-67t/t - ausência de mutação); 130 pb, 108 pb e 61 pb (GATA-67t/c - presença da mutação em heterozigose); 130 pb e 61 pb GATA-67c/c (mutação em homozigose). A eletroforese destes produtos da digestão foi realizada em gel de agarose a 4,5% (80V por 60 min.) (Figura 20).

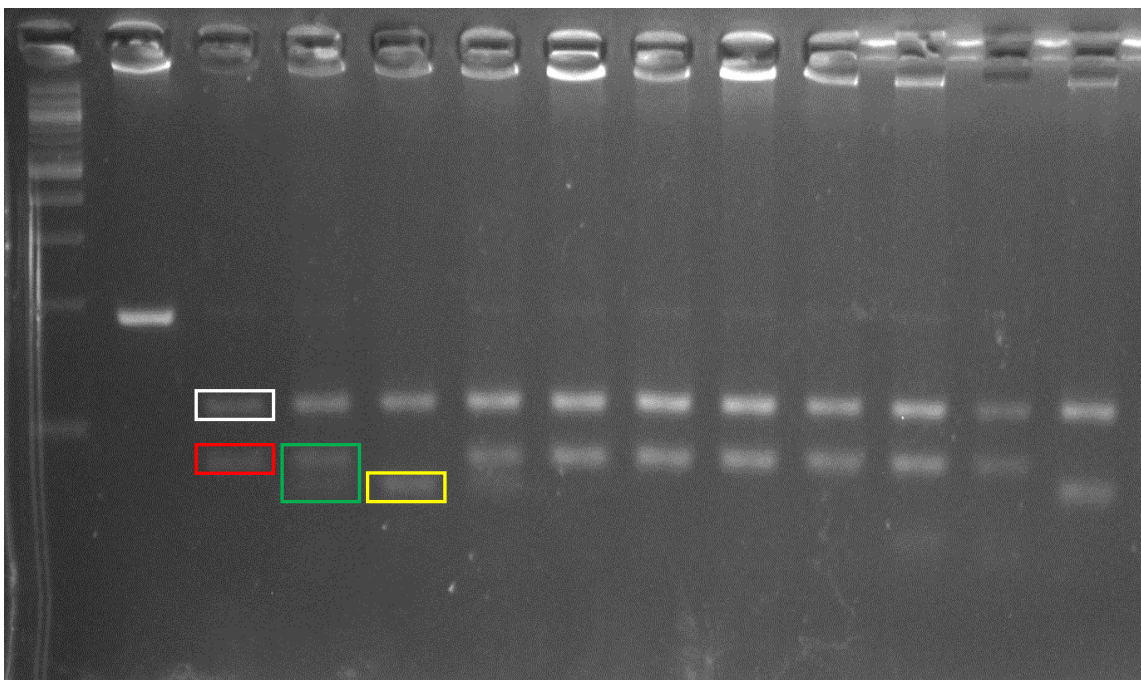


Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose (4,5%) dos produtos da PCR-RFLP (enzima *StyI*) da região promotora GATA-1 (Sistema Duffy). Da esquerda para a direita, temos: marcador (100 pb); controle da PCR (189 pb); controles da digestão (GATA-67t/t; GATA-67t/c; GATA-67c/c); indivíduos pesquisados (GATA-67t/t – 7ª à 12ª coluna; GATA-67t/c – 6ª coluna; GATA-67c/c – última coluna).

Legendas (retângulos): branco (130 pb – não serve para interpretação); vermelho (108 pb – GATA-67t/t); verde (duas bandas: 108 pb e 61 pb – GATA-67t/c); amarelo (61 pb – GATA-67c/c).

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

5.4.7 Genotipagem de alelos JK*A/B (Sistema Kidd)

Os produtos da amplificação destes alelos foram colocados para migração em gel de agarose a 2%, a 150V por 15 minutos (Figura 21).

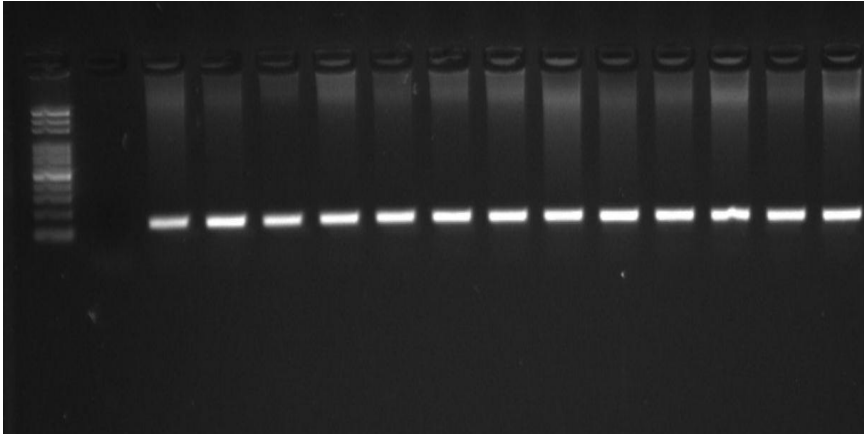


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos da PCR-AS dos alelos JK*A/B (Sistema Kidd). Da esquerda para a direita, temos: marcador (100 pb); branco (controle negativo); controles da reação e indivíduos pesquisados. Em todos os casos, houve amplificação (produto de 168 pb), exceto no branco, indicando que não houve contaminação.

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

10 Para a diferenciação entre os alelos, uma digestão foi feita com a enzima *MnII*, que neste caso reconhece o nucleotídeo G na posição 838 do éxon 9 do gene *JK*. Foram misturados 10 µl de cada produto da amplificação com um coquetel envolvendo 0,5 µl da enzima, 2 µl de buffer e 7,5 µl de água; posteriormente, foi realizada a digestão no termociclador a 37°C, por 12 horas. Conseqüentemente, surgiram os seguintes produtos:

15 pb, 48 pb, 21 pb e 17 pb (JK*A); 103 pb, 48 pb e 17 pb (JK*B). A eletroforese ocorreu em gel de agarose a 3,5% (80V por 60 min.) (Figura 22).

20

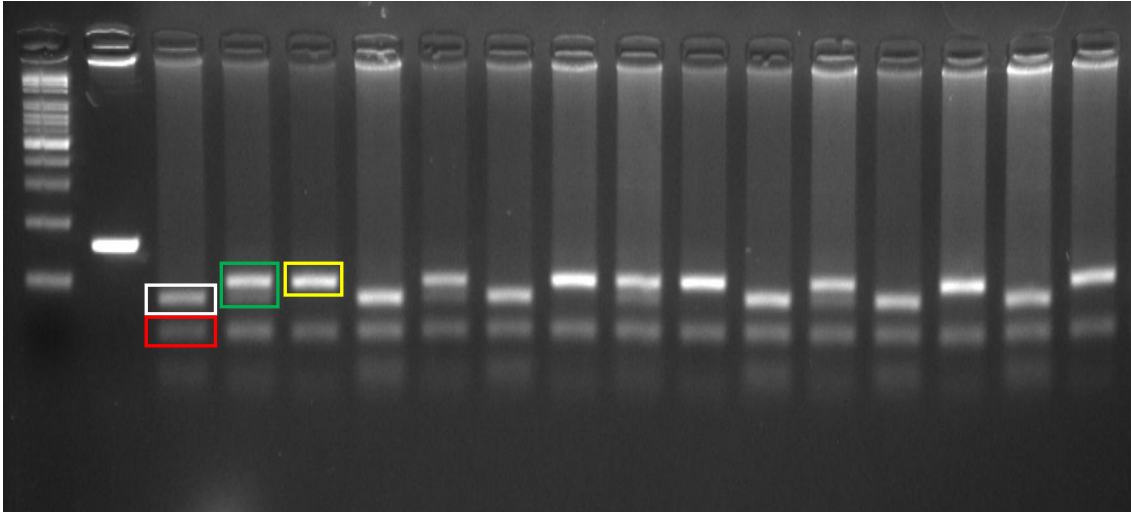


Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose (3,5%) dos produtos da PCR-RFLP (enzima *MnlI*) dos alelos JK*A/B (Sistema Kidd). Da esquerda para a direita, temos: marcador (100 pb); controle da PCR; controles da digestão (JK*A/JK*A; JK*A/JK*B; JK*B/JK*B); indivíduos pesquisados (JK*A/JK*A – 6^a, 8^a, 12^a, 14^a e 16^a colunas; JK*A/JK*B – 7^a, 10^a e 13^a colunas; JK*B/JK*B – 9^a, 11^a, 15^a e 17^a colunas).

Legendas (retângulos): branco (82 pb – alelo JK*A); vermelho (48 pb – alelos JK*A e JK*B); verde (duas bandas: 103 e 82 pb – alelos JK*B e JK*A); amarelo (103 pb – alelo JK*B).

Fonte: Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

5.5 Armazenamento de dados e análise estatística

Todos os dados clínicos e epidemiológicos coletados, bem como os resultados da genotipagem e fenotipagem eritrocitárias, foram armazenados em bancos de dados (Microsoft Excel[®]). Os resultados foram organizados em tabelas e gráficos, com as variáveis sendo submetidas a uma análise descritiva utilizando medidas de centralidade e dispersão. Devido à não-normalidade e não-homogeneidade de algumas variáveis, uma análise não-paramétrica de variância foi realizada por meio de software (SigmaStat 3.5 – Systat Software Inc.[®] - San Jose, CA – EUA), com o Teste Mann-Whitney para comparar grupos independentes. Os Testes Exato de Fisher e Qui-quadrado foram aplicados para dados de frequência, através do mesmo software.

Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%. Por fim, os resultados encontrados foram comparados aos descritos na literatura.

6. RESULTADOS

6.1 Distribuição dos indivíduos quanto ao gênero, etnia e idade

5 Foram estudados 287 indivíduos (170 doadores e 117 pacientes); deste total, 140 (48,78%) homens e 147 (51,22%) mulheres; dentre os 170 doadores, 85 (50%) do gênero masculino e 85 (50%) feminino; dos 117 pacientes, 55 (47,01%) homens e 62 (52,99%) mulheres (Gráfico 2; Tabela 10). Não foi observada diferença significativa na comparação entre doadores e pacientes (Tabela 10).

10

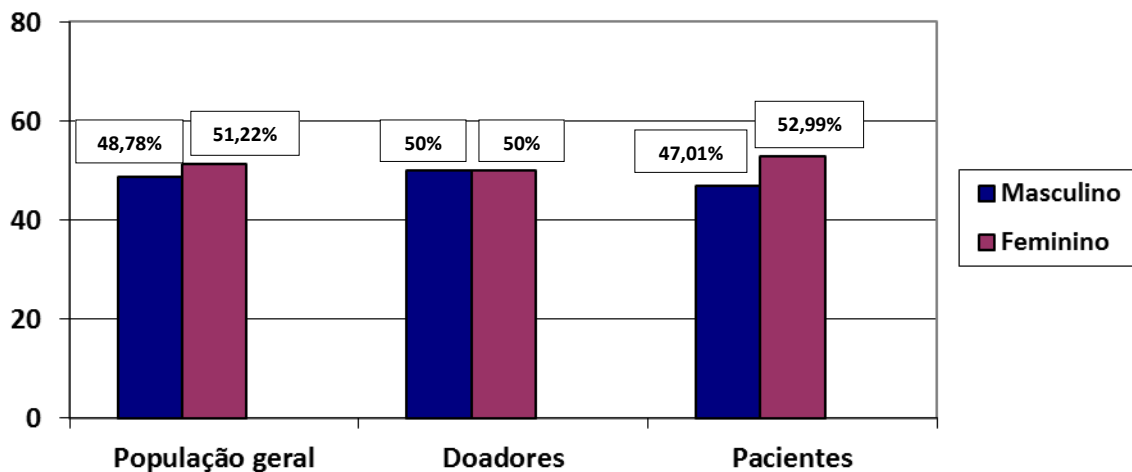


Gráfico 2 – Distribuição da população estudada quanto ao gênero.

15 Quanto à etnia, na população geral estudada, 105 (36,59%) brancos, 121 (42,16%) pardos e 61 (21,25%) negros; dentre os doadores, 73 (42,94%) brancos, 70 (41,18%) pardos e 27 (15,88%) negros; dos pacientes, 32 (27,35%) brancos, 51 (43,59%) pardos e 34 (29,06%) negros (Gráfico 3; Tabela 10). Ao equipararmos doadores e pacientes, houve uma diferença estatisticamente significativa (Tabela 10).

20

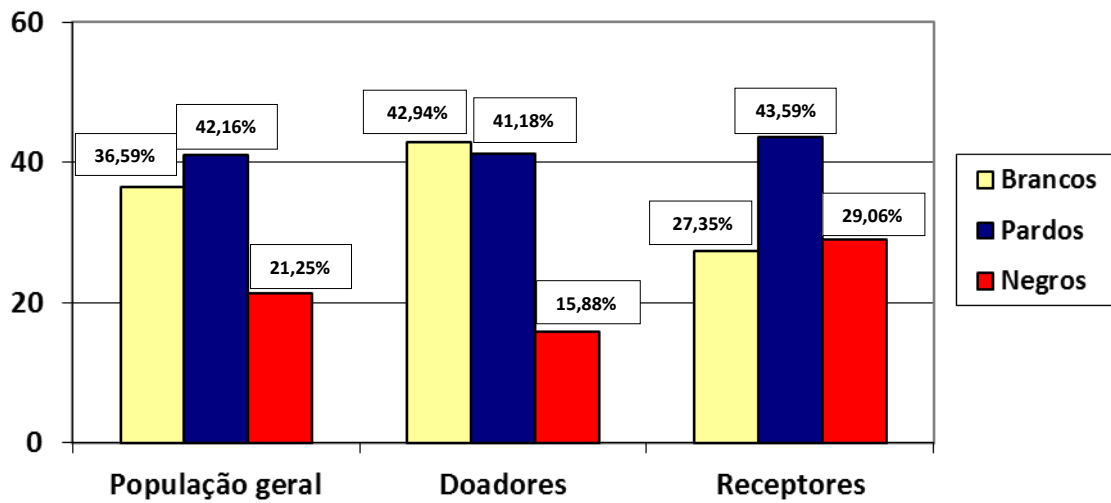


Gráfico 3 – Distribuição da população estudada quanto à etnia.

- 5 A idade mediana dos 287 indivíduos foi de 30 anos (2-84), enquanto dos doadores foi de 34 (18-64) e dos pacientes de 20 anos (2-84) ($p < 0,001$) (Tabela 10).

Tabela 10 – Distribuição da população estudada quanto ao gênero, etnia e idade.

	Total (n = 287)		Doadores (n = 170)		Pacientes (n = 117)		p
	n	%	n	%	n	%	
Gênero							
Masculino	140	48,78	85	50	55	47,01	p = 0,705
Feminino	147	51,22	85	50	62	52,99	
Etnia							
Branco	105	36,59	73	42,94	32	27,35	p = 0,006
Pardo	121	42,16	70	41,18	51	43,59	
Negro	61	21,25	27	15,88	34	29,06	
Idade							
Mediana	30		34		20		p < 0,001
(mín-máx)	(2-84)		(18-64)		(2-84)		

10

6.2 Frequências de genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e receptores

Os genótipos mais frequentes foram: RHD pos. (88,15%), RHD*Ψ neg. (98,95%),
 15 RHCE*cc (49,83%), RHCE*ee (75,96%), KEL*2/KEL*2 (95,82%), FY*B/FY*B (50,52%),
 GATA-67t/t (56,79%) e JK*A/JK*B (45,65%). Também verificamos que estes genótipos foram os mais comuns nos doadores e pacientes. Ao compararmos estes grupos, diferenças

significantes foram observadas apenas na região promotora do gene Duffy (GATA-1), com a mutação GATA-67c/c ocorrendo em 22,22% dos pacientes e apenas 7,65% dos doadores ($p = 0,002$ - Tabela 11).

5 **Tabela 11** – Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM.

Genótipos	Total (n = 287)		Doadores (n = 170)		Pacientes (n = 117)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh							
RHD pos.	253	88,15	145	85,29	108	92,31	p = 0,105
RHD neg.	34	11,85	25	14,71	9	7,69	
*RHD*Ψ pos.	3	1,04	0	0	3	2,56	p = 0,370
*RHD*Ψ neg.	284	98,95	170	100	114	97,44	
RHCE*CC	38	13,24	22	12,94	16	13,68	p = 0,859
RHCE*Cc	106	36,93	65	38,24	41	35,04	
RHCE*cc	143	49,83	83	48,82	60	51,28	
RHCE*EE	8	2,79	6	3,53	2	1,71	p = 0,235
RHCE*Ee	61	21,25	31	18,24	30	25,64	
RHCE*ee	218	75,96	133	78,24	85	72,65	
Sistema Kell							
KEL*1/KEL*1	0	0	0	0	0	0	p = 0,335
KEL*1/KEL*2	12	4,18	5	2,94	7	5,98	
KEL*2/KEL*2	275	95,82	165	97,06	110	94,02	
Sistema Duffy							
FY*A/FY*A	28	9,76	13	7,65	15	12,82	p = 0,113
FY*A/FY*B	114	39,72	75	44,12	39	33,33	
FY*B/FY*B	145	50,52	82	48,24	63	53,85	
+GATA-67t/t	163	56,79	105	61,76	58	49,57	p = 0,002
§GATA-67t/c	85	29,62	52	30,59	33	28,21	
£GATA-67c/c	39	13,59	13	7,65	26	22,22	
Sistema Kidd							
JK*A/JK*A	110	38,33	61	35,88	49	41,88	p = 0,574
JK*A/JK*B	131	45,65	80	47,06	51	43,59	
JK*B/JK*B	46	16,03	29	17,06	17	14,53	

*RHD Pseudogene; +Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose); £Presença da mutação (em homozigose).

10 Na comparação dos doadores com os pacientes (considerando apenas os portadores de anemia falciforme - 63), diferenças significantes ocorreram não apenas na região GATA-1, como também no RHD*Ψ (RHD pseudogene), encontrado em 4,76% dos receptores e 0% dos doadores ($p = 0,027$) e sistema Kidd ($p = 0,0044$). Com relação aos alelos FY*A/B (sistema Duffy), houve uma tendência de significância estatística ($p = 0,057$) (Tabela 12).

Tabela 12 – Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU e 63 politransfundidos com anemia falciforme no HRU e/ou HC/UFTM.

Genótipos	Doadores (n = 170)		Pacientes (n = 63)		p
	n	%	n	%	
Sistema Rh					
RHD pos.	145	85,29	59	93,65	0,135
RHD neg.	25	14,71	4	6,35	
*RHD*Ψ pos.	0	0	3	4,76	0,027
*RHD*Ψ neg.	170	100	60	95,24	
RHCE*CC	22	12,94	4	6,35	
RHCE*Cc	65	38,24	21	33,33	0,196
RHCE*cc	83	48,82	38	60,32	
RHCE*EE	6	3,53	1	1,59	
RHCE*Ee	31	18,24	13	20,63	0,698
RHCE*ee	133	78,24	49	77,78	
Sistema Kell					
KEL*1/KEL*1	0	0	0	0	
KEL*1/KEL*2	5	2,94	5	7,94	0,191
KEL*2/KEL*2	165	97,06	58	92,06	
Sistema Duffy					
FY*A/FY*A	13	7,65	7	11,11	
FY*A/FY*B	75	44,12	17	26,98	0,057
FY*B/FY*B	82	48,24	39	61,90	
+GATA-67t/t	105	61,76	25	39,68	
§GATA-67t/c	52	30,59	17	26,98	<0,001
£GATA-67c/c	13	7,65	21	33,33	
Sistema Kidd					
JK*A/JK*A	61	35,88	34	53,97	
JK*A/JK*B	80	47,06	21	33,33	0,0044
JK*B/JK*B	29	17,06	8	12,70	

*RHD Pseudogene; +Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose); £Presença da mutação (em homozigose).

5

Ao avaliarmos os genótipos Rh estendido, o DCcee foi o mais frequente nos 287 indivíduos (30,31%); o mesmo ocorrendo nos doadores (32,35%) e pacientes (27,35%). Já os genótipos ddCcee e ddccEe foram os menos comuns, com frequência de apenas 0,35% cada (Tabela 31 – apêndice). Comparando doadores e pacientes, não foi observada diferença significativa; o mesmo válido na comparação entre doadores e pacientes com anemia falciforme (Tabelas 31 e 32 – apêndice).

15

6.3 Frequências de genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e receptores, quanto ao gênero

Dentre os 287 indivíduos, observamos que, em ambos os gêneros, os genótipos mais frequentes em cada sistema foram: Rh (RHD pos., RHD*Ψ neg., RHCE*cc, RHCE*ee); Kell (KEL*2/KEL*2); Duffy (FY*B/FY*B, GATA-67t/t); Kidd (JK*A/JK*B). Não houve diferenças estatisticamente significantes (Tabela 33 – apêndice).

Tanto nos doadores quanto nos receptores, verificamos que os mesmos genótipos foram os mais comuns em homens e mulheres; porém, o JK*A/JK*A foi mais comum nos pacientes do gênero masculino (Tabela 35 – apêndice). Diferenças estatísticas não foram observadas em ambos os grupos (Tabelas 34 e 35 – apêndice), com exceção da mutação GATA-67c/c (sistema Duffy), significativamente maior nos doadores do gênero masculino (12,94%) em comparação aos do gênero feminino (2,35%) ($p = 0,034$) (Tabela 13).

Tabela 13 – Frequências de genótipos eritrocitários do sistema Duffy (região GATA-1) de 170 doadores do HRU, quanto ao gênero.

Fenótipos	Total (n = 170)		Masculino (n = 85)		Feminino (n = 85)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sistema Duffy							
+GATA-67t/t	105	61,76	50	58,82	55	64,71	p = 0,034
§GATA-67t/c	52	30,59	24	28,24	28	32,94	
£GATA-67c/c	13	7,65	11	12,94	02	2,35	

+Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose); £Presença da mutação (em homozigose).

20

Considerando os genótipos Rh estendido, dentre os 287 indivíduos pesquisados, o mais observado foi o DCcee, em homens (32,14%) e mulheres (29,25%). Na comparação geral entre os gêneros, não foram encontradas diferenças significantes (Tabela 36 – apêndice). Resultados similares foram observados na população de doadores (Tabela 37 – apêndice); todavia, nos receptores, o genótipo Dccee foi o mais frequente no gênero feminino (27,42%) (Tabela 38 – apêndice). Tanto em doadores quanto em pacientes, não houve diferenças estatisticamente significantes na comparação geral entre homens e mulheres (Tabelas 37 e 38 – apêndice).

30

6.4 Frequências de genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e receptores, quanto à etnia

Dentre todos os 287 indivíduos pesquisados, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre brancos, pardos e negros com relação aos seguintes alelos: RHD* Ψ , RHCE*E/e e KEL*1/2 (Tabela 14).

Todavia, o genótipo RHD pos. foi observado em 81,90% dos brancos, 90,08% dos pardos e 95,08% dos negros, enquanto as frequências de RHD neg. nestas etnias foram, respectivamente: 18,10%, 9,92% e 4,92% ($p = 0,028$). RHCE*CC foi encontrado em 13,33% dos brancos, 18,18% dos pardos e 3,28% dos negros, enquanto os percentuais de RHCE*cc foram, de modo respectivo: 41,90%, 47,11% e 68,85% ($p = 0,003$) (Tabela 14).

