



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PREVALÊNCIA E FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA
EM DOADORES DE SANGUE NO HEMOCENTRO
REGIONAL DE SANTA MARIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Adriana Najai Stein Bortolotto

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

PREVALÊNCIA E FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA EM DOADORES DE SANGUE NO HEMOCENTRO REGIONAL DE SANTA MARIA

Adriana Najai Stein Bortolotto

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

B739p Bortolotto, Adriana Najai Stein
Prevalência e fenotipagem eritrocitária em doadores de sangue no
Hemocentro Regional de Santa Maria / por Adriana Najai Stein
Bortolotto. – 2011.
82 f. : il. ; 31 cm

Orientador: José Edson Paz da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria,
Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, RS, 2011

1. Grupos sanguíneos 2. Doadores de sangue 3. Fenotipagem 4.
Genotipagem 5. Hemocentro 6. Santa Maria – Rio Grande do Sul I.
Silva, José Edson Paz da II. Título.

CDU 616.15(816.5)

Ficha catalográfica elaborada por Simone G. Maisonave – CRB 10/1733
Biblioteca Central da UFSM

© 2011

Todos os direitos autorais reservados a Adriana Najai Stein Bortolotto. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito da autora. E-mail: najai@terra.com.br.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PREVALÊNCIA E FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA EM DOADORES
DE SANGUE NO HEMOCENTRO REGIONAL DE SANTA MARIA**

elaborada por
Adriana Najai Stein Bortolotto

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

José Edson Paz da Silva, Dr.
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Rafael Noal Moresco (UFSM)

Prof. Dra. Marta Palma Alves (UNIFRA)

Santa Maria, 31 de agosto de 2011

*Dedico este trabalho à minha filha, Mariana,
minha alegria de viver.*

*Ao meu marido, Nelson,
meu porto seguro, sempre com a palavra certa.*

*À minha mãe Ady,
por sua força, sua alegria, sua presença ... fundamentais*

*E, ao meu amado pai, Ivo
por seu exemplo de honestidade, perspicácia e garra.
(in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

“Em toda a parte só se aprende com quem se gosta”
Goethe

*Assim, agradeço, primeiramente,
ao meu orientador, José Edson Paz da Silva,
por quem tenho um especial carinho, pois foi quem despertou em mim o interesse
pela hemoterapia, com seu conhecimento, sua maneira empolgante de transmiti-lo,
por me fazer acreditar SEMPRE!*

*Ao meu amigo Zanoni,
que me recebeu no serviço de hemoterapia e sempre me fez sentir importante,
possibilitando meu crescimento profissional e colaborando para realização deste
trabalho, estando sempre presente em todas as suas etapas. Meu carinho a você,
com quem aprendi, também, a respeitar e a valorizar as pessoas, a dividir
conhecimento e tarefas. Agradeço o apoio constante, o carinho.*

*À Dr^a Lilian Castilho,
que me auxiliou dividindo seus conhecimentos e realizando uma parte tão
importante deste trabalho no hemocentro da Unicamp, essencial para a valorização
deste estudo.*

*Ao meu querido professor e amigo, Luis Felipe,
pelo grande auxílio na estatística do trabalho.*

*Às meninas do Hemocentro Marcia, Adrianne, Rosângela e às minhas estagiárias
Samara, Camila, Emanuelle;
formamos uma equipe que com alegria compartilhou o aprendizado, o nervosismo,
as dificuldades e, com respeito e disposição em ajudarmos umas às outras,
fortalecendo nossa amizade.*

*Aos colegas do hemocentro,
pela ajuda fundamental com os doadores, com as coletas,
mas, principalmente, pelo seu interesse neste projeto.*

*Agradeço, também, aos meus amigos e aos meus familiares.
Que todos se sintam incluídos neste momento de conquista,
pois foram importantes sim, por me fazerem sorrir, pensar, acreditar e me sentir
envolvida por bons pensamentos e energias positivas.*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

PREVALÊNCIA E FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA EM DOADORES DE SANGUE NO HEMOCENTRO REGIONAL DE SANTA MARIA

AUTORA: ADRIANA NAJAI STEIN BORTOLOTTO
ORIENTADOR: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 31 de agosto de 2011

O conhecimento da variabilidade dos antígenos de grupos sanguíneos é essencial na prática transfusional, principalmente para evitar aloimunizações graves. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a prevalência dos fenótipos dos doadores de sangue do Hemocentro de Santa Maria, os quais foram avaliados para os principais antígenos dos sistemas ABO, Rh e Kell. Das amostras fenotipadas quanto ao sistema Rh, 1274 amostras (54,18%) foram fenotipadas como Rh positivos e 1077 amostras (45,82%) fenotipadas como Rh negativo. Dos doadores fenotipados como Rh negativos, 103 amostras (9,5%) foram positivas para o antígeno "C" e/ou "E". Relacionando o percentual do sistema Kell positivo em doadores Rh negativos foi de 8,3%. Conclui-se, então, que o doador Rh negativo deve ser analisado para os demais antígenos do sistema Rh e para o antígeno Kell, pois, mesmo sendo menos imunogênicos, estes antígenos são capazes de causar doença hemolítica graves e aloimunizações. O antígeno D pode variar de expressão fenotípica, devido a alterações qualitativas/quantitativas: D fraco, D parcial. Este trabalho analisou uma amostragem de doadores, através de genotipagem para identificar quais as variantes de D mais frequentes nesta região, foi encontrado (44%) D fraco, (3%) D parcial. Reforça, dessa forma, a importância de ser estabelecidos protocolos para utilização destes sangues raros e garantir o uso correto destes hemocomponentes, assim como a segurança transfusional.

Palavras-Chave: Grupos sanguíneos. Fenotipagem. Genotipagem.

