



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS PRINCIPAIS SISTEMAS DE  
GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITÁRIOS EM DOADORES DE SANGUE DO  
ESTADO DO AMAZONAS

**MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA**

Orientador: Dr. SERGIO ROBERTO LOPES ALBUQUERQUE  
Coorientador: Dr. JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO

MANAUS – AM  
2022

MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA

INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS PRINCIPAIS SISTEMAS DE  
GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITÁRIOS EM DOADORES DE SANGUE DO  
ESTADO DO AMAZONAS

Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Amazonas  
requisito final para obtenção do título de Doutor  
em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Dr. SERGIO ROBERTO LOPES  
ALBUQUERQUE

Coorientador: Dr. JOSÉ PEREIRA DE MOURA  
NETO

MANAUS – AM  
2022

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729i Souza, Mylner Oliveira Fermiano de  
Investigação da frequência alélica dos principais sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários em doadores de sangue do Estado do Amazonas / Mylner Oliveira Fermiano de Souza . 2022  
93 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Sérgio Roberto Lopes Albuquerque  
Coorientador: José Pereira de Moura Neto  
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Genotipagem. 2. Genótipos variantes. 3. Antígenos eritrocitários. 4. Polimorfismo. I. Albuquerque, Sérgio Roberto Lopes. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha  
família e aos irmãos de alma.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal que tive ao ingressar na pós-graduação a nível de Doutorado. Sem ele, os momentos difíceis não seriam amenizados e a paz de espírito necessária para lidar com as intercorrências e situações adversas, estaria ausente.

Ao Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá – HEMOAP, pelo incentivo à minha qualificação como servidor público através da liberação por meio de licença aperfeiçoamento quando as disciplinas eram presenciais, antes da pandemia de COVID-19.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pelo apoio na realização do presente trabalho.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) pelo acolhimento na obtenção dos dados e realização das genotipagens finais onde pude vivenciar, em prática, a metodologia utilizada neste estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. SERGIO ROBERTO LOPES ALBUQUERQUE que é como um amigo, que confiou no meu potencial para encarar essa missão científica de produzir este trabalho e me ensinar como enxergar a Imunohematologia que é uma área que eu me apaixono cada vez mais.

À minha mãe, que sempre me incentivou desde quando criança, a procurar pelos estudos e foi minha referência de ética e dedicação na área da saúde.

Ao meu esposo, que sempre me apoiou e se orgulha de mim pela minha história de vida e que compreendeu as ausências necessárias para dedicação a este estudo. Seu acolhimento deixaram os medos mais leves.

Aos meus amigos e amigas que sempre enchem a minha autoestima, descrevendo inúmeros adjetivos positivos sobre meu jeito profissional de ser.

## RESUMO

A identificação dos antígenos eritrocitários é necessária na prática transfusional. As limitações das técnicas sorológicas para fenotipagem foram ultrapassadas com uso da genotipagem para identificação de alelos variantes nos genes correspondentes à expressão dos antígenos eritrocitários. Visando o aumento da segurança transfusional dos pacientes, o Ministério da Saúde estruturou o serviço de genotipagem eritrocitária em diferentes regiões do Brasil para fomentar o cadastro nacional de sangues raros. Os objetivos deste estudo foram descrever a frequência alélica dos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton e Sciana; detectar genótipos raros entre os doadores de sangue do Estado do Amazonas; e identificar as frequências genóticas que caracterizem os doadores atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). Foram analisadas as frequências alélicas e genóticas para os sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton e Sciana pelo método MicroArray, o qual detecta 24 polimorfismos (SNPs) associados a 38 antígenos eritrocitários e variantes fenóticas em um único teste de PCR Multiplex, por meio de sondas em chips. Para genotipagem *RHCE* foi observada uma frequência de 0,103 à possíveis fenótipos VS+V+ e 0,009 à VS+V- e que podem estar relacionados à antígenos parciais “c” parcial e “e” parcial. Foram encontrados os genótipos raros para os genótipos *DI\*01/DI\*01* (0,002), genótipos de baixa frequência populacional e importante relevância transfusional, *KEL\*06/KEL\*06* (0,001), *LU\*01/LU\*01* (0,001) e para *SC\*02/ SC\*02* (0,002). As frequências genóticas *RHCE\*C/C* (0,296), *RHCE\*C/c* (0,248), *RHCE\*E/E* (0,086), *FY\*A/FY\*A* (0,299), *JK\*B/JK\*B* (0,295) e *DI\*01/DI\*02* (0,096) foram diferentes das genotipagens realizadas em outros Estados do Brasil, sendo caracterizadas como um diferencial em relação à frequência genotípica de indivíduos na região Amazônica.

Palavras-chave: Genotipagem; Genótipos variantes; Antígenos eritrocitários; Polimorfismo

## ABSTRACT

The identification of erythrocyte antigens is necessary in transfusion practice. The limitations of serological techniques for phenotyping have been overcome with the use of genotyping to identify variant alleles in genes corresponding to expression of erythrocyte antigens. Aiming at increasing transfusion safety of patients, the Ministry of Health has structured the erythrocyte genotyping service in different regions of Brazil to foster the national registry of rare bloods. The objectives of this study were to describe the allelic frequency of the Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton, and Sciana systems; to detect rare genotypes among blood donors in the State of Amazonas; and to identify the genotype frequencies that characterize the donors seen at the Amazonas Hospital Foundation for Hematology and Hemotherapy (HEMOAM). The allelic and genotypic frequencies for Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton and Sciana systems were analyzed by the MicroArray method, which detects 24 polymorphisms (SNPs) associated with 38 erythrocyte antigens and phenotypic variants in a single Multiplex PCR test, by means of on-chip probes. For RHCE genotyping a frequency of 0.103 was observed for possible VS+V+ and 0.009 for VS+V- phenotypes and that may be related to partial "c" and partial "e" antigens. Rare genotypes were found for *DI\*01/DI\*01* (0.002), genotypes of low population frequency and important transfusion relevance, *KEL\*06/KEL\*06* (0.001), *LU\*01/LU\*01* (0.001) and for *SC\*02/SC\*02* (0.002). The genotype frequencies *RHCE\*C/C* (0.296), *RHCE\*C/c* (0.248), *RHCE\*E/E* (0.086), *FY\*A/FY\*A* (0.299), *JK\*B/JK\*B* (0.295) and *DI\*01/DI\*02* (0.096) were different from genotyping performed in other states of Brazil and are characterized as a differential in relation to the genotype frequency of individuals in the Amazon region.

Keywords: Genotyping; Variant genotypes; Erythrocyte antigens; Polymorphism

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Modelo de membrana: inserção dos antígenos de grupos sanguíneos carboidratos; proteínas de passagem única tipos I e II; proteínas de passagens múltiplas e glicoproteínas ancoradas à membrana através da molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI).....19
- Figura 2. Organização dos genes *RHD* e *RHCE*.....26
- Figura 3. Modelo dos polipeptídeos RhD e RhCE na membrana mostrando as regiões codificadas pelos 10 éxons.....26
- Figura 4. Modelo da glicoproteína Kell, com os domínios altamente conservados em verde e os domínios variáveis na porção distal em azul. A região de *linker* é o sítio de ligação ao domínio transmembrana. ....27
- Figura 5. Representação da glicoproteína Kidd mostrando os domínios que abrangem a membrana, terminais N- e C- citoplasmáticos, um único N - glicano no terceiro loop extracelular em Asn211 e posição do polimorfismo Jka/Jkb no quarto alça extracelular. ....28
- Figura 6. Representação diagramática da Glicoforina A (GPA) e Glicoforina B (GPB), e sua disposição na membrana eritrocitária, demonstrando a posição dos polimorfismos de M/N na posição 1 e 5 da GPA e dos polimorfismos na posição 29 de S/s da GPB. ....30
- Figura 7. Representação da proteína Colton com os seis domínios que atravessam a membrana com o N- e C- terminal dentro da membrana celular. O polimorfismo Coa/Cob é indicado na posição 45 (A=Alanina. V=Valina), assim como o sítio de glicosilação em N42.....34
- Figura 8. Modelo para a topografia do domínio de membrana da glicoproteína de banda 3. No modelo convencional (acima) a proteína atravessa a membrana 14 vezes e tem domínios citoplasmáticos N- e C- terminais. Posições do aminoácido são mostradas as substituições.....35
- Figura 9. Relação dos principais fenótipos eritrocitários raros cadastrados no CNSR. ....37
- Figura 10. Distribuição dos fenótipos raros de grupos sanguíneos cadastrados no CNSR – Brasil. ....38
- Figura 11. Fases de Amplificação, Leitura e Interpretação das Imagens no sistema HEA BeadChip™ .....46
- Figura 12. Microscópio de fluorescência acoplado a um leitor de código de barras e a um computador. Cada lâmina contendo os chips de DNA possui um código de barras que a identifica e fornece ao sistema os dados referentes à localização dos beads na lâmina.....47



- Figura 13. Hibridização e emissão de fluorescência. A fluorescência, representada através de um ponto claro, decorrente da hibridização do DNA alvo com a sonda pré-existente no BeadChip™. Em (b) não houve hibridização entre o DNA alvo e a sonda e desta forma, não se visualiza a emissão da fluorescência. ....48
- Figura 14. Representação da organização dos dados de genotipagens eritrocitárias em planilhas eletrônicas para análise do estudo. ....49

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1, Nomes dos sistemas e características genéticas e antigênicas dos Sistemas de grupos sanguíneos. ....	21
Tabela 2. Marcadores genéticos para os antígenos de glóbulos vermelhos no teste PreciseType HEA. ....	44
Tabela 3. Frequência Alélica das genotipagens eritrocitárias para o gene RHCE baseado no SNP 307C>T(P103S) no éxon 2, na presença ou ausência da inserção 109 bp no íntron 2, nos SNPs 733C>G (L245V) no éxon 5, 1006G>T (G336C) no éxon 7 e 733C>G (L245V) no éxon 5. n = 803. ..	53
Tabela 4. . Frequência Genotípica para o gene <i>RHCE</i> com análise nos SNPs 307C>T(P103S) no éxon 2, na presença ou ausência da inserção 109 bp no íntron 2, nos SNPs 733C>G (L245V) no éxon 5, 1006G>T (G336C) no éxon 7 e 733C>G (L245V) no éxon 5, assim como sua subsequente predição fenotípica para antígeno RHCE (n = 803). ....	54
Tabela 5. Frequência Genotípica para o gene <i>RHCE</i> e predição fenotípica para antígeno RHCE (n = 803).....	55
Tabela 6. Frequência Genotípica para o genótipo <i>KEL</i> e predição fenotípica para antígeno KEL (n = 803). ....	58
Tabela 7. Frequência Genotípica para o genótipo <i>FY</i> e predição fenotípica para antígeno FY (n = 803). ....	60
Tabela 8. Frequência genotípica para o genótipo <i>JK</i> e predição fenotípica para antígeno Jk (n = 803). ....	63
Tabela 9. Frequência Genotípica para o genótipo <i>GYP A/GYP B</i> e predição fenotípica para antígenos do Sistema MNS KEL (n = 803). ....	64
Tabela 10. Frequência genotípica para os genótipos <i>LU</i> , <i>DI</i> , <i>CO</i> e <i>DO</i> e predição fenotípica para os antígenos Lu, Di, Co, Do, Hy e Jo (n = 803). ....	65
Tabela 11. Frequência genotípica para os genótipos <i>LW</i> e <i>SC</i> e predição fenotípica para os antígenos LW e Sc (n = 803).....	68
Quadro 1. Frequências genotípicas para os sistemas de grupos sanguíneos RH, FY, K, JK, GPA/B e DI de doadores de sangue do Estado do Amazonas comparados à genotipagens realizadas em outros Estados. ....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIS	<i>BioArray Array Imaging System</i>
BASIS	<i>BioArray Solutions Information System</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comitê Nacional de Ética e Pesquisa
DHPN	Doença Hemolítica Perinatal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
FAPEAM	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HEMOSC	Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
HEMORIO	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR- <i>multiplex</i>	Reação em Cadeia da Polimerase <i>multiplex</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>

TAD+	Teste de Antiglobulina Direta positivo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFAM	Universidade Federal do Amazonas

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	19
2.1.	SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITÁRIOS	19
2.2.	SISTEMA Rh	25
2.3.	SISTEMA KELL	27
2.4.	SISTEMA KIDD	28
2.5.	SISTEMA MNS	29
2.6.	SISTEMA LUTHERAN	31
2.7.	SISTEMA DOMBROCK	32
2.8.	SISTEMA LANDSTEINER-WIENER	33
2.9.	SISTEMA COLTON	33
2.10.	SISTEMA SCIANA	34
2.11.	SISTEMA DIEGO	35
2.12.	FENÓTIPOS RAROS NO BRASIL	36
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	39
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	41
4.1.	OBJETIVO GERAL	41
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>5.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	42
5.1.	TIPO DE ESTUDO	42
5.2.	POPULAÇÃO DE ESTUDO	42
5.3.	LOCAL DO ESTUDO	42
5.4.	CÁLCULO DA AMOSTRA	43
5.5.	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	43
5.6.	GENOTIPAGEM DE SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS	43
5.6.1.	Fase Pré-PCR	45
5.6.2.	Amplificação, Leitura e Interpretação dos Dados	45
5.7.	CRIAÇÃO DO BANCO DE DADOS	49
5.8.	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	49
5.9.	ASPECTOS ÉTICOS	50
5.10.	ANÁLISE DOS DADOS	51
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	52

6.1.	SISTEMA RH (gene <i>RHCE</i> ) .....	53
6.2.	SISTEMA KELL .....	58
6.3.	SISTEMA DUFFY .....	60
6.4.	SISTEMA KIDD .....	62
6.5.	SISTEMA MNS .....	63
6.6.	SISTEMAS LUTHERAN, DIEGO, COLTON e DOMBROCK .....	65
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>73</b>
	REFERÊNCIAS .....	75
	ANEXOS .....	81

## 1. INTRODUÇÃO

Os eritrócitos possuem uma camada dupla de fosfolípidos na qual estão presentes proteínas, glicoproteínas e glicolípidos, distribuídos na parte externa, interna e transmembranar, nas quais existem sequências de aminoácidos que compõem os antígenos de sistemas de grupos sanguíneos (GASPARDI, 2016).

Os antígenos eritrocitários são resultados de expressões de sequências gênicas e têm como característica apresentar sequências específicas de aminoácidos que constituem uma proteína, podendo estar associadas a carboidratos ou a lipídios da membrana eritrocitária. Tanto os antígenos eritrocitários como os plaquetários, em sua maioria, são bialélicos, constituídos por pares antitéticos, diferindo-se de seu par antitético por um polimorfismo de único nucleotídeo *missense*, termo que provém do inglês *single-nucleotide polymorphism* (SNP), e que pode variar em diferentes populações (MENEGATI, 2019).

O primeiro sistema de grupo sanguíneo a ser descrito foi o sistema ABO (ISBT01), em 1900, por Karl Landsteiner e colaboradores. O sistema Rh foi descoberto em 1939 por Levine e Stetson, devido um caso de Doença Hemolítica Perinatal (DHPN), sendo o mais complexo dos sistemas eritrocitários e o segundo mais importante na medicina transfusional, depois do sistema ABO (DANIELS, 2013).

Atualmente há 360 antígenos eritrocitários distribuídos em 45 sistemas de grupos sanguíneos. Dentre estes, os mais importantes clinicamente são os sistemas ABO e Rh (ISBT04) devido à alta antigenicidade que os carboidratos das glicoproteínas ABO e à alta imunogenicidade da proteína Rh possuem no sistema imune e o risco elevado de reações hemolíticas em transfusões sanguíneas (GASSNER *et al.*, 2022).

O sistema ABO é o único sistema de grupo sanguíneo que tem como característica a produção de anticorpos regulares dirigidos aos antígenos ABO não presentes no fenótipo do indivíduo. Isso é devido à uma reação cruzada de reconhecimento de açúcares presentes em bactérias da microbiota intestinal e que estimulam a produção de anticorpos que têm reação cruzada com a glicoproteínas ABO (DANIELS, 2013).

Os critérios para registrar um sistema de grupo sanguíneo incluem a característica genética associada ao controle de um único gene ou por genes homólogos contíguos, apresentando diferentes antígenos dentro de um sistema que são produtos por formas variantes de um gene. Todos os antígenos de grupos sanguíneos devem ser definidos sorologicamente por um anticorpo formado por aloimunização, decorrente da ausência deste antígeno (GASSNER, 2022).

Entre os 45 sistemas de grupos sanguíneos descritos até o momento, os com maior importância clínica são os sistemas Rh, KEL, Kidd, Duffy e MNS, devido a sua imunogenicidade proveniente pela sua composição bioquímica, visto que antígenos constituídos por polipeptídeos, possuem maior importância clínica em relação a antígenos como glicoforinas ou lipoproteínas (OSMAN, 2017).

A identificação dos antígenos eritrocitários é necessária na prática transfusional, pois o desenvolvimento de aloanticorpos após exposição à antígenos eritrocitários não-próprios, através de transfusões sanguíneas, gestações e transplantes de órgãos/tecidos ou enxertos, pode se tornar um grande problema clínico, principalmente nos casos de pacientes que precisam realizar transfusões rotineiras, como os pacientes com hemoglobinopatias como anemia falciforme, talassemias ou pacientes oncológicos, a fim de evitar um quadro hemolítico de reação transfusional (ALVES, 2016; COSTA, 2016).

Atualmente, a identificação dos antígenos é realizada de forma difundida por fenotipagem eritrocitária utilizando anticorpos comerciais para fins diagnósticos. Esta



metodologia é amplamente utilizada nos procedimentos diagnósticos e pré-transfusionais, considerada como padrão ouro pois requer poucos recursos metodológicos, apresentando excelente sensibilidade e especificidade, sendo utilizada por diversos serviços hemoterápicos, porém apresenta limitações pela disponibilidade de anticorpos comerciais disponíveis diante das variações alélicas nos genes correspondentes à expressão dos antígenos eritrocitários, principalmente no que se refere aqueles de relevância clínica (FUNG, 2017).

As limitações das metodologias sorológicas para a determinação de diversos antígenos simultaneamente são decorrentes da disponibilidade de antissoros raros e reagentes de alto custo. Além disso, a pesquisa de alguns antígenos não é possível pela indisponibilidade de antissoros comerciais ou pela interferência em fenotipar corretamente um paciente recentemente transfundido devido à presença de hemácias do doador na sua circulação (WESTHOFF, 2019).

A genotipagem eritrocitária, em contrapartida, oferece diferenciais para a medicina transfusional pois permite predizer o perfil antigênico de doadores de sangue em vários sistemas de grupos sanguíneos, inclusive em sistemas que só possuem a biologia molecular como mecanismo de identificação. Além disso, possibilita estimar qual a fenotipagem de pacientes submetidos a transfusões sanguíneas recentes e pacientes com teste direto de antiglobulina positivo (TAD+), o qual apresenta aloanticorpos ou autoanticorpos adsorvidos à membrana eritrocitária e que interferem na fenotipagem realizada por uso de soros comerciais (DANIELS, 2013).

O risco associado à aloimunização torna-se ainda mais alto quando pacientes apresentam no soro anticorpos contra antígenos de alta frequência populacional ou, ainda, a combinação de múltiplos anticorpos de diferentes especificidades. O atendimento à demanda transfusional desses pacientes representa um grande desafio para os serviços de hemoterapia, visto que o suporte depende da disponibilidade de unidades de concentrados de hemácias de doadores com

fenótipos raros de grupos sanguíneos. O conceito de sangue raro é definido quando uma frequência populacional do fenótipo em questão encontra-se em uma proporção inferior à 1:1000 pessoas (BRASIL, 2022).

Além disso, um fenótipo pode ser considerado raro, também, pela ausência de um antígeno de alta frequência populacional e que está presente em mais de 90% da população. Adicionalmente, quando há a ausência da expressão de vários antígenos de um mesmo sistema ou de sistemas de grupos sanguíneos diferentes (CASTILHO, 2016; ISBT, 2022; BRASIL, 2022)

O Ministério da Saúde, através da Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados, instituiu um projeto visando a criação do Cadastro Nacional de Sangues Raros, motivado pela realização da Copa das Confederações de futebol em 2013 e a Copa do mundo de futebol em 2014, assim como outros possíveis grandes eventos. A partir de então, ocorreu a estruturação de quatro hemocentros no Brasil, sendo o HEMOAM, o HEMOSC, o HEMORIO e a UNICAMP para a realização de genotipagem eritrocitária a fim de alimentar a o Cadastro Nacional de Sangues Raros, atualmente gerenciado pelo Hemocentro de Campinas (CASTILHO, 2016).

Como visto, a biologia molecular pode ser uma alternativa importante para superar as limitações das técnicas sorológicas para a determinação do perfil antigênico dos pacientes, sendo, portanto, de fundamental importância a realização de estudos que possam contribuir com o aumento da segurança transfusional dos pacientes politransfundidos, com a identificação de novos alelos na população e determinar as frequências genótípicas nas diferentes regiões do Brasil (BIANCHI, 2015; GUZ, 2019).

A população brasileira é de origem étnica bastante heterogênea. Esta diversidade populacional também está distribuída de forma desproporcional dentro um país de área geográfica tão extensa. Além da população nativa como os

indígenas, o Brasil recebeu muitos imigrantes de regiões como Portugal, Itália, Espanha, Alemanha, Japão e Oriente Médio. Entre os séculos 16 e 18, recebeu em decorrência do tráfico de escravos do século em torno de 4 milhões de africanos, principalmente de Angola, Congo e Moçambique, que se difundiram em quase todas as regiões do país (BRASIL, 2022).