Considerando os alelos FY*A/B (sistema Duffy), FY*A/FY*A foi observado em 19,05% nos brancos e em apenas 5,79% dos pardos e 1,64% dos negros, enquanto FY*B/FY*B foi encontrado em 77,05% dos negros, 45,45% dos pardos e 40,95% dos brancos ($p < 0,001$). Quanto à região GATA-1 (mesmo sistema), as frequências de GATA-67t/t (ausência de mutação) e GATA-67c/c (mutação em homozigose) em brancos, pardos e negros foram, nesta ordem: 81,90%, 54,55% e 18,03%; 0,95%, 6,61% e 49,18% ($p < 0,001$) (Tabela 14).

No sistema Kidd, JK*A/JK*A foi encontrado em 31,43% dos brancos, 34,71% dos pardos e 57,38% dos negros, enquanto JK*B/JK*B teve os seguintes percentuais nestas etnias, de modo respectivo: 20,95%, 19,01% e 1,64% ($p = 0,001$) (Tabela 14).

25

30

Tabela 14 – Frequências de genótipos eritrocitários de 287 indivíduos - 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto à etnia.

Genótipos	Total (n = 287)		Branços (n = 105)		Pardos (n = 121)		Negros (n = 61)		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh									
RHD pos.	253	88,15	86	81,90	109	90,08	58	95,08	p = 0,028
RHD neg.	34	11,85	19	18,10	12	9,92	03	4,92	
*RHD*Ψ pos.	03	1,04	00	0	02	1,65	01	1,64	p = 0,417
*RHD*Ψ neg.	284	98,95	105	100	119	98,35	60	98,36	
RHCE*CC	38	13,24	14	13,33	22	18,18	02	3,28	p = 0,003
RHCE*Cc	106	36,93	47	44,76	42	34,71	17	27,87	
RHCE*cc	143	49,83	44	41,90	57	47,11	42	68,85	
RHCE*EE	08	2,79	04	3,81	03	2,48	01	1,64	p = 0,905
RHCE*Ee	61	21,25	23	21,90	24	19,83	14	22,95	
RHCE*ee	218	75,96	78	74,29	94	77,69	46	75,41	
Sistema Kell									
KEL*1/KEL*1	00	0	00	0	00	0	00	0	p = 0,402
KEL*1/KEL*2	12	4,18	05	4,76	03	2,48	04	6,56	
KEL*2/KEL*2	275	95,82	100	95,24	118	97,52	57	93,44	
Sistema Duffy									
FY*A/FY*A	28	9,76	20	19,05	07	5,79	01	1,64	p < 0,001
FY*A/FY*B	114	39,72	42	40	59	48,76	13	21,31	
FY*B/FY*B	145	50,52	43	40,95	55	45,45	47	77,05	
+GATA-67t/t	163	56,79	86	81,90	66	54,55	11	18,03	p < 0,001
§GATA-67t/c	85	29,62	18	17,14	47	38,84	20	32,79	
£GATA-67c/c	39	13,59	01	0,95	08	6,61	30	49,18	
Sistema Kidd									
JK*A/JK*A	110	38,33	33	31,43	42	34,71	35	57,38	p = 0,001
JK*A/JK*B	131	45,65	50	47,62	56	46,28	25	40,98	
JK*B/JK*B	46	16,03	22	20,95	23	19,01	01	1,64	

*RHD Pseudogene; +Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose);
£Presença da mutação (em homozigose).

5

Resultados similares ocorreram tanto nos doadores quanto nos pacientes; porém, ao contrário do observado na população total estudada, não houve diferenças estatisticamente significantes nos sistemas Rh (doadores e pacientes - Tabelas 15 e 16) e Kidd (doadores - Tabela 15).

10

15

Tabela 15 – Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU, quanto à etnia.

Genótipos	Total (n = 170)		Brancos (n = 73)		Pardos (n = 70)		Negros (n = 27)		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh									
RHD pos.	145	85,29	59	80,82	60	85,71	26	96,30	p = 0,151
RHD neg.	25	14,71	14	19,18	10	14,29	1	3,70	
*RHD*Ψ pos.	0	0	0	0	0	0	0	0	-
*RHD*Ψ neg.	170	100	73	100	70	100	27	100	
RHCE*CC	22	12,94	8	10,96	13	18,57	1	3,70	
RHCE*Cc	65	38,24	33	45,21	24	34,29	8	29,62	p = 0,106
RHCE*cc	83	48,82	32	43,84	33	47,14	18	66,67	
RHCE*EE	6	3,53	4	5,48	2	2,86	0	0	
RHCE*Ee	31	18,24	13	17,81	12	17,14	6	22,22	p = 0,705
RHCE*ee	133	78,24	56	76,71	56	80	21	77,78	
Sistema Kell									
KEL*1/KEL*1	0	0	0	0	0	0	0	0	
KEL*1/KEL*2	5	2,94	4	5,48	0	0	1	3,70	p = 0,148
KEL*2/KEL*2	165	97,06	69	94,52	70	100	26	96,30	
Sistema Duffy									
FY*A/FY*A	13	7,65	10	13,70	2	2,86	1	3,70	
FY*A/FY*B	75	44,12	32	43,83	35	50	8	29,62	p = 0,034
FY*B/FY*B	82	48,24	31	42,46	33	47,14	18	66,67	
+GATA-67t/t	105	61,76	60	82,19	39	55,71	6	22,22	
§GATA-67t/c	52	30,59	13	17,81	29	41,43	10	37,04	p < 0,001
£GATA-67c/c	13	7,65	0	0	2	2,86	11	40,74	
Sistema Kidd									
JK*A/JK*A	61	35,88	23	31,51	23	32,86	15	55,55	
JK*A/JK*B	80	47,06	34	46,58	35	50	11	40,74	p = 0,104
JK*B/JK*B	29	17,06	16	21,92	12	17,14	1	3,70	

*RHD Pseudogene; +Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose); £Presença da mutação (em homozigose).

Tabela 16 – Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto à etnia.

Genótipos	Total (n = 117)		Branços (n = 32)		Pardos (n = 51)		Negros (n = 34)		p
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Sistema Rh									
RHD pos.	108	92,31	27	84,38	49	96,08	32	94,12	p = 0,134
RHD neg.	09	7,69	05	15,63	02	3,92	02	5,88	
*RHD*Ψ pos.	03	2,56	00	0	02	3,92	01	2,94	p = 0,539
*RHD*Ψ neg.	114	97,44	32	100	49	96,08	33	97,06	
RHCE*CC	16	13,68	06	18,75	09	17,65	01	2,94	p = 0,054
RHCE*Cc	41	35,04	14	43,75	18	35,29	09	26,47	
RHCE*cc	60	51,28	12	37,5	24	47,06	24	70,59	
RHCE*EE	02	1,71	00	0	01	1,96	01	2,94	p = 0,826
RHCE*Ee	30	25,64	10	31,25	12	23,53	08	23,53	
RHCE*ee	85	72,65	22	68,75	38	74,51	25	73,53	
Sistema Kell									
KEL*1/KEL*1	00	0	00	0	00	0	00	0	p = 0,621
KEL*1/KEL*2	07	5,98	01	3,13	03	5,88	03	8,82	
KEL*2/KEL*2	110	94,02	31	96,88	48	94,12	31	91,18	
Sistema Duffy									
FY*A/FY*A	15	12,82	10	31,25	05	9,80	00	0	p < 0,001
FY*A/FY*B	39	33,33	10	31,25	24	47,06	05	14,71	
FY*B/FY*B	63	53,85	12	37,50	22	43,14	29	85,29	
+GATA-67t/t	58	49,57	26	81,25	27	52,94	05	14,71	p < 0,001
§GATA-67t/c	33	28,21	05	15,63	18	35,29	10	29,41	
£GATA-67c/c	26	22,22	01	3,13	06	11,76	19	55,88	
Sistema Kidd									
JK*A/JK*A	49	41,88	10	31,25	19	37,25	20	58,82	p = 0,027
JK*A/JK*B	51	43,59	16	50,00	21	47,18	14	41,18	
JK*B/JK*B	17	14,53	06	18,75	11	21,57	00	0	

*RHD Pseudogene; +Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose); £Presença da mutação (em homozigose).

5

Quanto aos genótipos Rh estendido, o DCcee foi o mais comum em brancos (33,33%) e pardos (30,58%), enquanto o Dcee foi o mais frequente nos negros (40,98%). Na comparação geral entre as etnias, houve uma diferença estatisticamente significativa (p < 0,001) (Tabela 17).

10

15

Tabela 17 – Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 287 indivíduos - 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto à etnia.

Genótipos	Total (n = 287)		Branco (n = 105)		Pardos (n = 121)		Negros (n = 61)		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh									
*DCcee	88	30,66	35	33,33	37	30,58	16	26,23	p < 0,001
Dcee	62	21,60	12	11,43	25	20,66	25	40,98	
DccEe	40	13,94	10	9,52	17	14,05	13	21,31	
DCCee	35	12,20	12	11,43	21	17,36	02	3,28	
**ddccee	32	11,15	18	17,14	11	9,09	03	4,92	
DCcEe	17	5,92	11	10,48	05	4,13	01	1,64	
DccEE	08	2,79	04	3,81	03	2,48	01	1,64	
DCCEe	03	1,05	02	1,90	01	0,83	00	0	
ddccEe	01	0,35	00	0,00	01	0,83	00	0	
ddCcee	01	0,35	01	0,95	00	0	00	0	

*D – RHD positivo; **dd – RHD negativo.

5

Resultados similares foram encontrados nos doadores e pacientes (Tabelas 18 e 19); contudo, na comparação geral entre as etnias, os dados diferiram de forma significativa apenas nos receptores (Tabela 19).

Tabela 18 – Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 170 doadores do HRU, quanto à etnia.

Genótipos	Total (n = 170)		Branco (n = 73)		Pardos (n = 70)		Negros (n = 27)		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh									
*DCcee	55	32,35	26	35,61	21	30	8	29,63	p = 0,079
Dcee	33	19,41	9	12,33	13	18,57	11	40,74	
**ddccee	24	14,12	13	17,81	10	14,28	1	3,70	
DccEe	20	11,76	6	8,22	8	11,43	6	22,22	
DCCee	20	11,76	7	9,59	12	17,14	1	3,70	
DCcEe	9	5,29	6	8,22	3	4,29	0	0	
DccEE	6	3,53	4	5,48	2	2,86	0	0	
DCCEe	2	1,18	1	1,37	1	1,43	0	0	
ddCcee	1	0,59	1	1,37	0	0	0	0	

*D – RHD positivo; **dd – RHD negativo.

15

20

Tabela 19 – Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto à etnia.

Genótipos	Total (n = 117)		Branços (n = 32)		Pardos (n = 51)		Negros (n = 34)		p
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Sistema Rh									
*DCcee	33	28,21	09	28,12	16	31,37	08	23,53	p = 0,043
Dccee	29	24,78	03	9,38	12	23,53	14	41,18	
DccEe	20	17,09	04	12,50	09	17,65	07	20,59	
DCCee	15	12,82	05	15,62	09	17,65	01	2,94	
**ddccee	08	6,84	05	15,62	01	1,96	02	5,88	
DCcEe	08	6,84	05	15,62	02	3,92	01	2,94	
DccEE	02	1,71	00	0	01	1,96	01	2,94	
DCCEe	01	0,85	01	3,12	00	0	00	0	
ddccEe	01	0,85	00	0	01	1,96	00	0	
ddCcee	00	0,00	00	0	00	0	00	0	

*D – RHD positivo; **dd – RHD negativo.

5

6.5 Frequência de fenótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e pacientes

Observamos que os fenótipos mais comuns, na população geral estudada, foram: sistema Rh (D pos.: 87,46%, C-c+: 48,43%, E-e+: 76,31%); sistema Kell (K-k+: 95,82%); sistema Duffy (Fy(a+b+): 36,59%); sistema Kidd (Jk(a+b+): 41,81%). Estes mesmos fenótipos foram os mais encontrados em doadores e pacientes, com uma pequena diferença: Jk(a+b-) foi o mais frequente nos receptores (39,32%) (Tabela 20).

15

20

25

Tabela 20 – Frequências de fenótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM.

Fenótipos	Total (n = 287)		Doadores (n = 170)		Pacientes (n = 117)	
	n	%	n	%	n	%
Sistema Rh						
RhD pos.	251	87,46	144	84,71	107	91,45
RhD neg.	36	12,54	26	15,29	10	8,55
Rh(C+c-)	33	11,50	22	12,94	11	9,40
Rh(C+c+)	103	35,89	66	38,82	37	31,62
Rh(C-c+)	139	48,43	82	48,24	57	48,72
Rh(C?*c+)	8	2,79	0	0	8	6,84
Rh(C+c?*)	4	1,39	0	0	4	3,42
Rh(E+e-)	8	2,79	6	3,53	2	1,71
Rh(E+e+)	51	17,77	31	18,24	20	17,09
Rh(E-e+)	219	76,31	133	78,24	86	73,50
Rh(E?*e+)	9	3,14	0	0	9	7,69
Sistema Kell						
K+k-	0	0	0	0	0	0
K+k+	11	3,83	5	2,94	6	5,13
K-k+	275	95,82	165	97,06	110	94,02
K?*k+	1	0,35	0	0	1	0,85
Sistema Duffy						
Fy(a+b-)	60	20,91	38	22,35	22	18,80
Fy(a+b+)	105	36,59	50	29,41	55	47,01
Fy(a-b+)	91	31,71	68	40	23	19,66
Fy(a-b-)	31	10,80	14	8,24	17	14,53
Sistema Kidd						
Jk(a+b-)	107	37,28	61	35,88	46	39,32
Jk(a+b+)	120	41,81	80	47,06	41	35,04
Jk(a-b+)	44	15,33	29	17,06	15	12,82
Jk(a?*b+)	3	1,05	0	0	3	2,56
Jk(a+b?*)	8	2,79	0	0	8	6,84
Jk(a?*b?*)	4	1,39	0	0	4	3,42

*Fenótipos inconclusivos por presença de dupla população de hemácias.

5

6.6 Comparação entre genótipos e fenótipos eritrocitários – doadores e pacientes

Ao compararmos os fenótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd com seus respectivos genótipos, nos 287 indivíduos pesquisados, observamos que 46 (16,03%) apresentaram discrepâncias, para um ou mais sistemas. Este índice foi de 2,35% nos doadores e 35,90% nos pacientes ($p < 0,001$) (Tabela 21).

10

Tabela 21 – Comparação entre genótipos e fenótipos eritrocitários de 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM.

	Total (n = 287)		Doadores (n = 170)		Pacientes (n = 117)		p
	n	%	n	%	n	%	
Genótipo e Fenótipo compatíveis*	241	83,97	166	97,65	75	64,10	p < 0,001
Genótipo(s) e Fenótipo(s) discrepantes**	46	16,03	4	2,35	42	35,90	

*Para todos os sistemas pesquisados; **Para um ou mais sistemas pesquisados.

- 5 Cada um dos quatro doadores com diferenças genótipo/fenótipo apresentou uma discrepância diferente (Tabela 22).

Tabela 22 – Discrepâncias genótipo/fenótipo eritrocitários encontradas em quatro doadores do HRU.

Genótipo	Fenótipo	
Sistema Rh	RhD neg.	
RHD pos. / *RHD*Ψ neg.	01	
RHCE*cc	Rh(C+c+)	
	01	
Sistema Kidd	Jk(a+b+)	Jk(a+b-)
JK*A/JK*A	01	00
JK*A/JK*B	00	01

*RHD pseudogene

10

Dentre os 42 receptores (dos quais 40 haviam recebido transfusões recentes – nos três meses anteriores à coleta sanguínea), 21 (50%) apresentaram uma discrepância, 11 (26,19%) tiveram duas, sete (16,67%) apresentaram três diferenças genótipos/fenótipos e três pacientes (7,14%) quatro (Gráfico 4).

15

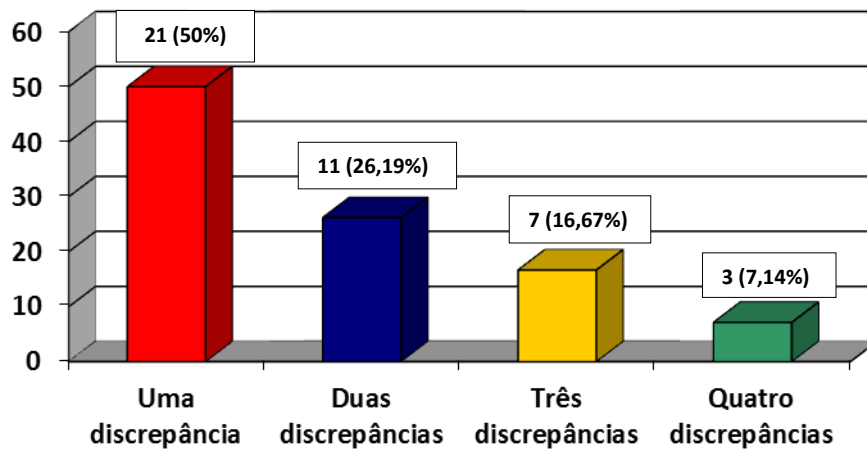


Gráfico 4 – Distribuição dos 42 politransfundidos* com discrepâncias genótipos/fenótipos eritrocitários quanto ao número de discrepâncias identificadas.

*40 haviam recebido transfusões recentes (nos três meses prévios à coleta sanguínea).

5

Ainda nos pacientes, o sistema com maior número de discrepâncias foi o Duffy (31), seguido por: Rh (26), Kidd (16) e Kell (01) (Tabela 23).

10

15

20

25

30

35

Tabela 23 – Discrepâncias genótipo/fenótipo eritrocitários encontradas em 42 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, dentre os quais 40 haviam recebido transfusões recentes.

Genótipo	Fenótipo			
	Rh(C?*c+)	Rh(C+c?*)	Rh(C+c+)	Rh(C-c+)
Sistema Rh				
RHCE*CC	00	03	00	01
RHCE*Cc	04	01	00	00
RHCE*cc	04	00	01	00
	Rh(E?*e+)	Rh(E-e+)		
RHCE*Ee	06	03		
RHCE*ee	03	00		
Sistema Kell	K?*k+			
KEL*1/KEL*2	01			
Sistema Duffy	Fy(a+b+)	Fy(a-b+)	Fy(a+b-)	
FY*A/FY*A (t/t)+	03	00	00	
FY*A/FY*B (t/c)§	03	01	00	
FY*B/FY*B (t/t)+	06	00	00	
FY*B/FY*B (t/c)#	08	00	00	
FY*B/FY*B (c/c)£	06	02	02	
Sistema Kidd	Jk(a+b?*)	Jk(a?*b?*)	Jk(a?*b+)	Jk(a-b+)
JK*A/JK*A	03	00	00	01
JK*A/JK*B	05	03	02	00
JK*B/JK*B	00	01	01	00

*Fenótipos inconclusivos por presença de dupla população de hemácias;

+GATA-67t/t (ausência de mutação);

5 §GATA-67t/c (presença da mutação em heterozigose – neste caso (FY*A/FY*B), o antígeno Fy^b não é expresso nas hemácias);

#GATA-67t/c (presença da mutação em heterozigose – neste caso (FY*B/FY*B), o antígeno Fy^b é expresso normalmente nas hemácias);

10 £GATA-67c/c (presença da mutação em homozigose – neste caso, o antígeno Fy^b não é expresso nas hemácias).

Dentre as 74 discrepâncias acima, observamos que, na maioria (67), houve transfusão de hemácias diferentes ou incompatíveis com os genótipos dos próprios receptores, nos três meses anteriores à coleta das amostras sanguíneas para a realização dos testes de genotipagem e fenotipagem eritrocitárias, o que não ocorreu em apenas sete casos (RHCE*cc/Rh(C+c+) (1); RHCE*Ee/Rh(E-e+) (1); FY*B/FY*B (t/t)/Fy(a+b+) (2); FY*B/FY*B (t/c)/ Fy(a+b+) (3)).

20 6.7 Número de transfusões recebidas pelos pacientes

Os 117 pacientes avaliados receberam, ao todo, 3.053 transfusões de CH (mediana: 8). Deste total, 1.700 (55,68%) foram destinadas aos receptores que apresentaram discrepâncias entre genótipo(s) e fenótipo(s) eritrocitários, com uma mediana de 14,5 transfusões, enquanto

os pacientes que não tiveram discrepâncias receberam 1.353 transfusões (mediana: 6), com diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p = 0,007$) (Tabela 24).

5 **Tabela 24** - Número total de transfusões de concentrados de hemácias recebidas por 117 pacientes no HRU e/ou HC/UFTM.

Transfusões	Pacientes				Total	
	Genótipos/Fenótipos compatíveis (n = 75)*		Genótipo(s)/Fenótipo(s) discrepantes (n = 42)**			
	N	%	N	%		
Total	1353	44,32	1700	55,68	3053	
Mediana	6		14,5		8	p = 0,007
(Mín-Máx)	(3-125)		(3-239)		(3-239)	

* Para todos os sistemas pesquisados; ** Para um ou mais sistemas pesquisados

10 Constatamos que 46 pacientes receberam ao todo 211 transfusões de CH nos três meses anteriores à coleta das amostras sanguíneas para a realização dos testes de genotipagem e fenotipagem eritrocitária. Deste total, 173 (81,99%) foram realizadas em 35 receptores que apresentaram genótipo(s)/fenótipo(s) discrepantes, enquanto apenas 38 (18,01%) foram destinadas a 11 pacientes com genótipos e fenótipos compatíveis para todos os sistemas pesquisados. Ao compararmos os dois grupos de receptores, houve diferença significativa ($p < 0,001$) (Tabela 25).

15

Tabela 25 - Número de transfusões recentes de concentrados de hemácias recebidas por 46 pacientes no HRU e/ou HC/UFTM.

Transfusões	Pacientes				Total	
	Genótipos/Fenótipos compatíveis (n = 11)*		Genótipo(s)/Fenótipo(s) discrepantes (n = 35)**			
	N	%	N	%		
Recentes+	38	18,01	173	81,99	211	
Mediana	0		3		0	p < 0,001
(Mín-Máx)	(0-8)		(0-13)		(0-13)	

* Para todos os sistemas pesquisados; ** Para um ou mais sistemas pesquisados; + Nos três meses prévios à coleta das amostras sanguíneas.

20

25 Das 173 bolsas de CH recebidas nos três meses prévios à coleta por 35 pacientes que apresentaram genótipo(s)/fenótipo(s) discrepantes, constatamos que 84 (48,55%) das mesmas possuíam fenótipos incompatíveis aos genótipos dos receptores, desconhecidos ou não pesquisados para os sistemas Rh, Duffy e/ou Kidd; resultado observado em apenas sete (18,42%) das 38 bolsas recebidas por 11 pacientes que apresentaram genótipos/fenótipos compatíveis, com diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p = 0,001$).