ABSTRACT

Master's Thesis
Postgraduation Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

PREVALENCE AND ERYTHROCYTED PHENOTYPING IN BLOOD DONORS AT THE REGIONAL BLOOD CENTER IN SANTA MARIA

AUTHOR: ADRIANA NAJAI STEIN BORTOLOTTTO
ADVISER: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA
Defense Place and Date: Santa Maria, August, 31, 2011

The knowledge of the variability of antigens of blood groups is essential in the transfusional practice, mainly to avoid grave alloimmunizations. This study had as objective to evaluate the prevalence of the phenotypes from the blood donors from Santa Maria's Blood Center. These donors were evaluated for the mainly antigens of ABO, Rh and Kell systems. About the phenotyped samples with Rh system, 1274 samples (54.18%) were phenotyped as positives Rh and 1077 samples (45.82%) phenotyped as negative Rh. From the phenotyped donors as negatives Rh, 103 samples (9.5%) were positives for the "C" or "E" antigen. Relating the percentage of the Kell system positive in donors with negative Rh, was gotten 8.3%. We concluded that the negative Rh donor must be analyzed for other antigens of Rh system and for the Kell antigen, exactly being less immunogenics, these antigens are able to cause Grave Hemolytic Disease and Alloimmunizations. The D antigen Phenotypic expression may vary due to changes qualitative/quantitative: weak D, partial D. This study analyzed a sample of donors by genotyping to identify the most common D variants in this region was found (44%) weak D, (3%) and partial D. Strengthens thus the importance of established protocols for use of rare blood and ensure the proper use of blood products, as well as the safety of blood transfusion.

Keywords: Blood groups. Phenotyping. Genotyping.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Proteína Rh	27
Figura 2 – Variantes Rh D nas hemácias	32
Figura 3 – Densidades antigênicas de antígenos RhD fraco mais comuns	33
Figura 4 – Proteína Rh D fraco	33
Figura 5 – Proteína Rh D parcial	35
Figura 6 – Representação dos diferentes padrões de reação em microtubos	49
Figura 7 – Frequência do Sistema ABO.....	53
Figura 8 – Frequência do Sistema Rh	55
Figura 9 – Relação doadores Rh Negativos com C e/ou E Positivos	57
Figura 10 – Relação doadores Rh Negativos e Kell Positivos	58
Figura 11 – Resultado das variantes do antígeno D	63
Figura 12 – Resultados das amostras analisadas molecularmente	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência genética do Sistema Rh.....	25
Tabela 2 – Frequência dos haplótipos Rh.....	25
Tabela 3 – Frequência dos haplótipos Rh em populações inglesas, nigerianas e brasileiras	26
Tabela 4 – Diferenças estruturais entre antígenos D, C, c, E, e.....	26
Tabela 5 – Diferença estrutural entre os antígenos C, c, Cw	28
Tabela 6 – Teorias Genéticas e nomenclaturas do Sistema	30
Tabela 7 – Categorias dos antígenos D parciais.....	36
Tabela 8 – Frequência dos fenótipos KELL	40
Tabela 9 – Diferença fenotípica do sistema Rh e Kell.....	42
Tabela 10 – Frequência do sistema Rh.....	43
Tabela 11 – Frequência do sistema Kell	43
Tabela 12 – Frequência do sistema Rh e Kell.....	44
Tabela 13 – Frequência dos grupos ABO nos doadores fenotipados	54
Tabela 14 – Frequência dos doadores quanto ao sexo	54
Tabela 15 – Frequência dos doadores fenotipados quanto ao sistema Rh.....	56
Tabela 16 – Frequência dos doadores fenotipados quanto ao sistema Kell	57
Tabela 17 – Relação da frequência dos antígenos do sistema Rh e Kell	59
Tabela 18 – Resultados das amostras genotipadas.....	62
Tabela 19- Relação das variantes Rh D e fenótipos	65
Tabela 20- Resultados quanto ao grau de aglutinação	66
Tabela 21- Frequência de grupos ABO nos doadores genotipados	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Grupos sanguíneos do sistema ABO	23
Quadro 2 – Tipos comuns de Genótipos Rh segundo as nomenclaturas e frequências	30
Quadro 3 – Comparação entre os resultados das amostras fenotipadas e genotipadas	61
Quadro 4 – Resultado das variantes do antígeno D nos doadores genotipados.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
AGH	Teste de antiglobulina humana
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS-PCR	Técnica de PCR alelo-específico
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação Ética
D Del	Antígeno RhD DEL
DAR	Antígeno RhD parcial DAR
DAU	Antígeno RhD parcial DAU
DBT	Antígeno RhD parcial DBT
DFR	Antígeno RhD parcial DFR
DHMi	Antígeno RhD parcial DHMi
DHRN	Doença Hemolítica do Recém-Nascido
DII	Antígeno RhD parcial categoria II
DIIIa	Antígeno RhD parcial categoria D IIIa
DIIIb	Antígeno RhD parcial categoria IIIb
DIIIc	Antígeno RhD parcial categoria IIIc
DIVa	Antígeno RhD parcial categoria D IVa
DIVb	Antígeno RhD parcial categoria IVb
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (Fita de nucleotídeos)
DVI	Antígeno RhD parcial categoria DVI
DVII	Antígeno RhD parcial categoria DVII
EDTA	Ácido Etilenoaminotetraacético
EXON	Região do DNA que codifica aminoácidos
IG	Imunoglobulinas
INTRON	Região do DNA que não codifica aminoácidos
ISBT	<i>Internacional Society for Blood Transfusion</i>
LISS	Tampão de baixa força iônica
NaCl	Cloreto de Sódio
PCR	Reação de cadeia da polimerase/ <i>Polimerase Chain Reaction</i>
Primers	Sequência de oligonucleotídeos sintéticos
R ₀ R ₀	Fenótipo Rh DDccee
R ₀ r	Fenótipo RhDccee
r' r''	Fenótipo Rh dCcEe
r''r	Fenótipo Rh dccEe
r''r''	Fenótipo Rh dccEE
r'r'	Fenótipo Rh dCcee
R ¹ r	Fenótipo RhDCcee
R ¹ R ¹	Fenótipo RhDCCee
R ¹ R ²	Fenótipo RhDCcEe
R ² r	Fenótipo RhDccEe
R ² R ²	Fenótipo RhDccEE
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RFLP	Técnica de PCR seguida por análise dos fragmentos
Rh null	Rh nulo
RH	Gene RH
Rh	Sistema Rh
RhC	Antígeno RhC
RhCE	Antígeno RhCE
RHCE	Gene RHCE
RhD	Antígeno RhD
RHD	Gene RHD
RHD-CE-D	Gene híbrido RHD-CE-D
RHD ψ	Pseudogene RHD
rpm	Rotação por minuto
rr	Fenótipo dccee
ryr	Fenótipo Rh dCCEE
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
μ l	Microlitro
ml	Mililitro
pb	Pares de base