Portanto, diante das limitações das técnicas sorológicas para fenotipagem, seja por limitação da disponibilidades de soros comerciais para este fim, como pela interferência de reações de hemaglutinação em pacientes com anticorpos irregulares presentes no soro, faz-se necessário o uso da técnica de genotipagem para predição antigênica dos indivíduos para compreender a disponibilidade de hemocomponentes que possam ser utilizados em medicina transfusional com segurança a nível de compatibilidade sanguínea entre doador e receptor a fim de diminuir os riscos de reações transfusionais agudas e/ou tardias.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITÁRIOS

Os sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários são caracterizados por antígenos da membrana do eritrócito, com características funcionais e polimórficas específicas (Figura 1). Atualmente estão descritos 360 antígenos eritrocitários, sendo 326, distribuídos em 45 sistemas (Tabela 1), reconhecidos pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea - ISBT. Alguns antígenos de glóbulos vermelhos não pertencem a um sistema de grupo sanguíneo porque suas bases moleculares não foram definidas. O ISBT consolida esses antígenos em coleções ou séries. Existem duas séries de antígenos denominadas séries 700 e 901 (Tabela 2 e 3) que representam antígenos com prevalência na população de estudo, inferior a 1% ou superior a 90%, respectivamente (STORRY et al, 2019; ISBT, 2022).

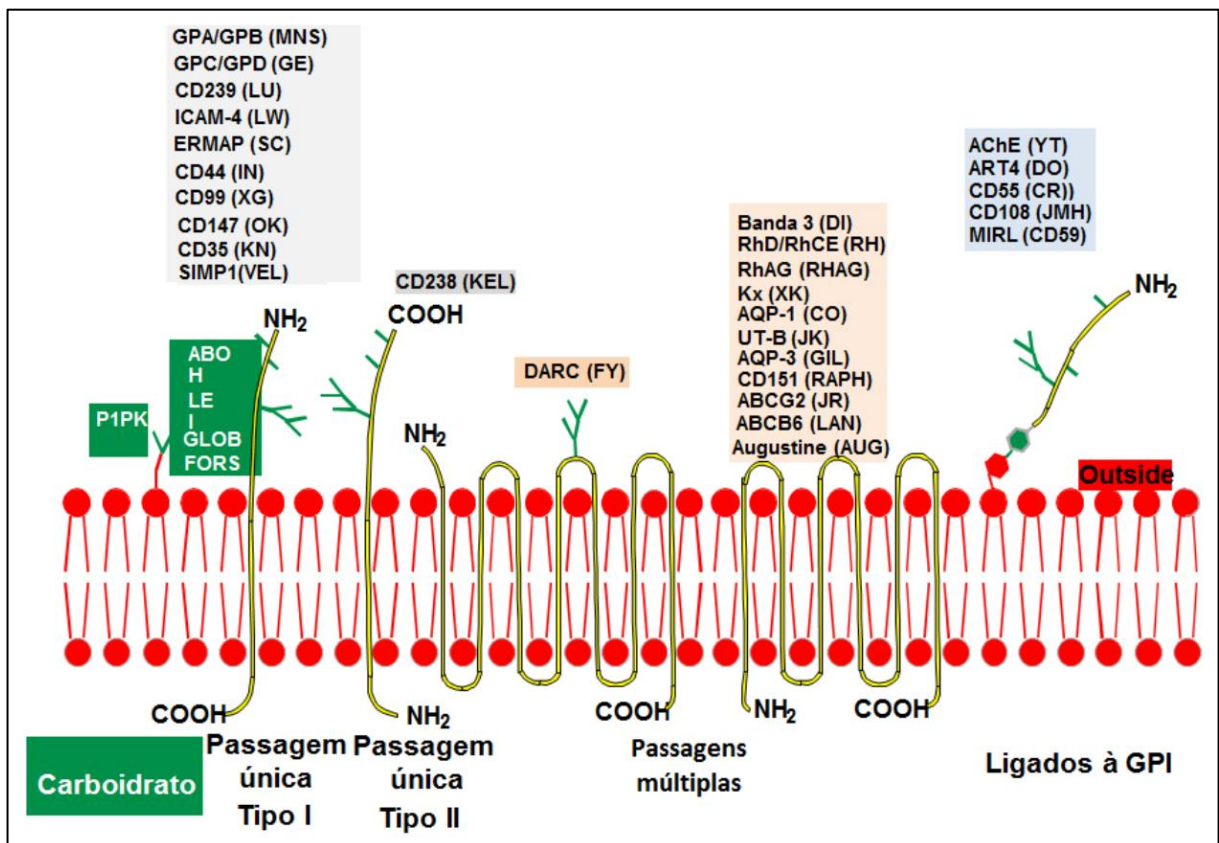


Figura 1. Modelo de membrana: inserção dos antígenos de grupos sanguíneos carboidratos; proteínas de passagem única tipos I e II; proteínas de passagens múltiplas e glicoproteínas ancoradas à membrana através da molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Fonte: Adaptado de Castilho, Pellegrino Jr e Reid, 2015.

Cada sistema eritrocitário possui um único gene ou um conjunto de dois ou três genes próximos e homólogos. Até o momento, os 45 sistemas são produtos de um total de 50 genes (ISBT, 2023).

Tabela 1, Nomes dos sistemas e características genéticas e antigênicas dos Sistemas de grupos sanguíneos.

Nº	Nome do Sistema	Símbolo do Sistema	Nome do Gene	Referência Genômica do <i>Locus</i>	Número de Antígenos	Localização Cromossomal	Nº do <i>Cluster of Differentiation</i>
001	ABO	ABO	<i>ABO</i>	792	4	9q34.2	
002	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, (GYPE)</i>	793; 794	50	4q31.21	CD235a CD235b
003	P1PK	P1PK	<i>A4GALT</i>	795	3	22q13.2	CD77
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	796; 797	56	1p36.11	CD240
005	Lutheran	LU	<i>BCAM</i>	798	28	19q13.2	CD239
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	799	38	7q33	CD238
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	800	6	19p13.3	
008	Duffy	FY	<i>ACKR1</i>	801	5	1q21-q22	CD234
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	802	3	18q11-q12	
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	803	23	17q21.31	CD233
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	804	6	7q22	
012	Xg	XG	<i>XG, CD99</i>	805; 1023	2	Xp22.32	CD99†
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	806	9	1p34.2	
014	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	807	10	12p13-p12	CD297
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	808	4	7p14	

Nº	Nome do Sistema	Símbolo do Sistema	Nome do Gene	Referência Genômica do <i>Locus</i>	Número de Antígenos	Localização Cromossomal	Nº do <i>Cluster of Differentiation</i>
016	Landsteiner-Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	809	4	19p13.2	CD242
017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	137; 138	9	6p21.3	
018	H	H	<i>FUT1; FUT2</i>	810; 811	1	19q13.33	CD173
019	Kx	XK	<i>XK</i>	812	1	Xp21.1	
020	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	813	13	2q14-q21	CD236
021	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	127	20	1q32	CD55
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	814	13	1q32.2	CD35
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	815	6	11p13	CD44
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	816	3	19p13.3	CD147
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	817	1	11p15.5	CD151
026	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	818	8	15q22.3-q23	CD108
027	I	I	<i>GCNT2</i>	819	1	6p24.2	
028	Globoside	GLOB	<i>B3GALNT1</i>	820	3	3q25	
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	821	1	9p13	
030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	<i>RHAG</i>	822	6	6p12.3	CD241
031	FORS	FORS	<i>GBGT1</i>	826	1	9q34.13-q34.3	
032	JR	JR	<i>ABCG2</i>	823	1	4q22.1	CD338
033	LAN	LAN	<i>ABCB6</i>	824	1	2q36	

Nº	Nome do Sistema	Símbolo do Sistema	Nome do Gene	Referência Genômica do Locus	Número de Antígenos	Localização Cromossomal	Nº do <i>Cluster of Differentiation</i>
034	Vel	VEL	<i>SMIM1</i>	827	1	1p36.32	
035	CD59	CD59	<i>CD59</i>	41	1	11p13	CD59
036	Augustine	AUG	<i>SLC29A1</i>	1027	4	6p21.1	
037	Kanno	KANNO	<i>PRNP</i>		1	20p13	
038	SID	SID	<i>B4GALNT2</i>		1	17q21.32	
039	CTL2	CTL2	<i>SLC44A2</i>		2	19p13.2	
040	PEL	PEL	<i>ABCC4</i>	1183	1	13q32.1	
041	MAM	MAM	<i>EMP3</i>		1	19q13.33	
042	EMM	EMM	<i>PIGG</i>		1	4p16.3	
043	ABCC1	ABCC1	<i>ABCC1</i>		1	16p13.11	
044	Er	ER	<i>PIEZO1</i>	1137	5	16q24.3	
045	CD36	CD36	<i>CD36</i>		1	7q21.11	CD36

\*Conforme definido pelo Comitê de Nomenclatura Genética HUGO <http://www.genenames.org/>. () nenhum produto genético nas hemácias normais.

Fonte: ISBT, 2023.



Todos os antígenos de grupos sanguíneos descritos até o momento são herdados pela herança autossômica dominante, com exceção dos sistemas XK e XG, que são codificados pelo cromossomo X. Sua grande diversidade é originada a partir de mudanças ao nível genético que variam desde polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) a trocas gênicas, inversões, deleções, inserções, *splicing* alternativo, dentre outros mecanismos (WESTHOFF, 2019).

Embora o mecanismo de herança genética seja simples, a prevalência dos antígenos de grupos sanguíneos pode variar entre diferentes populações. Este entendimento tem provado ser útil no rastreamento dos padrões de imigração de diferentes grupos étnicos ao longo do tempo. O conhecimento da distribuição dos antígenos de grupos sanguíneos entre um grupo étnico e outro é importante também na busca de sangue fenótipo compatível entre pacientes e doadores de sangue, em especial, fenótipos raros ou variantes Rh que são predominantes em determinadas populações (DANIELS, 2013).

A obtenção de sangue pode ser difícil ou até mesmo impossível para transfusões compatíveis a pacientes com múltiplos anticorpos. A demora em se encontrar unidades compatíveis ou mesmo a incapacidade técnica de assegurar uma transfusão segura pode trazer consequências graves decorrente das reações hemolíticas transfusionais implicando na mortalidade do paciente (MENEGATI, 2019).

Em relação à frequência, os anticorpos mais implicados em reações hemolíticas transfusionais são os dirigidos contra antígenos dos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS. Por outro lado, há aloanticorpos clinicamente importantes desenvolvidos contra outros antígenos eritrocitários e que ocorrem em menos que 1% da população, como por exemplo nos sistemas Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Colton, Sciana e Diego. O significado clínico dos anticorpos antieritrocitários, depende da incidência do antígeno (que pode

variar em diferentes origens étnicas), da sua imunogenicidade e de situações clínicas específicas (RIBEIRO, 2009; BIANCHI, 2015).

## 2.2. SISTEMA Rh

O Sistema Rh (ISBT 004) é o segundo mais importante dos 43 sistemas de grupos sanguíneos descritos até o momento, constituído por 56 antígenos presentes nas proteínas RhD e RhCE, apresentando peso molecular de 30kD (DANIELS, 2013).

Sua relevância na medicina transfusional está associada à alta imunogenicidade, de aproximadamente 80% de chance de aloimunização, quando um indivíduo é exposto a um antígeno Rh não-próprio, normalmente decorrente de uma variação alélica em genes responsáveis pelos epítomos associados a esses antígenos (LUO *et al.*, 2017).

As proteínas a RhD e a RhCE são codificadas pelos genes *RHD* e *RHCE*, localizados nas posições do cromossomo 1p36. Ambos os genes *RHD* e *RHCE* englobam dez éxons, com estrutura altamente homóloga, porém em orientação oposta: 5'-RHD-3'-3'-RHCE-5' (Figura 2 e 3). Além do antígeno RhD há outros 55 antígenos no sistema Rh, entre os quais observa-se com alta imunogenicidade os antígenos C (RH2), E (RH3), c (RH4), e e (RH5). Os antígenos do Sistema Rh estão expressos na superfície eritrocitária, em uma região conhecida como complexo Rh, onde encontram-se também as proteínas RhAG, Banda 3, GPA, GPB, LW e CD47 (MOTA *et al.*, 2012).

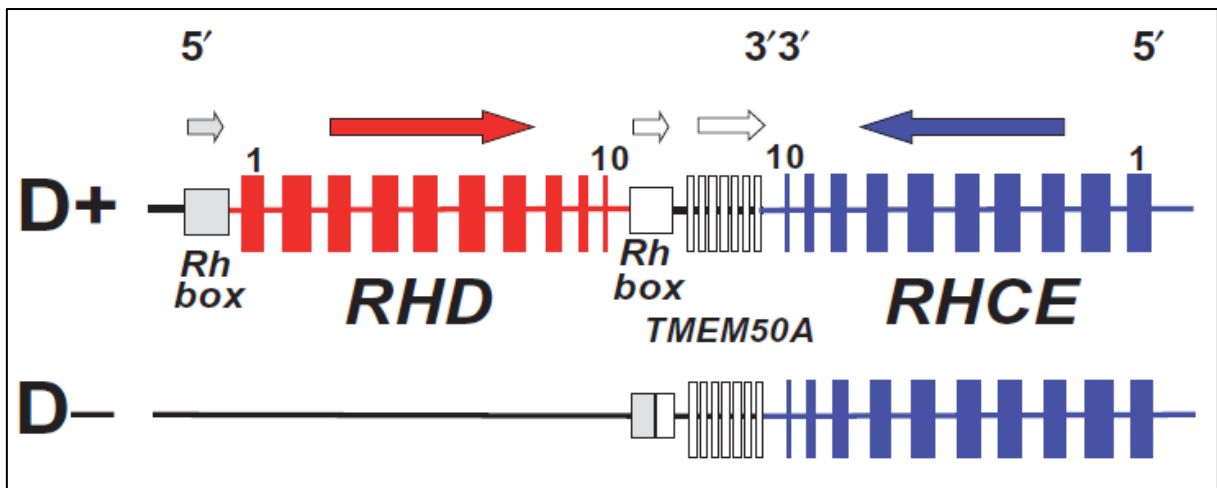


Figura 2. Organização dos genes *RHD* e *RHCE*.  
Fonte: Daniels, 2013.

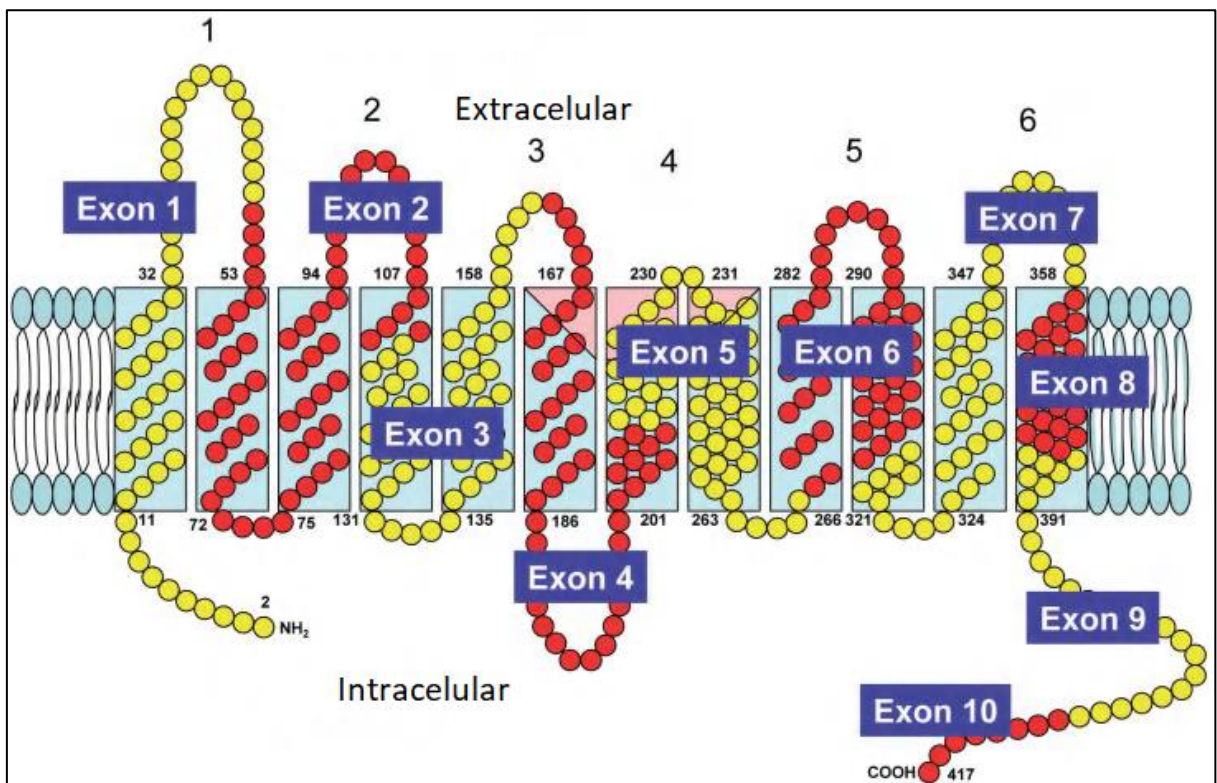


Figura 3. Modelo dos polipeptídeos RhD e RhCE na membrana mostrando as regiões codificadas pelos 10 éxons.  
Fonte: Adaptado de Daniels, 2013.

### 2.3. SISTEMA KELL

O sistema Kell (ISBT 006) é altamente polimórfico possuindo 38 antígenos. Existem sete conjuntos de antígenos no sistema Kell com relações alélicas: K e k; Kp<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup> e Kp<sup>c</sup>; Js<sup>a</sup> e Js<sup>b</sup>; K11 e K17 (Wk<sup>a</sup>); KEL14 e KEL24; KEL25 e KEL28; KEL31 e KEL38. O gene *KEL* está localizado no cromossomo 7q33, possui 19 éxons, com tamanho aproximado de 21,5 Kb (DANIELS, 2013; MATTEOCCI, PIERELLI, 2014).

Os antígenos do sistema constituem uma glicoproteína de membrana tipo II de 93 KDa, com 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. A glicoproteína está covalentemente ligada a outra proteína, denominada XK, através de uma ponte única de íons dissulfeto (ALVES, 2016).

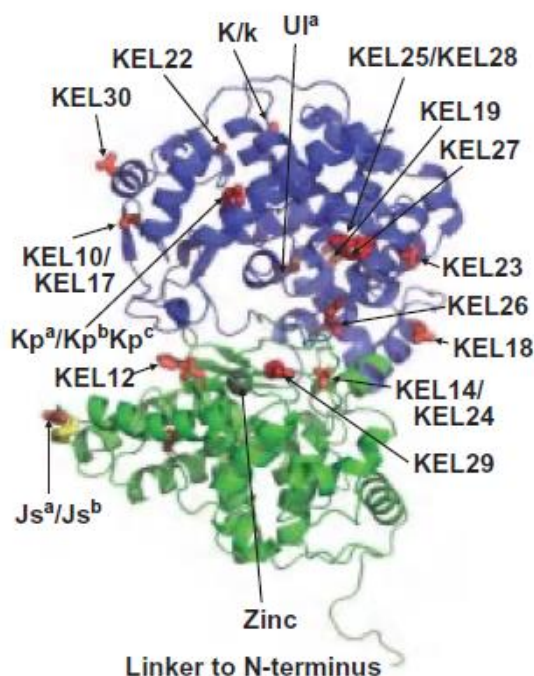


Figura 4. Modelo da glicoproteína Kell, com os domínios altamente conservados em verde e os domínios variáveis na porção distal em azul. A região de *linker* é o sítio de ligação ao domínio transmembrana.

Fonte: Daniels, 2013.

Depois dos sistemas ABO e Rh, o sistema Kell é considerado o mais importante em transfusões, visto que alguns de seus antígenos (como o K) apresentam elevada imunogenicidade e os aloanticorpos possivelmente gerados podem causar reações hemolíticas graves, podendo levar a óbito. Os anticorpos anti-K pertencem à classe IgG e fixam complemento. Já o anticorpo anti-k está envolvido tanto em reações transfusionais hemolíticas quanto em DHPN (DANIELS, 2013; CASTILHO; PELLEGRINO JUNIOR; REID, 2015).

#### 2.4. SISTEMA KIDD

O sistema de grupo sanguíneo Kidd (ISBT 009) é representado por 3 antígenos, sendo  $Jk^a$  e  $Jk^b$ , polimórficos e o antígeno  $Jk3$ , de alta frequência na população. Esses antígenos são codificados pelo cromossomo 18q11-q12 pelo genótipo *JK* (genes *SLC14A1*, *HUT11A*), composto por 11 éxons e 30 kpb de gDNA, onde os éxons de 4 a 11 codificam a proteína completa. O produto desse gene é uma glicoproteína de multipassagem com 389 aminoácidos que atravessam a membrana eritrocitária 10 vezes (Figura 5).

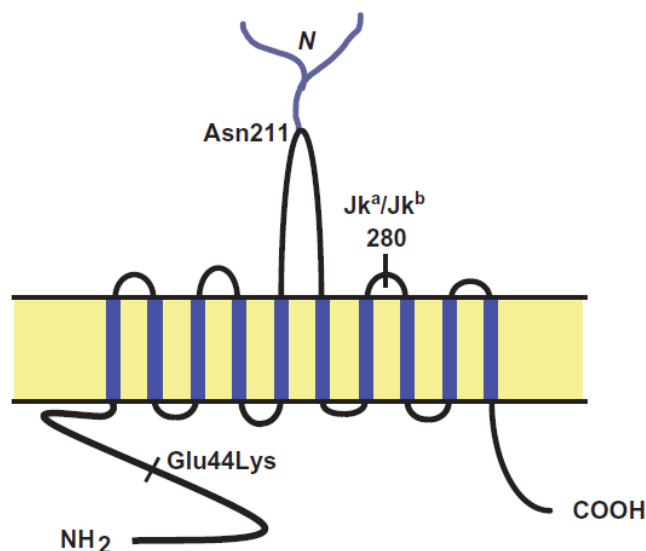


Figura 5. Representação da glicoproteína Kidd mostrando os domínios que abrangem a membrana, terminais N- e C- citoplasmáticos, um único N - glicano no terceiro loop extracelular em Asn211 e posição do polimorfismo  $Jk^a/Jk^b$  no quarto alça extracelular.