Todavia, nestes 11 indivíduos, as hemácias incompatíveis aos seus genótipos provenientes destas transfusões não foram detectadas nos testes de fenotipagem eritrocitária (Tabela 26).

Tabela 26 – Número de transfusões recentes de concentrados de hemácias recebidas por 46 pacientes no HRU e/ou HC/UFTM com fenótipos compatíveis e incompatíveis aos seus respectivos genótipos eritrocitários.

Transfusões Recentes+	Pacientes				p
	Genótipos/Fenótipos compatíveis (n = 11)*		Genótipo(s)/Fenótipo(s) discrepantes (n = 35)**		
	N	%	N	%	
Total (mediana)	38 (0)	100	173 (3)	100	p = 0,001
Fenótipos compatíveis*	31	81,58	89	51,45	
Fenótipos incompatíveis#	7##	18,42	84	48,55	

+ Nos três meses prévios à coleta das amostras sanguíneas.

* Para todos os sistemas pesquisados.

** Para um ou mais sistemas pesquisados.

Transfusões com fenótipos incompatíveis aos genótipos dos pacientes, desconhecidos ou não pesquisados para os sistemas Rh, Duffy e/ou Kidd.

Hemácias incompatíveis oriundas destas transfusões não foram detectadas na fenotipagem destes pacientes.

15

6.8 Teste da Antiglobulina Direta – Pacientes

Observamos que 34 (29,06%) dos 117 politransfundidos apresentaram o Teste da Antiglobulina Direta (TAD) positivo; resultado ocorrido em 21 (50%) dos 42 pacientes que tiveram genótipos e fenótipos discrepantes e em apenas 13 (17,33%) dos 75 receptores onde os genótipos foram compatíveis com os respectivos fenótipos, para todos os sistemas pesquisados. Na comparação entre os dois grupos, encontramos uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Tabela 27).

Tabela 27 – Resultados do Teste da Antiglobulina Direta (TAD) realizado em 117 politransfundidos, com e sem discrepâncias, no HRU e/ou HC/UFTM.

	Pacientes				p
	Genótipos/Fenótipos compatíveis (n = 75)*		Genótipo(s)/Fenótipo(s) discrepantes (n = 42)**		
	N	%	N	%	
TAD positivo	13	17,33	21	50	p < 0,001
TAD negativo	62	82,67	21	50	

*Para todos os sistemas pesquisados; **Para um ou mais sistemas pesquisados.

25

6.9 Aloanticorpos eritrocitários e número de transfusões em pacientes aloimunizados e não aloimunizados

Dentre os 117 pacientes estudados, 23 (19,66%) apresentaram histórico de aloimunização eritrocitária ou se tornaram aloimunizados após a coleta sanguínea para a realização dos testes de genotipagem e fenotipagem eritrocitária. Destes 23, 13 (56,52%) desenvolveram anticorpos contra antígenos do sistema Rh, enquanto o anti-K (sistema Kell) foi identificado em quatro (17,39%) dos aloimunizados (Tabela 28).

10 **Tabela 28** – Aloanticorpos antieritrocitários desenvolvidos por 23 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM.

Aloanticorpo	Sistema	N	%
Anti-E	Rh	2	8,69
Anti-C	Rh	2	8,69
Anti-D	Rh	1	4,35
Anti-c	Rh	1	4,35
Anti-K	Kell	1	4,35
Anti-M	MNS	1	4,35
Anti-S	MNS	1	4,35
Anti-Lu ^a	Lutheran	1	4,35
Anti-E + Anti-c	Rh	1	4,35
Anti-E + Anti-K	Rh + Kell	1	4,35
Anti-E + Anti-C + Anti-K	Rh + Kell	1	4,35
Anti-E + N.I.*	Rh	1	4,35
Anti-D + N.I.*	Rh	1	4,35
Anti-C + Anti-K + N.I.*	Rh + Kell	1	4,35
Anti-C + Anti-Fy ^a + N.I.*	Rh + Duffy	1	4,35
N.I.*	N.I.*	6	26,09
Total		23	100

*Não identificado.

O percentual de pacientes com discrepâncias que apresentaram aloanticorpos eritrocitários foi de 21,43%, enquanto entre os receptores com genótipos e fenótipos compatíveis o percentual foi de 18,42%; na comparação entre os grupos, não houve significância estatística (Tabela 29).

20 **Tabela 29** – Distribuição de 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, com e sem discrepâncias entre genótipos e fenótipos eritrocitários, quanto à presença ou não de aloanticorpos.

Pacientes	Genótipos/Fenótipos compatíveis (n = 75)		Genótipo(s)/Fenótipo(s) discrepantes (n = 42)		p
	n	%	n	%	
	Com aloanticorpos	14	18,42	09	
Sem aloanticorpos	62	81,58	33	78,57	

Todos os 14 pacientes com genótipos e fenótipos compatíveis que apresentaram aloimunização haviam desenvolvido seus aloanticorpos antes da coleta sanguínea para a realização dos testes de genotipagem e fenotipagem eritrocitária, o mesmo observado em seis (66,67%) dos nove aloimunizados com discrepâncias. Dentre estes nove indivíduos, três (33,33%) apresentaram Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) ou Teste da Antiglobulina Indireta (TAI) positiva após a coleta e detecção das discrepâncias.

Constatamos ainda que, embora sem diferença estatística, as medianas de transfusões nos pacientes aloimunizados e não aloimunizados foram de nove e 7,5, respectivamente (Tabela 30).

Tabela 30 – Número de transfusões recebidas por 117 pacientes no HRU e/ou HC/UFTM, aloimunizados e não aloimunizados contra antígenos eritrocitários.

Número de transfusões	Aloimunizados (n = 23)	Não aloimunizados (n = 94)	p
Total	1005	2048	
Mediana (min.-max.)	9 (3-239)	7,5 (3-236)	p = 0,081

7. DISCUSSÃO

7.1 Frequências de genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd em doadores e receptores

5

Ao definirmos o perfil genotípico eritrocitário de 287 indivíduos, incluindo 170 doadores de sangue e 117 receptores crônicos de transfusões de concentrados de hemácias, observamos que os genótipos mais frequentes na população total foram: sistema Rh (RHD pos., RHD* Ψ neg, RHCE*cc e RHCE*ee); sistema Kell (KEL*2/KEL*2); sistema Duffy
10 (FY*B/FY*B e GATA-67t/t); sistema Kidd (JK*A/JK*B). Estes mesmos genótipos foram os mais comuns tanto em doadores quanto em pacientes (Tabela 11).

Com relação aos alelos RHD e RHD* Ψ , nossos percentuais encontrados em doadores e pacientes foram similares aos de estudos feitos em São Paulo e Paraná (GUSLSIN et al., 2010; GUSLSIN et al., 2011; PELLEGRINO JUNIOR et al., 2001) (Tabelas 39 a 41 –
15 apêndice). Porém, quanto aos alelos C/c (sistema Rh), considerando somente os doadores, Ribeiro et al. (2009) (São Paulo) e Guelsin et al. (2011) (Paraná) encontraram o RHCE*Cc como o mais frequente; no primeiro estudo, inclusive houve diferença significativa na comparação aos nossos achados (Tabela 39 – apêndice). Dentre os pacientes, Ribeiro et al. (2009), ao avaliarem 144 portadores de anemia falciforme, apesar da ausência de diferença
20 significativa na comparação aos nossos resultados, observaram novamente um maior percentual para RHCE*Cc, diferindo do presente estudo, onde prevaleceu o genótipo RHCE*cc (Tabela 41 – apêndice).

Como previamente demonstrado, em caucasianos, os antígenos C e c possuem frequências de 70 e 80%, respectivamente; já em negros africanos, o percentual de c é maior
25 (aproximadamente 99%), enquanto o de C está próximo de 17% (DANIELS, 2005). Isso pode justificar as diferenças encontradas na comparação de nossos resultados aos de estudos feitos em São Paulo e Paraná, pelo fato de Minas Gerais ter um percentual menor de brancos e maior de negros em relação aos outros estados (IBGE, 2010a).

Tanto em doadores quanto em pacientes, verificamos que os percentuais dos genótipos
30 envolvendo os alelos E/e (sistema Rh) foram similares aos dos referidos estudos (Tabelas 39 e 41 – apêndice). Já os índices muito baixos do genótipo RHCE*EE e muito altos de RHCE*ee, tanto em nosso trabalho quanto nos demais citados podem ser explicados pelo fato de que, na maioria das populações, a frequência do antígeno E está em torno de 30%; porém, o e alcança os 98% (DANIELS, 2005).

Quanto ao sistema Kell, dentre os doadores, verificamos que a frequência de KEL*1/KEL*2 em nosso trabalho foi inferior a de quatro estudos (BOTURÃO-NETO et al., 2008; GUELSIN et al., 2011; PELLEGRINO JUNIOR et al., 2001; RIBEIRO et al., 2009) (Tabelas 39 e 40 – apêndice); em um destes, feito em São Paulo (Tabela 40 – apêndice), inclusive houve diferença significativa. O mesmo ocorreu com relação aos pacientes, na comparação a dois estudos, realizados em 79 portadores de doenças hematológicas e insuficiência renal crônica (GUELSIN et al. 2010) e 108 indivíduos com hemoglobinopatias (BOTURÃO-NETO et al., 2008), embora sem diferença estatística (Tabelas 41 e 42 – apêndice).

Conforme demonstrado, o respectivo fenótipo (K+k+), na população geral, é mais encontrado em caucasianos do que em negros (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015 – Tabela 3). O que poderia justificar estas diferenças é o menor percentual de brancos e maior de negros em Minas Gerais em relação a São Paulo e Paraná (IBGE, 2010a). Quanto ao genótipo KEL*1/KEL*1, seu respectivo fenótipo (K+k-), segundo Castilho, Pellegrino Junior e Reid (2015), é bastante incomum na população geral (Tabela 3), o que está de acordo com os resultados do presente estudo e dos referidos trabalhos (Tabelas 39 a 42 – apêndice).

No sistema Duffy (alelos FY*A/B), dentre os doadores, nossos percentuais diferiram significativamente de Ribeiro et al. (2009), que encontraram o FY*A/FY*B como o mais frequente, ao contrário do presente estudo (FY*B/FY*B) (Tabela 39 – apêndice). Embora sem diferença significativa, FY*A/FY*B também teve maior prevalência no trabalho de Guelsin et al. (2011) (Tabela 39 – apêndice). Nos pacientes, Guelsin et al. (2010) e Ribeiro et al. (2009), também encontraram o FY*B/FY*B como o mais frequente, porém com menores percentuais em relação ao presente estudo (Tabela 41 – apêndice). Sabe-se que, na população geral, FY*A/FY*B é o mais comum nos indivíduos caucasianos, em contraste com FY*B/FY*B, que é o mais prevalente em negros africanos (DANIELS, 2005).

Considerando a região GATA-1 (também do sistema Duffy) nos doadores, a frequência de GATA-67c/c em nosso trabalho foi superior a de Ribeiro et al. (2009) e Guelsin et al. (2011), sendo esta última significativamente inferior a nossa (Tabela 39 – apêndice). A referida mutação é característica dos negros, sendo rara nos caucasianos (DANIELS, 2005; MENY, 2010). Entretanto, Pellegrino Junior verificaram que o percentual de GATA-67c/c foi praticamente o dobro de nossos achados; apesar disso, a mutação em heterozigose (GATA-67t/c) teve uma frequência bem abaixo da nossa ($p < 0,001$) (Tabela 40 – apêndice). Segundo Daniels (2005), este genótipo pode alcançar uma frequência de até 30% em negros africanos, sendo também de rara ocorrência na população caucasiana (DANIELS, 2005). Dentre os

pacientes, a frequência de GATA-67c/c foi maior que a de outros dois trabalhos (GUELSIN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2009), inclusive com diferença significativa em uma das comparações (Tabela 41 – apêndice).

Novamente, acreditamos que o fato de Minas Gerais possuir menor quantidade de indivíduos brancos e maior de negros, com relação a São Paulo e Paraná (IBGE, 2010a), possa justificar a maioria destas diferenças observadas no sistema Duffy, ao equipararmos nossos resultados aos dos referidos estudos.

Estas diferenças no perfil étnico entre os estados podem também ser aplicadas no sistema Kidd. Considerando apenas os doadores, nossos percentuais envolvendo os alelos JK*A/B diferiram significativamente na comparação a dois estudos (GUELSIN et al., 2011; PELLEGRINO JUNIOR et al., 2001) (Tabelas 39 e 40 – apêndice). Enquanto JK*A/JK*A teve maior frequência em nossos achados (em relação aos outros dois), JK*A/JK*B teve um percentual muito maior no segundo trabalho citado. Dentre os pacientes, embora sem diferença estatística, nosso percentual de JK*A/JK*A foi superior ao de Guelsin et al. (2010) e Ribeiro et al. (2009), enquanto JK*A/JK*B foi mais encontrado nestes estudos (Tabela 41 – apêndice). Como já citado, o fenótipo Jk(a+b-) possui maior prevalência nos negros, enquanto Jk(a+b+) é mais frequente nos caucasianos (LOMAS-FRANCIS, 2007).

Considerando os genótipos Rh estendido, observamos que os mais comuns nos doadores foram: DCcee, Dccee, ddccee, DccEe e DCCee (Tabela 31 - apêndice). Ao compararmos nossos achados aos de Novaretti, Dorlhiac-Llacer e Chamone (2000), os quais avaliaram fenótipos de 2.462 doadores de São Paulo, diferenças relevantes foram observadas quanto ao ddccee, que no nosso estudo foi duas vezes mais prevalente (Tabela 43 – apêndice). Embora ddccee (ou ccee) seja mais encontrado em caucasianos (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015 – Tabela 2), os quais são mais numerosos no estado de São Paulo (IBGE, 2010a), a diferença pode ser justificada pelo fato do percentual de doadores brancos pesquisados no nosso estudo ter sido de 42,94%, enquanto no daqueles autores foi de 33,87%. Uma possível explicação poderia ser o eventual recrutamento seletivo de doadores do tipo “O” naquele serviço, sabidamente mais comum em negros.

No presente estudo devemos destacar que, embora os percentuais de indivíduos brancos, pardos e negros na cidade de Uberaba sejam de 61,88%, 27,96% e 9,11% (nesta ordem), segundo dados do IBGE (IBGE, 2010a – Tabela 8), as respectivas frequências encontradas em nosso trabalho foram diferentes (42,94%, 41,18% e 15,88% - Gráfico 3; Tabela 10), possivelmente em virtude do fato de o perfil étnico dos doadores do HRU não

representar o respectivo perfil de Uberaba, já que grande parte dos doadores geralmente possui um perfil socioeconômico mais baixo, no qual a etnia negra é mais prevalente.

5 7.2 Frequências de genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd – comparação entre doadores e pacientes

Ao compararmos doadores e pacientes, dentre todos os genótipos pesquisados, diferenças significantes ocorreram apenas na região promotora GATA-1 do sistema Duffy, com destaque para o percentual muito maior de GATA-67c/c nos receptores (Tabela 11). Como previamente citado, trata-se de uma mutação característica da etnia negra (DANIELS, 2005; MENY, 2010). O maior percentual destes indivíduos no grupo de pacientes explica este resultado; adicionalmente, 63 (53,85%) dos 117 pacientes tinham anemia falciforme, uma doença característica dos negros (CAVALCANTI; MAIO, 2011).

Devido a este último fato, ao equipararmos os portadores deste diagnóstico aos doadores, diferenças significantes ocorreram não apenas na região GATA-1, como também em outros sistemas (Tabela 12). O maior índice de RHD*Ψ (RHD pseudogene) nos receptores pode ser explicado pelo fato de o mesmo ser característico da etnia negra (SINGLETON et al., 2000). No sistema Kidd, JK*A/JK*A teve maior percentual nos pacientes e JK*A/JK*B nos doadores. Como previamente citado, os fenótipos Jk(a+b-) e Jk(a+b+) são mais comuns, respectivamente, em negros e caucasianos (LOMAS-FRANCIS, 2007), o que pode justificar estes resultados. E com relação aos alelos FY*A/B (sistema Duffy), houve uma tendência de diferença significante, com destaque para o percentual maior de FY*B/FY*B nos pacientes e de FY*A/FY*B nos doadores; resultados que provavelmente se devem ao motivo de FY*A/FY*B ser mais frequente em caucasianos e FY*B/FY*B em negros africanos (DANIELS, 2005).

A maior frequência de GATA-67c/c nos pacientes reforça a importância da genotipagem eritrocitária como método auxiliar à fenotipagem na rotina transfusional. Embora a referida mutação leve a uma não expressão do antígeno Fy^b nas hemácias, ela permite a transfusão de hemácias Fy^b positivas, sem risco de aloimunização, já que o antígeno é expresso normalmente em outras partes do organismo do receptor (MENY, 2010). Isso evita um desperdício de hemácias Fy^b neg., as quais, no Brasil, são encontradas em apenas 35% dos indivíduos (CASTILHO, 2007). No entanto, se apenas o fenótipo eritrocitário do paciente for

pesquisado, isso poderá, em muitos casos (especialmente nos receptores negros), levar a transfusões desnecessárias de eritrócitos com o mesmo fenótipo.

Em outros dois trabalhos, nenhuma diferença significativa entre doadores e pacientes foi constatada (GUELSIN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2009), o mesmo válido para Boturão-Neto et al. (2008), em um estudo envolvendo apenas o sistema Kell (diversos alelos). Tais resultados podem ser explicados pelo alto índice de miscigenação no Brasil.

7.3 Frequências dos genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e receptores, quanto ao gênero

Considerando os genótipos avaliados, na comparação entre os gêneros, dentre todos os 287 indivíduos estudados, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, o mesmo ocorrendo no grupo de pacientes. Todavia, nos doadores, um resultado chama muita atenção. Na região promotora GATA-1 do sistema Duffy, a frequência de GATA-67c/c foi significativamente superior nos homens (Tabela 13).

Embora, como previamente citado, a referida mutação seja característica da etnia negra, observamos que, dos 27 doadores negros deste estudo, 14 (51,85%) eram homens e 13 (48,15%) mulheres. Dentre os 14 do gênero masculino, nove (64,29%) apresentaram genótipo GATA-67c/c (presença da mutação – em homozigose), quatro (28,57%), GATA-67t/c (presença da mutação – em heterozigose) e apenas um (7,14%) GATA-67t/t (ausência da mutação). Contudo, nas 13 mulheres, estes genótipos foram encontrados, de modo respectivo, em dois (15,38%), seis (46,15%) e cinco (38,46%) doadoras. Das seis mulheres com genótipo GATA-67t/c, duas (33,33%) possuíam no mínimo um ascendente branco, duas (33,33%) ascendentes negros e pardos e duas (33,33%) somente ascendência negra, enquanto a maioria (três - 60%) das cinco mulheres com genótipo GATA-67t/t afirmaram ter no mínimo um ascendente branco na família (um dos pais e/ou um dos avós). Além disso, considerando os nove doadores negros do gênero masculino com genótipo GATA-67c/c, seis (66,67%) possuíam apenas ascendência negra (pais e avós). Tais dados são muito importantes, por demonstrarem que a ancestralidade dos indivíduos pesquisados possivelmente influenciou na maior prevalência da mutação GATA-67c/c nos doadores do gênero masculino em comparação ao feminino, inclusive com significância estatística. Fatos como este podem ocorrer em um país tão miscigenado como o Brasil, onde possuir determina etnia não significa necessariamente ser portador de um genótipo específico.

Com relação aos genótipos Rh estendido, não houve diferenças estatisticamente significantes na comparação entre homens e mulheres (população total, doadores e pacientes – Tabelas 36 a 38 - apêndice).

5 Nenhum outro trabalho envolvendo comparação de genótipos eritrocitários entre os gêneros foi identificado na literatura.

7.4 Frequências dos genótipos eritrocitários dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd nos doadores e receptores, quanto à etnia

10

Com relação à etnia, observamos nos 287 indivíduos uma maior prevalência de RHD pos. nos negros em relação a brancos e pardos, com diferença significativa na população total avaliada (Tabela 14). Sabe-se que 80 a 85% das pessoas caucasianas contêm o antígeno D, enquanto em afrodescendentes este percentual ultrapassa os 90% (SINGLETON et al., 2000),
15 o que está de acordo com nossos achados.

15

Quanto ao pseudogene RHD (RHD*Ψ), este foi observado somente nos receptores, com percentuais de 0% nos brancos, 3,92% nos pardos e 2,94% nos negros (Tabela 16). Embora sem diferença estatística, chama atenção o fato de sua frequência ter sido um pouco maior nos pardos em relação aos negros, já que, como previamente citado, ele é característico da etnia negra (SINGLETON et al., 2000). Os dois pacientes pardos RHD*Ψ positivos eram
20 duas irmãs com anemia falciforme (assim como o receptor negro com o genótipo), as quais relataram que seus pais e avós (maternos e paternos) também eram todos pardos. Todavia, como previamente citado, o alto grau de miscigenação do povo brasileiro deve ser levado em consideração, tendo em vista que a doença em questão também é originária desta etnia
25 (CAVALCANTI; MAIO, 2011).

25

Conforme já descrito, na presença do RHD*Ψ, não haverá expressão do antígeno D na membrana da hemácia e o indivíduo será fenotipado como RhD negativo (SINGLETON et al., 2000). Porém, ao conferirmos os fenótipos dos três portadores do genótipo em questão, verificamos que dois deles (um negro e uma parda) eram RhD positivos, enquanto apenas
30 uma (parda) era RhD negativa. Isso pode ser explicado pelo fato de que o pseudogene, em alguns casos, pode ocorrer em heterozigose com o gene RHD normal (sem alterações) ocorrendo deste modo a expressão normal do antígeno D (fenótipo RhD positivo). Singleton et al. (2000), no mesmo artigo citado, avaliaram 98 amostras randômicas de negros da África

do Sul (95 RhD positivas e 3 RhD negativas) e observaram que o RHD*Ψ estava presente em 14 destas amostras.

5 Considerando os alelos C/c, os maiores percentuais de RHCE*cc nos negros e de RHCE*Cc nos brancos (Tabelas 14 a 16) estão de acordo com dados da literatura, pois, como previamente relatado, há maior prevalência do antígeno C nos caucasianos e de c nos negros (DANIELS, 2005).

10 Com relação aos alelos E/e (sistema Rh), observamos, de um modo geral, que os percentuais de RHCE*EE, RHCE*Ee e RHCE*ee foram similares ao equipararmos brancos, pardos e negros (população total, doadores e pacientes – Tabelas 14 a 16), sem qualquer diferença significativa. Isso está de acordo com Castilho, Pellegrino Junior e Reid (2015), que descrevem percentuais semelhantes dos respectivos fenótipos, na comparação entre caucasianos e negros.