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	75
APÊNDICE B – Protocolo / Questionário	77
APÊNDICE C – Termo de Compromisso	78
APÊNDICE D – Declaração sobre a Divulgação dos Resultados	79
APÊNDICE E – Declaração sobre o Destino do Material Coletado	80
APÊNDICE F – Carta ao Doador	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Histórico	16
2.2 Sistemas Sanguíneos	21
2.2.1 Sistema ABO	21
2.2.2 Sistema Rh	23
2.2.3 Sistema Kell	37
2.2.4 Prevalência dos Grupos Sanguíneos Encontrados em Doadores e Pacientes	40
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Amostras	47
4.2 Aspectos éticos	47
4.3 Análises estatísticas	48
4.4 Destino dos materiais	48
4.5 Técnicas laboratoriais	48
4.5.1 Tipagem Direta usando cartões ABD Confirmação ou ABD Rh	49
4.5.2 Tipagem Reversa em Cartão NaCl	50
4.5.3 Pesquisas de D Parcial e D fraco	50
4.5.4 Fenotipagem Rh (C.c.Cw.E,e) e Kell	50
4.5.5 Genotipagem	51
4.5.5.1 Extração do DNA	51
4.5.5.2 Reação em cadeia de Polimerase (PCR)	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Hemoterapia caracteriza-se pelo emprego terapêutico do sangue. Essa ciência vem sendo estudada há muitos anos, tendo passado por várias fases, evoluindo e apresentando uma grande perspectiva futura (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005).

No Brasil, a Hemoterapia vem assumindo um papel de extrema importância na medicina moderna, com a criação de uma Legislação própria, o fim de doações remuneradas e o surgimento dos Hemocentros e de Rede Pública Hemoterápica (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005).

Os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados por antígenos na membrana eritrocitária, com características funcionais e polimórficas definidas. A frequência com que os antígenos aparecem numa determinada população varia de acordo com a sua composição racial (GIRELLO, KUHN, 2002, 2007).

Mais de 250 antígenos de grupos sanguíneos são reconhecidos pela *Internacional Society for Blood Transfusion* (ISBT) sendo classificados em 30 sistemas de grupos sanguíneos, os mais conhecidos são o ABO e o Rh, mas, também importantes os sistemas Kell, MNS, Duffy, Lutheran, Lewis, entre outros (BEIGUELMAN, 2003; BRASIL, 2001; VIEIRA et al, 2009).

O sistema mais importante na clínica transfusional é o ABO e a fenotipagem deste sistema é definida pelos antígenos presentes nas hemácias e pelos anticorpos “naturais”, encontrados no soro (GIRELLO, KUHN, 2002, 2007; HARMENING, 2006).

O sistema Rh é o maior e mais complexo sistema de grupos sanguíneos, compreendendo 49 antígenos. Este se tornou o sistema com maior grau de polimorfismo entre os marcadores conhecidos da membrana eritrocitária. Os principais antígenos do sistema Rh incluem: D, C/c/Cw e E/e, porém, o antígeno Rh D é considerado o mais imunogênico, seguido dos antígenos c, E, C, e, Cw (CASTILHOS, 2007) .

O sistema de grupo sanguíneo Kell é o terceiro em importância clínica transfusional. O antígeno K1 (Kell) está presente em apenas uma pequena parte da população, enquanto o antígeno k (cellano) está presente em 99%. Os antígenos do

sistema Kell são altamente imunogênicos (BEIGUELMANN, 2003).

A fenotipagem sanguínea é a determinação da presença ou ausência de antígenos eritrocitários na membrana da hemácia. Atualmente, a hemoterapia, no Brasil e no mundo, tem se caracterizado pelo desenvolvimento e adoção de novas tecnologias, como a fenotipagem eritrocitária (CASTILHOS, 2008).

Neste trabalho foi realizado a prevalência dos antígenos do sistema ABO, Rh (D,C,Cw,c,E,e) e do antígeno K1 do sistema Kell em uma amostra significativa de doadores de sangue, do hemocentro de Santa Maria, com o objetivo de minimizar os riscos transfusionais, tornando-se uma prática mais segura identificando fenótipos antes nem conhecidos. Foi o primeiro estudo, nesta região, em que foi utilizado duas metodologias: a fenotipagem e a genotipagem para melhor conhecermos a população desta localidade, possibilitando, também, o aconselhamento dos familiares, com base nessas características.