Fonte: Adaptado de DANIELS, 2013.

O polimorfismo existente entre os antígenos Jk<sup>a</sup> e Jk<sup>b</sup> consiste na alteração de um único nucleotídeo na posição 838G>A do éxon 9. Existem, ainda, deleções, mutação do tipo *missense* e *nonsense* que podem levar ao fenótipo *null*. Os anticorpos desenvolvidos contra os antígenos do sistema Kidd são extremamente hemolíticos devido à resposta imune da classe IgG1 e IgG3, com capazes de ativar o sistema complemento (BIANCHI *et al.*, 2015; COSTA, 2016).

## 2.5. SISTEMA MNS

O sistema de grupo sanguíneo MNS (ISBT 002) consiste em 50 antígenos, sendo 37 de baixa frequência, 9 de alta frequência e 4 polimórficos: M, N, S e s. Esses antígenos são codificados por dois genes homólogos com 95% de correspondência, localizados no cromossomo 4q31.21, expressos na Glicoforina A (GPA), codificada pelo gene *GYPA* composto por 7 éxons distribuídos em 60 kpb de gDNA, e na Glicoforina B (GPB), codificada pelo gene *GYPB* composto por 6 éxons (sendo um pseudoéxon) distribuídos em 58 kpb de gDNA. Existe outro gene codificador, o *GYPE*, embora não codifique um produto na membrana dos eritrócitos, está envolvido em rearranjos, resultando em alelos variantes (GASSNER, 2022; ISTB, 2019; DANIELS, 2013).

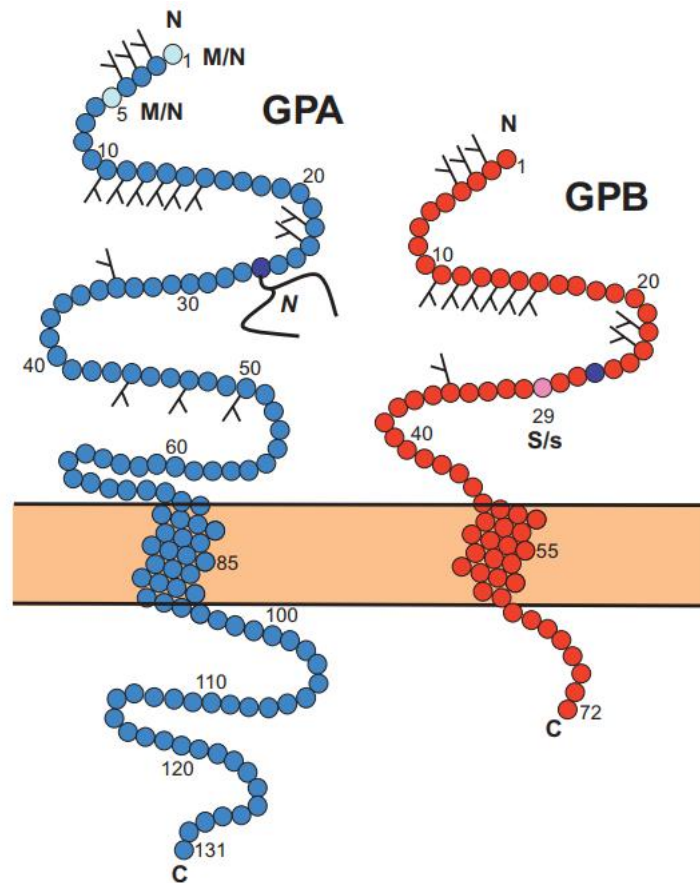


Figura 6. Representação diagramática da Glicoforina A (GPA) e Glicoforina B (GPB), e sua disposição na membrana eritrocitária, demonstrando a posição dos polimorfismos de M/N na posição 1 e 5 da GPA e dos polimorfismos na posição 29 de S/s da GPB.  
Fonte: Adaptado de Daniels, 2013.

O sistema MNS é o mais complexo após o Rh, sendo os antígenos M, N, S, s e U, extremamente polimórficos, e a frequência variada de acordo com a população. O fenótipo S-s-U- é causado pela deleção do éxon 2-6 do gene *GYPB* não havendo sua expressão no eritrócito. Já o fenótipo S-s-U+var é caracterizado pela expressão enfraquecida do antígeno U e ausência do antígeno S, na membrana dos eritrócitos, causadas por duas mutações no gene *GYPB*, designadas de *GYPB.P2* e *GYPB.NY* (BIANCHI *et al.*, 2015; DANIELS, 2013).

A mutação *P2* é caracterizada por uma alteração C>G na extremidade 3' do éxon 5 do gene *GYPB*, no sítio acceptor de *splicing* e uma alteração G>T na posição +5 do íntron 5. Por isso, também é conhecida como *plus5intron5*, afetando o sítio doador de *splicing*. Essas mutações acarretam um salto do

éxon 5 no momento do *splicing* e, conseqüentemente, mudam o quadro de leitura aberta no *GYPB* mRNA, levando ao silenciamento de um alelo S do gene *GYPB*. A mutação *GYPB.NY* é resultado do SNP 208G>T e 230C>T no éxon 5 do gene *GYPB*, resultando em um salto parcial do éxon, acarretando a ausência do antígeno S na membrana eritrocitária (REID, LOMAS-FRANCIS, OLSSON, 2012; RIBEIRO, 2009).

Os antígenos M e N estão presentes na GPA e raramente estão envolvidos em reações hemolíticas; assim sendo, na maior parte das vezes, não apresenta importância clínica transfusional. Os antígenos S, s e U, por sua vez, estão presentes na GPB e estão implicados com reação hemolítica transfusional devido à presença de anticorpos da classe IgG, tornando-se importante na investigação imuno-hematológica (DANIELS, 2013).

## 2.6. SISTEMA LUTHERAN

O sistema de grupo sanguíneo Lutheran (ISBT 005) consiste em 28 antígenos, sendo 2 de baixa frequência e 21 de alta frequência. Os antígenos polimórficos desse sistema são: Lu<sup>a</sup>, Au<sup>a</sup> e Au<sup>b</sup>. Tais antígenos são codificados pelo cromossomo 19q13.2, composto por 15 éxons distribuídos aproximadamente em 12kpb de gDNA. Os antígenos do sistema Lutheran estão expressos em uma glicoproteína de única passagem do Tipo I, composta por 597 aminoácidos, e na proteína B-CAM composta por 557 aminoácidos, devido ao *splicing* alternativo no éxon 13.

Os antígenos relacionados com aloimunização são principalmente o Lu<sup>a</sup> e Lu<sup>b</sup>, com capacidade de desenvolver resposta imune com a produção de anticorpos de classe IgG levando a reações hemolíticas brandas e tardias (DANIELS, 2013).



## 2.7. SISTEMA DOMBROCK

O sistema de grupo sanguíneo Dombrock (ISBT 014) consiste em 10 antígenos, sendo dois pares antitéticos Do<sup>a</sup> e Do<sup>b</sup> e 8 antígenos de alta frequência (Gy<sup>a</sup>, Hy, Jo<sup>a</sup>, DOYA, DOMR, DOLG, DOLC, DODE). A expressão dos antígenos Do<sup>a</sup> e Do<sup>b</sup> é dependente dos antígenos de alta frequência. Tais antígenos são codificados pelo cromossomo 12p12 composto por 3 éxons distribuídos em 14 kpb de gDNA e esses são expressos em uma glicoproteína de 253 ou 240 aminoácidos ligados GPI.

Os antígenos Dombrock são produtos da expressão do genótipo *DO* e estão localizados em uma glicoproteína que faz parte da família das ADP-ribosiltransferases, localizada tanto em eritrócitos quanto em células de outros tecidos, como ovários, intestino e fígado (BRASIL, 2022).

São antígenos de baixa imunogenicidade envolvidos em reações transfusionais de medianas em relação à gravidade e assim como em DHPN. A frequência varia conforme a distribuição e origem étnica-populacional (LANGER *et al.*, 2019).

Embora não sejam anticorpos comuns, muitos exemplos de anti-Do<sup>a</sup> e anti-Do<sup>b</sup> são conhecidos. Estes anticorpos geralmente ocorrem em soros contendo outros aloanticorpos eritrocitários. Também têm sido responsáveis por reações hemolíticas transfusionais agudas e tardias, requerendo eritrócitos negativos para antígenos devem ser selecionados para transfusão (REID, LOMAS-FRANCIS, OLSSON, 2012; BIANCHI, 2015).

## 2.8. SISTEMA LANDSTEINER-WIENER

O sistema Landsteiner-Wiener (ISBT0016) consiste em 4 antígenos, sendo LW<sup>a</sup>, LW<sup>b</sup>, LW<sup>ab</sup> e LWEM. A glicoproteína LW (ICAM-4 e CD242), do sistema de grupo sanguíneo Landsteiner-Wiener (ISBT 016), é produto do gene *ICAM4*. Este gene é constituído por 3 éxons o qual é localizado no cromossomo 19p13.2.

Os antígenos LW<sup>a</sup>, LW<sup>b</sup>, LW<sup>ab</sup> e LWEM são considerados de alta e baixa frequência populacional, respectivamente (DANIELS, 2013; SRIVASTAVA, ALMARRY, FLEGEL, 2014).

Esta glicoproteína possui o domínio N-terminal extracelular, com dois domínios da superfamília das imunoglobulinas, que tem sequência homóloga à proteína da família de moléculas de adesão intercelular (ICAMs). É provável que a glicoproteína LW tenha participação na adesão dos eritrócitos durante a hematopoiese e em doenças vasculares (BONIFACIO, NOVARETTI, 2009; DANIELS, 2013)

## 2.9. SISTEMA COLTON

O sistema de grupo sanguíneo Colton (ISBT 015) consiste em 4 antígenos, sendo 1 polimórfico (Co<sup>b</sup>) e 3 de alta frequência (Co<sup>a</sup>, Co<sup>3</sup>, Co<sup>4</sup>), codificados pelo cromossomo 7p14, pelo genótipo CO [gene *AQP1* (*Aquaporina-1*)], composto por 4 éxons distribuídos em 11,6 kpb de gDNA. O produto desse gene é a proteína Aquaporina 1 (AQP1), uma proteína de multipassagem, atravessando a membrana eritrocitária 6 vezes.

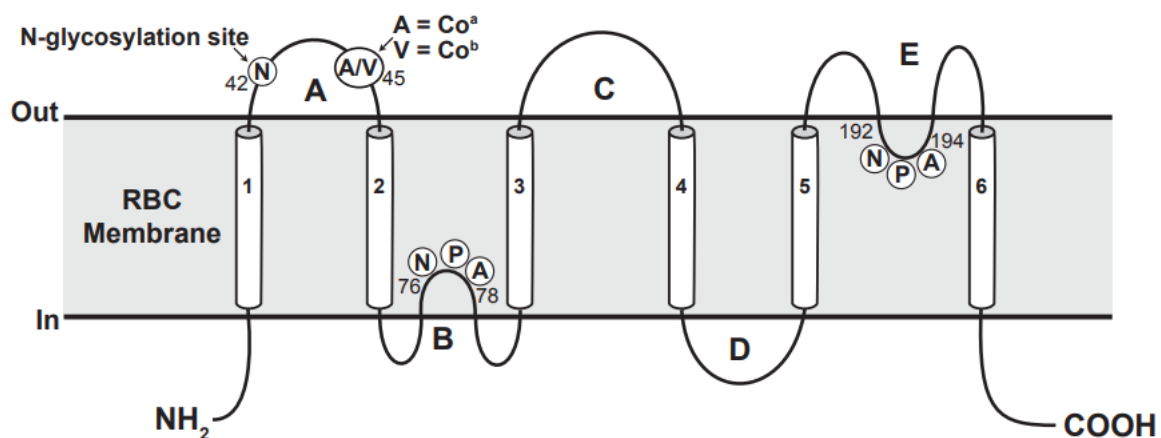


Figura 7. Representação da proteína Colton com os seis domínios que atravessam a membrana com o N- e C- terminal dentro da membrana celular. O polimorfismo Co<sup>a</sup>/Co<sup>b</sup> é indicado na posição 45 (A=Alanina. V=Valina), assim como o sítio de glicosilação em N42. Fonte: Adaptado de HALVERSON; PEYRARD, 2010.

Os anticorpos desenvolvidos na resposta imune contra esses antígenos são da classe IgG e clinicamente significantes e, até o momento, os soros para a determinação sorológica dos antígenos não foram comercializados. O anti-Co<sup>a</sup> é mais clinicamente significativa que o anti-Co<sup>b</sup> (BIANCHI, 2015).

## 2.10. SISTEMA SCIANA

O sistema Scianna (ISBT 013) é representado por 9 antígenos: um par de antígenos antitéticos, os antígenos de alta e baixa frequência SC1 e SC2, o antígeno de baixa frequência SC4 e seis antígenos de frequência muito alta. SC3 está ausente apenas das células do Scianna de fenótipo nulo. Os antígenos Scianna estão localizados na glicoproteína SC, codificada pelo gene *ERMAP* na posição 1p34.2.

Anticorpos ao sistema Scianna são muito incomuns e, quando ocorrem, não fixam complemento. Estudos *in vitro* demonstram que os anti-SC3 podem apresentar significância clínica (DANIELS, 2013).

## 2.11. SISTEMA DIEGO

O sistema de grupo sanguíneo Diego (ISBT 010) possui 23 antígenos, sendo 3 de alta frequência ( $Di^b$ ,  $Wr^b$  e DISK) e os outros 20, de baixa frequência. Os antígenos do sistema Diego são codificados pelo cromossomo 17q21.31 do gene *SLC4A1*, composto por 20 éxons distribuídos em 20 kpb de gDNA. O produto desse gene é a proteína da Banda 3 de multipassagem, atravessando a membrana 14 vezes (Figura 8).

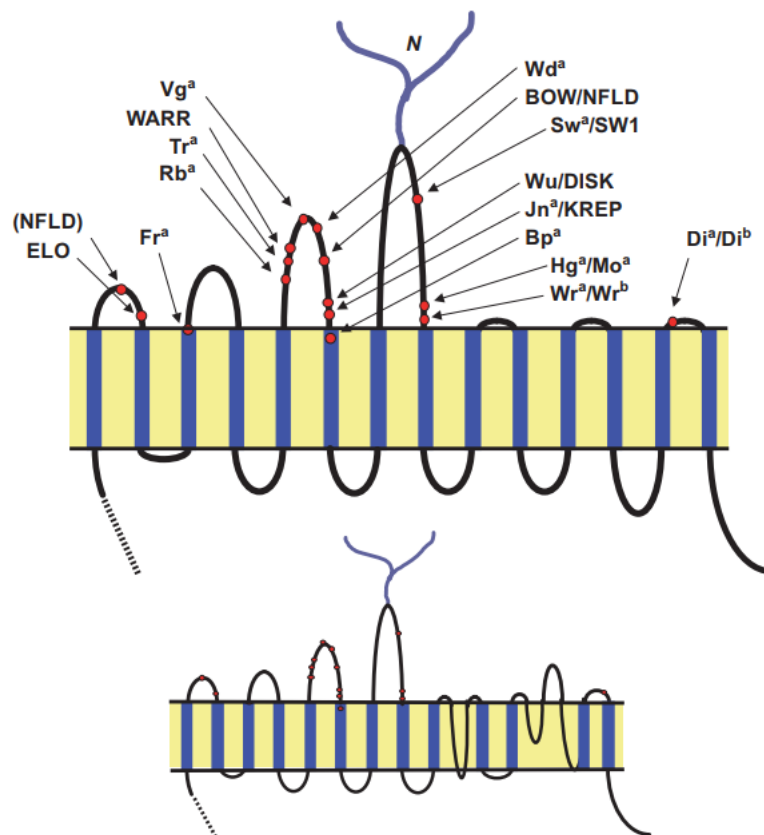


Figura 8. Modelo para a topografia do domínio de membrana da glicoproteína de banda 3. No modelo convencional (acima) a proteína atravessa a membrana 14 vezes e tem domínios citoplasmáticos N- e C- terminais. Posições do aminoácido são mostradas as substituições. Fonte: Adpatado de Daniels, 2013.

O antígeno  $Di^a$  é de baixa frequência na população branca e negra; no entanto, na população dos índios da América do Sul, ele está presente em heterozigose em aproximadamente 36% dos indivíduos e em 10% na população asiática. Os anticorpos mais implicados com reações transfusionais são o  $Di^a$ ,  $Di^b$ ,  $Wr^a$  e, mais raramente, ELO e DISK (REID, LOMAS-FRANCIS, OLSSON, 2012; COSTA, 2016).

## 2.12. FENÓTIPOS RAROS NO BRASIL

A Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH/MS) instituiu em 2016, formalmente, o Cadastro Nacional de Sangue Raro (CNSR), construindo um banco de dados com gestão centralizada com dados de fenótipos eritrocitários raros alimentados oriundos dos hemocentros públicos do Brasil.

Atualmente o CNSR possui 8.880 registros de fenotipagens de doadores de sangue raro, cadastrados nos hemocentros públicos do Brasil. A Região Sudeste do País compõe uma parcela significativa deste quantitativo, com mais de 99% do total de registros dos doadores, enquanto as demais regiões do Brasil estão minimamente representadas (BRASIL, 2022).

Do total dos 8.880 cadastros no CNSR, 88% (7.821) dos doadores são considerados portadores de sangue raro devido à ausência combinada de múltiplos antígenos comuns de diferentes sistemas de grupos sanguíneos. Os demais, 1.059 (12%) doadores cadastrados que apresentam fenótipos eritrocitários raros devido à associação de antígenos comuns negativos de um mesmo sistema ou devido à ausência de antígeno de alta frequência populacional, conforme demonstrado nas figuras 9 e 10 de acordo com a região de registro (BRASIL, 2022).

Legenda	Fenótipo	Cadastro Nacional de Sangue Raro – Brasil					Total
		Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	
	D--	-	1	-	-	-	1
	R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> (DCE/DCE)	1	7	-	1	-	9
	rr(dCE/dCE)	-	3	-	2	1	6
	r'r'(dCe/dCe)	1	2	-	18	9	30
	r''r''(dEc/dEc)	-	2	-	12	2	16
	RH:-19 (hr <sup>h</sup> -)	-	-	-	43	-	43
	RH:-31 (hr <sup>h</sup> -)	-	-	-	96	-	96
	O <sub>b</sub> (Bombay)	-	2	-	-	1	3
	KEL:-2 (k-)	19	57	-	67	-	143
	KELL Nulo (K <sub>a</sub> )	-	1	-	-	-	1
	KEL:-4 (Kpb-)	16	13	3	-	-	32
	KEL:-7 (Jsb-)	2	-	-	3	1	6
	JK:-1,-2 (Jk(a-b-))	1	2	-	1	-	4
	FY:-1,-2 (Fy(a-b-))	10	25	2	489	1	527
	MNS:-3,-4,-5 (S-s-U-)	-	4	-	19	-	23
	MNS:-3,-4,-5var (S-s-U***)	-	8	-	12	1	21
	MNS nulo (M <sup>h</sup> M <sup>h</sup> )	-	1	-	-	-	1
	LU:1,-2 (Lu(a+b-))	-	12	1	4	-	17
	LU:-1,-2 (Lu(a-b-))	18	38	-	-	-	56
	DI:-2 (Dib-)	-	2	-	7	1	10
	CO:-1 (Coa-)	-	-	-	2	-	2
	GE:-2 (Ge2-)	-	5	-	-	-	5
	YT:-1 (Yta-)	-	1	-	3	-	4
	DO:-5 (Joa-)	-	-	-	2	1	3
<b>Total de fenótipos raros</b>		<b>68</b>	<b>186</b>	<b>6</b>	<b>781</b>		<b>1.059</b>

Figura 9. Relação dos principais fenótipos eritrocitários raros cadastrados no CNSR.  
Fonte: BRASIL, 2022.