15 No sistema Kell, não encontramos diferenças significantes entre as etnias. Contudo, o maior percentual de KEL*1/KEL*2 nos negros em comparação aos brancos e pardos, na população total estudada (Tabela 14), merece destaque, pelo fato de o respectivo fenótipo (K+k+) ser mais comum nos caucasianos (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015). Todavia, dentre os quatro indivíduos negros com o genótipo, dois (50%) afirmaram ter no mínimo um ascendente branco na família (um dos pais e/ou um dos avós); o terceiro, mesmo com seus pais e avó materna negros relatou desconhecer a etnia do avô materno e de
20 ambos os avós paternos; o quarto, embora com a mãe negra, o pai pardo, a avó materna parda e o avô materno negro, não sabia a etnia de seus avós paternos. Portanto, não podemos descartar a hipótese destes ancestrais com etnia desconhecida serem brancos. Todos estes fatores podem ter contribuído para o maior percentual do referido genótipo nos negros, embora sem significância estatística; além disso, reforçam o alto grau de miscigenação em
25 nosso país.

No sistema Duffy (alelos FY*A/B), diferenças significantes ocorreram em todas as comparações feitas neste estudo (Tabelas 14 a 16), com destaque para o percentual sempre maior de FY*B/FY*B na etnia negra, o que está de acordo com Daniels (2005), que afirma ser este genótipo o mais comum em negros africanos. Segundo este mesmo autor, o alelo
30 FYA é encontrado em até 68% dos caucasianos, porém em apenas 13% dos negros, o que também está de acordo com nossos achados, devido à prevalência muito maior de FY*A/FY*A nos brancos em comparação aos pardos e negros.

Na região promotora GATA-1 (sistema Duffy), diferenças significantes também foram encontradas em todas as equiparações deste trabalho (Tabelas 14 a 16). A maior frequência de

GATA-67c/c nos negros confere com a literatura, já que a referida mutação é observada em até 67% dos negros africanos, sendo rara nos caucasianos (DANIELS, 2005). Esta raridade nos caucasianos também corrobora nossos achados, pois, dentre os 105 brancos estudados, somente um (0,95%) apresentou o genótipo em questão (Tabela 14).

5 Quanto ao sistema Kidd, diferenças significantes ocorreram na população total e nos pacientes (Tabelas 14 e 16). A maior prevalência do fenótipo Jk(a-b+) nos caucasianos em relação aos negros (LOMAS-FRANCIS, 2007 – Tabela 6), pode justificar os percentuais bem maiores de JK*B/JK*B no presente estudo na etnia branca em comparação à negra. JK*A/JK*B também foi mais comum nestes indivíduos do que nos negros, embora com
10 menores diferenças. Segundo o mesmo autor, o respectivo fenótipo é mais encontrado em caucasianos do que em negros (Tabela 6), o que pode explicar tais achados. E as maiores frequências do genótipo JK*A/JK*A nos negros também estão de acordo com o referido autor, o qual cita um maior percentual de Jk(a+b-) nestes indivíduos (Tabela 6).

Considerando os genótipos Rh estendido, diferenças significantes ocorreram na
15 comparação geral entre brancos, pardos e negros (população total e receptores – Tabelas 17 e 19); quanto aos doadores, houve uma tendência de diferença significativa (Tabela 18). Dccee teve maiores percentuais nos negros, o que está de acordo com Novaretti, Dorlhiac-Llacer e Chamone (2000), que estudaram 2.462 doadores de São Paulo, verificando uma frequência de 36,58% do respectivo fenótipo nesta etnia, com uma diferença significativa em relação a
20 mulatos (22,13%) e brancos (8,27%) ($p < 0,001$).

Em nossos achados, DCcee foi mais comum nos brancos e pardos em relação aos negros, o que também está de acordo com o estudo citado. Além disso, em nosso trabalho, ddccee teve maior índice nos brancos em comparação aos pardos e negros, embora nos doadores tenha havido pouca diferença entre brancos e pardos. Isso também confere com os
25 dados dos referidos autores, que encontraram o respectivo fenótipo em 10,19% dos caucasoides, 6,17% dos mulatos e 4,62% dos negros ($p < 0,001$).

Castilho, Pellegrino Junior e Reid (2015) descrevem os seguintes fenótipos Rh como os mais comuns na população negra em geral: DDccee ou Dccee (45,8%), DDCcee ou DCcee (21%) e DDccEe ou DccEe ou (18,6%); dados que corroboram os resultados observados para
30 esta etnia em nosso estudo. Nos caucasianos, em geral, segundo os mesmos autores: DCcee ou DDCcee (34,9%), DCCee ou DDCCee (18,5%), ccee ou ddccee (15,1%), DCcEe ou DDCCeE (13,3%) e DDccEe ou DccEe (11,8%); no presente estudo, entretanto, o genótipo ddccee foi o segundo mais encontrado nos brancos (17,14%), enquanto DCCee foi o terceiro, juntamente com o Dccee (11,43% cada).

7.5 Comparação entre genótipos e fenótipos eritrocitários – doadores e pacientes

Ao realizarmos o teste de fenotipagem eritrocitária para os sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd e compararmos os resultados com os respectivos genótipos, em todos os 287 indivíduos pesquisados, observamos um percentual significativamente maior de discrepâncias entre os referidos testes nos receptores (Tabela 21).

Dentre os quatro doadores, o primeiro teve seu genótipo definido como RHD positivo, RHD*Ψ (pseudogene RHD) negativo; seu fenótipo, no entanto, foi RhD negativo, inclusive com a pesquisa de antígeno D fraco sendo negativa. O segundo foi genotipado como RHCE*cc, porém fenotipado como Rh(C+c+). O terceiro apresentou genótipo JK*A/JK*B; entretanto, fenótipo Jk(a+b-); já o quarto, com genótipo JK*A/JK*A, foi fenotipado como Jk(a+b+) (Tabela 22); todavia, o antígeno Jk^b, identificado nesta fenotipagem, exibiu uma intensidade de aglutinação de duas cruzes, diferente do padrão encontrado nos demais indivíduos (no mínimo três cruzes).

Com relação ao primeiro doador, existe a possibilidade deste ser portador de um antígeno D fraco que acabou não sendo detectado na tipagem RhD feita no HRU, o que pode ocorrer em certos casos (como previamente citado), levando a um resultado falso negativo, requerendo deste modo análises moleculares adicionais ou pesquisa com anticorpos monoclonais de maior sensibilidade (COSTA et al., 2014; MORAES-SOUZA; ALVES, 2015; SCHMIDT et al., 2015). Também há a possibilidade de o indivíduo em questão ser um portador do fenótipo DEL, uma expressão particularmente enfraquecida do antígeno D, com mudanças moleculares ainda mais severas em relação ao D fraco (FLEGEL, 2007b).

Quanto aos doadores RHCE*cc; Rh(C+c+) e JK*A/JK*A; Jk(a+b+), sabe-se que, em alguns casos, os primers utilizados na genotipagem podem apresentar limitações, não reconhecendo sequências de determinados alelos e conseqüentemente não se ligando a eles, tampouco causando amplificação dos mesmos durante a PCR, o que ocorre devido a um polimorfismo ou mutação em um dos sítios de ligação. Nestas situações, temos um fenótipo verdadeiro, porém um genótipo falso. No caso do indivíduo JK*A/JK*B; Jk(a+b-), pode se tratar de um genótipo verdadeiro e fenótipo falso, o que acontece nos seguintes casos (em doadores): presença de antígeno com expressão muito fraca, alterações no eritrócito com destruição antigênica ou baixa qualidade dos antissoros utilizados na fenotipagem (PEYRARD, 2015 – Comunicação Pessoal).

As amostras de DNA destes doadores com discrepâncias foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos da Universidade de Campinas-SP

(UNICAMP), sob responsabilidade da Dra. Lílian Castilho, em novembro de 2015, para análises moleculares adicionais; no momento, estamos aguardando o resultado destas análises.

Em outros dois doadores, embora não tenha ocorrido discrepância, um resultado interessante foi observado durante a genotipagem RHD. Após a eletroforese dos produtos da amplificação por PCR, apenas uma das bandas (498 pb), referente ao íntron 4 do gene em questão foi visualizada em luz UV, fato que não ocorreu com a outra banda (95 pb) (éxon 7). O fenótipo destes indivíduos havia sido definido como RhD positivo. Diante do resultado na PCR, as amostras de DNA destes doadores foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos da UNICAMP, sendo então submetidas a análise molecular por BeadChip, que é uma técnica de alta precisão capaz de detectar uma ampla extensão de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) que afetam a expressão antigênica (BIOARRAY SOLUTIONS, 2011). Por este método, concluiu-se que os doadores, na verdade, possuíam uma variante RHD (*RHD*DIVa tipo 2* ou *RHD*DIVa tipo 2/DIIIa-CE(4-7)-D*), a qual produz um fenótipo RhD parcial. Como já destacado, neste fenótipo, ocorre a ausência de alguns epítomos do antígeno D na membrana da hemácia (CASTILHO, 2007); entretanto, os indivíduos portadores continuam classificados como RhD positivos (genotipicamente e fenotipicamente). O fenótipo merece atenção especial quando é encontrado em pacientes, os quais não devem receber hemácias RhD positivas, a fim de se evitar a aloimunização contra os epítomos do antígeno D ausentes em suas próprias hemácias (FLEGEL, 2007b).

Quanto aos receptores, observamos que as diferenças genótipo(s)/fenótipo(s) ocorreram em todos os sistemas pesquisados (Rh, Kell, Duffy e/ou Kidd) (Tabela 23). Castilho et al. (2002), ao avaliarem 40 pacientes com anemia falciforme, observaram que 15% apresentaram discrepâncias nos sistemas Rh, Duffy e Kidd; um percentual inferior ao presente estudo (35,90%). Ao estudarem 144 receptores com a mesma doença, Ribeiro et al. (2009) verificaram que 10,42% deles exibiram discrepâncias nos sistemas Rh, Duffy e/ou Kidd; um índice também inferior ao de nossos achados. Entretanto, Guelsin et al. (2010) relataram diferenças nos sistemas Rh, Kell, Duffy e/ou Kidd, em 42,1% de 38 pacientes politransfundidos com doenças hematológicas e insuficiência renal crônica; uma frequência maior do que a encontrada no presente estudo.

Em nossos receptores, verificamos também que as discrepâncias foram mais frequentes no sistema Duffy, seguido por: Rh, Kidd e Kell. Guelsin et al. (2010), no entanto, encontraram um maior número de diferenças genótipo(s)/fenótipo(s) no sistema Rh, seguido por: Duffy, Kidd e Kell. No estudo de Castilho et al. (2002), a ordem decrescente de

discrepâncias nos sistemas foi: Kidd, Rh e Duffy; no de Ribeiro et al. (2009): Rh, Kidd e Duffy.

Sabe-se que as transfusões recentes são um fator que limita a realização da fenotipagem eritrocitária em pacientes, devido à presença de hemácias dos doadores, as quais
 5 ainda se encontram na circulação sanguínea (AVENT, 2008; CASTILHO et al., 2002; DENOMME; FLEGEL, 2008; ROZMAN; DOVC; GASSNER, 2000). Entretanto, dos 42 pacientes com discrepâncias, dois não haviam recebido transfusões nos três meses anteriores à coleta das amostras sanguíneas para a realização dos testes de genotipagem e fenotipagem eritrocitárias. O primeiro teve genótipo RHCE*cc e fenótipo Rh(C+c+) (discrepância relatada
 10 em um dos doadores); o segundo foi genotipado como RHCE*Ee e fenotipado como Rh(E-e+). Como já abordado, no primeiro caso, pode se tratar de um fenótipo verdadeiro, porém um genótipo falso, por limitações dos primers da PCR, que podem ocorrer em determinadas situações; quanto ao segundo paciente, um genótipo verdadeiro e fenótipo falso, devido a antígeno com expressão muito fraca, alterações no eritrócito com destruição antigênica ou
 15 baixa qualidade dos antissoros utilizados na fenotipagem (PEYRARD, 2015 – Comunicação Pessoal).

As amostras de DNA destes indivíduos foram também encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos da UNICAMP, em novembro de 2015, para análises moleculares adicionais; no momento, estamos aguardando o resultado destas análises.

Convém citar que a discrepância RHCE*cc; Rh(C+c+) já tem sido relatada em
 20 indivíduos negros (EKMAN; BILLINGSLY; HESSNER, 2002; TAX et al., 2002); no presente estudo, inclusive, o doador e o paciente que apresentaram esta diferença eram desta etnia. Sua origem é uma variação no gene *RHD* (*r's* ou *Cde^s*), a qual codifica um polipeptídeo Rh que expressa o antígeno C e leva a uma ausência de um íntron *RHC* específico (íntron 2).
 25 Conseqüentemente, o alelo *RHC* não é identificado na genotipagem; porém, a pesquisa fenotípica do antígeno C é positiva (TAX et al., 2002).

Todas estas discrepâncias genótipo/fenótipo encontradas em alguns doadores e pacientes, as quais exigiram análises moleculares adicionais, mostram que a genotipagem eritrocitária, em alguns casos, não é o método padrão para a definição correta do perfil
 30 antigênico do indivíduo, requerendo a fenotipagem como método complementar.

Outros cinco receptores com diferenças (FY*B/FY*B (GATA-67t/t)/Fy(a+b+) (2); FY*B/FY*B (GATA-67t/c)/Fy(a+b+) (3)) também não haviam recebido transfusões recentes; no entanto, apresentaram o Teste da Antiglobulina Direta positivo; assunto que será tratado detalhadamente no tópico 7.7.

7.6 Número de transfusões recebidas pelos pacientes

Observamos que os pacientes com discrepâncias genótipo(s)/fenótipo(s) receberam números significativamente maiores de transfusões de CH (total e recentes – nos três meses anteriores à coleta das amostras sanguíneas para a realização dos testes de genotipagem e fenotipagem eritrocitárias) em comparação aos receptores que apresentaram genótipos e fenótipos compatíveis para todos os sistemas avaliados (Tabelas 24 e 25). Tais achados estão de acordo com outros três trabalhos (CASTILHO et al., 2002; GUELSIN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2009), embora os pesquisadores não tenham informado o número de transfusões recebidas pelos pacientes; apenas afirmaram que os receptores com discrepâncias receberam mais transfusões.

Dos 42 receptores que apresentaram discrepâncias, 35 haviam recebido transfusões recentes, dentre os quais, a maioria (22 - 62,86%) recebeu hemácias com fenótipos incompatíveis, desconhecidos ou não pesquisados para os sistemas Rh, Duffy e/ou Kidd, enquanto 13 (30,95%) receberam eritrócitos diferentes, porém compatíveis, sem qualquer risco de aloimunização eritrocitária. Como exemplos: pacientes com genótipo RHCE**Cc* e fenótipo Rh(C?c+), por terem recebido hemácias Rh(C-c+); genótipo FY*B/FY*B; GATA-67c/c (mutação em homozigose, onde o antígeno Fy^b não é expresso nas hemácias) e fenótipo Fy(a-b+), por terem recebido eritrócitos com este fenótipo; conforme já destacado, neste caso, não há risco de aloimunização pelo fato de Fy^b ser expresso em outras partes do organismo.

Assim como em nossos achados, outros trabalhos da literatura evidenciaram que a maioria dos pacientes com discrepâncias genótipo(s)/fenótipo(s) haviam sido recentemente transfundidos com hemácias diferentes ou incompatíveis com seus respectivos genótipos eritrocitários (CASTILHO et al., 2002; GUELSIN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2009).

No presente estudo, dentre os 75 pacientes sem discrepâncias, apenas 11 receberam transfusões nos três meses prévios à coleta. Destes 11, quatro (36,36%) foram transfundidos com eritrócitos possuindo fenótipos incompatíveis com seus genótipos, desconhecidos ou não pesquisados para os sistemas Rh, Duffy e/ou Kidd e dois (18,18%) receberam hemácias distintas, porém compatíveis, sem risco de aloimunização. Todavia, conforme já elucidado, estas hemácias diferentes acabaram não sendo identificadas na fenotipagem eritrocitária destes seis indivíduos. Já a maior parte (cinco – 45,45%) recebeu hemácias totalmente compatíveis com seus genótipos, para todos os sistemas pesquisados.

Entretanto, o fato de 26 (22,22%) dos 117 politransfundidos terem recebido hemácias incompatíveis merece atenção (assim como em outros trabalhos); este será um assunto abordado detalhadamente no tópico 7.9.

5

7.7 Teste da Antiglobulina Direta – Pacientes

Como referido no final do tópico 7.5, cinco pacientes não haviam recebido transfusões recentemente, porém apresentaram o Teste da Antiglobulina Direta (TAD) positivo. Estes indivíduos tinham insuficiência renal crônica e genótipo FY*B/FY*B; no entanto, apresentaram fenótipo Fy(a+b+). O TAD positivo indica uma possível presença de autoanticorpos antieritrocitários, o que por sua vez é uma limitação na fenotipagem eritrocitária, aumentando a possibilidade de resultados falso-positivos (CASTILHO et al., 2002; MARTINS, M. L. et al., 2009).

O fato de o TAD positivo também estar diretamente associado a discrepâncias nos testes de fenotipagem e genotipagem é reforçado pelo seguinte achado: dentre os pacientes com genótipos e fenótipos discrepantes, 50% tiveram TAD positivo, resultado encontrado em apenas 17,33% dos receptores com genótipos/fenótipos compatíveis, para todos os sistemas pesquisados ($p < 0,001$; Tabela 27).

Dos 117 pacientes estudados, 34 (29,06%) apresentaram TAD positivo. Todavia, como previamente demonstrado, este resultado não significa necessariamente a presença de autoanticorpos, pois outras hipóteses devem ser consideradas, como: (I) reações transfusionais, onde o aloanticorpo do receptor sensibiliza as hemácias provenientes do doador ou anticorpos transfundidos deste se fixam aos eritrócitos do receptor; (II) interações de medicamentos ou complexos droga-anticorpo com as hemácias do paciente; (III) hipergamaglobulinemia, na qual imunoglobulinas inespecíficas são adsorvidas às hemácias circulantes; (IV) síndrome do linfócito passageiro, em que anticorpos transitórios produzidos pelos linfócitos do doador de um órgão transplantado revestem os eritrócitos do receptor (CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015).

Em suma, o alto percentual de TAD positivo observado no presente estudo deve ser considerado, por estar associado de forma significativa às discrepâncias genótipos/fenótipos, reforçando a necessidade de sua realização em todos os pacientes politransfundidos, de modo a evitar resultados falso-positivos na definição dos fenótipos destes indivíduos. Além disso,

tais achados corroboram a importância da genotipagem como método ideal também nos casos de TAD positivo.

5 **7.8 Aloanticorpos eritrocitários nos pacientes e número de transfusões em aloimunizados e não aloimunizados**

No presente estudo, observamos que 19,66% dos 117 receptores estudados apresentaram histórico de aloimunização eritrocitária ou Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) positiva após a coleta sanguínea para a realização dos testes de genotipagem e fenotipagem eritrocitária (Tabela 28). Tal índice é superior ao de vários trabalhos (DATTA et al. 2015; NATUKUNDA et al., 2010; GUELSIN et al., 2010; SANZ et al., 2013; THOMPSON et al., 2011), cujos índices variaram de 5,6% a 16,5%, porém inferior ao de outros (GADER; AL GHUMLAS; AL-MOMEN, 2008; MARTINS, M. L. et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009; WANG et al., 2006), cujas frequências oscilaram entre 22,06% a 55%. Outro trabalho realizado em um serviço transfusional brasileiro relatou um índice de aloimunização de 62,1% em portadores de anemia falciforme (DEZAN et al., 2016, no prelo).

Anticorpos contra antígenos do sistema Rh foram encontrados na maioria dos aloimunizados (56,52%) (Tabela 28), o que está de acordo com diversos autores (DATTA et al. 2015; GADER; AL GHUMLAS; AL-MOMEN, 2008; GUELSIN et al., 2010; MARTINS, M. L. et al., 2009; MARTINS, P. R. J. et al., 2008; NATUKUNDA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2009; SANZ et al., 2013; SCHONEWILLE; DE VRIES; BRAND, 2009; THOMPSON et al., 2011; WANG et al., 2006).

O sistema Kell foi o segundo mais identificado (Tabela 28), assim como em vários estudos (GADER; AL GHUMLAS; AL-MOMEN, 2008; GUELSIN et al., 2010; MARTINS, P. R. J. et al., 2008; MARTINS, M. L. et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009; SANZ et al., 2013; SCHONEWILLE; DE VRIES; BRAND, 2009; THOMPSON et al., 2011). Já os anticorpos de outros sistemas (como Duffy e MNS) foram encontrados em menores percentuais, assim como na maioria dos referidos trabalhos, enquanto anticorpos do sistema Kidd não foram observados, o que confere com apenas três estudos (GADER; AL GHUMLAS; AL-MOMEN, 2008; GUSLSIN et al. 2010; WANG et al., 2006).

Tais resultados, de um modo geral, confirmam a maior imunogenicidade dos antígenos do sistema Rh (CASTILHO, 2007), seguido pelos antígenos do sistema Kell (LEE, 2007; MATTEOCCI et al., 2014), na prática transfusional.

Constatamos em nossos resultados que os pacientes aloimunizados receberam uma mediana maior de transfusões do que os não aloimunizados (Tabela 30); entretanto, a diferença não chegou a ser significativa entre os dois grupos, embora tenha havido uma tendência ($p = 0,081$). Isso difere de um estudo anterior de nosso grupo, envolvendo apenas
5 pacientes com doenças agudas e/ou atendidos em emergências médicas, onde encontramos uma correlação direta entre aloimunização eritrocitária e número de transfusões (ALVES et al., 2012). Em outro trabalho, também de nossa equipe, onde foram incluídos receptores com diagnósticos bastante variados, verificamos que a maioria dos anticorpos foram produzidos precocemente (até a décima transfusão) (MARTINS, P. R. J. et al., 2008).

10 Tais diferenças evidenciam que a aloimunização eritrocitária nem sempre está relacionada a um alto número de transfusões, pois outros diversos fatores devem ser considerados. Dentre eles, podemos citar a imunogenicidade de cada antígeno e a predisposição genética de cada receptor, já que certos indivíduos, ao receberem quantidades mínimas de hemácias estranhas, já produzem aloanticorpos antieritrocitários (bons
15 respondedores); outros, no entanto, não se tornam aloimunizados, mesmo ao serem expostos a eritrócitos estranhos sucessivamente e em alta quantidade (maus respondedores) (NOVARETTI, 2007). Esta teoria é reforçada por um estudo onde foi demonstrado que a aloimunização em diversos pacientes depende muito pouco do número de transfusões recebidas, com forte evidência de um subgrupo de indivíduos com um risco
20 significativamente maior de produzirem aloanticorpos; risco que também é bastante alto em pacientes que já possuem histórico de aloimunização eritrocitária (HIGGINS; SLOAN, 2008).

Sabe-se que, em pacientes com doenças onco-hematológicas, a própria enfermidade e os tratamentos quimioterápicos podem ter um efeito imunossupressor (SCHONEWILLE; DE VRIES; BRAND, 2009). Quanto à anemia falciforme, trabalhos sugerem que a doença, por si
25 só, não está relacionada a um risco maior ou menor de aloimunização, mas que este risco pode ser aumentado pela presença de inflamações (FASANO et al., 2015; HENDRICKSON et al., 2012), como na síndrome torácica aguda e em crises vaso-oclusivas (FASANO et al., 2015).