Para a determinação dos grupos sanguíneos foram utilizadas reações padronizadas de hemaglutinação pela técnica de gel centrifugação em cartão. Foram realizadas as técnicas de prova direta ABO/Rh e a prova reversa, pesquisa de D fraco e/ou parcial e a pesquisa dos antígenos CDE para o sistema Rh, a fenotipagem dos sistemas Rh e Kell e foi realizado a genotipagem para identificar as variantes do antígeno D, do sistema Rh.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

A hemoterapia se caracteriza pelo emprego terapêutico do sangue. No Brasil, ela assume papel de extrema importância na medicina moderna com a criação de uma Legislação própria, o fim de doações remuneradas e o surgimento dos Hemocentros e da Rede Pública Hemoterápica (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005),

Contribuíram, também, para este avanço, entre outros, os fatores econômicos, o desenvolvimento da genética molecular, da biotecnologia, da terapia celular e das inovações em metodologias, equipamentos e automação e, de extrema importância e de forma sistemática, os sistemas de qualidade, como controles internos (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005).

A transfusão de sangue, no mundo, teve dois períodos: um empírico, que vai até 1900, e outro científico, de 1900 em diante (BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007). Esse período é marcado por muitas mortes devido à falta de conhecimento científico, e havia, ainda, dúvidas quanto à quantidade de sangue a ser coletado, ficando, às vezes, os doadores, anêmicos depois de doarem. Os grupos sanguíneos não eram conhecidos e não havia provas de compatibilização (OLIVEIRA, 2003).

Não se sabe ao certo a data da primeira transfusão de sangue, mas, ainda que o resultado desse evento tenha sido insatisfatório, o primeiro registro real ocorreu em 1492, quando se retirou sangue de três homens, concedendo ao papa Inocêncio VII, portador de doença renal crônica, na esperança da cura; infelizmente todos os quatro morreram. Embora o resultado desse evento tenha sido insatisfatório, foi a primeira vez que uma transfusão de sangue, propriamente, foi registrada na história (HARMENING, 2006; VERRASTRO; LORENZI; NETO, 2005).

William Harvey, em 1613, com a descoberta da circulação sanguínea, chamou a atenção dos estudiosos da época para a possibilidade de transfusão de sangue. A primeira transfusão foi realizada com sangue de carneiro para um paciente com tifo. Seguiram-se tentativas de transfusão entre seres humanos, braço

a braço, que não foram bem sucedidas e ficaram proibidas na Europa durante 150 anos (BORDIN; JÚNIOR; COVAS, 2007).

Após várias tentativas de transfusões de sangue de animais em humanos, sem sucesso, em 1818, James Blundell, um obstetra de Londres, constatou a impossibilidade de transfusões entre espécies diferentes. Este médico realizou transfusão de sangue humano em mulheres com hemorragia pós-parto (PORTAL, 2008), desenvolveu métodos transfusionais, tornando-se conhecido como “Pai da Moderna Transfusão Sanguínea” (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005). Então, em 1840, Lane foi o primeiro a demonstrar que o sangue fresco poderia corrigir a tendência de sangramento em pacientes hemofílicos (VERRASTRO; LORENZI; NETO, 2005).

A fase científica, período de 1900 até os dias atuais, foi iniciada com a descoberta dos grupos sanguíneos pelo pesquisador Karl Landesteiner, após observar reação de aglutinação ao misturar soro com hemácias de diferentes indivíduos. Com base nos padrões de aglutinação, denominou os antígenos encontrados, utilizando as duas primeiras letras do alfabeto “A” e “B”. Hemácias que não fossem aglutinadas por ambos os soros como “C” eram usualmente chamados “não-A, não-B” e, posteriormente, referidas como “O” (BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007). Em 1902, Von de Castelli e Sturli descobriram o grupo “AB” (GIRELLO; KUHN, 2002).

A classificação, em diferentes grupos de sangue, permitiu estabelecer as compatibilidades e incompatibilidades entre os indivíduos, estruturando-se a base para a utilização do sangue como agente terapêutico. Foi pela introdução de testes de compatibilidade, por Ottemberg, em 1907, e Moss, em 1910, que a transfusão começou a adquirir bases mais científicas para a sua realização (VERRASTRO; LORENZI; NETO, 2005).

Foi durante a Primeira Guerra Mundial, 1914, que surgiram os Bancos de Sangue. A guerra serviu de motivo para as primeiras campanhas de doação e, desde essa época, a questão do sangue seguro para transfusão tornou-se mais desafiadora (MARIN, 2004). Os primeiros bancos de sangue passaram a ser idealizados em Leningrado (1932), Barcelona (1936) e Chicago (1937).

Com o desenvolvimento de frascos específicos e do anticoagulante Adenina Citrato Dextrose (ACD) (MOLLISON; ENGELFRIET; CONTRERAS, 1987), unidades colhidas na América do Norte ou na Inglaterra podiam ser transportadas até os

hospitais de campanha, próximos aos combates, durante a Segunda Guerra Mundial (VERRASTRO; LORENZI; NETO, 2005).

Com a descrição do Sistema RH, em 1939, por Levine e Stetson, e do Soro de Coombs, em 1945, por Coombs, Mourant e Race, novos desenvolvimentos ocorreram no conhecimento de grupos sanguíneos (VERRASTRO; LORENZI; NETO, 2005).

No Brasil, as primeiras transfusões foram realizadas por volta de 1879, no Rio de Janeiro. Nesta época havia pouco embasamento teórico na área e, em 1940, fez-se necessária a criação do Serviço de Transfusão de Sangue, por ter conotação assistencial, e exigir atividades científicas. Infelizmente, nessa fase, muitos viam a prática da hemoterapia apenas com o intuito comercial (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005).

Fato relevante nessa época foi a criação da Seção de Investigação Científica do Banco de Sangue da Prefeitura do Distrito Federal, que na época localizava-se no Rio de Janeiro. Ali foram realizados estudos sobre os grupos sanguíneos de populações índias e neo-brasileiras. Ocorreram excursões pelo Brasil e exterior, sendo designado como chefe: P. C. Junqueira (BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007).