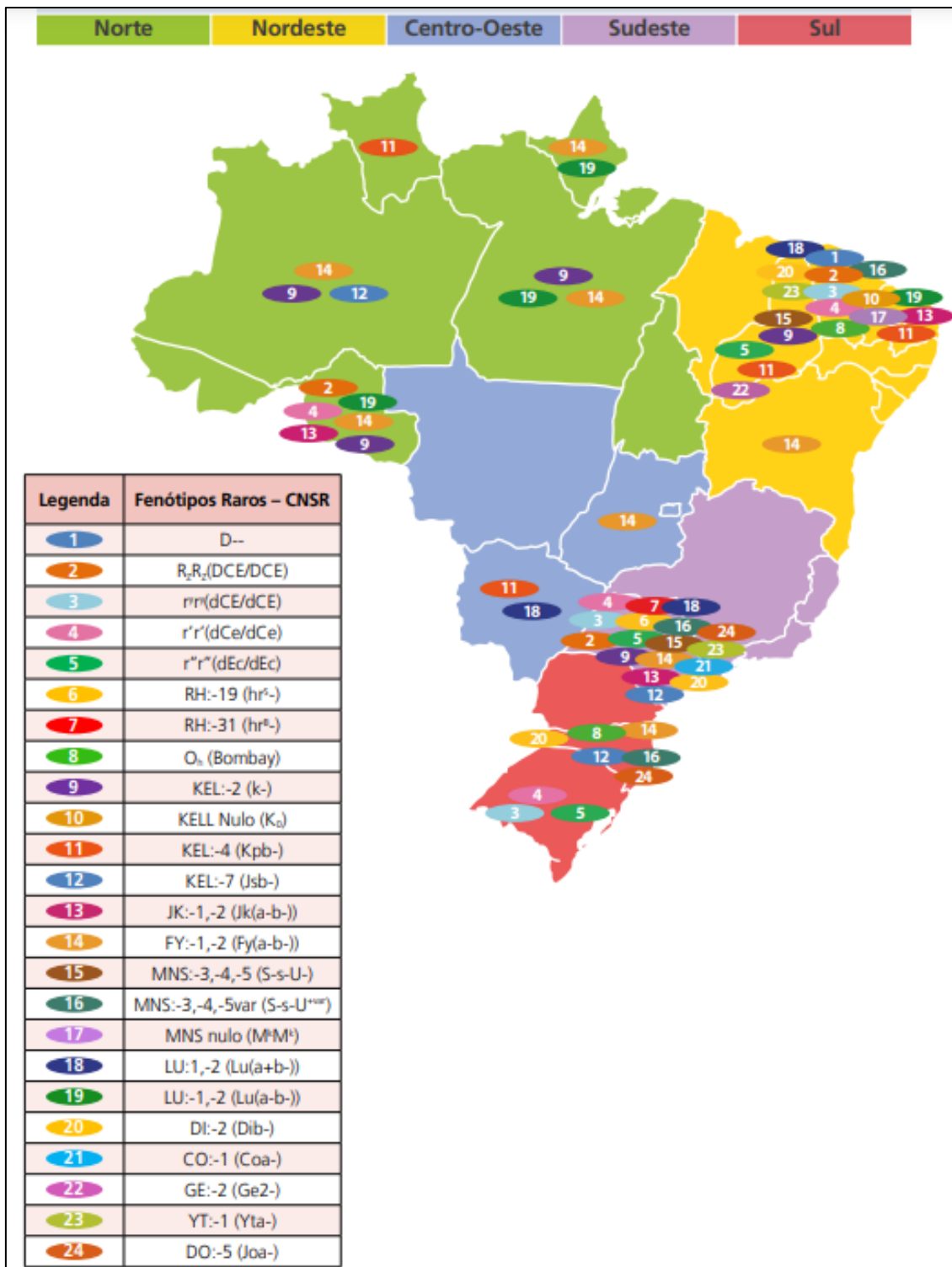


Figura 10. Distribuição dos fenótipos raros de grupos sanguíneos cadastrados no CNSR – Brasil.

Fonte: BRASIL, 2022.

### 3. JUSTIFICATIVA

A necessidade de genotipagem é decorrente devido as limitações das técnicas sorológicas, como a presença de resultado de TAD+, além da limitação de reagentes disponíveis ou até mesmo inexistentes.

Na medicina transfusional, o uso de técnicas sorológicas para atender a necessidade sobre a procura de sangues compatíveis em pacientes politransfundidos apresenta limitações, visto que podem apresentar anticorpos de aloimunização proveniente de transfusões anteriores. A presença desses anticorpos em reações TAD+ ou a presença de hemácias de transfusões recebidas pode interferir nas fenotipagens, sendo a genotipagem um recurso que pode suprir esta limitação, além de possibilitar a identificação de genótipos raros.

Os métodos moleculares para a identificação dos antígenos de grupos sanguíneos já são aplicados em alguns países. Inclusive já existem protocolos de genotipagem de antígenos eritrocitários bem estabelecidos e validados na população brasileira. Entretanto, apesar da miscigenação étnico-racial brasileira, diferentes áreas geográficas apresentam peculiaridades ancestrais que podem propiciar frequência mais específicas em determinados genes, relacionados a características fenotípicas importantes na medicina transfusional e na identificação de indivíduos com fenótipos raros, sendo assim possíveis candidatos a comporem um banco nacional de doadores de sangue raro.

A investigação desses polimorfismos na região amazônica pode permitir concordância ou refutar achados genotípicos de combinações alélicas importantes para identificação de fenótipos eritrocitários de baixa frequência ou de importância clínica, tendo em vista a população de mamelucos e cafuzos como predominantes nesta região brasileira, sendo este estudo necessário pois ainda não foi realizado na região norte do Brasil.



Sendo assim, a necessidade desta análise se faz necessária para identificar a porcentagem de chance de encontrar bolsas de sangue compatíveis para pacientes com frequências alélicas mais difíceis de serem encontradas, possibilitando levantar as diferentes variações genéticas relacionadas aos principais sistemas de grupos sanguíneos, entre os doadores de sangue do Estado do Amazonas. Assim como, possibilitar o aumento da segurança transfusional dos pacientes politransfundidos e para os pacientes com fenótipos raros (pacientes negativos para antígenos de alta frequência, como o k- (celanos), Kp<sup>b</sup> - Js<sup>b</sup> -, U, Di<sup>b</sup>).

Portanto, ainda há necessidade de identificar os polimorfismos dos grupos sanguíneos nas diferentes regiões brasileiras, como, por exemplo, na população do Estado do Amazonas, onde não tinha sido realizado nenhum estudo com esse tema e sendo uma das regiões designadas pelo Ministério da Saúde a implantação deste tipo de serviço.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar a frequência alélica dos principais sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários em doadores de sangue do Estado do Amazonas.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Descrever a frequência alélica dos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton e Sciana;

Detectar genótipos raros entre os doadores de sangue do Estado do Amazonas;

Identificar as frequências genotípicas que caracterizam os doadores atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. TIPO DE ESTUDO**

Pesquisa aplicada, quantitativa, descritiva e retrospectiva.

### **5.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO**

Participaram deste estudo, 803 doadores voluntários de sangue, do período de fevereiro de 2014 a fevereiro de 2020.

### **5.3. LOCAL DO ESTUDO**

Este projeto foi realizado na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), através da anuência de sua Diretoria, assim como da chefia do Departamento do ciclo do sangue e gerencia de imuno-hematologia, sendo autorizado a obtenção dos dados referentes às genotipagens eritrocitárias realizadas desde o período de implantação do serviço no ano de 2014, os quais ficam armazenados no banco de dados em nuvem após exportação realizada pelo software wHEA BioArray Solutions Information System (BASIS). Esses dados, então, após consolidação em planilhas eletrônicas, foram analisados quanto às frequências genotípicas geradas.

## 5.4. CÁLCULO DA AMOSTRA

Amostragem não-probabilística, por livre demanda, dos doadores incluídos nos critérios de inclusão que foram genotipados conforme a disponibilidade de testes do serviço.

### 5.4.1. Amostragem

As amostras foram obtidas por livre demanda, precedidas de autorização prévia por aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao doador antes da coleta de amostras realizada no procedimento de doação de sangue, o qual dispõe sobre a autorização de que sua amostra poderá ser utilizada para fins de testes imuno-hematológicos.

## 5.5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos doadores de sangue voluntários, de repetição como no mínimo 3 doações realizadas, apto nas triagens clínica, hematológica e sorológica, pertencentes aos grupos sanguíneos ABO A e O

Foram excluídas as genotipagens em que não foi possível realizar leitura no chip por emissão de baixo sinal de fluorescência por extravio ou degradação de DNA.

## 5.6. GENOTIPAGEM DE SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS

A genotipagem eritrocitária realizada no HEMOAM é baseada no sistema HEA BeadChip™ (BioArray Solutions, Immucor, Warren, NJ), uma plataforma comercial disponível que prevê o fenótipo eritrocitário por análise de DNA, em PCR Multiplex (Reação em Cadeia da Polimerase – multiplex). O

sistema HEA BeadChip™ detecta 24 polimorfismos (SNPs) associados a 38 antígenos eritrocitários e variantes fenotípicas em um único teste (Tabela 2).

Tabela 2. Marcadores genéticos para os antígenos de glóbulos vermelhos no teste PreciseType HEA.

Sistema de Grupo Sanguíneo	Analito	Polimorfismo (SNP)	Fenótipo (ISBT)	Genótipo (ISBT)
<b>Rh</b>	c/C	307 C>T 109 Ins	RH4, RH2	<i>RHCE*4, RHCE*2</i>
	e/E	676 G>C	RH5, RH3	<i>RHCE*5, RHCE*3</i>
	VS	733 C>G,	RH20	<i>RHCE*01.20.01,</i>
	V	1006 G>T	RH10	<i>RHCE01.20.02, RHCE*01.20.04, RHCE*01.20.05</i>
<b>Kell</b>	K/k	698 T>C	KEL1, KEL2	<i>KEL*01, KEL*02</i>
	Js <sup>a</sup> /Js <sup>b</sup>	1910 C>T	KEL6, KEL7	<i>KEL*06, KEL*07</i>
	Kp <sup>a</sup> /Kp <sup>b</sup>	961 T>C	KEL3, KEL4	<i>KEL*03, KEL*04</i>
<b>Duffy</b>	Fy <sup>a</sup> /Fy <sup>b</sup>	125 G>A	FY1, FY2	<i>FY*01, FY*02</i>
	GATA	-67 T>C	FY-2	<i>FY*02N.01</i>
	(Silencing FY) Fy <sup>x</sup> [Fy(b+ <sup>w</sup> )]	265 C>T	FY2W	<i>FY*02M</i>
<b>Kidd</b>	Jk <sup>a</sup> /Jk <sup>b</sup>	838 G>A	JK1, JK2	<i>JK*01, JK*02</i>
<b>MNS</b>	M/N	59 C>T	MNS1, MNS2	<i>GYPA*01, GYPA*02</i>
	S/s	143 T>C	MNS3, MNS4	<i>GYPB*03, GYPB*04</i>
	Silencing S (Uvar, Uneg)	230C>T	MNS-3, 5W, MNS-3,-4,-5	<i>GYPB*03N.01 or GYPB*03N.02</i>
	In5 g>t			<i>GYPB*03N.03 or GYPB*03N.04</i>
<b>Lutheran</b>	Lu <sup>a</sup> /Lu <sup>b</sup>	230 A>G	LU1, LU2	<i>LU*01, LU*02</i>
<b>Dombrock</b>	Do <sup>a</sup> /Do <sup>b</sup>	793 A>G	DO1, DO2	<i>DO*01, DO*02</i>
	Hy+/Hy	323 G>T	DO4	<i>DO*04</i>
	Jo(a+)/Jo(a)	350 C>T	DO5	<i>DO*05</i>
<b>Landsteiner-Wiener</b>	LW <sup>a</sup> /LW <sup>b</sup>	308 A>G	LW5, LW7	<i>LW*05, LW*07</i>
<b>Diego</b>	Di <sup>b</sup> /Di <sup>a</sup>	2561 C>T	DI2, DI1	<i>DI*02, DI*01</i>
<b>Colton</b>	Co <sup>a</sup> /Co <sup>b</sup>	134 C>T	CO1, CO2	<i>CO*01, CO*02</i>
<b>Scianna</b>	Sc1/Sc2	169 G>A	SC1, SC2	<i>SC*01, SC*02</i>

Fonte: Adaptado de IMMUCOR, 2014.

### 5.6.1. Fase Pré-PCR

A primeira fase para realização das genotipagens é a extração do DNA, realizada pelo método Brazol-LCC®/Clorofórmio-NUCLEAR® para retirada de material genético da região do *Buffycoat*. Após o término da extração foram realizadas as dosagens do DNA e sua diluição para atingir a concentração de no mínimo 100ng/μl, avaliadas no Nanodrop-TERMO SCIENTIFIC®. Aqueles que apresentaram concentração superior a 150 ng/μl foram diluídos para atenderem o padrão de concentração necessário em relação a quantificação de DNA.

Nesta fase que antecede a PCR, foram preparados os reagentes PCR Master Mix, que contém os desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), que foram necessárias para a realização da PCR, em adição às amostras juntamente com a HotStarTaq® DNA Polymerase, conforme protocolo detalhado no ANEXO I.

### 5.6.2. Amplificação, Leitura e Interpretação dos Dados

O DNA genômico foi amplificado com os *primers* (tabela x correspondentes em uma PCR multiplex por um termociclador. Uma vez concluída a PCR, iniciadores oligonucleotídicos residuais e desoxirribonucleotídicos trifosfatos da PCR são digeridos pelo reagente ExoSAP na etapa de purificação. A etapa subsequente é a digestão com exonuclease lambda, que gera alvos de ssDNA para serem aplicados às lâminas HEA BeadChip™ para a etapa de alongamento on-BeadChip usando um forno de hibridação de alta umidade (InSlide Out modelo 241000; Boekel Scientific, Feasterville, PA).

O BeadChip™ é uma matriz plana com aproximadamente 4.000 esferas codificadas por fluorescência, cada uma das quais acomoda aproximadamente 106 sondas de 20 nucleotídeos de comprimento. Uma biblioteca de *beads* funcionais e codificadas, incluindo controles internos positivos, negativos e do sistema, é imobilizada na matriz para cada chip, é produzida uma imagem de decodificação que grava uma configuração exclusiva da matriz.

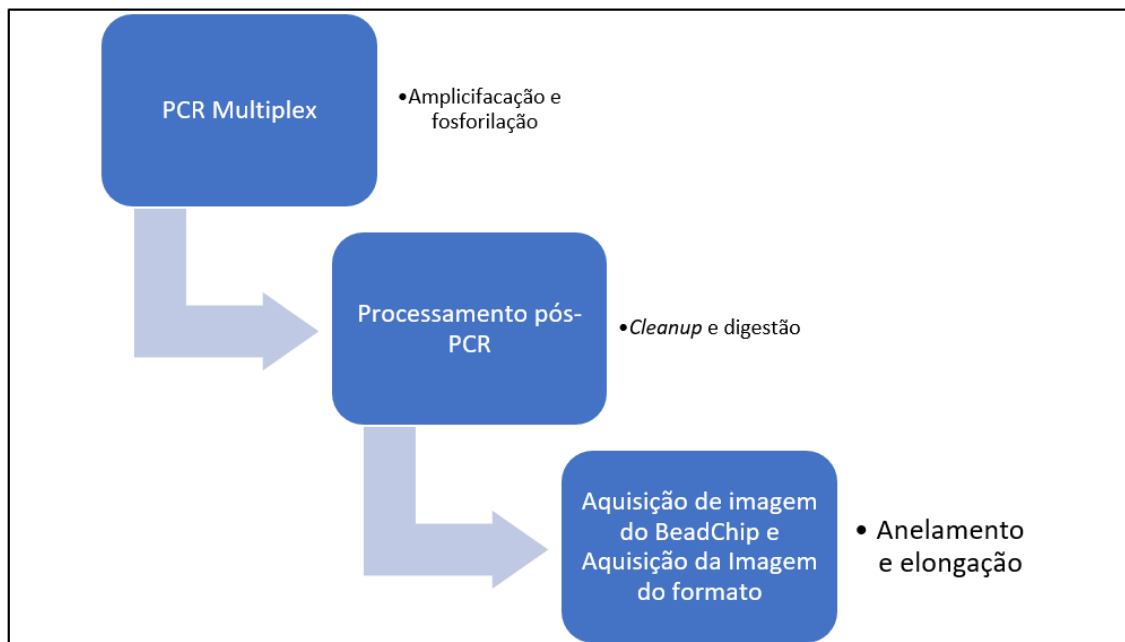


Figura 11. Fases de Amplificação, Leitura e Interpretação das Imagens no sistema HEA BeadChip™.

Fonte: Adaptado de PACCAPELO, 2015.

Em relação ao controle de qualidade, a determinação da validade da corrida e da amostra é realizada pelo software BASIS. São necessários dois controles positivos e um negativo, conforme fornecidos, para cada execução. Os resultados de todos os controles devem atender aos critérios de validade da execução. Se algum dos controles não atender a nenhum critério, a execução será interpretada como inválida e deverá ser repetida. Um valor inferior a trinta e dois resultados de sinal baixo (LS) no relatório de fenótipo da amostra de controle negativo indicam possível contaminação por DNA genômico em quantidade que pode afetar os resultados do teste. Quando isto ocorre, todos os resultados de amostra na execução são inválidos. O padrão fenotípico das duas amostras de controle positivo deve corresponder ao padrão fenotípico esperado. Se algum dos resultados do controle não atender a nenhum critério, todos os resultados da amostra na execução serão considerados inválidos.

Os produtos de alongamento na superfície do chip são então detectados por um microscópio capaz de capturar imagens fluorescentes. A imagem do padrão de fluorescência dentro da matriz é gravada com um sistema automatizado de imagens denominado BioArray Array Imaging System (AIS) 400C o qual é equipado com ótica de fluorescência e uma câmera com dispositivo acoplado carregado, projetada para uso com os kits BeadChip™.

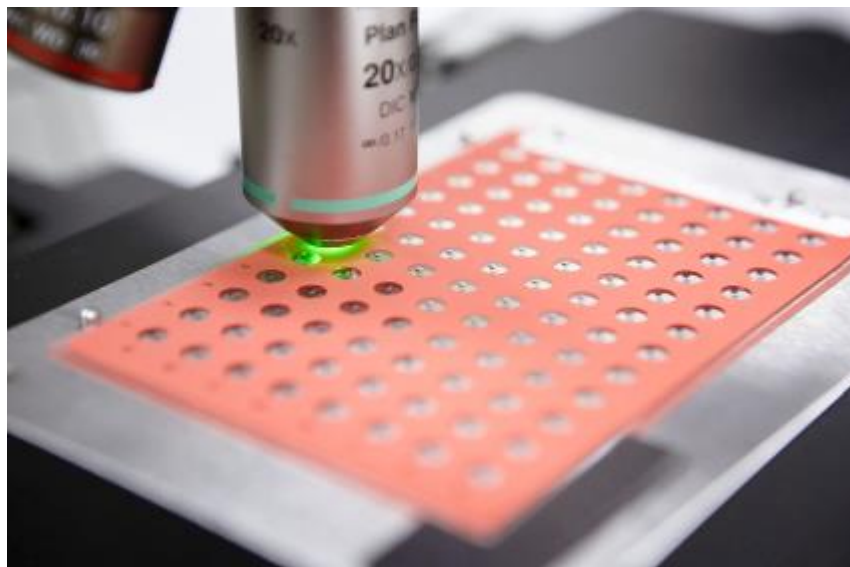


Figura 12. Microscópio de fluorescência acoplado a um leitor de código de barras e a um computador. Cada lâmina contendo os chips de DNA possui um código de barras que a identifica e fornece ao sistema os dados referentes à localização dos beads na lâmina.

Fonte: Adaptado de COSTA, 2011.

Usando as intensidades registradas e os valores de corte específicos do lote do kit, o genótipo e os fenótipos previstos são determinados para cada chip. A proporção de intensidades de sinal de ensaio produzidas por um par de sondas (uma sonda que combina com o alelo "A" e outra que combina com o alelo "B") fornece a base para a discriminação de alelos. As intensidades da sonda são convertidas em genótipos através da aplicação de valores delta da intensidade do par de sonda a níveis de limiar específicos do lote.

A interpretação dos dados é realizada pelo software wHEA da BioArray Solutions Information System (BASIS), que converte sinais de fluorescência no padrão de reação correspondente e na atribuição de alelos e/ou fenótipos



previstos. A validade de cada amostra é estabelecida se nenhuma das seguintes mensagens de erro aparecer: um alto sinalizador de plano de fundo, um alto coeficiente de variação, um alto número de fenótipos de sinal baixo e um número de fenótipos de chamada indeterminados. O BASIS fornece um sistema centralizado de gerenciamento de banco de dados para processar e gerenciar todos os dados e informações relacionados ao BeadChip™.

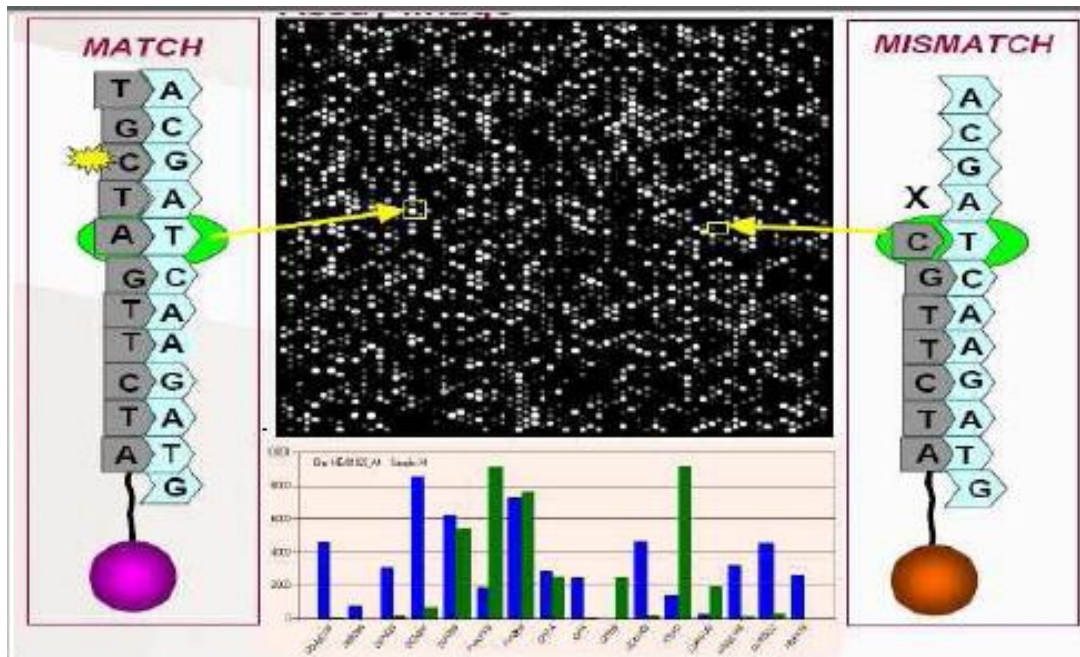


Figura 13. Hibridização e emissão de fluorescência. A fluorescência, representada através de um ponto claro, decorrente da hibridização do DNA alvo com a sonda pré-existente no BeadChip™. Em (b) não houve hibridização entre o DNA alvo e a sonda e desta forma, não se visualiza a emissão da fluorescência.