No presente estudo, verificamos ausência total de aloimunização em 18 pacientes com
30 diferenças genótipo(s)/fenótipo(s) que haviam recebido bolsas de hemácias incompatíveis (nos três meses prévios à coleta). Contudo, devemos ressaltar que, destes 18, 15 (83,33%) receberam transfusões incompatíveis para os sistemas Duffy e/ou Kidd, cujos anticorpos, em vários casos, podem não ser detectados na rotina transfusional, como já destacado, por diversos motivos (CASTILHO, 1996; LOMAS-FRANCIS, 2007; MELO; SANTOS, 1996a).

Observamos que três pacientes apresentaram Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) positiva após a coleta sanguínea e detecção de discrepância genótipo/fenótipo; todos do gênero feminino. A primeira, com mieloma múltiplo e histórico de 23 transfusões de concentrados de hemácias, teve um anticorpo não identificado após 13 dias. Seu genótipo era
5 FY*B/FY*B, fenótipo Fy(a+b+), TAD negativo e recebera uma bolsa com hemácias não fenotipadas ou com fenótipo desconhecido para o sistema Duffy, nos três meses prévios à coleta. Pacientes com este diagnóstico, no entanto, podem apresentar, em decorrência de hipergamaglobulinemia, uma agregação inespecífica de hemácias, o que leva a resultados falso-positivos na pesquisa de anticorpos (ARAVECHIA, 2015 – Comunicação Pessoal).

10 A segunda receptora, com insuficiência renal crônica (IRC), apresentou PAI positiva 21 dias após a coleta, com anticorpo não identificado. Seu genótipo foi FY*B/FY*B, fenótipo Fy(a+b+); TAD positivo e sem transfusões recentes. Neste caso, não podemos descartar a hipótese de autoanticorpos ou outros fatores (TAD positivo) terem influenciado nos resultados da fenotipagem e PAI. Já a terceira, com IRC, genótipo RHCE*cc e fenótipo
15 Rh(C?c+), ao contrário das anteriores, desenvolveu um anticorpo que foi identificado (anti-C - sistema Rh), 30 dias após a coleta, possivelmente em virtude de transfusão de hemácias contendo o antígeno C. Recebera seis bolsas de hemácias compatíveis apenas para os antígenos ABO e RhD, nos três meses prévios à coleta, o que ocorreu devido ao fato de pacientes com este diagnóstico, embora politransfundidos, não serem submetidos
20 rotineiramente à fenotipagem eritrocitária no HRU, recebendo bolsas antígeno negativas para os sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e/ou outros apenas em casos de desenvolvimento e detecção do respectivo aloanticorpo.

Um caso interessante de aloimunização foi constatado em uma paciente com leucemia mieloide crônica, histórico de oito transfusões e sem discrepâncias. Desenvolveu um anti-D
25 (sistema Rh) acrescido de um anticorpo não identificado, dois meses antes da coleta para fenotipagem e genotipagem. A identificação do anti-D chamou atenção, pelo fato de a paciente ter sido genotipada como RHD pos., RHD*Ψ neg. e fenotipada como RhD positiva. Diante de tal achado, acreditamos que a paciente, na verdade, seja portadora do fenótipo RhD parcial, por serem estes indivíduos susceptíveis à aloimunização contra o antígeno D ao
30 receberem hemácias RhD positivas (CASTILHO, 2007; MELO; SANTOS, 1996b). Sua amostra de DNA foi encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos da UNICAMP, em setembro de 2015, para análises moleculares adicionais; no momento, estamos aguardando o resultado destas análises.

7.9 Transfusões de hemácias incompatíveis com os próprios genótipos eritrocitários – considerações importantes

Um problema a ser considerado em relação ao alto número de pacientes que
5 receberam bolsas com fenótipos incompatíveis, desconhecidos ou não pesquisados para
alguns (ou todos) sistemas avaliados é a escassez crônica de sangue no serviço. O
Hemocentro Regional de Uberaba (HRU)/Fundação HEMOMINAS é responsável pela
cobertura transfusional de 27 municípios, envolvendo um total de mais de 700 mil habitantes
(IBGE, 2010b). Embora o índice de doações sanguíneas recomendado pela Organização
10 Mundial da Saúde seja de 3 a 5 doações por 100 habitantes/ano (PAHO – ORGANIZAÇÃO
DE SAÚDE PAN-AMERICANA, 2009), o HRU, com uma média de 14.174 coletas anuais,
possui um índice de apenas 1,84 doações/100 habitantes, semelhante ao observado para todo o
país (1,9) (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014 – dados de 2012).

Tais condições muitas vezes dificultam ou até mesmo inviabilizam a seleção de um
15 doador compatível para diversos sistemas sanguíneos, ainda mais quando o mesmo precisa ser
identificado, convocado, ter seu sangue coletado, processado e liberado para um paciente sem
condições de esperar por dois, três ou mais dias, como os portadores de hemoglobinopatias e
doenças onco-hematológicas em regime de hipertransusão e/ou que requerem transfusões
regulares, obrigando, muitas vezes, a liberação de compatibilidades apenas para o sistema
20 ABO e o antígeno RhD e, em algumas situações de extrema urgência, somente para o sistema
ABO.

Outro aspecto a ser considerado foi o fato de que, em muitos pacientes que receberam
transfusões de fenótipos incompatíveis, não havia evidências clínicas e/ou laboratoriais, em
seus prontuários, que as justificassem. Tal fato reforça a importância da atuação dos Comitês
25 Transfusionais, que poderiam e deveriam agir de forma mais efetiva junto ao médico
assistente de cada paciente na avaliação risco-benefício das prescrições de hemocomponentes,
especialmente na vigência de um fenótipo discrepante, o que poderia resultar em menor risco
de aloimunização.

8. CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, envolvendo genótipos eritrocitários em doadores de sangue e em politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), temos as seguintes conclusões:

1. Diferenças na frequência de diversos genótipos dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd, em comparação a estudos realizados em São Paulo e Paraná, em doadores e politransfundidos, confirmando nossa primeira hipótese, são justificadas pelo diferente perfil étnico de Minas Gerais em relação àqueles estados, reforçando a importância de se pesquisar a frequência destes genótipos em diferentes estados e regiões do país, tanto em doadores quanto em pacientes, para que se possa estimar a disponibilidade de sangue compatível;
2. Ao equipararmos doadores e receptores, diferenças ocorreram na região promotora GATA-1 do sistema Duffy, devido a um maior percentual de negros no grupo de pacientes, o que também pode explicar a maior frequência não apenas da mutação GATA-67c/c, como também do RHD pseudogene (RHD*Ψ) e JK*A/JK*A (sistema Kidd) nos pacientes com anemia falciforme, na comparação com os doadores;
3. Nos doadores, a mutação GATA-67c/c foi mais frequente nos homens do que nas mulheres, apesar da proporção similar de negros estudados em ambos os gêneros, o que pode ser justificado pelo fato da maioria das mulheres referirem ascendência branca;
4. O alto índice de fenótipos incompatíveis aos genótipos eritrocitários nos pacientes recentemente transfundidos confirma a segunda hipótese do presente estudo. Acreditamos que isto possa estar ocorrendo em vários outros hemocentros do país, devido ao uso ainda bastante restrito da genotipagem eritrocitária na rotina transfusional e à pouca eficácia dos Comitês Transfusoriais;
5. O número maior de pacientes com discrepâncias genótipos/fenótipos que apresentaram Teste da Antiglobulina Direta (TAD) positivo reforça a necessidade de sua realização em todos os politransfundidos, a fim de se evitar resultados errôneos na fenotipagem, além da importância da genotipagem como método ideal a ser aplicado nos casos de TAD positivo;

6. A maior frequência de aloanticorpos eritrocitários dos sistemas Rh e Kell está de acordo com a literatura e a ocorrência de aloimunização não foi diretamente relacionada ao número de transfusões recebidas, mas, possivelmente, a outros diversos fatores já conhecidos, como a imunogenicidade de cada antígeno, predisposição genética do paciente à resposta imune a estes antígenos, a própria enfermidade e tratamentos quimioterápicos e ocorrência de inflamação.
5
7. O estudo ressalta a superioridade da genotipagem em relação à fenotipagem como um método mais seguro na correta definição do perfil antigênico eritrocitário de pacientes politransfundidos. Contudo, como algumas limitações podem ser também observadas neste método, a genotipagem e a fenotipagem devem ser utilizadas em complementaridade;
10
8. Em síntese, os resultados encontrados reforçam a necessidade da adoção de medidas locais e de políticas regionais e nacionais, perpassando pelo aumento das doações de sangue no país, a implementação da genotipagem eritrocitária em conjunto com a fenotipagem, especialmente para pacientes aloimunizados e/ou politransfundidos e ainda, uma atuação enérgica e eficaz dos Comitês Transfusionais do país. Tais medidas são fundamentais para reduzir o número de transfusões de hemácias incompatíveis, minimizando os riscos de aloimunização, reação hemolítica pós-transfusional e, em alguns casos, até mesmo de óbito em pacientes que requerem transfusões crônicas e regulares de concentrados de hemácias.
15
20

REFERÊNCIAS

- ALLEN, F. H.; DIAMOND, L. K.; NIEDZIELA, B. A new blood group antigen. **Nature**, v. 167, p. 482, 1951.
- 5 ALVES, V. M.; MARTINS, P. R. J.; SOARES, S.; ARAÚJO, G.; SCHMIDT, L. C.; COSTA, S. S. M.; LANGHI, D. M.; MORAES-SOUZA, H. Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 34, n. 3, p. 206-11, 2012.
- 10 ARAVECHIA, M. A. Problemas na identificação de anticorpos: como resolver (palestra). In: **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO 2015)**. São Paulo, 19 a 22 de Novembro de 2015.
- 15 AVENT, ND. Large-scale blood group genotyping – clinical implications. **British Journal of Haematology**, v. 144, p. 03-13, 2008.
- BABIKER, H. A. M.; ELSAYED, T. Y. Frequency of Alloantibodies Among Chronic Renal Failure Patients in Red Sea State. **Indian J. Hematol. Blood Transfus.**, v. 30, n. 3, p. 187–190, 2014.
- 20 BARNWELL, J. W.; NICHOLS, M. E.; RUBINSTEIN, P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. **J Exp Med**, v. 169, n. 5, p. 1795-802, 1989.
- 25 BIOARRAY SOLUTIONS, 2011. BioArray™ HEA BeadChip. Extended Red Blood Cell Antigen Typing by DNA Analysis. Disponível em: <http://www.immucor.com/en-us/Products/Documents/BioArray_HEA_SalesSheet.pdf>. Acesso em: 15/01/2015.
- BORDIN, J. O.; MOREIRA JÚNIOR, G. Sistemas Kell e Kx. In: **STD: Imuno-hematologia eritrocitária**. Belo Horizonte: IEA Editora/SBHH, 1996. p. 137-43.
- 30 BOTURÃO-NETO, E.; CHIBA, A.; VICARI, P.; FIGUEIREDO, M. S.; BORDIN, J. O. Molecular studies reveal a concordant KEL genotyping between patients with hemoglobinopathies and blood donors in São Paulo city, Brazil. **Haematologica**, v. 93, n. 9, p. 1408-09, 2008.
- 35 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Caderno de Informação – Sangue e Hemoderivados**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_informacao_sangue_hemoderivados_7ed>. Acesso em: 20/07/2015.
- 40 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos**. Portaria nº 2.712, de 12 de Novembro de 2013. Brasília, 2013.
- 45 CARRITT, B.; KEMP, T. J.; POULTER, M. Evolution of the human RH (rhesus) blood group genes: a 50 year old prediction (partially) fulfilled. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 6, p. 843-50, 1997.

- CASTILHO, L. Sistema de grupo sanguíneo Rh. In: BORDIN J. O.; LANGHI JÚNIOR, D. M.; COVAS, D. T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 138-144.
- 5 CASTILHO, L. Sistema Duffy. In: **STD: imunohematologia eritrocitária**. Belo Horizonte: IEA Editora/SBHH, 1996. p. 153-57.
- CASTILHO, L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. **Transfusion** v. 47, p. 28S-31S, 2007.
- 10 CASTILHO, L.; PELLEGRINO JÚNIOR, J. Blood group genotyping. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** p. 26, n. 2, p-135-140, 2004.
- CASTILHO, L.; PELLEGRINO JUNIOR, J.; REID, M. E. **Fundamentos de Imunohematologia**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2015, 232 p.
- 15 CASTILHO, L.; RIOS, M.; BIANCO, C.; PELLEGRINO JÚNIOR, J.; ALBERTO, F. L.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. **Transfusion**, v. 42, p. 232-38, 2002.
- 20 CASTILHO, L.; RIOS, M.; PELLEGRINO JUNIOR, J.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F.; REID, M. E. A novel FY allele in Brazilians. **Vox Sanguinis**, v. 87, p. 190–195, 2004.
- CAVALCANTI, J. M.; MAIO, M. C. Between black and miscigenated population groups: sickle cell anemia and sickle cell trait in Brazil in the 1930s and 1940s. **Hist. cienc. saude-Manguinhos**, v. 18, n. 2, 2011.
- 25 CHAUDHURI, A.; ZBRZEZNA, V.; POLYAKOVA, J.; POGO, A. O.; HESSELGESSE, J.; HORUK, R. Expression of the Dum Antigen in K562 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 7835-38, 1994.
- 30 CHOWN, B.; LEWIS, M.; KAITA, H. The Duffy Blood Group System in Caucasians: Evidence for a New Allele. **American Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 5, p. 384-89, 1965.
- 35 COOMBS, R. R. A.; MOURANT, A. E.; RACE, R. R. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 26, n. 4, p. 255–66, 1945.
- COOMBS, R. R. A.; MOURANT, A. E.; RACE, R. R. In-vivo isosensitisation of red cells in babies with haemolytic disease. **Lancet**, v. 1, p. 264-6, 1946.
- 40 COSTA, S.; MARTIN, F.; CHIBA, A.; LANGHI JUNIOR, D. M.; CHIATTONE, C.; BORDIN, J. RHD alleles and D antigen density among serologically D–C+Brazilian blood donors. **Transfus. Med.**; v. 24. n. 1, p. 60–61, 2014.
- 45 CUTBUSH, M., MOLLISON, P. L; PARKIN, D. M. The Duffy blood group system. **Heredity**, v. 4, p. 383-89, 1950.
- CUTBUSH, M.; MOLLISON, P. L.; PARKIN, D. M. A new human blood group. **Nature**, p. 50 165-88, 1950.

- DANIELS, G. The molecular genetics of blood group polymorphism. **Transplant Immunology**, v. 14, p. 143-153, 2005.
- 5 DANIELS, G. Variants of RhD – current testing and clinical consequences. **British Journal of Haematology**, v. 161, p. 461–70, 2013.
- DATTA, S. S.; MUKHERJEE, S.; TALUKDER, B.; BHATTACHARYA, P.; MUKHERJEE, K. Frequency of Red Cell Alloimmunization and Autoimmunization in Thalassemia Patients: A Report from Eastern India. **Advances in Hematology**, v. 2015, p. 1-6, 2015.
- 10 DECASTELLO, A.; STURLI A.. U ber die isoagglutinine im serum gesunder und kranker menschen. **Munch Med Wochenschr**, v. 49, p. 1900-5, 1902.
- DENOMME, G. A.; FLEGEL, W. A. Applying molecular immunohematology discoveries to standards of practice in blood banks: now is the time. **Transfusion**, v. 48, p. 2461-69, 2008.
- 15 DEZAN, M. R.; OLIVEIRA, V. B.; VIEIRA, J. B.; RODRIGUES, V; SOLANO, J. H.; GOMES, F. C. et al. (no prelo). Effectiveness of a red cell antigen-matching transfusion protocol in Sickle Cell Disease patients.
- 20 EKMAN, G. C.; BILLINGSLY, R.; HESSNER, M. J. Rh genotyping: Avoiding false-negative and false-positive results among individuals of African ancestry. **American Journal of Hematology**, v. 69, n. 1, p. 34–40, 2002.
- 25 FASANO, R. M.; BOOTH, G. S.; MILES, M.; DU, L.; KOYAMA, T.; MEIER, E. R.; LUBAN, N. L. Red blood cell alloimmunization is influenced by recipient inflammatory state at time of transfusion in patients with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 168, n. 2: 291-300, 2015.
- 30 FDA. Fatalities reported to FDA following blood collection and transfusion: Annual Summary for Fiscal Year 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/UCM459461.pdf>>. Acesso em: 13/02/2015.
- 35 FLEGEL, W. A. Blood group genotyping in Germany. **Transfusion**, v. 47, p. 47-53, 2007.
- FLEGEL, W. A. The genetics of the Rhesus blood group system. **Blood Transfusion**, v. 5, p. 50-57, 2007.
- 40 FRANCHINI, M.; LIUMBRUNO, G. M. ABO blood group: old dogma, new perspectives. **Clin. Chem. Lab. Med.** v, 51, n. 8, p. 1545–1553, 2013.
- GADER, A. G. M. A.; AL GHUMLAS, A. K.; AL-MOMEN, A. K. M. Transfusion medicine in a developing country – Alloantibodies to red blood cells in multi-transfused patients in Saudi Arabia. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 39, p. 199–204, 2008.
- 45 GARCÍA GALA, J. M.; VARGAS PABON, M.; RODRÍGUEZ VICENTE, P.; RAMÍREZ PAYER, A.; ROSÓN PORTO, C.; CORTE BUELGA, J. R. Aloimmunización en pacientes politransfundidos. Utilidad de seleccionar hematíes compatibles para antígenos diferentes al ABO y D. **Sangre**, v. 39, n. 6, p. 417-21, 1994.
- 50

GEITVIK, G. A.; HOYHEIM, I. B.; GEDDE-DAHL, T.; GRZESCHIK, K. H.; LOTHE R.; TOMTER, H.; OLAISEN, B. The Kidd (JK) blood group locus assigned to chromosome 18 by close linkage to a DNA-RFLP. **Hum. Genet.**; v. 77, p. 205-209, 1987.

5 GUELSIN, G. A. S.; SELL, A. M.; CASTILHO, L.; MASAKI, V. L.; MELO, F. C.; HASHIMOTO, M. N. et al. Benefits of Blood Group Genotyping in Multi-Transfused Patients from the South of Brazil. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 24, p. 311–316, 2010.

10 GUELSIN, G. A. S.; SELL, A. M.; CASTILHO, L.; MASAKI, V. L.; MELO, F. C.; HASHIMOTO, M. N. et al. Genetic polymorphisms of Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in a population from the State of Paraná, southern Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 33, n. 1, p. 21- 25, 2011.

15 GUO, Z.; WANG, C.; YAN, K.; XIE, J.; SHEN, W.; LI, Q. et al. The mutation spectrum of the JK-null phenotype in the Chinese population. **Transfusion**, v. 53, p. 545-53, 2013.

HEMOMINAS, Fundação. **Procedimento Operacional Sistêmico (POP) - Seleção e liberação de hemocomponentes para pacientes candidatos a transfusões crônicas.**
20 Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Minas Gerais (HEMOMINAS), 2013.

HENDRICKSON, J. E.; HOD, E. A.; PERRY, J. R.; CHAPPA, P.; ADISA, O.; KEAN, L. S. et al. Alloimmunization to transfused HOD RBCs is not increased in mice with sickle cell disease. **Transfusion**, v. 52, n. 2, p. 231–240, 2012.

HIGGINS, J. M.; SLOAN, S. R. Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2546-53, 2008.

30 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Censo Demográfico 2010). Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 23/05/2013.

35 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Censo Demográfico 2010 – População das cidades de Minas Gerais). Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=31&search=minas-gerais>>. Acesso em: 13/07/2015.

40 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Censo Demográfico 2010 - Questionário básico do recenseamento). Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br/images/pdf/censo2010/questionarios/questionario_basico_cd2010.pdf>. Acesso em 23/05/2013.

45 IKIN, E. W.; MOURANT, A. E.; PETTENKOFFER, H. J.; BLUMENTHAL, G. Discovery of the excepted haemagglutinin anti-Fy^b. **Nature**, v. 168, p. 1077, 1951.

INTHARANUT, K.; GRAMS, R.; BEJRACHANDRA, S.; SRIWANITCHRAK, P.; NATHALANG, O. Improved Allele-Specific PCR Technique for Kidd Blood Group Genotyping. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 27, p. 53–58, 2013.

50

IRSHAID, N. M.; EICHER, N. I.; HUSTINX, H.; POOLE, J.; OLSSON, M. L. Novel alleles at the JK blood group locus explain the absence of the erythrocyte urea transporter in European families. **British Journal of Haematology**, v. 116; p. 445-53, 2002.

- 5 ISBT. International Society of Blood Transfusion. Table of group blood antigens. Disponível em: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red%20cells/links%20tables%20in%20introduction%20text/Table%20blood%20group%20antigens%20within%20systems%20v4.0%20141124.pdf. Acesso em: 15/07/2015.
- 10 JENS, E.; PAGLIARINI, T.; NOVARETTI, M. C. Z. Sistema de grupo sanguíneo Duffy: biologia e prática transfusional. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p. 110-19, 2005.
- 15 LANDSTEINER, K. Zur kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden wirkungendes des blutserums und der lympe. **Zentralbl Bakteriol**, v. 27, p. 357-63, 1900.
- LANDSTEINER, K.; LEVINE, P. On the inheritance of agglutinogens of human blood demonstrable by immune agglutinins. **J. Exp. Med.**, v. 48, n. 5, p. 731-49, 1928.
- 20 LANGHI JÚNIOR, D. M.; ALBUQUERQUE, S.; COVAS D. T., et al. Presença do alelo FYAnull, do sistema de grupo sanguíneo Duffy em habitantes de região endêmica para malária e doadores de sangue no Brasil. **Rev. Bras. Hemat. Hemot.**, v. 26, n. 2, p. 268-9, 2004.
- 25 LANGHI JÚNIOR, D. M.; BOTURÃO NETO, E.; CARVALHO, J. C. M. Sistemas de grupos sanguíneos Duffy, Kell e Kidd. In: BORDIN J. O.; LANGHI JÚNIOR, D. M.; COVAS, D. T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 147-59.
- 30 LANGHI JÚNIOR, D. M.; PEREIRA, J. P. M.; PEREIRA, C. M. Reações transfusionais hemolíticas. In: BORDIN J. O.; LANGHI JÚNIOR, D. M.; COVAS, D. T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 438-44.
- LEE, S. Molecular Basis of Kell Blood Group Phenotypes. **Vox Sang**, v. 73, p. 1–11, 1997
- 35 LEE, S. The value of DNA analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems. **Transfusion**, v. 47, p. 32s-39s, 2007.
- 40 LEE-STROKA, H.; SLEZAK, S. L.; ADAMS, S.; MARTIN, J.; ROBBINS, F. U. CARUCCIO, L et al. Another example of a KEL1 variant red cell phenotype due to a threonine to serine change at position 193 of Kell glycoprotein. **Transfusion**, v. 48, p. 925-929, 2008.
- 45 LEVINE, P.; STETSON, R. E. An unusual case of intra-group agglutination. **Am. Med. Assoc.** v. 113; p. 126, 1939.
- LOMAS-FRANCIS, C. The value of DNA analysis for antigens of the Kidd blood group system. **Transfusion**, v. 47, p. 23s-27s, 2007.