Sabe-se, hoje, que a transfusão restabelece a capacidade de transporte de oxigênio, em pacientes com anemias ou perdas agudas de sangue, assegurando a vitalidade de órgãos e tecidos. Porém, com o grande número de contaminações devido às transfusões, gerou-se grande polêmica, culminando com a proibição das doações remuneradas. Isto ocorreu com a inclusão do artigo 199 na Constituição Brasileira, aprovada em 1988, que proibiu todo e qualquer comércio de sangue e hemoderivados (BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007).

Hoje, a doação é voluntária. Estas mudanças ocorreram, no sistema hemoterápico, por razões sócio-econômicas e pelo surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). O aparecimento da AIDS introduziu novos procedimentos, tais como a substituição da doação anônima pela personalizada, e a disciplina do uso do sangue, de seus componentes e derivados, através da avaliação do trinômio riscos/benefícios/custos (BRASIL, 2004).

As principais razões para promover a doação voluntária baseiam-se na proteção do receptor, pois estes doadores têm menos prevalência de infecção transmitida pelo sangue (LUDWIG; RODRIGUES, 2005).

Com técnicas de fracionamento plasmático, de processadores celulares para

Aférese (Cohn, Latham, Frierech), de novas soluções de preservação (CPD, CPD-A, Sag-M), do uso de novas técnicas de compatibilidade (Enzima, meio de baixa força iônica), e da prevenção de doenças, a transfusão pode ganhar o desenvolvimento extraordinário que vem sofrendo nos últimos anos (GIRELLO; KUHN, 2002, 2007; VERRASTRO; LORENZI; NETO; 2005).

A terapia de componentes de sangue apropriados proporciona tratamento mais efetivo e o uso mais completo dos derivados do sangue. Hoje, pode-se selecionar o componente específico para as necessidades particulares do paciente, pois uma unidade de sangue é fracionada em: concentrado de hemácias, plaquetas e outros fatores de coagulação como o fator anti-hemofílico crioprecipitado e plasma (HARMENING, 2006). Além disso, a imunohematologia dispõe de testes laboratoriais capazes de oferecer maior segurança na transfusão, através da fenotipagem de pacientes e doadores (BRASIL, 2001).

O termo “grupo sanguíneo” não se refere somente ao sistema de antígenos dos eritrócitos, mas também à diversidade imunológica, expressa por outros constituintes sanguíneos, incluindo leucócitos, plaquetas e plasma (DAVEY; HENRY, 1999). Este termo foi inicialmente utilizado na classificação ABO para indicar conjunto de antígenos com características sorológicas similares. Com o desenvolvimento da imunohematologia, novos antígenos foram descobertos e agrupados em sistemas, coleções e séries (BRASIL, 2001).

Considera-se importante esclarecer que um antígeno eritrocitário é uma proteína ou um açúcar capaz de induzir o sistema imune a produzir anticorpos e que são herdados dos pais através de genes. O conjunto dos genes herdados constitui o genótipo de um indivíduo. A expressão dos antígenos nas hemácias, detectada pelos testes imunohematológicos, é chamada de fenótipo (SANTOS; SARAIVA; MALTEZ, 1996).

Atualmente, mais de 250 antígenos de grupos sanguíneos são reconhecidos pela *Internacional Society for Blood Transfusion* (ISBT), sendo classificados em trinta sistemas, cinco coleções e duas séries de grupos sanguíneos (BEIGUELMAN, 2003; BRASIL, 2001; VIEIRA et al., 2009).

As coleções de antígenos de grupo sanguíneo são constituídas por conjuntos de antígenos com características sorológicas e bioquímicas similares e conhecidas, mas com especificidades não relacionadas aos sistemas de grupos sanguíneos já estabelecidos (BRASIL, 2001; SANTOS; SARAIVA; MALTEZ, 1996).

As séries de antígenos são constituídas por antígenos conhecidos sorologicamente e agrupados em baixa e alta freqüência na população: antígeno de baixa freqüência – é aquele encontrado em menos de 1% de uma dada população; antígeno de alta freqüência – é aquele encontrado em mais de 99% de uma dada população (SANTOS; SARAIVA; MALTEZ, 1996).

Além dos sistemas de grupos sanguíneos ABO e Rh, são conhecidos, atualmente, os sistemas Kell, MNS, Kidd, Duffy, Lutheram, Lewis e Diego, entre outros (SANTOS; SARAIVA; MALTEZ, 1996).

Os sistemas de grupos sanguíneos caracterizam-se pela expressão de antígenos protéicos e carboidratos na membrana eritrocitária, os quais são identificados por anti-soros específicos. Esses grupos têm importância prática, nas transfusões, na obstetrícia, na neonatologia e na medicina legal (BONINI-DOMINGOS et al., 2003).

Os antígenos de grupos sanguíneos são resultantes de variabilidades genéticas que ocorrem nos componentes da membrana celular, que podem ser proteínas, glicoproteínas ou glicolipídios. Os anticorpos eritrocitários são imunoglobulinas (Ig), produzidas pelo sistema imune, em resposta ao antígeno eritrocitário. Estes aloanticorpos que reconhecem os antígenos de grupos sanguíneos são de ocorrência natural ou imunes devido à aloimunização em decorrência de transfusão ou gravidez (MELO; SANTOS, 1996).

A união dos antígenos com seus anticorpos correspondentes possui princípios gerais, como: especificidade, reversibilidade, equilíbrio e termodinâmica (GOMES, 2002).

A parte da molécula antigênica que está diretamente envolvida na interação com o anticorpo é chamada de epítopo ou determinante antigênico, que é o responsável pela especificidade de um determinado antígeno (GIRELLO; KUHN, 2007; KAGAN, 1992). Um antígeno pode apresentar muitos epítopos diferentes ou repetidos e os anticorpos são específicos para cada epítopo (GOMES, 2002).