Fonte: Adaptado de COSTA, 2011.

Para analisar os polimorfismos, o sistema BASIS utiliza das seguintes legendas para interpretação dos genótipos baseado na presença de homocigotos para o alelo A (AA), homocigotos para o alelo B (BB), heterocigoto (AB), classificação indeterminada para o alelo B (Ax), classificação indeterminada para o alelo A (xB), Baixo Sinal (LS) e Classificação indeterminada (IC).

Conforme instrução do fabricante, os resultados IC com ou sem combinações de mais genótipos Ax com xB devem ser desconsiderados visto pode ter havido interferência inerente à montagem das amostras.

## 5.7. CRIAÇÃO DO BANCO DE DADOS

Os resultados das genotipagens dos doadores foram extraídos da plataforma BASIS e consolidados em uma planilha eletrônica para aplicação dos recursos do programa e consequente análise das genotipagens e predições antigênicas, assim como validação dos resultados. Desta forma foi possível gerar os dados utilizados como resultados neste trabalho.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	
1	Chip	Sample	Notes	Status	Detail	C/c 307C-T RHCE-F1	C/f/c RHCE-10	E/f/c 676D-C RHCE-A2	V5 733C-G RHCE-L24	V 1006G-T RHCE-63	K1/K2	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb	Ka/Kb
48	HEAA2640_4	387MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
49	HEAA2640_5	388MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
50	HEAA2640_6	389MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
51	HEAA2640_7	390MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
52	HEAA2640_8	391MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
53	HEAA2641_2	408MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
54	HEAA2641_3	409MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
55	HEAA2641_4	410MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
56	HEAA2641_5	411MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
57	HEAA2641_6	412MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
58	HEAA2641_7	413MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
59	HEAA2641_8	414MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
60	HEAA2642_2	439MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
61	HEAA2642_3	441MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
62	HEAA2642_4	442MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
63	HEAA2642_5	443MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
64	HEAA2642_6	444MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
65	HEAA2642_7	445MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
66	HEAA2643_2	452MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
67	HEAA2643_3	453MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
68	HEAA2643_4	454MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
69	HEAA2643_5	455MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
70	HEAA2643_7	457MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
71	HEAA2643_8	458MK			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
72	HEAA2644_2	491			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
73	HEAA2644_2	491			1	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB

Figura 14. Representação da organização dos dados de genotipagens eritrocitárias em planilhas eletrônicas para análise do estudo.

Fonte: Própria do autor.

## 5.8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O teste é utilizado apenas para uso em pesquisa e não se encontra disponível para uso comercial.

A presença de mutações raras que não estão previstas no chip pode afetar a ligação dos *primers* ou da sonda e levar a não detecção dos alelos e/ou *amplicons* ou originar resultados falso-negativos. Demais mutações não previstas nas sondas poderão ser detectadas apenas por sequenciamento gênico.

Vários mecanismos moleculares podem ser responsáveis pela alteração na expressão dos antígenos eritrocitários, como: alterações, variações na sequência do DN, incluindo *stop códon* prematuro, mutação de ponto missenses (SNP), genes híbridos, alterações na transcrição do RNA incluindo *splicing* alternativo.

O software do sistema BeadChip™ HEA não foi desenhado para interpretar todas as combinações de genótipos/alelos para determinar os fenótipos dos antígenos que possuem múltiplos alelos (>2). Portanto, a técnica utilizada para a realização das genotipagens apresenta limitação na quantidade de SNP possíveis a serem detectadas (IMMUCOR, 2014; PACCAPELO *et al.*, 2015; LANE *et al.*, 2018).

## 5.9. ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), requerendo avaliação da referida pesquisa científica, conforme regulamentação estabelecida pelo Comitê Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP), de número 466/2012, e obteve parecer consubstanciado aprovado sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) de nº 36716520.3.0000.0009 (ANEXO II).

Os riscos foram considerados como mínimos pois não houve contato com indivíduos ou amostras biológicas. Todos os dados retrospectivos referentes a este trabalho foram provenientes do banco de dados de genotipagem dos doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), não havendo contato a dados pessoais nem aos indivíduos doadores de sangue, o que resultou em solicitação de justificativa de dispensa de TCLE. Os pesquisadores do projeto

não tiveram acesso aos dados pessoais dos indivíduos, estando restrito somente aos resultados de genotipagens eritrocitárias para os fins de realização deste estudo. Caso ocorresse quebra de sigilo de confidencialidade, os pesquisadores se comprometeram a manter o sigilo das informações.

#### 5.10. ANÁLISE DOS DADOS

As frequências genótípicas dos 11 sistemas e 24 frequências alélicas que compõem o kit para cada um dos 803 doadores foram consolidadas em planilhas eletrônicas. Para realizar a comparação das frequências gênicas e alélicas será realizada por meio do Teste do Qui-quadrado com correção de Yate's ou teste exato de Fisher, quando adequado, usando uma tabela de contingência 2x2. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado como significativo. A descrição das frequências foi baseada no preconizado por Beigueman (2003).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As transfusões sanguíneas podem salvar vidas, principalmente em pacientes que necessitam entrar em protocolos terapêuticos de politransusão. Antígenos que compõem a diversidade antigênica presente nos eritrócitos podem induzir a produção de aloanticorpos de importância clínica com risco de reações hemolíticas transfusionais. A genotipagem eritrocitária tem sido um excelente recurso para identificação de possíveis fenótipos antes não possíveis de serem identificados apenas com provas sorológicas (CASTILHO, 2016).

Inúmeros antígenos variantes são alvos de estudos de frequência, para classificação e investigação de sua origem genética, a fim de que haja maior disponibilidade de informação sobre sua distribuição populacional (COSTA, 2011; OSMAN, 2017).

A análise dos resultados de genotipagem realizados no HEMOAM em larga escala possibilitou a determinação das frequências genotípicas e alélicas de 24 genes de grupos sanguíneos em uma população de 803 doadores voluntários de sangue.

Como o estudo realizado apresenta limitações devido o software do sistema BeadChip™ HEA não ter sido desenhado para interpretar todas as combinações de genótipos/alelos para determinar os fenótipos dos antígenos que possuem múltiplos alelos (>2), frequência de genótipos Ax encontrados está relacionada a limitação da técnica, onde um dos alelos não foi compatível para ser reconhecido pelas sondas com os respectivos SNPs esperados pelo sistema. Desta forma, presume-se que haja a presença de variantes alélicas nestes éxons, podendo ser elucidado por meio de outros mecanismos moleculares como sequenciamento genético (RIBEIRO, 2009; GASPARDI, 2016, COSTA, 2016).

## 6.1. SISTEMA RH (gene *RHCE*)

Foram realizadas 803 genotipagens eritrocitárias por meio da plataforma HEA BeadChip™ em doadores de sangue resultando em determinação de frequências alélicas e genóticas dos principais genes de grupo sanguíneo na amostra populacional estudada. Dentre os resultados esperados e considerando o sistema Rh (gene *RHCE*) foram obtidos os seguintes resultados, conforme exposto nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Frequência Alélica das genotipagens eritrocitárias para o gene *RHCE* baseado no SNP 307C>T(P103S) no éxon 2, na presença ou ausência da inserção 109 bp no íntron 2, nos SNPs 733C>G (L245V) no éxon 5, 1006G>T (G336C) no éxon 7 e 733C>G (L245V) no éxon 5. n = 803.

Genótipos esperados	<b>C/"c"</b>	<b>C/"c"</b>	<b>E/"e"</b>	<b>VS</b>	<b>V</b>
	<b>307C&gt;T RhCE-P103S</b>	<b>RhCE-109Ins</b>	<b>676G&gt;C RhCE- A226P</b>	<b>733C&gt;G RhCE- L245V</b>	<b>1006G&gt;T RhCE- G336C</b>
	<b>n/%</b>	<b>n/%</b>	<b>n/%</b>	<b>n/%</b>	<b>n/%</b>
AA	182 (0,227)	366 (0,456)	583 (0,726)	709 (0,083)	795 (0,990)
AB	5 (0,006)	437 (0,544)	151 (0,188)	88 (0,110)	8 (0,010)
BB	238 (0,296)	N/A	69 (0,086)	6 (0,007)	N/A
Ax	378 (0,471)	N/A	0	N/A	N/A
xB	0	N/A	0	N/A	N/A
<b>TOTAL</b>	<b>803 (1,000)</b>	<b>803 (1,000)</b>	<b>803 (1,000)</b>	<b>803 (1,000)</b>	<b>803 (1,000)</b>

AA: Homozigoto para AA; AB: Heterozigoto; BB: Homozigoto para BB; Ax: Indeterminado para B; xB: Indeterminado para A.

n: frequência absoluta de doadores; %: frequência relativa.

NA: Não se aplica.

Fonte: Própria do autor.

A frequência genotípica para *RHCE* encontrada considera os genótipos observados para os polimorfismos analisados, compondo diferentes combinações alélicas e subseqüentes predições de fenótipo C e E (Tabela 4).

Tabela 4. . Frequência Genotípica para o gene *RHCE* com análise nos SNPs 307C>T(P103S) no éxon 2, na presença ou ausência da inserção 109 bp no íntron 2, nos SNPs 733C>G (L245V) no éxon 5, 1006G>T (G336C) no éxon 7 e 733C>G (L245V) no éxon 5, assim como sua subsequente predição fenotípica para antígeno RHCE (n = 803).

C/"c" 307C>T RhCE- P103S	C/"c" RhCE - 109In s	E/"e" 676G>C RhCE- A226P	VS 733C> G RhCE- L245V	V 1006G >T RhCE- G336C	c	C	e	E	n	%	Observação
AA	AA	AA	AA	AA	+	0	+	0	150	0,187	
Ax	AA	AA	AA	AA	+	0	+	0	39	0,049	
Ax	AA	AA	AB	AA	+	0	+	0	40	0,050	Possível VS+V+
Ax	AA	AA	BB	AA	+	0	+	0	5	0,006	Possível VS+V+
Ax	AA	AB	AA	AA	+	0	+	+	35	0,044	
Ax	AA	AB	AB	AA	+	0	+	+	9	0,011	Possível VS+V+
Ax	AA	AB	AB	AB	+	(0)*	+	+	3	0,004	Possível VS+V-
Ax	AA	BB	AA	AA	+	0	0	+	59	0,073	
Ax	AB	AA	AA	AA	+	+	+	0	78	0,097	
Ax	AB	AA	AB	AA	+	+	+	0	18	0,022	Possível VS+V+
Ax	AB	AA	AB	AB	+	+	+	0	1	0,001	Possível VS+V-
Ax	AB	AB	AA	AA	+	+	+	+	79	0,098	
Ax	AB	AB	AB	AA	+	+	+	+	2	0,002	Possível VS+V+
Ax	AB	BB	AA	AA	+	+	0	+	9	0,011	
BB	AB	AA	AA	AA	0	+	+	0	225	0,280	
BB	AB	AB	AA	AA	0	+	+	+	13	0,016	
AA	AB	AA	AA	AA	+	+	+	0	6	0,007	
AA	AA	AB	AA	AA	+	0	+	+	8	0,010	
AA	AB	AA	AB	AA	+	+	+	0	1	0,001	Possível VS+V+
AB	AB	AA	AA	AA	+	+	+	0	4	0,005	
Ax	AA	AA	AB	AB	+	0	+	0	1	0,001	Possível VS+V-
AA	AA	AA	AB	AA	+	0	+	0	12	0,015	Possível VS+V+
AA	AA	AA	BB	AB	+	(0)*	+	0	1	0,001	Possível VS+V+
AA	AA	BB	AA	AA	+	0	0	+	1	0,001	

C/"c" 307C>T RhCE- P103S	C/"c" RhCE - 109In s	E/"e" 676G>C RhCE- A226P	VS 733C> G RhCE- L245V	V 1006G >T RhCE- G336C	c	C	e	E	n	%	Observação
AA	AA	AB	AB	AA	+	0	+	+	1	0,001	Possível VS+V+
AB	AB	AB	AA	AA	+	+	+	+	1	0,001	
AA	AA	AA	AB	AB	+	(0)*	+	0	2	0,002	Possível VS+V-
<b>TOTAL</b>									803	1,000	

n: frequência absoluta de doadores; %: frequência relativa.

Fonte: Própria do autor.

A presença ou ausência para o antígeno RhC é baseada no resultado da genotipagem para os polimorfismos 307C>T(P103S) no éxon 2, 733C>G (L245V) no éxon 5, 1006G>T (G336C) no éxon 7 e na presença ou ausência da inserção 109 bp no íntron 2 do gene *RHCE*. A frequência genotípica para o gene *RHCE* demonstrou um predomínio de genótipos *RHCE*\*4 em homozigose, seguido do genótipo *RHCE*\*2.

Para os alelos AA, interpreta-se os genótipos *RHCE*\*c/ *RHCE*\*c com predição fenotípica da presença de antígenos “c” e ausência de “C”. AB significa que é um genótipo heterozigoto para os SNPs esperados, ou seja, *RHCE*\*C/ *RHCE*\*c. E BB refere-se ao genótipo *RHCE*\*C/*RHCE*\*C. Da mesma forma segue-se a interpretação que estarão ligadas à síntese do antígeno “E” e “e” nos alelos *RHCE*\*e e *RHCE*\*E.

Tabela 5. Frequência Genotípica para o gene *RHCE* e predição fenotípica para antígeno RHCE (n = 803).

Genótipos esperados	<i>RHCE</i> *c/ <i>RHCE</i> *C	<i>RHCE</i> *e/ <i>RHCE</i> *E
	n / %	n / %
AA	366 (0,456)	583 (0,726)
AB	199 (0,248)	151 (0,188)
BB	238 (0,296)	69 (0,086)
<b>TOTAL</b>	<b>803 (1,000)</b>	<b>803 (1,000)</b>

Para o genótipo *RHCE*, AA = *RHCE*\*c/ *RHCE*\*c, AB = *RHCE*\*c/ *RHCE*\*C e BB = *RHCE*\*C/*RHCE*\*C.

n: frequência absoluta de doadores; %: frequência relativa.

Fonte: Própria do autor.



Estes dados são concordantes com a frequência gênica em nativos americanos e caucasianos/europeus conforme descrito por Delaney *et al.* (2015). Concordam, também, com os dados de Alves (2016) no Estado de Minas Gerais, no Brasil e RIBEIRO (2009), na cidade de Campinas – SP.

Foi observada uma frequência de 0,102 (82) genotipagens de alelos AB para o SNP 733C>G RhCE-L245V combinada com alelos AA para o SNP 1006G>T RhCE-G336C, conferindo uma predição de possível fenótipo VS+V+; de 7 (0,009) alelos AB para o SNP 733C>G RhCE-L245V combinada com alelos AB para o SNP 1006G>T RhCE-G336C, com predição de fenótipo VS+V-; de 1 (0,001) alelos BB para o SNP 733C>G RhCE-L245V combinada com alelos AB para o SNP 1006G>T RhCE-G336C, com predição de fenótipo VS+V+; e de 5 (0,006) alelos BB para o SNP 733C>G RhCE-L245V combinada com alelos AA para o SNP 1006G>T RhCE-G336C, com predição de fenótipo VS+V+. Logo, ao consolidar os fenótipos, pode-se ter uma frequência de 0,109 de doadores VS+V+ e 0,006 de VS+V-.

O teste HEA utiliza duas mutações de ponto, a 733C> G (L245V) no éxon 5 e a 1006G> T (G336C) no éxon7 do gene *RHCE* para prever os fenótipos dos antígenos V e VS. As regras de conversão de predição de genótipo para fenótipo empregadas pelo teste HEA utiliza o fato estabelecido que a ausência das duas mutações está correlacionada com a ausência de antígenos VS e V e que a presença das mutações leva à expressão do antígeno (IMMUCOR, 2014; PACCAPELO, C. *et al.* 2015).

Os antígenos VS e V são comuns em hemácias de populações nativas e de origem africana e raros em outras populações. Estes antígenos estão associados com o antígeno “e parcial”, denominado e<sup>S</sup>, e também com o antígeno “c parcial”, respectivamente. Tanto os antígenos “e” como o e<sup>S</sup> são difíceis de serem definidos sorologicamente. Os anticorpos anti-VS e anti-V apresentam significado clínico podendo causar reação transfusional.

A frequência de VS e V encontrada foi superior aos estudos de Belsito *et al.* (2015), que identificou frequência de 1,8% para estas variantes em

doadores italianos; de Santos *et al.* (2019), que descreveu frequência de 4-5% para um dos alelos do fenótipo VS/V e 5-6% para os dois, em doadores de sangue de Campinas-SP; e de Yee *et al.* (2017), com frequência de 4,8% em crianças portadoras de hemoglobinopatias de Atlanta-USA ( $p < 0,05$ ).

A presença de antígeno e-parcial e de outros antígenos parciais, pode possibilitar que o paciente reconheça um antígeno “e” comum, desenvolvendo anticorpos anti-e ou a outro antígeno de alta frequência. Isso traz como implicação a dificuldade de encontrar uma bolsa de sangue fenótipo compatível para o paciente (RIBEIRO, 2009; ALVES, 2016).

Em africanos, a frequência de VS e V tem sido de até 40%, sugerindo que sua presença em outras populações seja decorrente da contribuição de herança genética de origem africana (DANIELS, 2013, COSTA, 2011; BIANCHI, 2015, GASPARDI, 2016).

Houve 6 casos de predição fenotípica para C como (0)\* (frequência de 0,007) para o antígeno RHC, o que implica na possível presença de antígeno C alterado codificado pelo haplótipo (C)  $ce^s$ . Este antígeno caracteriza-se pela expressão de “C parcial” que pode induzir indivíduos com este fenótipo à aloimunização com a produção de anticorpos anti-C em caso de exposição ao antígeno C em transfusões sanguíneas.

A classificação (0)\* no antígeno RhC implica na possível presença do haplótipo Rh(C) $ce^s$ . Este possui dois genes alterados, sendo o gene híbrido {D-CE(4-7)-D} e o haplótipo (C) $ce^s$ . O gene *RHD* híbrido {D-CE(4-7)-D}  $ce^s$  resulta da inserção dos éxons 4-7 do gene *RHCE* no gene *RHD*. Este gene híbrido codifica 4 substituições de nucleotídeos: 186G>T (Leu62Phe) no éxon 2 do *RHD*, 410 C>T (Ala137Val) no éxon 3 de *RHD*, 733 C>G (Leu245Val) no éxon 5 de *RHCE* e 1006G>T (Gly366Cys) no éxon 7 de *RHCE* (SOUZA; CRUZ; COSTA, 2020).

O haplótipo (C)ce<sup>s</sup> leva a fraca expressão do antígeno C, mas expressão normal do antígeno c. O antígeno e fraco é chamado de e<sup>s</sup> e está associado ao VS (RH20) (IMMUCOR, 2014; PACCAPELO, C. *et al.* 2015).

Na Tabela 4 pode-se observar que a análise conjunta dos SNPs relacionados ao gene *RHCE* pode levar a diferentes combinações alélicas e com predições fenotípicas similares. Do ponto vista na prática transfusional, esses dados são importantes pois a limitação dos testes sorológicos não permite detecções de algumas variantes, como os antígenos VS e V, que podem aloimunizar pacientes trazendo risco de reações transfusionais futuras.

Em um cenário inverso, caso os receptores de hemocomponentes sejam do fenótipo VS e/ou V, podem ocorrer aloimunizações com a produção de anticorpos irregulares anti-VS e/ou anti-V.

## 6.2. SISTEMA KELL

O sistema Kell apresentou os seguintes resultados de frequência genotípica em relação aos SNPs 698 T>C, 1910 C>T e 961 T>C do gene *KEL* correspondentes aos fenótipos K/k, Js<sup>a</sup>/Js<sup>b</sup> e Kp<sup>a</sup> / Kp<sup>b</sup> (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência Genotípica para o genótipo *KEL* e predição fenotípica para antígeno KEL (n = 803).

Genótipos esperados	K/k*	Js <sup>a</sup> /Js <sup>b</sup> **	Kp <sup>a</sup> /Kp <sup>b</sup> ***
	698 T>C	1910 C>T	961 T>C
	n / %	n / %	n / %
AA	0	1 (0,001)	0
AB	29 (0,036)	21 (0,026)	9 (0,011)
BB	774 (0,964)	781 (0,973)	794 (0,989)
TOTAL	803 (1,000)	803 (1,000)	803 (1,000)

\*Para o genótipo *KEL*, AA = *KEL*\*02/ *KEL*\*02 (antígeno k/k), AB = *KEL*\*01/ *KEL*\*02 (antígeno k/K) e BB = *KEL*\*01/ *KEL*\*01 (antígeno K/K).

\*\*Para o genótipo *KEL*, AA = *KEL*\*06/ *KEL*\*06 (antígeno Js<sup>a</sup>/ Js<sup>a</sup>), AB = *KEL*\*06/ *KEL*\*07 (antígeno Js<sup>a</sup>/ Js<sup>b</sup>) e BB = *KEL*\*07/ *KEL*\*07 (antígeno Js<sup>b</sup>/ Js<sup>b</sup>).

\*\*\*Para o genótipo *KEL*, AA = *KEL*\*03/ *KEL*\*03 (antígeno Kp<sup>a</sup>/ Kp<sup>a</sup>), AB = *KEL*\*03/ *KEL*\*04 (antígeno Kp<sup>a</sup>/ Kp<sup>b</sup>) e BB = *KEL*\*04/ *KEL*\*04 (*KEL*\*03/ *KEL*\*03 (antígeno Kp<sup>b</sup>/ Kp<sup>b</sup>)).

n: frequência absoluta de doadores; %: frequência relativa.