LONDERO, D.; FIORINO, M.; MIOTTI, V.; DE ANGELIS, V. Molecular *RH* blood group typing of serologically D-/CE+ donors: the use of a polymerase chain reaction–sequence-specific primer test kit with pooled samples. **Immunohematology**, v. 27, n. 1, p. 25-28, 2011.

5 LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia: propedêutica e clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2006.

LUCIEN, N.; SIDOUX-WALTER, F.; OLIVE`S, B.; MOULDS, J.; LE PENNEC, P. Y.; CARTRON, J. P.; BAILLY, P. L. Characterization of the Gene Encoding the Human Kidd Blood Group/Urea Transporter Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 12973–80, 1998.

MARSH, W. L.; REDMAN, C. M. The Kell blood group system: a review. **Transfusion**, v. 30, p. 158-67, 1990.

15 MARTIN-BLANC, S.; SIMON, P.; GIEN, D.; KAPPLER-GRATIAS, S.; LE PENNEC, P. Y.; PHAM, B. N. Identification of novel silent KEL alleles causing KEL:-5 (Ko) phenotype or discordance between KEL:1,-2 phenotype/KEL*01/02 genotype. **Transfusion**, v. 53, p. 2859-66, 2013.

20 MARTINS, M. L.; CRUZ, K. V. D.; SILVA, M. C. F.; VIEIRA, Z. M. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, n. 4, p. 252-59, 2009.

25 MARTINS, P. R. J.; ALVES, V. M.; PEREIRA, G.; MORAES-SOUZA, H. Frequência de anticorpos antieritrocitários irregulares em politransfundidos no Hemocentro Regional de Uberaba-MG, de 1997 a 2005. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 4, p. 272-76, 2008.

30 MATTEOCCI, A.; MANCUSO, T.; MOSCETTI, A.; COLLARETTI, A; CASTAGNA, K.; SPACCINO, C. et al. Three missense mutations found in the KEL gene lead to Kmod or K0 red blood cell phenotypes. **Transfusion**, v. 54, p. 3216-3221, 2014.

35 MATTEOCCI, A.; PIERELLI, L. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease and in thalassaemia: current status, future perspectives and potential role of molecular typing. **Vox Sanguinis**, v. 106, p. 197-208, 2014.

40 MELO, L. Testes de Compatibilidade Sanguínea. In: BORDIN J. O.; LANGHI JÚNIOR, D. M.; COVAS, D. T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 172-75.

MELO, L.; SANTOS, J. A. Sistema Kidd. In: **STD: imunohematologia eritrocitária**. Belo Horizonte: IEA Editora/SBHH, 1996. p. 162-65.

45 MELO, L.; SANTOS, J. A. Sistema Rh. In: **STD: Imuno-hematologia eritrocitária**. Belo Horizonte: IEA Editora/SBHH, 1996. p. 120-28.

MELO, L.; SANTOS, J. A. Sistemas ABO, Hh e Lewis. In: **STD: Imuno-hematologia eritrocitária**. Belo Horizonte: IEA Editora/SBHH, 1996. p. 90-103.

50

- MENY, G. M. The Duffy blood group system: a review. **Immunohematology**, v. 26, n. 2, p. 51-56, 2010.
- MILLER, L. H.; MASON, S. J.; DVORAK, J. A.; McGINNIS, M. H.; ROTHMAN, I. K.
5 Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. **Science**, v. 189, p. 561-3, 1975.
- MONTALVO, L.; WALKER, P.; WEN, L.; LIM, W.; REED, W.; BUSCH, M. P.; LEE, T. H.
10 Clinical investigation of posttransfusion Kidd blood group typing using a rapid normalized quantitative polymerase chain reaction. **Transfusion**, v. 44, p. 694-702, 2004.
- MONTEIRO, M. A. G.; FERFEBAUM, R.; DINIZ, E. M. A. Aspectos Imunohematológicos, Genéticos e Clínicos da Aloimunização por Anticorpo Anti-c – Relato de dois casos. **Pediatria (São Paulo)**, v. 18, n. 2, p. 95-98, 1996.
15
- MORAES-SOUZA, H.; ALVES, V. M. Impact on patient of the detection of weakly expressed RhD antigens in blood donors. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 37, n. 5, p. 290–291, 2015.
- 20 NARDOZZA, L. M. M; SZULMAN, A.; BARRETO, J. A.; JUNIOR, E. A.; MORON, A. F. Bases moleculares do sistema Rh e suas aplicações em obstetrícia e medicina transfusional. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 6, p. 724-8, 2010.
- NATUKUNDA, B. et al. Red blood cell alloimmunization in sickle cell patients in Uganda.
25 **Transfusion**, v. 50, p. 20-25, 2010.
- NEOTE, K.; MAK, J. Y.; KOLAKOWSKI JR, L. F.; SCHALL, T. J. Functional and Biochemical Analysis of the Cloned Duffy Antigen: Identity With the Red Blood Cell Chemokine Receptor. **Blood**, v. 84, n. 1, p. 44-52, 1994.
30
- NOVARETTI, M. C. Z. Investigação Laboratorial em Pacientes com Anticorpos Eritrocitários. In: BORDIN, J. O.; LANGHI JÚNIOR, D. M.; COVAS, D. T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. p. 186-89.
- 35 NOVARETTI, M. C. Z.; DORLHIAC-LLACER, P. E.; CHAMONE, D. A. F. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasoides e negroides na cidade de São Paulo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 1, p. 23-32, 2000.
- 40 PAHO (Pan American Health Organization - 2009). **Blood from the heart is the safest blood**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1498%3Ablood-from-heart-safest-blood&Itemid=1926&lang=en>. Acesso em: 15/07/2015.
- 45 PELLEGRINO JUNIOR, J.; CASTILHO, L.; RIOS, M.; SOUZA, C. A. Blood Group Genotyping in a Population of Highly Diverse Ancestry. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 15, p. 8–13, 2001.
- PEYRARD, T. Resultados discrepantes entre sorologia e genotipagem em Imunohematologia (palestra). In: **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular** (HEMO 2015). São Paulo, 19 a 22 de Novembro de 2015.
50

- PLAUT, G.; IKIN, E. W.; MOURANT, A. E.; SANGER, R.; RACE R. R. A. New Blood-Group Antibody, Anti-Jk^b. **Nature**, v. 171, p. 431, 1953.
- 5 POOLE, J.; WARKE, N.; HUSTINX, H.; TALEGHANI, B. M.; MARTIN, P.; FINNING, K. et al. A KEL gene encoding serine at position 193 of the Kell glycoprotein results in expression of KEL1 antigen. **Transfusion**, v. 46, p. 1879-85, 2006.
- 10 PORTAL BRASIL (GOVERNO FEDERAL, 2011). 96% sabem fazer a autoclassificação. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/cidadania-e-justica/2011/07/ibge-influencia-da-corou-raca-e-reconhecida-por-63-7-dos-entrevistados>>. Acesso em 23/05/2013.
- REDMAN, C. M.; LEE, S. A historical perspective on the discovery of the Kell blood group carriers. **Transfusion**, v. 53, p. 2831-33, 2013.
- 15 REID, M. E.; RIOS, M.; POWELL, V. I.; CHARLES-PIERRE, D.; MALAVADE, V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. **Transfusion**, v. 40; p. 48-53, 2000.
- 20 RIBEIRO, K. R.; GUARNIERI, M. H.; COSTA D. C.; COSTA, F. F.; PELLEGRINO JR, J.; L. CASTILHO. 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. 97, p. 147-152, 2009.
- 25 RIOS, M.; CASH, K.; STRUPP, A.; UEHLINGER, J.; REID, M. DNA from urine sediment or buccal cells can be used for blood group molecular genotyping. **Immunohematology**, v. 15, n. 2, p. 3-7, 1999.
- 30 ROZMAN, P.; DOVC, T.; GASSNER, C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK and FY blood groups genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. **Transfusion**, v. 40, p. 936-41, 2000.
- RUIZ, L. G. P.; BARACIOLI, L. M. S. V.; FACHINI, R. M.; JUNIO, O. R. Detecção dos anticorpos regulares ABO maternos em recém-nascidos pelo método de tipagem sanguínea reversa estendida até fase de antiglobulina humana. **RBAC**, v. 40, n. 4, p. 301-03, 2008.
- 35 SANDLER, S. G.; FLEGEL, W. A.; WESTHOFF, C. M., DENOMME, G. A.; DELANEY, M. , KELLER, M. A. et al. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype? College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. **Transfusion**, v. 55, n. 3, p. 680-89, 2015.
- 40 SANGER, R.; RACE, R. R.; JACK, J. The Duffy blood groups of New York negroes: the phenotype Fy (a-b-). **Br. J. Haematol.**, v. 1, n. 4, p. 370-74, 1955.
- 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, p. 710-15, 2013.
- 45 SAZAMA, K. Reports of 355 transfusion-associated deaths: 1976 through 1985. **Transfusion**, v. 30, p. 583-90, 1990.

SCHMIDT L. C.; CASTILHO, L.; VIEIRA, O. V.; SIPPERT, E.; GASPARDI, A. C., MARTINS, M. L. et al. Impact of a confirmatory RhD test in the correct serologic typing of blood donors. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 37, n. 5, p. 302–05, 2015.

5 SCHONEWILLE, H.; DE VRIES, R. R. P.; BRAND, A. Alloimmune response after additional red blood cell antigen challenge in immunized hematocology patients. **Transfusion**, v. 49, p. 453-57, 2009.

10 SCHONEWILLE, H.; VAN DE WATERING, L. M.; LOOMANS, D. S.; BRAND, A. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. **Transfusion**, v. 46, p. 250-56, 2006.

15 SERRANO, J. Incidencia y caracterización de anticuerpos eritrocitários en un banco de sangre hospitalario. **Sangre**, v. 35, n. 5, p. 363-68, 1990.

20 SINGLETON, B. K.; GREEN, C. A.; AVENT, N. D.; MARTIN, P. G.; SMART, E.; DAKA, A. et al. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. **Blood**, v. 95, n. 1, p. 12-18, 2000.

25 SOUZA, R. A.; CARLOS, A. M.; SOUZA, B. M.; RODRIGUES, C. V.; PEREIRA, G. A.; MORAES-SOUZA, H. Alpha-Thalassemia: Genotypic Profile Associated with Ethnicity and Hematological Differentiation of Iron Deficiency Anemia in the Region of Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Hemoglobin**, v. 39, n. 4, p. 264-69, 2015.

30 SPRINGER, G. F.. Blood-group and Forssman antigenic determinants shared between microbes and mammalian cells. **Prog Allergy**, v. 15; p. 9-77, 1971.

35 TAD. Teste da Antiglobulina Direta. Disponível em: <<http://www.biomedicinapadiao.com.br/2010/11/teste-de-coombs-direto.html>>. Acesso em: 10/11/2015.

40 TAI. Teste da Antiglobulina Indireta. Disponível em: <<http://www.biomedicinapadiao.com.br/2011/02/teste-de-coombs-indireto.html>>. Acesso em: 10/11/2015.

45 TAX, M. G. H. M.; VAN DER SCHOOT, C. E.; VAN DOORN, R.; DOUGLAS-BERGER, L.; VAN RHENEN, D. J.; MAASKANT-VAN WIJK, P. A. RHC and RHc genotyping in different ethnic groups. **Transfusion**, v. 42, p. 634-44, 2002.

THAKRAL, B.; KARAN, S.; SHARMA, R. R.; MARWAHA, N. Red cell alloimmunization in a transfused patient population: a study from a tertiary care hospital in north India. **Hematology**, v. 13, p. 313-18, 2008.

THOMPSON, A. A.; CUNNINGHAM, M. J.; SINGER, S. T.; NEUFELD, E. J.; VICHINSKY, E.; YAMASHITA, R. et al. Red cell alloimmunization in a diverse population of transfused patients with thalassaemia. **British Journal of Haematology**, v. 153, p. 121–28, 2011.

TOYODA, C.; SUZUKI, Y.; TSUNEYAMA, H.; ONODERA, T.; MASUNO, A.; YABE, R. Production of human monoclonal anti-Jk3, recognizing an epitope including the Jka/Jkb polymorphic site of the Kidd glycoprotein. **Transfusion Medicine**, v. 24, p. 286–91, 2014.

- 5 WAGNER, F. F.; FLEGEL, W. A. *RHD* gene deletion occurred in the *Rhesus box*. **Blood**, v. 95, n. 12, p. 3662-68, 2000.

10 WANG, L. Y.; LIANG, D. C.; LIU, H. C.; CHANG, F. C.; WANG, C. L.; CHAN, Y. S.; LIN, M. Alloimmunization among patients with transfusion-dependent thalassemia in Taiwan. **Transfusion Medicine**, v. 16, p. 200–03, 2006.

15 WEINSTOCK, C.; MÖHLE, R.; DORN, C.; WEISE, K.; HÖCHSMANN, B.; SCHREZENMEIER, H.; KANZ, L. Successful use of eculizumab for treatment of an acute hemolytic reaction after ABO-incompatible red blood cell transfusion. **Transfusion**, v. 55; p. 605–10, 2015.

20 WENDEL NETO, S. Hemoterapia. In: VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia e Hemoterapia**: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. p. 237-53.

WENK, R. E.; CHIAFARI, F. A. DNA typing of recipient blood after massive transfusion. **Transfusion**, v. 37, p. 1108-1110, 1997.

25

30

35

40

APÊNDICE – TABELAS

Tabela 31 – Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM.

Genótipos	Total (n = 287)		Doadores (n = 170)		Pacientes (n = 117)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh							
*DCcee	87	30,31	55	32,35	32	27,35	p = 0,356
Dccee	62	21,60	33	19,41	29	24,79	
DccEe	40	13,94	20	11,76	20	17,09	
DCCee	35	12,20	20	11,76	15	12,82	
**ddccee	32	11,15	24	14,12	8	6,84	
DCcEe	18	6,27	9	5,29	9	7,69	
DccEE	8	2,79	6	3,53	2	1,71	
DCCEe	3	1,05	2	1,18	1	0,85	
**ddCcee	1	0,35	1	0,59	0	0	
ddccEe	1	0,35	0	0	1	0,85	

5 *D – RHD positivo; **dd – RHD negativo.

10 **Tabela 32** – Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 170 doadores do HRU e 63 politransfundidos com anemia falciforme no HRU e/ou HC/UFTM.

Genótipos	Doadores (n = 170)		Pacientes (n = 63)		p
	n	%	n	%	
Sistema Rh					
*DCcee	55	32,35	19	30,16	0,4501
Dccee	33	19,41	22	34,92	
DccEe	20	11,76	11	17,46	
DCCee	20	11,76	4	6,35	
**ddccee	24	14,12	4	6,35	
DCcEe	9	5,29	2	3,17	
DccEE	6	3,53	1	1,59	
DCCEe	2	1,18	0	0,85	
**ddCcee	1	0,59	0	0	
ddccEe	0	0	0	0,85	

*D – RHD positivo; **dd – RHD negativo.

15

20

25

Tabela 33 – Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto ao gênero.

Genótipos	Total (n = 287)		Masculino (n = 140)		Feminino (n = 147)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh							
RHD pos.	253	88,15	124	88,57	129	87,76	p = 0,975
RHD neg.	34	11,85	16	11,43	18	12,24	
*RHD*Ψ pos.	3	1,04	1	0,71	2	1,36	p = 0,966
*RHD*Ψ neg.	284	98,96	139	99,29	145	98,64	
RHCE*CC	38	13,19	20	14,29	18	12,24	p = 0,664
RHCE*Cc	106	36,93	54	38,57	52	35,37	
RHCE*cc	143	49,65	66	47,14	77	52,38	
RHCE*EE	8	2,79	4	2,86	4	2,72	p = 0,555
RHCE*Ee	61	21,25	26	18,57	35	23,81	
RHCE*ee	218	75,96	110	78,57	108	73,47	
Sistema Kell							
KEL*1/KEL*1	0	0	0	0	0	0	p = 0,835
KEL*1/KEL*2	12	4,18	5	3,57	7	4,76	
KEL*2/KEL*2	275	95,82	135	96,43	140	95,24	
Sistema Duffy							
FY*A/FY*A	28	9,76	16	11,43	12	8,16	p = 0,641
FY*A/FY*B	114	39,72	54	38,57	60	40,82	
FY*B/FY*B	145	50,52	70	50,00	75	51,02	
+GATA-67t/t	163	56,79	81	57,86	82	55,78	p = 0,925
§GATA-67t/c	85	29,62	40	28,57	45	30,61	
£GATA-67c/c	39	13,59	19	13,57	20	13,61	
Sistema Kidd							
JK*A/JK*A	110	38,33	54	38,57	56	38,10	p = 0,972
JK*A/JK*B	131	45,64	63	45,00	68	46,26	
JK*B/JK*B	46	16,03	23	16,43	23	15,65	

*RHD Pseudogene; +Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose); £Presença da mutação (em homozigose).

Tabela 34 – Frequências de genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 170 doadores do HRU, quanto ao gênero.

Genótipos	Total (n = 170)		Masculino (n = 85)		Feminino (n = 85)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh							
RHD pos.	145	85,29	74	87,06	71	83,53	p = 0,665
RHD neg.	25	14,71	11	12,94	14	16,47	
*RHD*Ψ pos.	0	0	0	0	0	0	-
*RHD*Ψ neg.	170	100	85	100	85	100	
RHCE*CC	22	12,94	10	11,76	12	14,12	p = 0,847
RHCE*Cc	65	38,24	34	40	31	36,47	
RHCE*cc	83	48,82	41	48,24	42	49,41	
RHCE*EE	6	3,53	3	3,53	3	3,53	
RHCE*Ee	31	18,24	14	16,47	17	20	p = 0,836
RHCE*ee	133	78,24	68	80	65	76,47	
Sistema Kell							
KEL*1/KEL*1	0	0	0	0	0	0	p = 0,6499
KEL*1/KEL*2	5	2,94	2	2,35	3	3,53	
KEL*2/KEL*2	165	97,06	83	97,65	82	96,47	
Sistema Duffy							
FY*A/FY*A	13	7,65	7	8,24	6	7,06	p = 0,956
FY*A/FY*B	75	44,12	37	43,53	38	44,71	
FY*B/FY*B	82	48,24	41	48,24	41	48,24	
+GATA-67t/t	105	61,76	50	58,82	55	64,71	p = 0,034
§GATA-67t/c	52	30,59	24	28,24	28	32,94	
£GATA-67c/c	13	7,65	11	12,94	2	2,35	
Sistema Kidd							
JK*A/JK*A	61	35,88	30	35,29	31	36,47	p = 0,975
JK*A/JK*B	80	47,06	40	47,06	40	47,06	
JK*B/JK*B	29	17,06	15	17,65	14	16,47	

*RHD Pseudogene; +Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose);
£Presença da mutação (em homozigose)

5

10

15

Tabela 35 – Frequências dos genótipos eritrocitários (sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) de 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto ao gênero.

Genótipos	Total (n = 117)		Masculino (n = 55)		Feminino (n = 62)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh							
RHD pos.	108	92,31	50	91,91	58	93,55	p = 0,852
RHD neg.	09	7,69	05	9,09	04	6,45	
*RHD*Ψ pos.	03	2,56	01	1,82	02	3,23	p = 0,916
*RHD*Ψ neg.	114	97,44	54	98,18	60	96,77	
RHCE*CC	16	13,68	10	18,18	06	9,68	p = 0,320
RHCE*Cc	41	35,04	20	36,36	21	33,87	
RHCE*cc	60	51,28	25	45,45	35	56,45	
RHCE*EE	02	1,71	01	1,82	01	1,61	p = 0,672
RHCE*Ee	30	25,64	12	21,82	18	29,03	
RHCE*ee	85	72,65	42	76,36	43	69,35	
Sistema Kell							
KEL*1/KEL*1	00	0,00	00	0,00	00	0,00	p = 0,870
KEL*1/KEL*2	07	5,98	03	5,45	04	6,45	
KEL*2/KEL*2	110	94,02	52	94,55	58	93,55	
Sistema Duffy							
FY*A/FY*A	15	12,82	09	16,36	06	9,68	p = 0,542
FY*A/FY*B	39	33,33	17	30,91	22	35,48	
FY*B/FY*B	63	53,85	29	52,73	34	54,84	
+GATA-67t/t	58	49,57	31	56,36	27	43,55	p = 0,154
§GATA-67t/c	33	28,21	16	29,09	17	27,42	
£GATA-67c/c	26	22,22	08	14,55	18	29,03	
Sistema Kidd							
JK*A/JK*A	49	41,88	24	43,64	25	40,32	p = 0,927
JK*A/JK*B	51	43,59	23	41,82	28	45,16	
JK*B/JK*B	17	14,53	08	14,55	09	14,52	

*RHD Pseudogene; +Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose);
£Presença da mutação (em homozigose).

Tabela 36 – Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 287 indivíduos – 170 doadores e 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto ao gênero.

Genótipos	Total (n = 287)		Masculino (n = 140)		Feminino (n = 147)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh							
*DCcee	88	30,66	45	32,14	43	29,25	p = 0,821
Dcee	62	21,60	31	22,14	31	21,09	
DccEe	40	13,94	15	10,71	25	17,01	
DCCee	35	12,20	19	13,57	16	10,88	
**ddccee	32	11,15	15	10,71	17	11,56	
DCcEe	17	5,92	09	6,43	08	5,44	
DccEE	08	2,79	04	2,86	04	2,72	
DCCEe	03	1,05	01	0,71	02	1,36	
ddccEe	01	0,35	01	0,71	00	0,00	
ddCcee	01	0,35	00	0,00	01	0,68	

*D – RHD positivo; **dd – RHD negativo.

- 5 **Tabela 37** – Frequências de genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 170 doadores do HRU, quanto ao gênero.

Genótipos	Total (n = 170)		Masculino (n = 85)		Feminino (n = 85)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh							
*DCcee	55	32,35	28	32,94	27	31,76	p = 0,676
Dcee	33	19,41	19	22,35	14	16,47	
**ddccee	24	14,12	11	12,94	13	15,29	
DccEe	20	11,76	8	9,41	12	14,12	
DCCee	20	11,76	10	11,76	10	11,76	
DCcEe	9	5,29	6	7,06	3	3,53	
DccEE	6	3,53	3	3,53	3	3,53	
DCCEe	2	1,18	0	0	2	2,35	
ddCcee	1	0,59	0	0	1	1,18	

*D – RHD positivo; **dd – RHD negativo.

Tabela 38 – Frequências dos genótipos eritrocitários (Rh estendido) de 117 politransfundidos no HRU e/ou HC/UFTM, quanto ao gênero.

Genótipos	Total (n = 117)		Masculino (n = 55)		Feminino (n = 62)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sistema Rh							
*DCcee	33	28,21	17	30,91	16	25,81	p = 0,715
Dccee	29	24,79	12	21,82	17	27,42	
DccEe	20	17,09	07	12,73	13	20,97	
DCCee	15	12,82	09	16,36	06	9,68	
**ddccee	08	6,84	04	7,27	04	6,45	
DCcEe	08	6,84	03	5,45	05	8,06	
DccEE	02	1,71	01	1,82	01	1,61	
DCCEe	01	0,85	01	1,82	00	0,00	
ddccEe	01	0,85	01	1,82	00	0,00	
ddCCee	00	0,00	00	0,00	00	0,00	
ddCcee	00	0,00	00	0,00	00	0,00	

*D – RHD positivo; **dd – RHD negativo.