As reações *in vivo* entre antígenos e anticorpos produzem imuno-complexos que não são visíveis. A necessidade de se investigar as reações imunológicas *in vitro* levou ao desenvolvimento de uma variedade de métodos com o objetivo de detectar e quantificar estas reações (GIRELLO; KUHN, 2002, 2007).

Em imunohematologia, pesquisa-se *in vitro* a interação entre antígeno e anticorpo, seja para pesquisa dos antígenos, como exemplo, na fenotipagem direta

ABO, seja para pesquisa de anticorpos regulares (por exemplo: ABO) ou irregulares (por exemplo: anti-C) no soro dos indivíduos, por meio do método de aglutinação de hemácias ou hemaglutinação, que culmina com a formação de aglutinatos de hemácias sensibilizadas por anticorpos. Para isto faz-se necessário conhecer as duas etapas dessa reação entre antígeno e anticorpo, a reação propriamente dita (etapa de sensibilização) e o fenômeno de hemaglutinação (etapa da visualização), para que se possa compreender e aplicar seus fundamentos no dia a dia (GIRELLO; KUHN, 2002, 2007).

A frequência com que os antígenos aparecem numa determinada população varia de acordo com a sua composição racial. A importância de se definir os fenótipos está relacionada à necessidade de se definir a compatibilidade pré transfusional, para selecionar adequadamente o hemocomponente a ser transfundido e, ainda, comparar a prevalência fenotípica da região (GIRELLO; KUHN, 2002; LORENZI et al., 2003).

Toda transfusão traz em si um risco, seja imediato ou tardio, devendo, portanto, ser criteriosamente indicada (BRASIL, 2004). Assim, os serviços de Hemoterapia são rotineiramente inspecionados e regulamentados, conforme as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As regulamentações técnicas para os procedimentos hemoterápicos estão determinadas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 57 de 16 de dezembro de 2010 e pela Portaria nº 1.353, de 13 de junho de 2011 (BRASIL, 2010, 2011). São realizados exames de controle de qualidade dos reagentes e das técnicas utilizadas, denominados como controle de qualidade interno e externo.

2.2 Sistemas Sanguíneos

2.2.1 Sistema ABO

Karl Landsteiner, verdadeiramente, abriu as portas dos Bancos de Sangue com sua descoberta do primeiro sistema de grupos sanguíneos, o ABO. Esse fato

marcou o início do conceito de individualidade definida pelos antígenos das hemácias presentes na membrana do eritrócito. O sistema ABO continua sendo o mais importante de todos os grupos sanguíneos na prática transfusional (HARMENING, 2006).

Em 1901, Landesteiner colheu seu próprio sangue e de cinco colaboradores, separando as células do soro, e a seguir misturou cada amostra com cada soro. Verificou que o soro de certos indivíduos era capaz de aglutinar os eritrócitos de outros, sendo, assim, o primeiro a realizar a classificação direta e a classificação reversa (HARMENING, 2006).

Os antígenos ABO estão presentes em todos os órgãos do corpo humano e são denominados como antígenos histossanguíneos. Os antígenos solúveis ABO podem ser sintetizados e secretados pelas células dos tecidos e com isto podem ser encontrados em todas as secreções corporais dependendo do gene ABO herdado (HARMENING, 2006).

Estes antígenos se desenvolvem precocemente ainda na vida fetal, mas não aumentam muito mais em sua força durante o período gestacional. A reatividade ABO do eritrócito no neonato não é tão potente quanto a da célula adulta, estima-se que possua de 25 a 50% do número de sítios antigênicos encontrados nas hemáceas adultas. É importante ressaltar que a expressão fenotípica destes antígenos pode variar com a idade, raça, interação genética e com o estado patológico (HARMENING-PITTIGLIO; FLYNN, 1992).

A fenotipagem ABO é definida pelos antígenos presentes nas hemácias e pelos anticorpos “naturais” encontrados no soro. São realizadas prova direta, onde se pesquisam os antígenos do sistema ABO que estão presentes nas hemácias do indivíduo, e prova reversa, onde se procura determinar os anticorpos do Sistema ABO que estão presentes no soro ou no plasma. O sistema é constituído por indivíduos do grupo sanguíneo tipo A, B, AB ou O (Quadro 1).

Por estar presente em tecidos e fluídos orgânicos, os antígenos do sistema ABO são importantes também na compatibilidade em transplantes de órgãos e medula óssea (GIRELLO; KUHN, 2007).

Grupos sanguíneos	Antígenos eritrocitários	Anticorpos séricos
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	-
O	-	Anti-A, Anti-B, Anti-AB

Quadro 1 – Grupos sanguíneos do sistema ABO

Fonte: Beiguelman, 2003.

A frequência dos fenótipos ABO e dos alelos comuns varia de acordo com a raça e população estudada devido ao fenômeno de migração populacional e cruzamentos étnicos (GIRELLO; KUHN, 2007).

Dentro do sistema ABO existem diversos subgrupos, denominados: subgrupos A, B e AB, sendo que os mais freqüentemente encontrados na prática são os subgrupos A1, A2, A1B e A2B. São fenótipos ABO que se expressam de forma diferente na membrana da hemácia, em consequência de alterações provocadas por mutações genéticas e apresentam significativa redução no número de sítios antigênicos expressos nas hemácias, isso explica o porquê, algumas vezes, observa-se menor reatividade com anti-soros A, B, e AB nas fenotipagens ABO (GIRELLO; KUHN, 2007; NOVARETTI; DORLHIA; CHAMONE, 2000).