Fonte: Própria do autor.

Não foram identificados fenótipos com Kp<sup>b-</sup>, nem k- (ambos negativos) na amostra estudada. Houve um resultado de *KEL*\*06/*KEL*\*06 (Js<sup>a</sup>(+)) com frequência genotípica de 0,001, sendo considerado um fenótipo raro. A frequência genotípica em heterozigose para os SNPs 698 T>C, 1910 C>T e 961 T>C do gene *KEL* foi de 0,036, 0,026 e 0,011, respectivamente.

O Sistema de Grupo Sanguíneo Kell é representado pelo antígenos K,k, Js<sup>a</sup>, Js<sup>b</sup>, Kp<sup>a</sup> e Kp<sup>b</sup>. Os antígenos k, Js<sup>b</sup> e Kp<sup>b</sup> são antígenos de alta frequência populacional, também conhecidos como antígenos públicos. Os antígenos K, Js<sup>a</sup> e Kp<sup>a</sup>, por sua vez, são antígenos de menor frequência na população.

A frequência em homozigose do SNP 698 T>C do gene *KEL* demonstrou a presença com uma frequência de 0,036 do alelo que está relacionado com a síntese do antígeno K. Este antígeno é de baixa frequência populacional e que está concordante com os dados de um estudo de fenotipagem eritrocitária em Belém-PA realizado por Monteiro *et al.* (2020), porém discordante dos resultados de Siqueira (2022), em Rio grande do Sul-RS. Isso pode estar associado às diferentes concentrações de origens étnicas e populacionais nas diferentes regiões do Brasil.

É importante apontar que os doadores que foram genotipados (*KEL*\*01/*KEL*\*02) e com predição fenotípica K+, que os concentrados de hemácias destes podem aloimunizar receptores a produzirem anticorpos anti-K. Para pacientes que necessitam de assistência transfusional esporádica, não há implicações clínicas no uso desses hemocomponentes. Porém, em pacientes que precisam de transfusões repetidas como pacientes com hemoglobinopatias, Neoplasias mieloproliferativas e oncológicos, podendo haver risco de reação transfusional. Este anticorpo normalmente é da classe IgG e pode estar presente na doença hemolítica do recém-nascido.

Neste estudo foi observado a frequência genotípica de 0,001 para o SNP 1910 C>T com alelos AA, genótipo *KEL*\*06/*KEL*\*06, correspondente à uma predição fenotípica de antígeno Js<sup>a+</sup> e Js<sup>b-</sup>, sendo assim considerado como um resultado de sangue raro para este doador. Confrontando os dados de

genotipagem com heterozigose para os alelos relacionados aos antígenos  $J_s^a/J_s^b$  deste estudo (0,026) com os dados de Bianchi (2016) que encontrou uma frequência de 0,042, pode-se concluir que houve semelhança nestes dados ( $p=0,0972$ ).

Apesar do antígeno  $Kp^a$  (*KEL \*02*) ser de baixa frequência populacional, foi encontrada uma frequência de 0,011 em doadores com genotipagem em heterozigose apresentando o alelo correspondente a este antígeno. Costa (2016) demonstrou em genotipagens em Campinas-SP e em Salvador-Ba uma frequência de 0,013 e 0,000 para  $Kp^a$ , respectivamente. Tais correlações podem estar associadas às diferentes concentrações populacionais referente aos predomínios étnicos de cada região do estudo.

### 6.3. SISTEMA DUFFY

O sistema Duffy apresentou os seguintes resultados em relação aos SNPs 125 G>A, -67 T>C\*\* e 265 C>T do genótipo *FY* correspondentes aos fenótipos  $F_ya/F_yb$ , conforme exposto na tabela 7.

Tabela 7. Frequência Genotípica para o genótipo *FY* e predição fenotípica para antígeno *FY* (n = 803).

Genótipos esperados	<b><math>F_y^a/F_y^{b*}</math> 125 G&gt;A</b>	<b>GATA** (<i>Silencing FY</i>) -67 T&gt;C</b>	<b><math>F_yx[F_y(b+^w)]</math> 265 C&gt;T</b>
	n / %	n / %	n / %
AA	171 (0,213)	595 (0,741)	783 (0,975)
AB	390 (0,486)	182 (0,227)	20 (0,025)
BB	240 (0,299)	26 (0,032)	-
Ax	2 (0,002)	-	-
TOTAL	803 (1,000)	803 (1,000)	803 (1,000)

---

\*Para o genótipo *FY*, AA = *FY\*02/FY\*02* (antígeno  $Fy^a/Fy^a$ ), AB = *FY\*01/FY\*02* (antígeno  $Fy^a/Fy^b$ ) e BB = *FY\*01/FY\*01* (antígeno  $Fy^b/Fy^b$ ).

\*\* Para o genótipo *FY\*02N.01* proveniente do SNP -67 T>C, AA = ausência de mutação silenciadora e AB = presença da mutação em heterozigose.

\*\*\* Para o genótipo *FY\*02M*, proveniente do SNP 265 C>T, AA = ausência de mutação para diminuição da expressão dos antígenos  $Fy^b$  e presença da mutação em heterozigose.

Ax = ocorrência de hemizigose, onde há hibridização de umas das sondas dos SNPs esperados do teste em um dos alelos, porém o outro não apresenta ligação com nenhuma das sondas com os SNPs esperados.

n: frequência absoluta de doadores; %: frequência relativa.

---

Fonte: Própria do autor.

Para o SNP 125 G>A do gene *ACKR1*, referente ao genótipo *FY*, houve uma frequência alélica Ax de 0,002 e maior frequência em heterozigose (0,486). Foram identificados 208 (frequência de 0,259) doadores que apresentam o fenótipo  $Fy(b-)$  com a presença da mutação -33 T>C no promotor eritróide GATA, localizado na região promotora do gene que inibe a expressão do antígeno  $Fy^b$  na superfície das hemácias, mas não em outros tecidos, sendo a frequência alélica de 182 (0,227) para AB e 25 (0,032) para BB.

Além disso, 26 genotipagens apresentaram resultado com a mutação GATA presente em homozigose e 20 com a mutação 265 C>T  $Fy^x$ , conferindo uma fraca expressão do antígeno  $Fy^b$ .

A frequência genotípica para o gene *FY* foi predominante para homozigose com os alelos AB ( $Fy^a/Fy^b$ ), genótipo *FY\*01/FY\*02*, em 0,486 divergindo dos dados de Costa (2016) e concordante com os dados de Ribeiro (2009) e Alves (2016). Os antígenos  $Fy^b$  são mais frequentes em indivíduos afrodescendentes e  $Fy^a$  em caucasóides e asiáticos. Observa-se que a frequência de alelos para  $Fy^a$  foi significativamente superior nas amostras deste estudo em comparação com vários estudos realizados no Brasil, podendo esta ser uma característica peculiar da população do estado do Amazonas visto sua influência populacional constituindo por povos indígenas e pela colonização europeia na Amazônia.

Apesar de ter havido uma frequência genotípica de 0,032 para a mutação GATA na posição -67 do gene *FY\*B* não houve possível silenciamento de expressão deste pois todos os doadores com esta mutação apresentaram genótipo BB para o SNP 125 G>A, que está relacionado com fenótipo  $Fy^{a+}$ . Pacientes com fenótipo  $Fy^{b-}$  e genótipo *FY\*B* com GATA mutado ou que apresentam o SNP 265C>T, podem ser transfundidos sem risco de aloimunização com hemácias  $Fy^b$  uma vez que o gene *FY\*B* é expresso em outros tecidos do indivíduo.

#### 6.4. SISTEMA KIDD

Em relação ao SNP 838 G>A do gene *SLC14A1*, referente ao genótipo *JK*, a frequência genotípica foi de 0,508 para ambos os alelos possíveis, ou seja, em heterozigose sendo a maior frequência entre as genotipagens realizadas para este gene. Além disso, houve uma frequência de 0,002 para o alelo Ax deste SNP.

O SNP com alelo "A", seja AA em homozigose ou AB, em heterozigose está presente em 0,803 dos doadores genotipados, o qual está relacionado com a síntese do antígeno  $Jk^b$ .

Houve duas genotipagens com frequência alélica Ax para o SNP 838 G>A do genótipo *JK*, não havendo ligação em nenhuma das sondas previstas na metodologia do teste para um dos pares alélicos do gene.

Tabela 8. Frequência genotípica para o genótipo *JK* e predição fenotípica para antígeno Jk (n = 803).

Genótipos esperados	Jka/Jkb* 838 G>A	Frequência
AA	237	0,295
AB	408	0,508
BB	156	0,194
Ax	2	0,002
TOTAL	803	1,000

\*Para o genótipo *JK*, AA = *JK\*01/JK\*01* (antígeno Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>a</sup>), AB = *JK\*01/JK\*02* (antígeno Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>) e BB = *JK\*02/JK\*02* (antígeno Jk<sup>b</sup>/Jk<sup>b</sup>).

Ax = ocorrência de hemizigose, onde há hibridização de umas das sondas dos SNPs esperados do teste em um dos alelos, porém o outro não apresenta ligação com nenhuma das sondas com os SNPs esperados.

Fonte: Própria do autor.

Para o sistema Kidd, o genótipo *JK\*A/JK\*B* de doadores do Amazonas foi o mais frequente e corrobora com os dados de Ribeiro (2016) e Soares (2022) e na maioria dos achados na literatura. Entretanto, o genótipo *JK\*A/JK\*A* foi menos frequente em relação às frequências genotípicas encontradas em trabalhos realizados em Rio Grande do Sul, por Soares (2016), em Santa Catarina, por Costa (2016), no Paraná, por Guelsin (2011), em São Paulo, por Ribeiro (2009), em Minas Gerais, por Alves (2016) e Bahia, por Costa (2016). Apesar da discordância com estes estudos, a frequência do genótipo *JK\*A/JK\*A* deste trabalho concorda com a frequência para povos hispânicos descrita por Hashmi *et al.* (2007).

## 6.5. SISTEMA MNS

Em relação ao genótipo *GYP A* que codifica a expressão dos antígenos M/N e do genótipo *GYP B* que codifica a expressão os antígenos S/s, obteve-se uma frequência genotípica maior para o genótipo *GYP A\*01/GYP A\*02*, de 0,473. Além disso, houve uma genotipagem que apresentou frequência alélica Ax para o SNP 59 C>T do gene *GYP A* (Tabela 9).



Tabela 9. Frequência Genotípica para o genótipo *GYPA/GYPB* e predição fenotípica para antígenos do Sistema MNS KEL (n = 803).

Genótipos esperados	M/N* 59C>T	S/s** 143 T>C	Silencing S (Uvar, Uneg) 230C>T	Silencing S (Uvar, Uneg) In5 G>T
	n / %	n / %	n / %	n / %
AA	295 (0,367)	81 (0,101)	791 (0,985)	801 (0,998)
AB	380 (0,473)	360 (0,448)	12 (0,015)	2 (0,002)
BB	127 (0,158)	362 (0,451)	-	-
Ax	1 (0,001)	-	-	-
TOTAL	803 (1,000)	803 (1,000)	803 (1,000)	803 (1,000)

\*Para o genótipo *GYPA*, AA = *GYPA\*01/GYPA\*01* (antígeno M/M), AB = *GYPA\*01/ GYPA\*02* (antígeno M/N) e BB = *GYPA\*02/ GYPA\*02* (antígeno N/N).

\*\*Para o genótipo *GYPB*, AA = *GYPB\*03/GYPB\*03* (antígeno S/S), AB = *GYPB\*03/ GYPB\*04* (antígeno S/s) e BB = *GYPB\*04/ GYPA\*04* (antígeno s/s).

\*\*\*SNP 230 C>T: AA = ausência de mutação silenciadora de antígeno S com expressão de antígeno U variante ou U negativo e AB = presença da mutação silenciadora de antígeno S com expressão de antígeno U variante ou U negativo, em heterozigose.

\*\*\*\* SNP In5 G>T: AA = ausência de mutação silenciadora de antígeno S com expressão de antígeno U variante ou U negativo e AB = presença da mutação silenciadora de antígeno S com expressão de antígeno U variante ou U negativo, em heterozigose.

Ax = ocorrência de hemizigose, onde há hibridização de umas das sondas dos SNPs esperados do teste em um dos alelos, porém o outro não apresenta ligação com nenhuma das sondas com os SNPs esperados.

n: frequência absoluta de doadores; %: frequência relativa

Fonte: Própria do autor.

Em relação ao genótipo *GYPA* que codifica a expressão dos antígenos M/N e do genótipo *GYPB* que codifica a expressão os antígenos S/s, obteve-se uma frequência genotípica maior para o genótipo *GPA\*01/GPA\*02* concordante com os dados de Costa (2016) e Ribeiro (2009).

Para o genótipo *GYPB*, a frequência genotípica para *GPB\*04/GPB\*04* de 0,451 foi mais predominante. O genótipo *GYPB\*03N.02* relacionado ao fenótipo Uvar decorrente de um SNP que silencia expressão do gene *GYPB* foi encontrado em heterozigose na frequência de 0,015 para doadores de sangue do Amazonas e fenótipo U- devido ao SNP In5 g>t (*GYPB-Int5*), em frequência de 0,002, respectivamente. Estes genótipos são raros de serem encontrados

em caucasianos e pode ser encontrado em aproximadamente 1% de indivíduos afrodescendentes (DANIELS, 2013).

Para o genótipo *GPB*, a frequência genotípica para *GPB\*04/GPB\*04* de 0,451 foi mais predominante e concorda dos dados de Ribeiro (2009) que teve predomínio de genótipo *GPB\*04/GPB\*04* e discorda com os dados de Costa (2016). Hashmi *et al.* (2007) fez um estudo comparando frequência conforme origem étnica obtida por autodeclaração de doadores de sangue, achando predomínio de frequência *GPB\*04/GPB\*04* em doadores de origem afrodescendente e hispânicos. Isso deve ter ocorrido porque a apesar da miscinegação étnica populacional brasileira, há determinadas concentrações de caucasianos no sul do Brasil.

#### 6.6. SISTEMAS LUTHERAN, DIEGO, COLTON e DOMBROCK

A frequência genotípica dos doadores de sangue do Amazonas para os sistemas *LU*, *DI*, *CO* e *DO* apresenta-se consolidada na tabela 10.

Tabela 10. Frequência genotípica para os genótipos *LU*, *DI*, *CO* e *DO* e predição fenotípica para os antígenos Lu, Di, Co, Do, Hy e Jo (n = 803).

Genótipos esperados	Lu <sup>a</sup> /Lu <sup>b</sup> 1 230 A>G	Di <sup>a</sup> /Di <sup>b</sup> 2 2561 C>T	Co <sup>a</sup> /Co <sup>b</sup> 3 134 C>T	Do <sup>a</sup> /Do <sup>b</sup> 4 793 A>G	Hy+/Hy 5 323 G>T	Jo(a+)/Jo(a) 6 350 C>T
	n / %	n / %	n / %	n / %	n / %	n / %
AA	1 (0,001)	2 (0,002)	786 (0,979)	85 (0,106)	792 (0,986)	782 (0,974)
AB	34 (0,042)	77 (0,096)	17 (0,021)	344 (0,428)	11 (0,014)	21 (0,026)
BB	768 (0,956)	722 (0,901)	-	374 (0,466)	-	-
TOTAL	803 (1,000)	801* (1,000)	803 (1,000)	803 (1,000)	803(1,000)	803 (1,000)

<sup>1</sup> Para o genótipo *LU*, AA = *LU\*01/LU\*01* (antígeno Lu<sup>a</sup>/ Lu<sup>a</sup>), AB = *LU\*01/LU\*02* (antígeno Lu<sup>a</sup>/ Lu<sup>b</sup>) e BB = *LU\*02/LU\*02* (antígeno Lu<sup>b</sup>/ Lu<sup>b</sup>).

<sup>2</sup> Para o genótipo *DI*, AA = *DI\*01/DI\*01* (antígeno Di<sup>a</sup>/ Di<sup>a</sup>), AB = *DI\*01/DI\*02* (antígeno Di<sup>a</sup>/ Di<sup>b</sup>) e BB = *DI\*02/DI\*02* (antígeno Di<sup>b</sup>/ Di<sup>b</sup>). Duas genoipagens tiveram pouca emissão de sinal para os alelos deste genótipo, sendo desconsiderados para análise. \* Foi considerado n = 801.

<sup>3</sup> Para o genótipo *CO*, AA = *CO\*01/CO\*01* (antígeno Co<sup>a</sup>/ Co<sup>a</sup>) e AB = *CO\*01/CO\*02* (antígeno Co<sup>a</sup>/ Co<sup>b</sup>).

<sup>4</sup> Para o genótipo *DO*, AA = *DO\*01/DO\*01* (antígeno Do<sup>a</sup>/ Do<sup>a</sup>), AB = *DO\*01/DO\*02* (antígeno Do<sup>a</sup>/ Do<sup>b</sup>) e BB = *DO\*02/DO\*02* (antígeno Do<sup>b</sup>/ Do<sup>b</sup>).

<sup>5</sup> Para o genótipo *DO*, AA = *Ausência do alelo DO\*04* (antígeno Hy+/Hy+) e AB = *-/DO\*04* (antígeno Hy+/Hy).

<sup>6</sup> Para o genótipo *DO*, AA = *Ausência do alelo DO\*05* (antígeno Jo(a+)/ Jo(a+)) e AB = *-/DO\*05* (antígeno Jo(a+)/Jo(a)).

n: frequência absoluta de doadores; %: frequência relativa.

Fonte: Própria do autor.

Em baixa frequência populacional, a frequência genotípica para o genótipo *LU\*01/LU\*01* foi de 0,001 e para o genótipo *DI\*01/ DI\*01* foi de 0,002. Não houve, para a mesma análise, presença de doadores com genótipos em homozigose para os genótipos *CO\*02*, *DO\*04* e *DO\*05*.

Os sistemas Diego, Colton, Dombrock, LW e Scianna apresentam uma distribuição populacional mais preservada e, conseqüentemente, seus respectivos antígenos. Atualmente, não são considerados antígenos que precisam ser respeitados em relação à segurança transfusional para pacientes politransfundidos aloimunizados contra antígenos eritrocitários ou em esquema de transfusão crônica, conforme descrito no artigo 188, parágrafo 18, anexo IV, da portaria de consolidação N.º 5, que dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos, emitida pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

Porém, os anticorpos produzidos em relação à aloimunização que podem causar reações transfusionais importantes e que precisam ser discutidas caso a caso, em função da clínica do paciente assim como das peculiaridades regionais relacionadas à frequência populacional considerando a presença de um determinado antígeno, como por exemplo os do Sistema Diego em populações com mais presença de indivíduos asiáticos e/ou ameríndios (ZACARIAS *et al.*, 2016; CASTILHO, 2016).

A frequência genotípica para o genótipo  $LU^*01/LU^*01$ , que é considerada de baixa frequência populacional, foi concordante neste estudo conforme os dados de Delaney *et al.* (2015) e Langer *et al.* (2019). Os anticorpos do Sistema Lutheran normalmente não são clinicamente significativos, apesar de haver registros DHPN de forma branda, os títulos destes anticorpos diminuem ao ponto de não serem detectados após alguns meses do evento de alo imunização causado (PINHEIRO, 2021).

A frequência genotípica de  $DI^*01/DI^*01$  (0,002) e  $DI^*01/DI^*02$  (0,096) deste estudo foi discordante dos dados de Soares (2022), pois para homozigose do alelo de baixa frequência populacional, na amostra estudada, os resultados dos doadores foram diferentes ( $p < 0,05$ ). Porém, concordantes com os dados trabalhos realizados em Rio Grande do Sul, por Costa (2016), em São Paulo e Bahia, por Costa (2016). Para  $DI^*01/DI^*02$ , a frequência genotípica de 0,096 deste concordou com as frequências de  $Di^a$  encontradas nos trabalhos realizados por Caldas *et al.* (2022) em Belém-PA e Sanguino *et al.* (2016) em Manaus, porém divergindo dos dados encontrados em estudos realizados em demais regiões brasileiras publicados até o momento ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao Sistema Colton, a frequência genotípica foi de 0,979 para o genótipo  $CO^*01/CO^*01$  enquanto para o genótipo  $CO^*01/CO^*02$  foi de 0,021. Esses dados concordam com os resultados de Hajar *et al.*, 2020, em estudo realizado na Malásia.

Os anticorpos Colton são normalmente da classe IgG, produzidos após exposição seja por transfusão sanguínea, seja por gestação. São detectados principalmente em testes que envolvem o uso de antiglobulina humana, com temperatura ótima de reação a 37°C. São clinicamente significativos, envolvidos com casos graves de reações transfusionais hemolíticas e doença hemolítica perinatal.

Para o Sistema Dombrock, a frequência genotípica foi analisada através do polimorfismo dos SNPs para o genótipo  $DO^*01$ ,  $DO^*02$ ,  $DO^*04$  e  $DO^*05$ . O resultado da frequência de  $DO^*01$  (0,106) foi semelhantes às frequências de

africanos em um grupo de doadores que se autodeclararam afro-americanos ( $p > 0,05$ ), porém discordantes dos grupos caucasianos, asiáticos e hispânicos do mesmo estudo ( $p < 0,05$ ) (HASHMI, 2007).

Analisando as frequências genótípicas de outros trabalhos realizados no Brasil, observa-se que a frequência de  $DO^*B/DO^*B$  deste estudo (0,466) foi maior em relação ao estudo de Bianchi (2016) a qual demonstrou que a maior frequência genotípica observada no sistema Dombrock foi para o genótipo  $DO^*A/DO^*B$ , assim como os resultados descritos por Piassi *et al.* (2013), na população estudada de doadores de Minas Gerais. Os alelos  $DO^*02.04$  (Hy) e  $DO^*02.05$  (Jo<sup>a</sup>) são de alta frequência na população e foram observados em frequência de 0,986 e 0,974, respectivamente. Porém, em heterozigose para  $DO^*02.04$  e  $DO^*02.05$  com frequência genotípica que concorda com os dados destes autores.