5

10

15

20

Tabela 39 – Comparação das frequências de genótipos eritrocitários (em doadores) encontradas neste estudo com as de outros realizados em São Paulo e Paraná.

Genótipos	Presente estudo (n = 170)		*São Paulo (n = 948)		p	**Paraná (n = 400)		p
	n	%	n	%		n	%	
Sistema Rh								
RHD pos.	145	85,29	N.P		-	345	86,25	p = 0,866
RHD neg.	25	14,71				55	13,75	
RHD*Ψ pos.	0	0	N.P		-	4	1	p = 0,447
RHD*Ψ neg.	170	100				396	99	
RHCE*CC	22	12,94	161	17	p = 0,001	70	17,5	p = 0,109
RHCE*Cc	65	38,24	465	49		171	42,75	
RHCE*cc	83	48,82	322	34		159	39,75	
RHCE*EE	6	3,53	19	2	p = 0,057	9	2,25	p = 0,120
RHCE*Ee	31	18,24	246	26		103	25,75	
RHCE*ee	133	78,24	683	72		288	72	
Sistema Kell								
KEL*1/KEL*1	0	0	0	0	p = 0,341	1	0,25	p = 0,439
KEL*1/KEL*2	5	2,94	47	5		20	5	
KEL*2/KEL*2	165	97,06	901	95		379	94,75	
Sistema Duffy								
FY*A/FY*A	13	7,65	144	12	p = 0,013	50	12,5	p = 0,079
FY*A/FY*B	75	44,12	455	48		192	48	
FY*B/FY*B	82	48,24	379	40		158	39,50	
+GATA-67t/t	105	61,76	654	69	p = 0,177	312	78	p < 0,001
§GATA-67t/c	52	30,59	237	25		78	19,5	
£GATA-67c/c	13	7,65	57	6		10	2,5	
Sistema Kidd								
JK*A/JK*A	61	35,88	265	28	p = 0,108	109	27,25	p = 0,046
JK*A/JK*B	80	47,06	493	52		192	48	
JK*B/JK*B	29	17,06	190	20		99	24,75	

*Ribeiro et al. (2009); **Guelsin et al. (2011).

+Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose); £Presença da mutação (em homozigose); N.P. – Não pesquisado.

5

10

15

Tabela 40 – Comparação das frequências de genótipos eritrocitários (em doadores) encontradas neste estudo com as de outros realizados em São Paulo.

Genótipos	Presente estudo (n = 170)		*São Paulo (n = 250)		p	**São Paulo (n = 205)		p
	n	%	n	%		n	%	
Sistema Rh								
RHD pos.	145	85,29	207	82,80	p = 0,585	N.P.		-
RHD neg.	25	14,71	43	17,20				
RHD*Ψ pos.	0	0			-	N.P.		-
RHD*Ψ neg.	170	100	N.P.					
RHCE*CC	22	12,94			-	N.P.		-
RHCE*Cc	65	38,24	N.P.					
RHCE*cc	83	48,82			-	N.P.		-
RHCE*EE	6	3,53						
RHCE*Ee	31	18,24	N.P.					
RHCE*ee	133	78,24						
Sistema Kell								
KEL*1/KEL*1	0	0	0	0	p = 0,020	0	0	p = 0,1967
KEL*1/KEL*2	5	2,94	23	9,20		13	6,3	
KEL*2/KEL*2	165	97,06	227	90,80		192	93,7	
Sistema Duffy								
FY*A/FY*A	13	7,65	34	13,60	p = 0,134	N.P.		-
FY*A/FY*B	75	44,12	96	38,40				
FY*B/FY*B	82	48,24	120	48				
+GATA-67t/t	105	61,76	184	73,60	p < 0,001	N.P.		-
§GATA-67t/c	52	30,59	31	12,40				
£GATA-67c/c	13	7,65	35	14				
Sistema Kidd								
JK*A/JK*A	61	35,88	54	21,60	p = 0,001	N.P.		-
JK*A/JK*B	80	47,06	161	64,40				
JK*B/JK*B	29	17,06	35	14				

* Pellegrino Junior et al. (2001); **Boturão-Neto et al. (2008).

+Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose); £Presença da mutação (em homozigose); N.P. – Não pesquisado.

5

10

15

20

Tabela 41 – Comparação das frequências de genótipos eritrocitários (em politransfundidos) encontradas neste estudo com as de outros realizados em São Paulo e Paraná.

Genótipos	Presente estudo (n = 117)		*São Paulo (n = 144)		p	**Paraná (n = 79)		p
	n	%	n	%		n	%	
Sistema Rh								
RHD pos.	108	92,31				69	87,34	p = 0,365
RHD neg.	09	7,69		N.P	-	10	12,76	
*RHD*Ψ pos.	3	2,56				0	0	p = 0,400
*RHD*Ψ neg.	114	97,44		N.P.	-	79	100	
RHCE*CC	16	13,68	23	16		14	17,72	
RHCE*Cc	41	35,04	66	46	p = 0,102	32	40,51	p = 0,410
RHCE*cc	60	51,28	55	38		33	41,77	
RHCE*EE	2	1,71	6	4		02	2,53	
RHCE*Ee	30	25,64	36	25	p = 0,519	26	32,91	p = 0,479
RHCE*ee	85	72,65	102	71		51	64,56	
Sistema Kell								
KEL*1/KEL*1	0	0	0	0		0	0	
KEL*1/KEL*2	7	5,98	7	5	p = 0,901	7	8,86	p = 0,628
KEL*2/KEL*2	110	94,02	137	95		72	91,14	
Sistema Duffy								
FY*A/FY*A	15	12,82	13	9		13	16,46	
FY*A/FY*B	39	33,33	62	43	p = 0,236	33	41,77	p = 0,252
FY*B/FY*B	63	53,85	69	48		33	41,77	
+GATA-67t/t	58	49,57	84	58		55	69,62	
§GATA-67t/c	33	28,20	40	28	p = 0,177	19	24,05	p = 0,004
£GATA-67c/c	26	22,22	20	14		5	6,33	
Sistema Kidd								
JK*A/JK*A	49	41,88	48	33		22	27,85	
JK*A/JK*B	51	43,59	69	48	p = 0,331	41	51,90	p = 0,124
JK*B/JK*B	17	14,53	27	19		16	20,25	

*Ribeiro et al. (2009); **Guelsin et al. (2010).

+Ausência da mutação; §Presença da mutação (em heterozigose); £Presença da mutação (em homozigose); N.P. – Não pesquisado.

5

Tabela 42 – Comparação das frequências de genótipos eritrocitários (sistema Kell - em politransfundidos) encontradas neste estudo com as de outro realizado em São Paulo.

Genótipos	Presente estudo (n = 117)		*São Paulo (n = 108)		p
	N	%	N	%	
Sistema Kell					
KEL*1/KEL*1	0	0	0	0	
KEL*1/KEL*2	7	5,98	7	6,5	p = 0,9025
KEL*2/KEL*2	110	94,02	101	93,5	

*Boturão-Neto et al. (2008).

10

15

Tabela 43 - Comparação das frequências de genótipos (Rh estendido – em doadores) encontradas neste estudo com as de fenótipos de outro realizado em São Paulo.

Genótipos	Presente estudo (n = 170)		*São Paulo (n = 2.462)		p
	n	%	n	%	
Sistema Rh					
DCcee	55	32,35	828	33,63	p = 0,064
Dcee	33	19,41	545	22,14	
DccEe	20	11,76	332	13,48	
DCCee	20	11,76	249	10,11	
ddccee	24	14,12	173	7,03	
DCcEe	9	5,29	237	9,63	
DccEE	6	3,53	54	2,19	
DCCEe	2	1,18	9	0,37	
ddccEe	0	0	5	0,20	
ddCcee	1	0,59	20	0,81	
ddCcEe	0	0	1	0,04	
DCcEE	0	0	6	0,24	
DCCEE	0	0	3	0,12	

*Novaretti et al. (2000).

5

10

15

20

25

30

APÊNDICE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação HEMOMINAS Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

5

Título do Projeto: “Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba-MG/Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da UFTM”

10

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você, doador (a) de sangue, está sendo convidado (a) a participar do estudo intitulado “*Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba-MG/Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da UFTM*”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo do estudo é conhecer as características genéticas (herdadas dos pais para os filhos) que estão nas células do sangue de cada indivíduo, para que se possa identificar o sangue mais compatível (adequado) a cada paciente, diminuindo o risco de complicações transfusionais e evitando que as células doadas em transfusões de sangue sejam destruídas pelo organismo do receptor, por serem diferentes. Caso você concorde em participar, serão coletados 10 ml de seu sangue. Você poderá ter algum desconforto apenas quando receber uma picada da agulha em seu braço. Em caso de necessidade, novas coletas poderão ser feitas no Hemocentro Regional de Uberaba, nas datas das próximas doações sanguíneas ou diretamente em sua residência, não trazendo nenhum gasto adicional a você.

15

20

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

30

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Título do Projeto: “Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba-MG/Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da UFTM”

Eu _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento no hemocentro. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do mesmo.

Uberaba,/...../.....

15

Assinatura do voluntário

Documento de Identidade

20

Assinatura do pesquisador responsável

25

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores:

Vítor Mendonça Alves – (34) 9995-3629

30 Paulo Roberto Juliano Martins - (34) 3312-5077

Helio Moraes de Souza - (34) 3312-5077

Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM - (34) 3318-5854

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas – (31) 3248-4587



Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação HEMOMINAS
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

5

Título do Projeto: “Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba-MG/Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da UFTM”

TERMO DE ESCLARECIMENTO

10

Você tem um tipo de doença denominada _____ e está sendo convidado (a) a participar do estudo intitulado “*Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba-MG/Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da UFTM*”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo do estudo é conhecer as características genéticas (herdadas dos pais para os filhos) que estão nas células do sangue de cada indivíduo, para que se possa identificar o sangue mais compatível (adequado) a cada paciente, diminuindo o risco de complicações transfusionais e evitando que as células doadas em transfusões de sangue sejam destruídas pelo organismo do receptor, por serem diferentes. Caso você concorde em participar, serão coletados 10 ml de seu sangue. Você poderá ter algum desconforto apenas quando receber uma picada da agulha em seu braço. Em caso de necessidade, novas coletas poderão ser feitas no Hemocentro Regional de Uberaba ou Hospital de Clínicas da UFTM ou diretamente em sua residência, não trazendo nenhum gasto adicional a você.

25

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número. Além disso, dados epidemiológicos deverão ser levantados de seus prontuários médicos.

30

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO.

Título do Projeto: “Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em
 5 politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba-MG/Fundação Hemominas e
 Hospital de Clínicas da UFTM”

Eu _____, li
 e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a
 que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu
 entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar
 10 minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado,
 que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em
 participar do mesmo.

Uberaba,/...../.....

15

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de Identidade

20

Assinatura do pesquisador responsável

25

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores:

Vítor Mendonça Alves – (34) 9995-3629

30 Paulo Roberto Juliano Martins - (34) 3312-5077

Helio Moraes de Souza - (34) 3312-5077

Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM - (34) 3318-5854

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas – (31) 3248-4587



**Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação HEMOMINAS
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)**

**5 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
10 PARA PARTICIPAÇÃO DE MENORES EM PROJETOS DE PESQUISA**


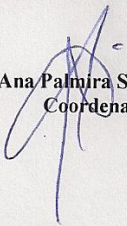
Título do Projeto: “Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em politransfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba-MG/Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da UFTM”

TERMO DE ESCLARECIMENTO

O menor sob sua responsabilidade tem um tipo de doença denominada _____ e está sendo convidado a participar do estudo intitulado “*Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em receptores de concentrados de hemácias portadores de hemopatias transfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba-MG/Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da UFTM*”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a participação do menor é importante. O objetivo do estudo é conhecer as características genéticas (herdadas dos pais para os filhos) que estão nas células do sangue de cada indivíduo, para que se possa identificar o sangue mais compatível (adequado) a cada paciente, diminuindo o risco de complicações transfusionais e evitando que as células doadas em transfusões de sangue sejam destruídas pelo organismo do receptor, por serem diferentes. Caso você permita a participação do menor sob sua responsabilidade, serão coletados 10 ml de seu sangue. O menor poderá ter algum desconforto apenas quando receber uma picada da agulha em seu braço. Em caso de necessidade, novas coletas poderão ser feitas no Hemocentro Regional de Uberaba ou Hospital de Clínicas da UFTM, nas datas de novas transfusões sanguíneas ou diretamente em sua residência, não trazendo nenhum gasto adicional a você.

Você e o menor sob sua responsabilidade poderão obter todas as informações que quiserem; o menor poderá ou não participar da pesquisa e o consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela participação do menor no estudo, você nem o menor receberão qualquer valor em dinheiro, mas haverá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. O nome do menor não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois ele será identificado por um número ou por uma letra ou outro código. Além disso, dados constantes deverão ser levantados de seus prontuários médicos.

**ANEXO – PARECER DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO (UFTM)**

4/4
 <p align="center">MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG) COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP Parecer Consubstanciado PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS</p>
IDENTIFICAÇÃO
<p>TÍTULO DO PROJETO: Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em receptores portadores de hemopatias transfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba-MG/Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da UFTM</p> <p>PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Helio Moraes de Souza</p> <p>INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM</p> <p>DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 16/11/2011</p> <p>PROTOCOLO CEP/UFTM: 2226</p>
<p>Material de consumo – itens: Tubos para coleta de sangue com EDTA – R\$ 429,00 Microtubos tipo Eppendorf (1,5 ml) – R\$ 285,00 Microtubos para PCR (0,2 ml) – R\$ 420,00 Ponteiras – R\$ 1.800,00 Luvas (Tamanhos P, M e G – Caixas com 100 luvas – 10 unidades) – R\$ 300,00</p> <p>Material de escritório: Papel para impressão, cartuchos de tinta para impressoras, cadernos e outros – R\$ 550,00 Fenotipagem eritrocitária (antissoros): R\$ 21.540,00 Total: R\$ 49.744,00</p> <p>Fonte de Recursos: FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais)</p> <p>12. FORMA E VALOR DA REMUNERAÇÃO DO PESQUISADOR O pesquisador responsável é professor titular da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, remunerado pela UFTM.</p> <p>13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE OBTÊ-LO O Termo será obtido e está adequado.</p> <p>14. ESTRUTURA DO PROTOCOLO – O protocolo foi adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.</p> <p>15. COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES</p>
<p>PARECER DO CEP: APROVADO (O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início do processo). DATA DA REUNIÃO: 09/03/2012</p>
<p>Prof.^a Ana Palmira Soares dos Santos Coordenadora</p> 
<hr/> <p>Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar, Sala H – Abadia 38025-180 - Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854 E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br</p>

**ANEXO – PARECER DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
DA FUNDAÇÃO CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO ESTADO
DE MINAS GERAIS (HEMOMINAS)**



Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas

CARTA DE ANUÊNCIA 02/341

1. Projeto de Pesquisa: "Estudo de genótipo eritrocitário em doadores de sangue e em receptores de concentrados de hemácias portadores de hemopatias transfundidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba /Fundação Hemominas e Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)"	
SUJEITOS DA PESQUISA	
2. Número de sujeitos No Centro: 250 Total: 250	3. Grupos Especiais: (X) Menor de 18 anos; () Portador de deficiência mental () Embrião/feto; () Relação de dependência (militares, presidiários...) () Outros; () Não se aplica
PESQUISADOR RESPONSÁVEL	
4. Nome: Helio Moraes de Souza	
5. Instituição a que pertence: Universidade Federal do Triângulo Mineiro	
INSTITUIÇÃO (OES) ONDE SERÁ REALIZADO	
6. Nome: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Fundação Hemominas	
7. Unidade/Órgão: Hemocentro Regional de Uberaba	
8. Participação Estrangeira: Sim () Não (X)	
9. Projeto Multicêntrico: Sim () Não (X) Nacional () Internacional ()	
PATROCINADOR Não se aplica ()	
10. Nome: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP	
11. Data de Entrada: 23/03/12	12. Registro no CEP: 341
13. Objetivos: O projeto tem como objetivo geral pesquisar e determinar a frequência dos genótipos eritrocitários dos sistemas de maior importância clínica, após o ABO (sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS), em doadores e pacientes portadores de hemoglobinopatias (doença falciforme e talassemias) e doenças oncohematológicas (leucemia mielóide aguda e síndrome mielodisplásica), receptores de transfusões crônicas de concentrados de hemácias pelo Hemocentro Regional de Uberaba (HRU)/Fundação Hemominas e/ou Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC/UFTM). Objetivos específicos: 1) Determinar as frequências dos genótipos eritrocitários na região de Uberaba dentro de diferentes categorias epidemiológicas (gênero e cor da pele), em doadores de sangue e receptores portadores de hemopatias; 2) Pesquisar o fenótipo eritrocitário na população de doadores e em cada paciente; 3) Verificar, em cada paciente, o histórico transfusional, a ocorrência ou não de transfusões de concentrados de hemácias nos três meses anteriores e o número de transfusões. Caso tenham sido transfundidos nesse período, realizar a fenotipagem eritrocitária e compará-la ao seu respectivo genótipo; 4) Em pacientes com diferenças entre genótipo e fenótipo eritrocitário, verificar o fenótipo das bolsas transfundidas nesses indivíduos. 5) Observar, nos pacientes pesquisados, a presença ou não de aloanticorpos anti-eritrocitários de importância clínica.	
14. Sumário do Projeto: O projeto propõe pesquisar e determinar a frequência dos genótipos eritrocitários dos sistemas de maior importância clínica, após o ABO (sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS), em doadores e pacientes portadores de hemoglobinopatias (doença falciforme e talassemias) e doenças oncohematológicas (leucemia mielóide aguda e síndrome mielodisplásica), receptores de transfusões crônicas de concentrados de hemácias.	
15. Comentário dos Relatores: O projeto de pesquisa é relevante por contribuir para melhor compreensão da distribuição dos genótipos eritrocitários na região do Triângulo Mineiro. Tendo os pesquisadores respondido todos os questionamentos do CEP, consideramos o projeto de pesquisa APROVADO no âmbito da Fundação Hemominas.	



Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas

16. Parecer:		
Aprovado (X)	Pendência ()	Não Aprovado ()
Data: 03/05/12	Data:	Data:
17. Cronograma de execução:		
Início: Maio/2012	Fim: Dezembro/2015	
19. Coordenador	 Assinatura	

HM-T.GDT-26

ANEXO – RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

300 Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2014

foi realizado no período analisado, com duração média de 117 minutos. Intercorrência durante a leucáfese ocorreu em 7/115 doadores (6%), sendo parestesia leve a moderada a manifestação mais frequente, resolvida com administração oral de cálcio. O produto coletado continha mediana de 5×10^{10} granulócitos/bolsa (0,21 a 7,75). Todos os doadores evoluíram com normalização do leucograma cerca de uma semana após a doação. A transfusão de granulócitos foi realizada em 25 pacientes com idade mediana de 37 anos (2 a 79), com neutropenia grave associada a quadro infeccioso grave não responsivo a antibioticoterapia, após pré-medicação com anti-térmico e anti-histamínico. Reação transfusional ocorreu em 2/25 pacientes, sendo um caso de reação febril não hemolítica e outro de sintomas pulmonares moderados. **Conclusão:** A coleta e transfusão de granulócitos é uma estratégia adjuvante no tratamento de pacientes com neutropenia febril grave que ainda requer uma logística trabalhosa para obtenção do produto com dose adequada para cada paciente.

856. MORTE CARDÍACA NA TALASSEMIA DEPENDENTE DE TRANSFUSÃO: DIFERENÇAS CONFORME O GÊNERO

Leal CT^a, Pinto ACS^a, Angulo IL^a, Trad HS^b, Favarin MDC^a, Covas DT^a

^a Hemocentro de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

Introdução: O uso regular de transfusões de eritrócitos e o uso de quelantes do ferro prolongaram a sobrevida de pacientes portadores da forma grave de beta talassemia. A mortalidade cardíaca permanece porém como a mais comum, agora acometendo os pacientes na terceira década da vida, para aqueles que nasceram após 1970, conforme o estudo de Borgna-Pignatti *et al.* O fato de que a mortalidade afeta mais o sexo masculino aparece nitidamente após os 20 anos de idade ($p = 0,0003$), com deslocamento nítido na curva de Kaplan-Meier nesse estudo italiano de 2004. O acúmulo de ferro transfusional, responsável pela patologia cardíaca, é maior no sexo masculino, mas o ferro cardíaco pode não o ser, evocando outras causas para a mortalidade e excluindo a má aderência ao tratamento quelante. **Métodos e resultados:** Numa coorte de 45 pacientes com beta talassemia dependente de transfusão acompanhados durante 15 anos no Centro Regional de Hematologia e Hemoterapia de Ribeirão Preto, nascidos após 1970 e com acesso a quelantes, ocorreram três óbitos por causa cardíaca, todos masculinos, excluídos da análise. As características dos gêneros dos sobreviventes masculinos (23 pacientes) e femininos (19 pacientes) foram, em média/desvio-padrão (dp) para idade, 21,6 anos/11 e 26,6 anos/13,7, respectivamente. O ferro cardíaco, medido por ressonância magnética (RMN) pela técnica do T2*, revelou média 24,3 ms/12,9 contra 24,1 ms/12,6 (normal > 20 ms). A concentração miocárdica de ferro medida em mg/grama foi de 1,6/1,7 contra 2,5/3,6 (normal < 1,16 mg/g), respectivamente, assim como a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEV%) medida pela RMN foi de 64,6/7,9 contra 68,7/5,6, respectivamente. Ferro hepático mg/grama de tecido, pela mesma técnica, foi de 10,1/6,4 contra 11,5/8,1. Os dados T2* e CHF apresentaram distribuição normal e a comparação entre os gêneros não revelou diferença estatística ($p = 0,86$ T2* e $p = 0,42$ CHF - F test). **Discussão:** o acúmulo de ferro cardíaco e hepático é semelhante entre os gêneros. Assim, a mortalidade maior no masculino deverá ser melhor explicada por outros elementos que não somente a hemossiderose cardíaca ou o ferro total do organismo. Influências além da aderência aos quelantes, tais como hormonais, genéticas, epigenéticas e outras, exigem estudos mais aprofundados para se encontrar elementos que influenciem, medidas de prevenção e aumento da sobrevida.