2.2.2 Sistema Rh

Em 1939, Philip Levine e Rufus Stetson descreveram a presença de um anticorpo, na circulação de uma mulher, responsável por uma reação transfusional hemolítica logo após uma transfusão de sangue doado pelo marido. Sugeriram que este anticorpo, que aglutinava 80% das hemáceas dos doadores ABO compatíveis, fora produzido nesta mãe por um antígeno fetal de origem paterna (BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007; GIRELLO; KUHN, 2007).

Em 1940, Landsteiner e Alexandre Wiener verificaram que a injeção de sangue do macaco rhesus *Macaca mulatta* em coelhos e cobaias resultava na formação de um anticorpo, denominado anti-Rh, que aglutinava as hemácias do macaco rhesus e de 85% das hemácias dos doadores de sangue caucasianos de

Nova York. Estes indivíduos foram posteriormente classificados como Rh (*Rhesus*) positivos. Os indivíduos cujas hemácias não eram aglutinadas por este anticorpo, foram classificados como Rh-negativos (CASTILHO, 2007; GIRELLO; KUHN, 2007).

Em 1942, Fisk e Ford observaram que o anticorpo descrito por Levine e Stetson não se tratava do mesmo anticorpo descrito por Landsteiner e Wiener, como se pensou naquela época. No entanto, o nome “Rh” de Rhesus não pôde ser mudado, pois aparecia em milhares de publicações. Assim, Levine e cols. propuseram que o antígeno definido pelo anticorpo anti-rhesus produzido em animal fosse chamado LW em homenagem a Landsteiner e Wiener e a denominação Rh foi mantida para o anticorpo formado pelo homem (BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007).

O sistema Rh é o maior e mais complexo sistema de grupos sanguíneos, compreendendo atualmente 49 antígenos. Representa um dos sistemas de maior interesse clínico, por seu envolvimento na Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN), nas Reações Transfusionais Hemolíticas e nas Anemias Hemolíticas Auto-imunes. No ponto de vista transfusional é o segundo mais importante, depois do ABO, devido à imunogenicidade de seus antígenos, como é o caso do antígeno D (CASTILHO, 2007; CREDIDIO, 2010; GIRELLO; KUHN, 2007).

Os antígenos Rh são exclusivamente eritrocitários, não são encontrados em leucócitos ou plaquetas e surgem precocemente em torno da décima semana de vida intra-uterina (GIRELLO; KUHN, 2007). O sistema Rh tornou-se, assim, o sistema de grupo sanguíneo com maior grau de polimorfismo entre os marcadores conhecidos da membrana eritrocitária: o gene RHD, que não possui alelos, produzindo o antígeno D; o gene RHCE, que possui vários alelos, produzindo dois pares de antígenos antitéticos, C/c e E/e (CASTILHO, 2007).

Os genes do sistema Rh, RHD e RHCE são altamente homólogos e diferem na sua localização cromossômica. Os genes RHD e RHCE estão localizados no cromossomo 1p36.13-34.3, organizados em dez éxons dentro de uma sequência genômica de aproximadamente 75Kb. As diferenças básicas entre estes dois genes estão na região do éxon 10 e na deleção de 600 pb no íntron 4 do gene RHD se comparado ao gene RHCE (CREDIDIO, 2010; RODRIGUES, 2005).

A proximidade entre os genes RHD e RHCE facilita a ocorrência de conversão gênica durante os rearranjos gênicos entre eles, levando, assim, à formação de híbridos (partes do gene RHD em RHCE e vice-versa), responsáveis por algumas variantes do antígeno Rh D (GIRELLO; KUHN, 2007).

Os cinco principais antígenos do sistema Rh incluem: D, C, c, E, e. Estes antígenos formam oito complexos gênico, conhecidos como haplótipos Rh (Cde, cDe, cde, cDE, cdE, Cde, CDE, CdE). Destes, o antígeno Rh D é o mais importante do ponto de vista clínico devido ao seu grau de imunogenicidade seguido dos antígenos c, E, C, e, C^w entre outros (CASTILHO, 2007).

Os genes do sistema Rh são co-dominantes de forma que, quando os genes RH herdados do pai são idênticos aos da mãe, chama-se o indivíduo de homozigótico. Se os genes herdados forem diferentes, o indivíduo será considerado heterozigótico (GIRELLO, KUHN, 2002, 2007).

Segundo Harmening, a frequência genética com que os antígenos do sistema Rh aparecem encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Frequência genética do Sistema Rh

Antígenos	%
D	85
C	70
E	30
d	15
c	80
e	98

Fonte: Harmening, 2006.

A frequência dos haplótipos Rh varia em diferentes populações. A Tabela 2 apresenta as combinações mais comuns de antígenos, expressos como haplótipos.

Tabela 2 – Frequência dos haplótipos Rh

Haplótipos	Genes presentes	Antígenos presentes	Fenótipos
R ¹	RHD, RHcE	D, C, e	R ₁
r	RHce	c, e	r
R ²	RHD, RHcE	D, c, E	R ₂
R ⁰	RHD, RHce	D, c, e	R ₀
r'	RHcE	C, e	r'
r''	RHcE	c, E	r''
R ^Z	RHD, RHCE	D, C, E	R _Z
r ^y	RHCE	C, E	r ^y

Fonte: Bordin, Junior e Covas, 2007.

A Tabela 3 apresenta a frequência dos oito haplótipos Rh em três populações distintas. Os oito haplótipos Rh podem parar em 36 genótipos, entretanto, utilizando-se os anti-soros anti-C, anti-c, anti-E e anti-e, somente 18 fenótipos podem ser determinados. Pela nomenclatura CDE, os fenótipos são geralmente expressos na forma de genótipos (Ex. DcE/dce), mas não significam o verdadeiro genótipo de um indivíduo, e sim o genótipo deduzido a partir da frequência gênica da população apropriada. A dificuldade em se estabelecer o genótipo baseia-se na impossibilidade de determinar a zigozidade do antígeno RhD por técnicas sorológicas. As técnicas moleculares tornaram possível a determinação da zigozidade do antígeno D, o que pode, agora, facilitar a identificação do genótipo Rh (BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007).