## 6.7. SISTEMAS LANDSTEINER-WIENER E SCIANNA

A frequência genotípica dos doadores de sangue do Amazonas para os sistemas *LW* e *SC* apresenta-se consolidada na tabela 11.

Tabela 11. Frequência genotípica para os genótipos *LW* e *SC* e predição fenotípica para os antígenos *LW* e *Sc* (n = 803).

Genótipos esperados	LW <sup>a</sup> / LW <sup>b</sup> *	Sc1/Sc2 **
	308 A>G	169 G>A
	n / %	n / %
AA	801 (0,998)	799 (0,995)
AB	2 (0,002)	2 (0,002)
BB	-	2 (0,002)
TOTAL	803(1,000)	803(1,000)

\*Para o genótipo *LW*, AA =  $LW^*05/LW^*05$  (antígeno LW<sup>a</sup>/ LW<sup>a</sup>) e AB =  $LW^*05/LW^*07$  (antígeno LW<sup>a</sup>/ LW<sup>b</sup>).

\*\*Para o genótipo *SC*, AA =  $SC^*01/SC^*01$  (antígeno Sc1/Sc1), AB =  $SC^*01/SC^*02$  (antígeno Sc1/Sc2) e BB =  $SC^*02/SC^*02$  (antígeno Sc2/Sc2).

n: frequência absoluta de doadores; %: frequência relativa.

Fonte: Própria do autor.

Em baixa frequência populacional, a frequência genotípica para o genótipo *SC\*02/ SC\*02* foi de 0,002. Não houve, para a mesma análise, presença de doadores com genótipos em homozigose para os genótipos *LW\*07*.

Os resultados encontrados para a frequência do genótipo *LW* neste estudo, com alta frequência para *LW\*05* (*LW<sup>a</sup>*) e baixa frequência *LW\*07* (*LW<sup>b</sup>*), são concordantes com os dados de Srivastava (2014), de forma bastante difundida em diferentes populações.

O sistema *Scianna* apresentou frequência para o alelo *SC\*02/SC\*02* de 0,002 sendo que Ribeiro (2009) obteve frequência genotípica de 0,000 para o mesmo alelo.

## 6.8. COMPARATIVO DE GENOTIPAGENS EM OUTRAS REGIÕES DO BRASIL

Soares (2022) fez um comparativo de alguns estudos de genotipagens realizadas no Brasil e que permite uma análise junto aos dados das genotipagens de doadores de sangue do Amazonas, conforme demonstrado no Quadro 1.

Assim, é possível visualizar como há variação das frequências genotípicas dos principais sistemas de grupos sanguíneos conforme a miscigenação étnico-populacional brasileira.

Quadro 1. Frequências genótípicas para os sistemas de grupos sanguíneos RH, FY, K, JK, GPA/B e DI de doadores de sangue do Estado do Amazonas comparados à genotipagens realizadas em outros Estados.

Genótipo	DOADORES HEMOAM (n = 803)	RS (n = 810)	SC (n = 373)	PR (n = 400)	SP (n = 948)	MG (n = 287)	BA (n = 196)
Sistema Rh							
<i>RHCE</i> *C/C	<b>0,296 (238)</b>	0.175 (142)	0.161 (60)	0.175 (70)	0.170 (161)	0.132 (38)	0.102 (20)
<i>RHCE</i> *C/c	<b>0,248 (199)</b>	0.515 (417)	0.427 (159)	0.427 (171)	0.490 (465)	0.369 (106)	0.398 (78)
<i>RHCE</i> *c/c	0,456 (366)	0.310 (251)	0.412 (154)	0.398 (159)	0.340 (322)	0.499 (143)	0.500 (98)
<i>RHCE</i> *E/E	<b>0,086 (69)</b>	0.067 (54)	0.026 (10)	0.022 (9)	0.020 (19)	0.027 (8)	0.020 (4)
<i>RHCE</i> *E/e	0,188 (151)	0.232 (187)	0.255 (95)	0.257 (103)	0.260 (246)	0.212 (61)	0.189 (37)
<i>RHCE</i> *e/e	0,726 (583)	0.701 (564)	0.719 (268)	0.721 (288)	0.720 (683)	0.761 (218)	0.791 (155)
Sistema Duffy							
<i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *A	<b>0,299 (240)</b>	0.176 (143)	0.184 (69)	0.125 (50)	0.120 (114)	0.098 (28)	0.127 (25)
<i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B	0,486 (390)	0.493 (399)	0.473 (176)	0.480 (192)	0.480 (455)	0.397 (114)	0.460 (90)
<i>FY</i> *B/ <i>FY</i> *B	0,213 (171)	0.331 (268)	0.343 (128)	0.395 (158)	0.400 (379)	0.505 (145)	0.413 (81)
Duffy Silenciado							
<i>GATA-67</i> T/T	0,741 (595)	0.935 (757)	0.944 (352)	0.780 (312)	0.690 (654)	0.568 (163)	0.318 (62)
<i>GATA-67</i> T/C	0,227 (182)	0.061 (50)	0.037 (14)	0.195 (78)	0.250 (237)	0.297 (85)	0.492 (97)
<i>GATA-67</i> C/C	0,032 (26)	0.004 (3)	0.019 (7)	0.025 (10)	0.060 (57)	0.135 (39)	0.190 (37)
Sistema Kidd							
<i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A	0,295 (156)	0.225 (182)	0.295 (110)	0.272 (109)	0.280 (265)	0.383 (110)	0.378 (74)
<i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B	0,508 (408)	0.532 (431)	0.472 (176)	0.480 (192)	0.520 (493)	0.457 (131)	0.480 (94)
<i>JK</i> *B/ <i>JK</i> *B	<b>0,295 (237)</b>	0.243 (197)	0.233 (87)	0.248 (99)	0.200 (190)	0.160 (46)	0.142 (28)

Genótipo	DOADORES HEMOAM (n = 803)	RS (n = 810)	SC (n = 373)	PR (n = 400)	SP (n = 948)	MG (n = 287)	BA (n = 196)
Sistema Kell							
<i>KEL*01/KEL*01</i>	0	0.006 (5)	0	0.002 (1)	0	0	0
<i>KEL*01/KEL*02</i>	0,036 (29)	0.060 (49)	0.057 (21)	0.050 (20)	0.049 (47)	0.041(12)	0.036 (7)
<i>KEL*02/KEL*02</i>	0,964 (774)	0.934 (756)	0.943 (352)	0.948 (379)	0.951 (901)	0.959 (275)	0.964 (189)
Sistema Diego							
<i>DI*01/DI*01</i>	0,002 (2)	0.016 (13)	0	NR	0	NR	0
<i>DI*01/DI*02</i>	<b>0,096 (77)</b>	0.030 (24)	0.056 (21)	NR	0.040 (38)	NR	0.030 (6)
<i>DI*02/DI*02</i>	0,901 (772)	0.954 (773)	0.944 (352)	NR	0.960 (910)	NR	0.970 (190)
Sistema MNS							
<i>GYPB*S/GYPB*S</i>	0,101 (81)	0.126 (102)	NR	NR	0.090 (86)	NR	NR
<i>GYPB*S/GYPB*s</i>	0,448 (360)	0.436 (353)	NR	NR	0.380 (360)	NR	NR
<i>GYPB*s/GYPB*s</i>	0,451 (362)	0.438 (355)	NR	NR	0.530 (502)	NR	NR

n = Número de amostras testadas; NR = Não realizado. RS: Doadores de Rio Grande do Sul; SC: Doadores de Santa Catarina; PR: Doadores do Paraná; SP: Doadores de São Paulo; MG: Doadores de Minas Gerais; BA: População mista da Bahia.

p<0,05 para os dados deste estudo comparados com os dados das demais regiões, marcados em negrito.

Fonte: Adaptado de Soares *et al.* (2022) com dados próprios do autor.



De fato, a genotipagem eritrocitária pode contribuir com identificação de genótipos com predições fenotípicas que auxiliam nas tomadas de decisão para diminuir os riscos transfusionais (WILKINSON, 2016; CASTILHO, 2016).

Na área da medicina transfusional, a possibilidade de fornecer sangue fenótipo compatível para pacientes politransfundidos abre uma nova perspectiva podendo inclusive reduzir o número de testes pré-transfusionais. Embora seja pouco provável que a genotipagem molecular venha substituir totalmente a hemaglutinação nos próximos anos, estas técnicas utilizadas em conjunto têm um valor potencial importante na segurança transfusional e materno-fetal.

O levantamento, interpretação de descrição dos dados obtidos neste estudo podem possibilitar aplicabilidade na instituição local de obtenção das genotipagens em questão para fins de identificação dos genótipos e consequente predição fenotípica de doadores de sangue que compõe o banco de dados com os registros destes resultados. Sendo assim, há a possibilidade de identificação de resultados de doadores com sangues considerados raros e que podem ser informados para a Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados e consequente alimentação do banco nacional de Sangues Raros, assim como ampliar as possibilidades fenotípicas para os pacientes atendidos na hemorrede do HEMOAM.

Sugere-se que novos estudos sejam realizados a fim de buscar possíveis doadores que tiveram um dos alelos não reconhecidos pelas sondas previstas na metodologia utilizada. Além disso, em estudo complementar, é proposto investigar a origem étnica dos participantes para correlacionar as frequências analisadas, além de novas pesquisas para analisar a frequência genotípica de doadores e pacientes no norte do Brasil.

## 7. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos do presente trabalho a partir dos dados de genotipagens eritrocitárias dos sistemas de grupos sanguíneos de doadores voluntários de sangue, pode-se concluir:

- Foram analisadas 803 genotipagens eritrocitárias dos genes relacionados aos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton e Sciana que permitiu conhecer a frequência genotípica de doadores de sangue do Estado do Amazonas;
- As frequências genotípicas *RHCE*\*C/C (0,296), *RHCE*\*C/c (0,248), *RHCE*\*E/E (0,086), *FY*\*A/*FY*\*A (0,299), *JK*\*B/*JK*\*B (0,295) e *DI*\*01/*DI*\*02 (0,096) foram diferentes das genotipagens realizadas em outros Estados do Brasil, sendo caracterizadas como um diferencial em relação à frequência genotípica de indivíduos na região Amazônica.
- A partir da frequência genotípica dos SNPs 733C>G *RhCE*-L245V e 1006G>T *RhCE*-G336C no gene *RHCE* foi observada uma frequência de 0,109 de doadores com fenótipos VS+V+ e 0,006 com fenótipos VS+V-;
- Houve 6 casos de predição fenotípica para C como (0)\* (frequência de 0,007) para o antígeno RHC, o que implica na possível presença de antígeno C alterado codificado pelo haplótipo (C) ce<sup>s</sup>;
- O genótipo *GYPB*\*03N.02 relacionado ao fenótipo U<sup>var</sup> decorrente de um SNP que silencia expressão do genótipo *GPB* foi encontrado em heterozigose na frequência de 0,015 para doadores de sangue do Amazonas e fenótipo U- devido ao SNP In5 g>t (*GYPB*-*Int5*), em frequência de 0,002;

- Foram encontrados os genótipos raros para os genótipos *DI\*01/DI\*01* (0,002), *KEL\*06/KEL\*06* (0,001) para o genótipo *LU\*01/LU\*01* foi de 0,001, e para o genótipo *SC\*02/ SC\*02* foi de 0,002. Não houve, para a mesma análise, presença de doadores com genótipos em homozigose para os genótipos *CO\*02*, *DO\*04*, *DO\*05* e *LW\*07*.

## REFERÊNCIAS

ALVES, Vitor Mendonça. **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)**. Orientador: Helio Moraes Souza. 2016. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, 2016. Disponível em: <http://bdtd.uftm.edu.br/handle/tede/678> . Acesso em: 10 fev. 2020.

BEIGUELMAN, B. **Os Sistemas Sanguíneos Eritrocitários**. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC Editora, 3a Edição, 2003.

BELSITO, A. *et al.* Erythrocyte genotyping for transfusion-dependent patients at the Azienda Universitaria Policlinico of Naples. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 52, n. 1, p. 72–77, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473050214002444> . Acesso em: 20 out. 2020.

BIANCHI, J. V. S. *et al.* Comparison of two high-throughput platforms for red blood cell and platelet antigens genotyping. **ISBT Science Series**, v. 10, n. 1, p. 45–51, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/voxs.12177> Acesso em: 05 fev. 2020.

BIANCHI, Juliana Vieira dos Santos. **Genotipagem de grupos sanguíneos por meio de microarranjos líquidos**. Orientador: Ester Cerdeira Sabino. 2016. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/99/99131/tde-19042016-145530/publico/JULIANABIANCHIFINAL.pdf> . Acesso em: 10 fev. 2020.

BONIFACIO, S. L.; NOVARETTI, M. C. Z.. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo , v. 31, n. 2, p. 104-111, abr. 2009 . Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842009000200013&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000200013&lng=en&nrm=iso) . Acesso em: 16 set. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Guia do cadastro nacional de sangue raro [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção Especializada à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília : Ministério da Saúde, 2022. 76 p. Disponível em: [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_cadastro\\_nacional\\_sangue\\_raro.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia_cadastro_nacional_sangue_raro.pdf) . Acesso em: 01 out. 2022.

BRASIL, 2017. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação N.º 5, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. ANEXO IV. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/MatrizesConsolidacao/Matriz-5-Programas.html> . Acesso em: 15 jan. 2020.

CALDAS, A. DOS S. *et al.* Frequency of antigen Di<sup>a</sup> on the blood donor population of the Hemocenter coordinator of the Hemopa Foundation. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 44, p. 352–357, 10 out. 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2531137921000079?via%3Dihub> . Acesso em 14 out. 2023.

CASTILHO, L.. Blood group polymorphisms in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 3, p. 182–183, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1516848416300330>. Acesso em: 9 out. 2022.

CASTILHO, L.; PELLEGRINO JUNIOR, J.; REID, M. E. **Fundamentos de Imuno-hematologia**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2015, 232 p.

CASTILHO, L.. Rare donor program in Brazil. **Immunohematology** , v. 32, p. 11-12, 2016. Disponível em: [https://www.redcrossblood.org/content/dam/redcrossblood/missing-documents/3407\\_Immuno\\_32\\_1\\_07.pdf](https://www.redcrossblood.org/content/dam/redcrossblood/missing-documents/3407_Immuno_32_1_07.pdf) . Acesso em: 28 jan. 2020.

COSTA, Daiane Cobianchi. **Investigação do polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no Estado de Santa Catarina**. Orientador: Maria Cláudia Santos da Silva. 2016. 104 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/167658> . Acesso em: 10 fev. 2020.

COSTA, Daiane Cobianchi. **Genotipagem de grupos sanguíneos no suporte transfusional para pacientes com anemia falciforme**. Orientador: Lilian Maria de Castilho. 2011. 128f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/795465> . Acesso em: 10 set. 2023.

DANIELS, G. **Human Blood Groups**. 3rd edition. Cambridge: Ed. England, 2013, 768 p.

DELANEY, M. *et al.* Red blood cell antigen genotype analysis for 9087 Asian, Asian American, and Native American blood donors: Asian American RBC

Genotype. **Transfusion**, v. 55, n. 10, p. 2369–2375, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/trf.13163> . Acesso em: 15 fev. 2022.

FLÔRES, M. A. L. R. *et al.* Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group system polymorphism in Brazilian Japanese descendants. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 50, n. 1, p. 123–128, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473050213002978>. Acesso em: 17 out. 2022.

FUNG, M.K. *et al.* **Technical manual 19<sup>th</sup>**. ed. Bethesda, MD: AABB Press, 2017.

GASSNER, C. *et al.* International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Report of Basel and three virtual business meetings: Update on blood group systems. **Vox Sang.**, p. vox.13361, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vox.13361> . Acesso em: 1 out. 2022.

GASPARDI, A. C. **Análise de polimorfismos de grupos sanguíneos: impacto no diagnóstico laboratorial e clínico**. Orientador: Lilian Maria de Castilho. 2016. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/967430> . Acesso em: 22 out. 2017.

GUELSIN, G. A. S. *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, 2010. Disponível em: <http://www.rbhh.org/?doi=10.5581/1516-8484.20110009> . Acesso em: 9 out. 2022.

GUZ, K. *et al.* Molecular biology methods for blood cell antigen genotyping in reference laboratories. **J. Transf. Med.** v. 12, n. 4, p. 199-205, 2019. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/2d97/7d38572253fc2acc6ba10b090e8016f80576.pdf> Acesso em: 06 mar. 2020.

HAJAR, C. G. N. *et al.* Extended blood group profiles for Malays, Chinese, and Indians in Peninsular Malaysia. **Egypt. J. Medical Hum. Genet.**, v. 21, n. 1, p. 51, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43042-020-00096-y>. Acesso em: 17 out. 2022.

HALVERSON, G.R.; PEYRARD, T. A review of the Colton blood group system. **Immunohematology**, v. 26, n. 1, p. 22–26, 2010. Disponível em: <https://www.sciendo.com/article/10.21307/immunohematology-2019-196> . Acesso em: 17 ago. 2022.

IMMUCOR. **IMMUCOR PrecyseType™ HEA: Molecular BeadChip™ Test**. 2014. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/88548/download> Acesso em: 05 jan. 2020.

ISBT. **Blood Group Allele Terminology**. Table of blood group systems v11.2\_ 31-JUL-2023. 2013. Disponível em: <https://www.isbtweb.org/resource/tableofbloodgroupsystems.html> . Acesso em: 30 out. 2023.

KALINICZENKO, A. *et al.* Frequency of the DI\*A, DI\*B and Band 3 Memphis polymorphism among distinct groups in Brazil. **Hematol. Transfus. Cell. Ther.**, p. S2531137922000529, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2531137922000529>. Acesso em: 9 out. 2022.

LANE, W. J. *et al.* Automated typing of red blood cell and platelet antigens: a whole-genome sequencing study. **The Lancet Haemat.**, v. 5, n. 6, p. e241–e251, jun. 2018. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanhae/article/PIIS2352-3026\(18\)30053-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanhae/article/PIIS2352-3026(18)30053-X/fulltext) . Acesso em: 10 set. 2022.

LANGER, I. B. V. *et al.* Genotyping of Dombrock and Lutheran blood group systems in blood donors from the southwestern region of the state of Paraná, Southern Brazil. **Hematol. Transfus. Cell. Ther.**, v. 41, n. 1, p. 25–30, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2531137918301007> . Acesso em: 9 out. 2022.

LUO, X. *et al.* Strategies to identify candidates for D variant genotyping. **Blood Transfus.** v.5, p. 1-9, abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2450/2017.0274-16>. Acesso em: 22 out. 2019.

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 Sang.** v. 106, p.197-208. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vox.12086> . Acesso em: 31 jan. 2020.

MENEGATI, S.F.P. *et al.* Discrepancies between red cell phenotyping and genotyping in daily immunohematology laboratory practice. **Transfus Apher Sci.** V. 9:102585 jul. 2019. Disponível em: doi:10.1016/j.transci.2019.06.020. Acesso em: 02 fev. 2020.

MONTEIRO, L. A. *et al.* Frequências fenotípicas dos sistemas de grupos sanguíneos ABO, Rh e Kell em doadores de sangue da região metropolitana de Belém-PA. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 52, n. 4, 2020. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/frequencias-fenotipicas-dos-sistemas-de-grupos-sanguineos-abo-rh-e-kell-em-doadores-de-sangue-da-regiao-metropolitana-de-belem-pa/> . Acesso em: 7 out. 2022.

MOTA, M. *et al.* RHD Allelic Identification Among D– Brazilian Blood Donors as a Routine Test Using Pools of DNA. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 26, p. 104–108, fev. 2012.

Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.21489/abstract> . Acesso em: 20 jan. 2020. doi:10.1002/jcla.21489

MOUSSA, Hajer; GHOMMEN, Néjiba. (C)ces haplotype screening in Tunisian blood donors. **Blood Transfus.**, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2450/2013.0153-13> . Acesso em: 7 out. 2022.

OSMAN, N.H. *et al.* Importance of extended blood group genotyping in multiply transfused patients. **Transfus. Apher. Sci.**, v. 56, p. 410-416 mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.03.009>. Acesso em: 05 fev. 2020.

PACCAPELO, C. *et al.* HEA BeadChip™ technology in immunohematology. **Immunohematology.**, v. 31, n. 2, p. 81-90, 2015. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/283263727\\_HEA\\_BeadChip\\_technology\\_in\\_immunohematology](https://www.researchgate.net/publication/283263727_HEA_BeadChip_technology_in_immunohematology). Acesso em: 19 nov. 2019.

PINHEIRO, C. J.T. *et al.* A frequência e a importância da identificação de anticorpos sanguíneos em doadores de sangue com pesquisa de anticorpos irregulares positiva no estado do Amapá. **Vigil Sanit Debate.**, v. 9, n. 3, p. 77–83, 2021. Disponível em: <https://www.redalyc.org/journal/5705/570569953010/html/#B14> . Acesso em: 17 out. 2022.

REID, M. E.; LOMAS-FRANCIS C.; OLSSON, L. **The blood group antigen. FactsBook.** 3rd ed. London: Elsevier, 2012.

RIBEIRO, K. A. R. **Genotipagem eritrocitária em larga escala: impacto na medicina transfusional.** Orientador: Lilian Maria de Castilho. 2009. 105 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009. Disponível em: [https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNICAMP-30\\_c0246f4d64c7bf8e6267b9996740a7a9](https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNICAMP-30_c0246f4d64c7bf8e6267b9996740a7a9). Acesso em 18 ago. 2022.