857. TITULAÇÃO EM TUBO DE ANTI-D POLICLONAL HUMANO COM HAPLÓTIPOS R2R2, R1R1 E R0R

Chinoca JP, Pagliarini T, Araújo RAB, Almeida-Neto C, Carvalho MB, Mendonça MC, Ghaname FS, Ganame A, Ghaname JN

Serviço de Hemoterapia, Hospital 9 de Julho, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: Titulação é um método semiquantitativo que estima a concentração dos anticorpos séricos. O resultado da titulação é importante na rotina das clínicas obstétricas, sendo empregado em casos de doença hemolítica do recém-nascido por incompatibilidade RhD materno-fetal, e fornece, juntamente com o resultado do Doppler, parâmetros para proce-

dimientos invasivos. A escolha da metodologia usada na titulação (tubo ou gel) e a seleção das hemácias são fatores críticos na condução do tratamento. A metodologia adotada pode variar em distintas instituições, fomentando muita discussão. **Objetivo:** Comparar os resultados de titulação utilizando soro policlonal anti-D contra diferentes os fenótipos R1R1, R2R2 e R0R. **Metodologia:** Utilizado método de titulação seriada em tubo-teste, preparando uma bateria de tubos em duplicata e adicionando 100µL de soro no primeiro e segundo tubo. A partir do segundo, adição de 100µL de solução fisiológica 0,9%. Após homogeneização, dez vezes, transferência de 100µL para o próximo tubo. Adicionamos 50µL de hemácias comerciais Immucor® (2-4%) com os fenótipos R1R1, R2R2, R0R e, após umahora de incubação a 37°C, lavamos três vezes em equipamento automático de lavagem de hemácias Helmer Ultra-CW®. Após esse ciclo, adicionamos 100µL de soro antiglobulina mono específico. A leitura foi realizada de acordo com o manual técnico da AABB. Utilizamos 15 hemácias R2R2 (com possíveis genótipos DcE/DcE, DcE/dcE), 32 hemácias R1R1 (com possíveis genótipos DcE/DcE, DcE/dcE) e 12 hemácias R0R (com possíveis genótipos Dce/Dce, Dce/dce). Todos os testes foram realizados em duplicata e por apenas um técnico. **Resultados:** Foram observados os seguintes resultados: com 15 hemácias R2R2 (uma amostra com título 08; três amostras com título 16; dez amostras com título 32 e uma amostra com título 64); com 32 hemácias R1R1 (oito amostras com título 04, 11 amostras com título 08, nove amostras com título 16, quatro amostras com título 32); com 12 hemácias R0R (sete amostras com título 16, três amostras com título 32 e duas amostras com título 64). **Discussão:** O resultado da titulação de anticorpos irregulares é importante na rotina em obstetria, porém, é uma metodologia que apresenta limitações por ser uma técnica semiquantitativa. Ainda hoje se discute a correlação entre resultados de titulação em tubo e gel-teste e artigos publicados mostram divergência de resultados, ainda sem consenso técnico. O manual de técnicas da AABB sugere a utilização de hemácias R2R2 na titulação de anti-D pelo fato de expressarem mais sítios da proteína RhD, e também sugere a investigação do fenótipo paterno para se inferir o fenótipo fetal. Sorologicamente não é possível determinar a zigosidade do antígeno RhD da hemácia utilizada na titulação, dificultando a manutenção do padrão analítico do exame. **Conclusão:** Os resultados encontrados apresentam divergências, variando entre quatro e cinco títulos. Neste trabalho optamos pela realização do teste pelo mesmo técnico, com o intuito de diminuir a subjetividade da interpretação das aglutinações. Concluímos que essa variação pode ser atribuída aos diferentes genótipos e possíveis diferenças na expressão individual do antígeno RhD. Nossos resultados foram concordes com orientação técnica da AABB, e encontramos títulos mais altos do anti-D (exceto em um caso) quando testados com hemácias (R2R2), que provavelmente apresentam maior expressão do antígeno RhD.

ANTÍGENOS DAS CÉLULAS DO SANGUE

858. ESTUDO DE GENÓTIPO ERITROCITÁRIO EM DOADORES DE SANGUE E RECEPTORES DE CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS PORTADORES DE HEMOPATIAS EM UBERABA (MG)

Alves VM^a, Garcia FB^a, Martins PR^b, Pereira GA^a, Castilho L^b, Souza HM^a

^a Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTRM), Uberaba, MG, Brasil

^b Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Introdução: Os antígenos eritrocitários são estruturas na membrana das hemácias com aproximadamente 300 já organizados em 30 sistemas sanguíneos e podendo levar à formação de aloanticorpos em transfusões e gestações, com risco de reação transfusional hemolítica tardia — segunda causa mais comum de óbito relacionado à transfusão, segundo o FDA. A fenotipagem eritrocitária, embora importante, possui limitações, superadas pela genotipagem que, entretanto, ainda não é rotineira na maioria dos hemocentros do país. A presença dos antígenos eritrocitários varia nas diferentes etnias e estudos sobre suas frequências são mais numerosos em São Paulo, porém escassos em Minas Gerais, que possui um perfil étnico populacional diferente, segundo o IBGE. **Objetivos:** Investigar a frequência de genótipos eritrocitários em doadores de sangue e receptores crônicos de concentrados de hemácias pelo Hemocentro Regional de Uberaba (HRU)/Hemominas, comparar a frequência entre doadores e re-

ceptores, pesquisar a concordância entre genótipo e fenótipo e o histórico de aloimunização eritrocitária nos pacientes. **Metodologia:** Amostras sanguíneas foram coletadas em EDTA e as hemácias fenotipadas para os antígenos C, c, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a e Jk^b (BioRad®). Em todos os pacientes também foi feito o teste de Coombs direto (C.D.; BioRad®). O DNA foi extraído dos leucócitos (Qiagen®), quantificado e submetido a PCR (AS, Multiplex e RFLP) para os alelos RHD, RHD*^ψ (Pseudogene), RHCE*^{CcEe}, KEL*1/KEL*2, FY*A/FY*B (exceto mutação GATA-33T>C - em fase de padronização) e JK*A/JK*B, com os produtos submetidos a eletroforese em gel de agarose (diferentes concentrações) e visualizados em luz UV (coloração: brometo de etídio). Análise estatística por software (Portal Action; nível de significância: 95%). Histórico de aloimunização e fenótipo das bolsas recebidas em caso de transfusão recente levantados nos arquivos do Serviço de Prova Cruzada do HRU. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM; 2226) e Fundação Hemominas (341). **Resultados:** Até o momento, foram avaliados 83 indivíduos (47 doadores e 36 pacientes — 31 com anemia falciforme e três previamente aloimunizados contra os antígenos C, E, K). Os genótipos mais frequentes foram: RHD*^{pos} (90,36%), RHD*^ψ (100%), RHCE*^{cc} (57,83%), RHCE*^{ee} (75,9%), KEL*2/KEL*2 (97,6%), FY*A/FY*B (55,42%) e JK*A/JK*A (44,58%). Não foram observadas diferenças significativas entre doadores e receptores. Genótipo e fenótipo diferiram em cinco doadores (sistemas Duffy e Kidd), enquanto 16 receptores (dois deles com C.D. positivo) apresentaram fenótipo diferente do genótipo nos sistemas Rh, Duffy e Kidd e/ou fenótipos C, c, E, Jk^a e Jk^b inconclusivos. Dentre tais pacientes, oito receberam hemácias diferentes do próprio genótipo nos três meses anteriores à coleta das amostras. **Conclusões:** Diferenças no sistema Duffy em quatro doadores e nove receptores exigem pesquisa de mutação GATA-33T>C e um doador requer sequenciamento do gene Kidd e/ou pesquisa de antígeno Jk^b com outros antígenos. Os resultados da fenotipagem em vários receptores reforçam as suas limitações e a necessidade da implantação da genotipagem eritrocitária em todos os pacientes que requerem transfusões crônicas de hemácias, aumentando a segurança transfusional.

859. FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTIERITROCITÁRIOS IRREGULARES IDENTIFICADOS NAS GESTANTES ATENDIDAS PELO LABORATÓRIO DE IMUNO-HEMATOLOGIA DE PACIENTES DA FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE BRASÍLIA, NO PERÍODO DE 2010 A 2012

Vieira AR, Triers APV, Dalapicolla CC, Silva DC, Leite LE

Fundação Hemocentro de Brasília (FHB-DF), Brasília, DF, Brasil

A detecção de anticorpos anti-eritrocitários irregulares em gestantes alocensibilizadas por transfusão ou na própria gestação, quando fetos apresentam antígenos eritrocitários de origem paterna, é um procedimento muito eficaz na prevenção da doença hemolítica perinatal - DHPN. Esta é uma complicação por incompatibilidade sanguínea materno-fetal onde ocorre a destruição das hemácias fetais por anticorpos maternos. A DHPN pode causar a morte do bebê ou, em casos onde não há morte, lesões no sistema nervoso central. O diagnóstico na prevenção da DHPN é feito por exames imuno-hematológicos: tipagem sanguínea ABO/RhD, teste da antiglobulina direta (TAD) e pesquisa de anticorpos anti-eritrocitários irregulares (PAI). **Objetivo:** Verificar a frequência de anticorpos anti-eritrocitários identificados em gestantes atendidas pelo Laboratório de Imuno-Hematologia de Pacientes da Fundação Hemocentro de Brasília (FHB-DF). **Casística e métodos:** Estudo retrospectivo avaliando os exames imuno-hematológicos realizados nas gestantes atendidas pelo Laboratório de Imuno-Hematologia de Pacientes da FHB, que compreende 11 hospitais regionais públicos do DF e o Hospital Universitário de Brasília (HUB), entre os anos de 2010 e 2012. **Resultados:** Foram encontradas 238 amostras de gestantes com PAI positiva e verificaram-se as seguintes especificidades: 70 anti-D (59%), 12 anti-E (10%), 14 anti-C (12%), três anti-c (2%), quatro anti-Le^a (3%), duas anti-K (1,5%), duas anti-M (1,5%), uma anti-S (1%), uma anti-Di^a (1%), uma anti-P, (1%), uma anti-Jk^a (1%), uma anti-Jk^b (1%) e sete (6%) não tiveram especificidade definida. **Conclusão:** A detecção de anticorpos anti-eritrocitários irregulares e a prevenção da DHPN devem ser tratadas com prioridade no acompanhamento de todas as gestantes. Para tanto, considera-se necessária a discussão do mecanismo imunológico desta patologia e a implantação de protocolos de atendimento confiáveis, que ajudem a prever a possibilidade da instalação da doença. Dessa forma, propostas de melhorias tecnológicas na área laboratorial com implantação de metodologias mais sensíveis ou

de melhor qualidade na detecção de anticorpos são de extrema importância, assim como estudos na área para promoção do conhecimento do perfil fenotípico e a realização da PAI a todas as gestantes.

860. ASSOCIAÇÃO DA INCOMPATIBILIDADE PLAQUETÁRIA A PERDAS FETAIS RECORRENTES

Martinelli BM^a, Vieira BD^a, Castro MLRB^a, Couto EC^b, Castro V^a

^a Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (INCT Sangue), Centro de Hematologia e Hemoterapia de Campinas (HEMOCENTRO Campinas), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Perdas fetais recorrentes ou abortos recorrentes (AR) acontecem em aproximadamente 1-3% dos casais que desejam ter um filho. As principais causas conhecidas para AR incluem anomalias cromossômicas, trombofilia materna, desordens anatômicas, endócrinas e imunológicas. Porém, em cerca de 50% dos casos, as causas não podem ser definidas. Recentemente, um grupo do Canadá descreveu, em um modelo animal, que anticorpos maternos dirigidos contra a glicoproteína Ib-IX plaquetária, a qual expressa os polimorfismos HPA-2 e HPA-12, podem ter um importante papel em abortamentos. No entanto, essa associação ainda não foi avaliada em humanos. Estes dados levantam a questão de um possível envolvimento de incompatibilidade HPA como fator de risco para AR. **Métodos:** No presente estudo prospectivo, foram analisados dois grupos: umde casais apresentando AR e outro de casais com gestações sem complicações (grupo controle - GC previamente estabelecido). Foi realizada a genotipagem HPA-1, -2, -3 e -5 utilizando PCR-SSP ou PCR-RFLP das pacientes e seus respectivos parceiros. As frequências dos genótipos e das incompatibilidades HPAs foram comparadas entre os grupos utilizando o programa StatCalc (Epi Info 7TM CDC). **Resultados:** Um total de 50 casais no grupo AR e 100 casais no grupo controle foram analisados. Foi possível detectar incompatibilidade HPA para qualquer dos sistemas em 62% dos pacientes do grupo AR e em 48% do GC, mas essa diferença não foi significativa. Quando o número de incompatibilidades dos sistemas HPA envolvidos foi analisado, pacientes do grupo AR apresentando incompatibilidade para dois ou mais sistemas apresentaram uma frequência significativamente maior do que no GC (28% e 8%, respectivamente, $p = 0,0037$, $\chi^2 = 8,11$; OR=4,79, var: 1,73-13,22). No entanto, a frequência de incompatibilidade para apenas um sistema HPA não apresentou diferença entre os grupos (34% e 40% respectivamente). A análise dos sistemas HPA envolvidos nas incompatibilidades demonstrou uma frequência maior de incompatibilidade HPA-3 e HPA-5 no grupo AR comparado com o GC (42% vs 23%, $p = 0,02$, $\chi^2 = 4,92$; OR= 2,42 var: 1,17-5,02 e 20% vs 6%, $p = 0,012$, $\chi^2 = 5,46$; OR = 3,91 var: 1,33-11,50, respectivamente) com nenhuma diferença significativa para o HPA-1 (22% vs 13%, respectivamente) e HPA-2 (14% em ambos os grupos). **Conclusão:** Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que múltiplas incompatibilidades assim como incompatibilidades dos sistemas HPA-3 e -5 podem representar fator de risco para a ocorrência de AR. Futuros estudos envolvendo outras populações, maior número de casos, assim como avaliação sorológica plaquetária podem ser interessantes para maior compreensão do papel da incompatibilidade HPA nas perdas fetais de repetição, bem como possíveis terapêuticas específicas para os casos de AR apresentando essa incompatibilidade. **Financiamento:** Estudo concedido pela FAPESP n° 2013/15816-6 (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

861. PERFIL DE ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA DAS PESSOAS COM TALASSEMIA BETA EM REGIME DE TRANSFUSÃO REGULAR ATENDIDAS PELO HEMOCENTRO CAMPINAS

Pereira FB^a, Veríssimo MPA^b, Cabral SB^b, Azevedo PR^a, Gilli S^a, Luzo ACM^a

^a Centro de Hematologia e Hemoterapia de Campinas (HEMOCENTRO Campinas), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brasil

A talassemia beta é uma anemia de origem genética causada pela diminuição da cadeia Beta da globina. No Brasil, estima-se que haja cerca de 550 pessoas com talassemia beta com necessidade de transfusão regular.

830. RHD VARIANTS IN BLOOD DONORS FROM SOUTHEASTERN BRAZIL

Gaspardi AC, Sippert EA, Botelho M, Macedo MD, Jr JP, Castilho L

Centro de Hematologia e Hemoterapia (HEMOCENTRO), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Background: RhD discrepancies between current and historical results are frequent in the D typing routine, due to the presence of D variants. The molecular background of D-variant phenotypes shows substantial ethnic variability. The population of Southeastern Brazil is considered to be a mixture of Europeans, Amerindians, and Africans. The aim of this study was to characterize the molecular background on samples with discrepancies in the RhD typing in blood donors from Southeastern Brazil. **Methods:** 94 blood samples were selected for this study. The Rh status was determined by hemagglutination using specific monoclonal antibodies. The D antigen was evaluated with an IgM anti-D and a blended anti-D. When an immediate spin-negative result was observed with the latter antiserum, the samples were tested using the indirect antiglobulin test with an IgG anti-D. DNA samples were studied by RHD exon scanning, PCR-SSP, PCR-RFLP, microarray, and sequencing. **Results:** Among the 97 DNA samples investigated, 53 were characterized as weak D and 44 as partial D. Fifteen known different alleles and one novel allele were responsible for the 97 D variant samples studied. The samples characterized as weak D included: four (4.1%) weak D type 1, 17 (17.5%) weak D type 2, six (6.2%) weak D type 3, 13 (13.4%) weak D type 4, one (1%) weak D type 5, nine (9.3%) weak D type 38, two weak D type 18 (2.1%). The samples genotyped as partial D included: 17 (17.5%) DAR, 16 (16.5%) DiVa type 2, four (4.1%) DVI type 2, two (2.1%) DAU-4, two (2.1%) DAU-0, one (1%) DBT, one (1%) DIIIc, and one (1%) DFR. **Conclusions:** Weak D types 4 and 38 showed to be more prevalent than weak D types 1 and 3 in this population. Interestingly, one rare allele (RHD*weak D type 18) was found in two samples with a very weak expression of D. The allelic variability found in this region of Southeast Brazil could be explained by the contribution of the European and African ethnicity to the genetic pool of the population. Understanding the RHD allele repertoire in the analyzed population will help to develop reliable strategies in blood banks and prenatal RHD genotyping.

831. CAUSES OF DISCREPANCY BETWEEN RED BLOOD CELL GENOTYPES AND PHENOTYPES IN CHRONIC RECIPIENTS OF PACKED RED BLOOD CELLS AND STRATEGIES TO INCREASE BLOOD TRANSFUSION SAFETY

Alves VM^a, Olivo RA^{a,b}, Garcia FB^a, Martins PR^{a,b}, Moraes-Souza H^{a,b}

^a Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brazil

^b Hemocentro Regional de Uberaba, Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS), Uberaba, MG, Brazil

Introduction and objectives: The wide range of red blood cell antigens may lead to alloimmunization, post-transfusion hemolytic reactions, and death in chronic recipients of packed red blood cells (RBC). Given these facts, this study aimed to investigate the RBC genotypes of the Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in these individuals; investigate RBC phenotypes (in comparison with the genotypes); analyze the number of transfusions (total and within three months prior to sample collection); investigate the phenotype of recently transfused blood and the presence of alloantibodies; and propose strategies to increase transfusion safety of these patients. **Methods:** Blood samples of 34 individuals (29 with sickle cell disease, three with β -thalassemia major, one with aplastic anemia, and one with RBC aplasia) who are chronic RBC transfusion recipients at the Regional Hemotherapy Center of Uberaba (HRU)/HEMOMINAS Foundation and/or at the Clinical Hospital of the Federal University of Triângulo Mineiro (HC/UFTM) were collected in EDTA tubes, upon their consent or the consent of their parents, caregivers, or legal guardians. The red blood cells were subjected to phenotyping for Rh, Kell, Duffy, and Kidd blood group antigens and to direct antiglobulin test. Then, the DNA was extracted from leukocytes and analyzed by polymerase chain reaction (PCR-AS, Multiplex, and RFLP) for detection and amplification of alleles of these systems. Clinical and epidemiological data were collected from patient records. The results were stored in a database and compared statistically, by Mann-Whitney, Fisher's exact, or chi-squared tests. All tests were performed with a significance level of 5%. This study was approved by the Research Ethics Committee of UFTM (No. 2226) and by the HEMOMINAS Foundation (No. 341). **Results:** Of the 34 patients, 64.7% were female and the median age

was 18 (2-61). Seven (19.44%) had a history of alloimmunization against different RBC antigens from Rh, Kell, Duffy, and Lutheran systems. Eight recipients (23.53%) showed discrepancies between RBC genotype(s) and phenotype(s), and received more transfusions than those without discrepancies (total and within three months prior to sample collection; $p = 0.004$ and $p < 0.001$, respectively); 75% of the transfusions had phenotype(s) discrepant with the genotypes, 66.67% of which were found to be urgent transfusion requests. Upon evaluation of the phenotypes of the RBC units transfused to these patients within three months prior to sample collection, all of them were found to have received RBC units with phenotypes incompatible with their own RBC genotypes, or units with unknown Duffy and/or Kidd phenotypes or that had not been phenotyped for these systems. **Conclusion:** the high rate of discrepancies is closely related to low blood supply, especially of phenotyped blood, and to the large number of emergency transfusions. Actions are required to increase blood donations in Brazil, to implement expanded phenotyping and genotyping, and to call for an energetic and effective participation of the transfusion committees. **Funding:** Foundation for Research Support from Minas Gerais State (FAPEMIG - Process number: APQ-02318-12) and Program of Restructuring and Expansion of Federal Universities (REUNI).

832. ANÁLISE MOLECULAR DO GENE GYPB DOS DOADORES DE SANGUE COM FENÓTIPO S-S-

Oliveira VB, Dezan MR, Gallucci AJO, Bonifácio SL, Medeiros VR, Junior AM, Dinardo CL

Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: O sistema MNS apresenta dois genes, GYPA e GYPB, localizados extremamente próximos no cromossomo 4 (4q28.2-q31.1) com mais de 90% de homologia. Eles codificam as glicoproteínas de membrana eritrocitária, glicoforina A (GPA) e glicoforina B (GPB), respectivamente. A perda de expressão da proteína glicoforina B por deleção total ou parcial do gene GYPB é responsável pelo fenótipo S-s-U-. O fenótipo S-s-U+^{var} está relacionado com a perda de expressão do antígeno S e expressão enfraquecida do antígeno U nos eritrócitos, devido a uma substituição (G>T) no intron 5 que leva à perda do éxon 5 (P2), ou a alterações no sítio de splice (208 G>T e 230 C>T) que levam à perda de parte do éxon 5 (NY) do gene GYPB. Unidades de hemácias U+^{var} podem ser fenotipadas como U-, comprometendo a segurança transfusional, visto que podem levar pacientes com o fenótipo U- a produzirem aloanticorpos anti-U, associados a reações hemolíticas graves e à doença hemolítica do feto e recém-nascido. A busca por hemácias de fenótipo U- é um desafio, devido à alta frequência do antígeno U na população. **Objetivo:** Avaliar corretamente o antígeno U por genotipagem eritrocitária dos doadores fenotipados como S-s- da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. **Método:** Foram selecionadas 16 amostras de doadores de sangue fenotipadas como S-s- pela técnica de hemaglutinação em coluna (gel Liss/Coombs) utilizando anticorpos policlonais (anti-S e anti-s). As técnicas de AS/PCR e ensaio combinado AS/PCR-RFLP foram empregadas para identificar a deleção do gene GYPB, os alelos GYPB**S*, GYPB**s* e as variantes GYPB (P2) e GYPB (NY). **Resultados:** Foi possível verificar a deleção do gene GYPB em oito amostras (50%). Foi observada presença do alelo U+^{var} em outras oito amostras (50%), todas devido à substituição de nucleotídeos e à perda do éxon 5 do gene GYPB, levando ao alelo variante P2. Não detectamos a ocorrência de nenhum genótipo U+^{var} devido a alterações no sítio de splice que leva à perda de parte do éxon 5, ou seja, variante NY. **Conclusão:** A caracterização molecular do gene GYPB é uma etapa fundamental na classificação do fenótipo U-, visto que permite a exclusão do fenótipo U+^{var}, garantindo maior segurança na prática transfusional.

833. ANÁLISE DO GENE RHD EM DOADORES DE SANGUE DA FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE/HEMOCENTRO DE SÃO PAULO COM FENÓTIPOS R'R, R''R E R'R''

Pessoa ER^a, Dezan MR^a, Gallucci AJO^a, Marsiglia JD^b, Pereira AC^b, Oliveira VB^a, Junior AM^a, Dinardo CL^a

^a Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^b Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Instituto do Coração (INCOR), São Paulo, SP, Brasil

Introdução: Para a determinação da tipagem RhD em doadores e receptores de sangue, são utilizados soros monoclonais anti-D, muitas vezes inca-