SANGUINO, E. C. *et al.* Atypical associations between *DI \*A* and *DI \*B* alleles and the band 3-Memphis mutation in Amazonian inhabitants. **ISBT Science Series**, v. 11, n. 2, p. 88–93, ago. 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/voxs.12285> . Acesso em 18 jan. 2020

SIQUEIRA, Vanessa D'Avila Siqueira; BOTH, Fernanda Lima; JACOCIUNAS, Laura Vicedo. Análise do perfil de Rh e Kell em doadores de sangue em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Clin. Biomed. Res.**, v. 42, n. 1, 2022. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/hcpa/article/view/110224> . Acesso em: 7 out. 2022.

SOARES, Scheila da Silva; AQUINO, Josiane Rodrigues; PETROLLI, Francini; *et al.* Frequencies of genetic variants of the Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS and Diego systems of northwest Rio Grande do Sul, Brazil. **Hematol. Transfus. Cell. Ther.**, p.



S2531137922000852, 2022. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2531137922000852> . Acesso em: 9 out. 2022.

SOUZA SILVA, Thamy C.; CRUZ, Bruno R.; COSTA, Sidneia S.; *et al.* RHD and RHCE molecular analysis in weak D blood donors and in patients with Rh antibodies against their own corresponding Rh antigen. **Blood Transfus.**, 2020. Disponível em:  
<https://doi.org/10.2450/2020.0026-20> . Acesso em: 6 out. 2022.

SRIVASTAVA, Kshitij; ALMARRY, Noorah Salman; FLEGEL, Willy A. Genetic variation of the whole *ICAM4* gene in Caucasians and African Americans: *ICAM4* Alleles of the LW Blood Group System. **Transfusion**, v. 54, n. 9, p. 2315–2324, 2014. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/trf.12615> . Acesso em: 18 out. 2022.

STORRY *et al.* International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. **Vox Sang.**, v. 114, p. 95-102, 2019. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/vox.12717>. Acesso em: 15 fev. 2020.  
DOI: 10.1111/vox.12717

VAN DER SCHOOT, C. E.; DE HAAS, M.; ENGELFRIET, C. P.; *et al.* Genotyping for red blood cell polymorphisms. **Vox Sang.**, v. 96, n. 2, p. 167–179, 2009. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1423-0410.2008.01131.x> . Acesso em: 9 out. 2022.

ZACARIAS, Joana Maira Valentini; LANGER, Ieda Bernadete Volkweis; VISENTAINER, Jeane Eliete Laguila; *et al.* Profile of Rh, Kell, Duffy, Kidd, and Diego blood group systems among blood donors in the Southwest region of the Paraná state, Southern Brazil. **Transfus. Apher. Sci.**, v. 55, n. 3, p. 302–307, 2016. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147305021630101X> . Acesso em: 9 out. 2022.

WESTHOFF, C.M. Blood group genotyping. **Blood.**, v. 133, n. 17, p. 1814-1820. Abr. 2019. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-abstract/133/17/1814/275900/Blood-group-genotyping?redirectedFrom=fulltext> . Acesso em: 10 fev. 2020. doi: 10.1182/blood-2018-11-833954

WILKINSON, David S. Clinical Utility of Genotyping Human Erythrocyte Antigens. **Lab. Medicine**, v. 47, n. 3, p. e28–e31, 2016. Disponível em:  
<https://academic.oup.com/labmed/article-lookup/doi/10.1093/labmed/lmw014> . Acesso em: 6 out. 2022.

YEE, M. E. M. *et al.* Red blood cell minor antigen mismatches during chronic transfusion therapy for sickle cell anemia. **Transfusion**, v. 57, p. 2738-2746, 2017. Disponível em: [doi:10.1111/trf.14282](https://doi.org/10.1111/trf.14282) . Acesso em: 05 jun. 2020.

## ANEXOS

ANEXO I -PROTICOLO 1- Extração de DNA genômico (BrazolTM LAC Biotecnológica)

### **Fase 1 – extração do DNA**

Pipetar 200µL da amostra de sangue em um microtubo de 2,0 mL, devidamente identificados. Se possível pipetar somente o creme leucocitário (buffy coat);

Adicionar 400µL de Brazol gelado (4°C) e agitar no vortex até a mostra adquirir um aspecto homogêneo;

Adicionar 100µL de clorofórmio gelado (4°C) e misturar no vortex até a amostra adquirir uma coloração marrom;

Centrifugar a amostra 12 minutos a 10.000 rpm em T.A;

Após a centrifugação, retirar o microtubo cuidadosamente da centrífuga e verificar se a solução está dividida em duas fases;

Pipetar cuidadosamente o sobrenadante e transferir para tubos para tubos de 1,5 mL devidamente identificados;

### **Fase 2 – precipitação do DNA genômico**

Adicionar 500µL de etanol a 100% gelado (4°C), homogeneizar no vortex e observar a formação de um precipitado. O precipitado é usualmente visualizado em 30 e 60 segundos;

Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm em T.A;

Decantar o sobrenadante e adicionar novamente 500µL de etanol a 100% gelado (4°C); 4- Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm em T.A;

Decantar o sobrenadante;

Remover o etanol residual com pipeta e colocar no banho seco a 56°C por 10 minutos; 7- Adicionar 200µL de água destilada estéril em cada tubo (H2O<sub>dd</sub>);

8- Quantificar o DNA genômico utilizando o equipamento NanoDrop 1000; 9- Armazenar o DNA purificado a 4°C ou a -20°C.

## PROTOCOLO 2- Genotipagem – PCR - BeadChip® KIT HEA

1. Os controles positivo e negativo (H<sub>2</sub>O livre de nuclease) devem ser incluídos em cada conjunto de testes.
2. Podem ser utilizadas pipetas multicanais ou monocanal, de acordo com a preferência do laboratório. Todas as pipetas utilizadas devem ser calibradas.
3. Misturar corretamente as amostras e os reagentes. Evite fazer espuma ou bolhas.
4. Retirar as quantidades necessárias de reagentes, amostras e controles. Se estiverem congelados, descongelar antes da sua utilização.
5. Retirar as lâminas do BeadChip da geladeira e deixar em temperatura ambiente durante 15 minutos antes de utilizar.
6. É extremamente importante evitar a contaminação cruzada entre os vários poços BeadChip. Tenha cuidado quando pipetar, lavar ou remover fluidos.
7. É necessária uma pipetagem precisa das amostras e dos reagentes para obter resultados precisos.
8. O BioArray Solutions AIS 400 Array Imaging System e o forno de hibridização (Boekel Inslide-Out, modelo 241000) devem ser ligados no mínimo 30 minutos antes do funcionamento e ajustado à temperatura para **53°C**. Coloque 2 toalhas de papel no tabuleiro do forno de hibridização e umedeça-as com 25mL de água destilada e deionizada (H<sub>2</sub>Odd) para manter as condições de umidade durante a incubação. Se o forno de hibridização foi utilizado anteriormente durante o dia, substitua as toalhas de papel por 2 novas e umedeça-as novamente com a mesma quantidade da água deionizada.

## DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

### Preparo dos reagentes:

1. Determinar o número de amostras e controles que devem ser testados.
2. Verificar o nome dos reagentes, lotes, validade e fabricante
3. Comparar o lote do kit de reagentes com o lote das lâminas a serem utilizadas (Os lotes devem ser os mesmos).
4. Os reagentes devem permanecer resfriados (gelo) por um período de 5 a 10 minutos antes de serem utilizados (exceto a *Clean Up* que deve ser mantido no freezer até a hora do uso).
5. Depois de descongelados, todos os reagentes devem ser agitados (vortex e spin) e armazenar imediatamente o restante do reagente que não foi utilizado.

**Nota:** Recomendam-se áreas laboratoriais distintas para os procedimentos pré-PCR e pós-PCR, para prevenir contaminação. Os passos descritos abaixo devem ser realizados na área do laboratório pré-PCR e sempre devem ser utilizadas ponteiros com filtro.

6. Consultar a tabela abaixo para preparar os reagentes. A tabela é uma diretriz, com acréscimo de 10% do volume necessário para a realização dos ensaios (o volume para 1 amostra é exato sem reagente em excesso).
7. Preparar o PCR Master Mix de acordo com a tabela abaixo e manter em gelo (rack térmica) até o momento de ser utilizado. Quando calcular o número de testes, lembre-se de incluir os controles.

Reagentes / Amostras		1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
HEA eMAP PCR Mix $\mu$ l	Adicionar em um Flaconete	16	144	296	448	592	736	880	1008	1168	1296	1456	1584	1744
HotStar Taq DNA polymerase ( $\mu$ l)		1	9	18.5	28	37	46	55	63	73	81	91	99	109

8. De acordo com a tabela abaixo, aliquotar o PCR Master Mix numa tira de 8 tubos.

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volume ( $\mu$ l) por tubo na tira	Ir para etapa 9	38	86	76	82	112	128	148	164	188	200	224

**NOTA:** Se aplicável utilizar cubeta alternativa para a pipetagem com a pipeta multicanal.

**NOTA:** Se aplicável utilizar cubeta alternativa para a pipetagem com a pipeta multicanal.

**NOTA:** Remover todas as bolhas de ar existentes no fundo da tira antes de pipetar os reagentes. Este passo é muito crítico.

9. Dispensar 17 $\mu$ L do PCR Master Mix em cada microtubo apropriadamente identificado. Sempre utilizar ponteiras com filtros.
10. Selar os microtubos e transferir para área especifica para a adição do DNA, fora da área pré-PCR.
11. Pipetar 8 $\mu$ L de DNA em cada microtubo de PCR e homogeneizar 3 vezes com a pipeta ou utilizar vórtex
12. Para o controle negativo dispensar 8 $\mu$ L de H<sub>2</sub>Odd (*nuclease free*) no microtubo apropriado e homogeneizar 3 vezes com a pipeta utilizando sempre ponteira com filtro.
13. Selar cuidadosamente os microtubos, agitar levemente (vortex) e centrifugar (spin).
14. Colocar os microtubos no termociclador e selecionar o protocolo do PCR desejado.

Por exemplo: Modelo Applied Biosystems – Modelo Veriti

94°C - 15 min

94°C - 30 seg, rampa de 60%

60°C - 30 seg, rampa 50%

68°C - 50 seg, rampa 35%

68°C – 8 min

} 30 ciclos

4°C até a retirada das amostras. As amostras não devem ficar no equipamento por mais de 24 horas.

Após o término da reação, retirar os produtos de PCR do termociclador e centrifugar.

**NOTA:** Devido à diferença entre os termocicladores, cada instrumento deve obrigatoriamente ser validado com amostras conhecidas para avaliar o seu desempenho.

As amostras centrifugadas e os controles devem ser usados imediatamente, mas podem ser armazenados a temperatura  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  durante 4 semanas.

### PROCESSAMENTO PÓS-PCR (Tratamento Amplicons)

1. Agitar os produtos de PCR vigorosamente e centrifugar (vortex e spin – segurar o botão de spin até a velocidade máxima da centrifuga e soltar).
2. Preparar e identificar uma nova tira
3. Transferir 6,5µL de cada produto de PCR para a nova tira. Utilizar somente **ponteiras com filtro**.
4. Aliquotar o Reagente *Clean Up* para a realização dos testes numa tira de 8 ou 16 tubos. Utilizar pipeta monocal, e adicionar reagentes conforme tabela abaixo:

Amostras		1	8	16
Clean Up Stock solução de trabalho µl	Flaconetes	2	18	36

Se for realizar teste > 16 amostras utilizar pipeta multicanal conforme tabela abaixo:

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volume (µl) do Reagente Clean up por tubo na tira	Ir para a etapa 5	6	9	12	14	16	18	20	22	24	26	28

5. Adicionar 2µL de reagente *Clean Up* a cada poço e homogeneizar 3 vezes com pipeta. Descartar o reagente que não foi utilizado. Utilizar somente **ponteiras com filtro**.

**Nota:** Realizar o procedimento cuidadosamente para garantir resultados corretos quando for pipetar volumes pequenos.

Armazenar o reagente *Clean Up* que não foi utilizado e manter os demais reagentes em gelo.

6. Selar cuidadosamente o microtubo, agitar levemente (vortex) e centrifugar (spin).

7. Colocar o microtubo no termociclador e executar o seguinte protocolo:

37 °C 25 min.

80°C 15 min.

4 °C até à remoção das tiras. O tempo não deve ultrapassar a 3 horas

NOTA: As amostras centrifugadas e os controles devem ser usados imediatamente, mas podem ser armazenados a temperatura  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  até 24 horas no freezer "**no frost free**".

#### PROCESSAMENTO PÓS-PCR - OBTENÇÃO DA FITA SIMPLES (LAMBDA EXONUCLEASE)

1. Homogeneizar (vortex) e centrifugar (spin) os microtubos contendo os produtos de PCR limpos.
2. Aliquotar o reagente Lambda Exonuclease para realização dos testes numa tira de 8 ou 16 microtubos. Se for utilizar pipeta monocal, adicionar reagentes conforme tabela abaixo:

Amostras		1	8	16
Volume (ul) Lambda Exonuclease	Flaconetes	2	18	36

Se for realizar teste > 16 amostras utilizar pipeta multicanal conforme tabela abaixo

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volume (ul) do Reagente Lambda Exonuclease por tubo na tira	Ir para a etapa 3	6	9	12	14	16	18	20	22	24	26	28

Armazenar o reagente Lambda Exonuclease não utilizado e manter os reagentes em gelo.



3. Adicionar a cada microtubo 2 $\mu$ L da solução de Lambda Exonuclease e homogeneizar 3 vezes com uma pipeta
4. Selar cuidadosamente o microtubo, agitar levemente (vortex) e centrifugar (spin).

5. Colocar o microtubo no termociclador e executar o seguinte protocolo:

37 °C 25 min.

80°C 15 min.

4 °C até a remoção das tiras. O tempo não deve ultrapassar a 3 horas

NOTA: As amostras centrifugadas e os controles devem ser usados imediatamente, mas podem ser armazenados a temperatura  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  até 16 horas no freezer "**no frost free**".

6. Ligar e preparar a incubadora Boekel Scientific (colocar papel toalha umedecido com H<sub>2</sub>Odd) e deixar atingir a temperatura de 53°C.
7. Ligar o sistema de captura de imagem (X-Cite e o Opti Scan II) e abrir o programa AISR3.0VI.
8. Identificar as lâminas contendo os BeadChips e deixá-las à TA por 15 minutos.
9. Transferir os dados do CD para o computador (Esta etapa deve ser realizada na abertura de cada kit).

#### **HIBRIDIZAÇÃO DO DNA ALVO NO BeadChip™**

**NOTA: Os passos 4 ao 11 não podem ser interrompidas em hipótese alguma.**

1. Verificar se o forno de hibridização está na temperatura de 53°C.
2. Assegurar que as lâminas do BeadChip estão em temperatura ambiente.
3. Agitar os produtos de PCR vigorosamente e centrifugar (vortex e spin).
4. Aliquotar o reagente Elongação eMAP® para realização dos testes numa tira de 8 ou 16 microtubos. Ter cuidado para evitar a formação de espuma. Se for utilizar pipeta monocal, adicionar reagentes conforme tabela abaixo:

Amostras		1	8	16
Volume (ul) eMAP elongase	Flaconetes	10	90	180

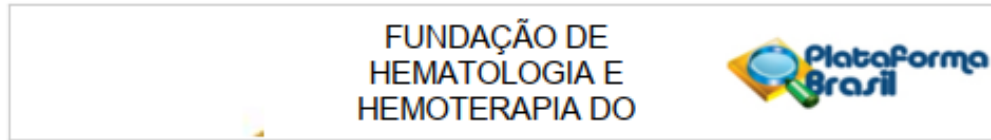
Se for realizar teste > 16 amostras utilizar pipeta multicanal conforme tabela abaixo

Até a amostra	#	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
eMAP Elongase (ul) Volume (ul) por tubo na tira	Ir para etapa 5	25	36	47	59	70	80	90	100	114	125	135

**NOTA:** Retirar todas as bolhas de ar no fundo da tira antes de prosseguir com a pipetagem dos reagentes.

5. Adicionar 10µL do reagente eMAP® em cada amostra e homogeneizar 3 vezes com a pipeta. Utilizar somente **ponteiras com filtro**. Descartar o reagente que não foi utilizado.
6. Transferir 15µL do Mix para o HEA BeadChip correspondente. Utilizar somente **ponteiras com filtro**.
7. Colocar as lâminas BeadChip™ no forno de hibridização e incubar durante 30 minutos a 53°C.
8. Retirar as lâminas do forno e lavar com H<sub>2</sub>Odd mantendo a lâmina na vertical segurando nas laterais.
9. Enxaguar cada BeadChip individualmente com H<sub>2</sub>Odd sob um fluxo de pressão constante. O fluxo de água deve ser perpendicular à face da lâmina e a aproximadamente 2,5 cm de distância. Enxaguar cada BeadChip durante aproximadamente 3 segundos
10. Remover o excesso da água da lâmina utilizando ar comprimido. Não agitar a embalagem de ar comprimido. Remover o excesso de água da parte traseira da lâmina com papel toalha.
11. Ler as lâminas BeadChip utilizando o BioArray Solutions AIS400 Array Imaging System. Processar as imagens utilizando o software HEA Analysis no BioArray Solutions Information System (BASIS).

## ANEXO II - PARECER CONSUBSTANCIADO DA PLATAFORMA BRASIL



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS PRINCIPAIS SISTEMAS DE GRUPOS SANGÜINEOS ERITROCITÁRIOS EM DOADORES DE SANGUE DO ESTADO DO AMAZONAS

**Pesquisador:** MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 36716520.3.0000.0009

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.323.231

**Apresentação do Projeto:**

A identificação dos antígenos eritrocitários é necessária na prática transfusional. As limitações das técnicas sorológicas para fenotipagem foram ultrapassadas com uso da genotipagem para identificação de alelos variantes nos genes correspondentes à expressão dos antígenos eritrocitários.

Visando o aumento da segurança transfusional dos pacientes politransfundidos, a identificação de novos alelos na população e Cadastro Nacional de Sangues Raros, o Ministério da Saúde estruturou o serviço de genotipagem eritrocitária em diferentes regiões do Brasil. O objetivo deste projeto é investigar a frequência alélica dos principais sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários em doadores de sangue do Estado do Amazonas.

Consiste em uma pesquisa aplicada, quantitativa, descritiva e retrospectiva, em doadores voluntários de sangue atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). Serão analisadas as frequências genotípicas realizada por MicroArray dos sistemas Rh,

Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton e Sciana e as 24 frequências alélicas que compõem o kit para cada

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.323.231

um dos 1316 doadores. Espera-se investigar a frequência alélica dos sistemas, as prováveis variantes gênicas nos alelos identificados e, diante dos possíveis resultados gerados, detectar genótipos raros entre os doadores de sangue do Estado do Amazonas.

Hipótese:

H0: Os polimorfismos alélicos dos grupos sanguíneos na população do Estado do Amazonas, onde não tinha sido realizado nenhum estudo com esse tema, apresentam uma frequência dentro do esperado com outros estudos em outras regiões brasileiras. H1: Os polimorfismos alélicos dos grupos sanguíneos na população do Estado do Amazonas apresentam uma frequência que diverge do esperado com outros estudos em outras regiões brasileiras, permitindo que os dados colaborem com o aumento de segurança transfusional dos pacientes da região de estudo.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Investigar a frequência alélica dos principais sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários em doadores de sangue do Estado do Amazonas.

Objetivo Secundário:

Investigar a frequência alélica dos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, Dombrock, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton e Sciana; Levantar a frequência de variantes gênicas nos alelos identificados; Detectar genótipos raros entre os doadores de sangue do Estado do Amazonas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os pesquisadores acataram a correção referente a este item questionado no parecer passado.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O item referente ao material e métodos questionado no parecer passado também foi inserido.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram apresentados.

**Recomendações:**

Todas as recomendações foram atendidas.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
 Bairro: Chapada CEP: 69.050-002  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.323.231

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1577478.pdf	26/08/2020 14:27:06		Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_4237649.pdf	26/08/2020 14:26:37	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_AO_CEP_HEMOAM_ASSINADA.pdf	26/08/2020 14:25:55	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DOUTORADO_MYLNER_CORRIGIDO_CEP.docx	26/08/2020 14:25:03	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
Outros	12_Termo_De_Compromisso_Para_Utilizacao_De_Dados_E_Prontuarios_ASSINADO_2.pdf	18/08/2020 10:28:26	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	13_Declaracao_de_dispensa_do_TCLE_ASSINADA.pdf	18/08/2020 10:26:44	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
Outros	12_Termo_De_Compromisso_Para_Utilizacao_De_Dados_E_Prontuarios_ASSINADO.pdf	18/08/2020 08:28:25	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
Outros	JOSE_NETO_Modelo_Termo_de_Anuencia_Pesquisadores_assinado.pdf	18/08/2020 07:59:30	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
Outros	SERGIO_Modelo_Termo_de_Anuencia_Pesquisadores_ASSINADO.pdf	18/08/2020 07:58:55	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_Pesquisador.pdf	18/08/2020 07:56:21	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JUSTIFICATIVA_DE_TCLE_ASSINADA.pdf	17/08/2020 21:36:52	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
Outros	02_Termo_Institucional_HEMOAM.pdf	17/08/2020 21:18:37	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
 Bairro: Chapada CEP: 69.050-002  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.323.231

Folha de Rosto	01_FOLHA_ROSTO_FINAL_ASSINADA.pdf	17/08/2020 21:16:39	MYLNER OLIVEIRA FERMIANO DE SOUZA	Aceito
----------------	-----------------------------------	------------------------	---	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 06 de Outubro de 2020

---

**Assinado por:**  
**Allyson Guimarães da Costa**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br