Tabela 3 – Frequência dos haplótipos Rh em populações inglesas, nigerianas e brasileiras

CDE	Haplótipos		Frequências		
	Rh-Hr	Ingleses	Nigerianos	Brasileiros	
DCe	R ¹	0,4205	0,602	0,3802	
dce	r	0,3886	0,2028	0,3058	
DcE	R ²	0,1411	0,1151	0,1435	
Dce	R ⁰	0,0257	0,5908	0,1131	
dcE	r ^{''}	0,0119	0	0,0101	
dCe	r [']	0,0098	0,0311	0,0398	
DCE	R ^z	0,0024	0	0,0075	
dCE	r ^y	0	0	0	

Fonte: Bordin, Junior e Covas, 2007.

Os genes RHD e RHCE apresentam uma estrutura similar. Se forem comparados os polipeptídeos produzidos por ambos, será constatada homologia entre eles.

Tabela 4 – Diferenças estruturais entre antígenos D, C, c, E, e

Fenótipo Rh	Proteína Rh		
	Proteínas	Peso molecular	Nº Aminoácidos
D positivo	Proteína D	32 KDa	417 aa
	Proteína CcEe	34 KDa	417 aa
D negativo	Proteína CcEe	34 KDa	417 aa

Fonte: Melo, Santos, 1996.

Os antígenos do sistema Rh estão localizados em duas proteínas não glicosiladas denominadas RhD e RhCE. A presença ou ausência do antígeno na superfície das hemácias está correlacionada com a presença ou ausência de um membro desta mesma família de proteínas. As proteínas Rh são compostas por 417 aminoácidos e atravessam a membrana eritrocitária 12 vezes, apresentando os segmentos aminoterminal e carboxiterminal intracelularmente (CREDIDIO, 2010).

Modelos estruturais apresentam a proteína Rh com seis alças extracelulares, 12 transmembranares e sete intracelulares. As proteínas Rh e RhCE diferem em 31 a 35 aminoácidos dependendo do alelo RHCE considerado. Estas diferenças podem talvez explicar em parte a imunogenicidade do antígeno D (CASTILHO, 2007) (Figura 1).

A proteína C difere da proteína c em quatro aminoácidos (verde na Figura 1). Esse polimorfismo da proteína RhCE, produzido por mutações em seis nucleotídeos no gene RHCE, apresenta um ponto importante de troca de aminoácidos na posição 103 da proteína serina (C), para uma prolina (c), na 2ª alça extracelular. (Ser103Pro) (CREDIDIO, 2010; GIRELLO; KUHN, 2002; RODRIGUES; CASTILHO, 2002; RODRIGUES, 2005).

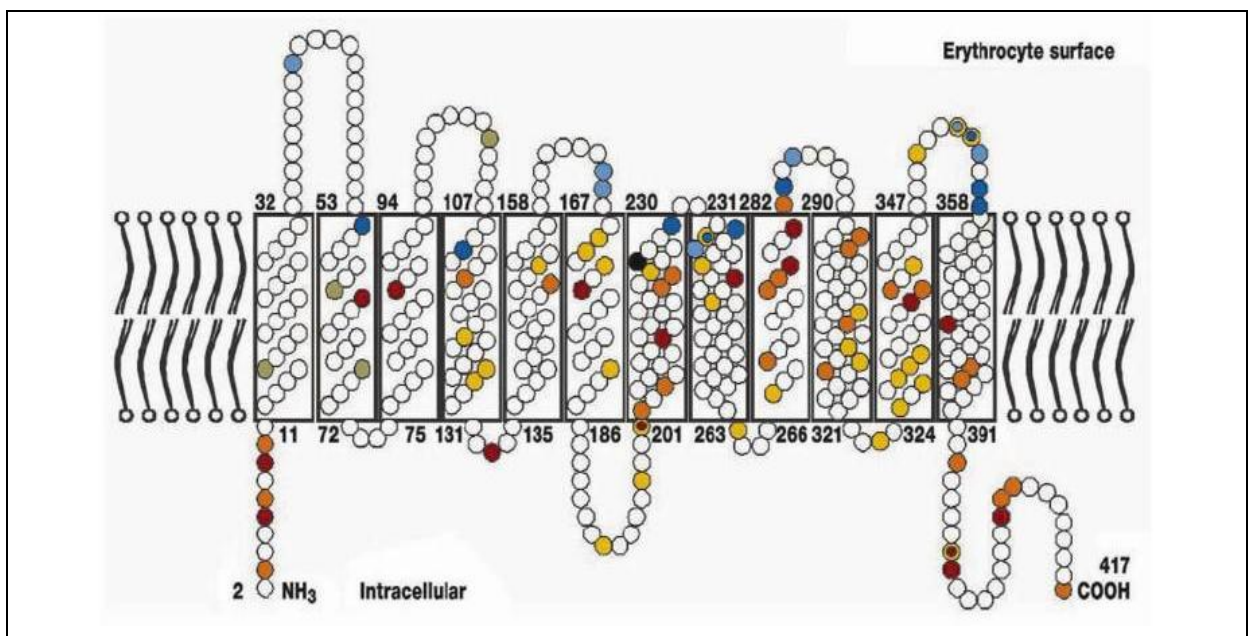


Figura 1 - Proteína Rh: A proteína Rh na membrana eritrocitária. Ambas as proteínas Rhesus mostram 417 aminoácidos. As substituições de aminoácidos que distinguem o RhD da proteína RhCE são mostradas em amarelo, com os quatro aminoácidos que codificam o antígeno C em verde e um que codifica para o antígeno E em preto. As únicas substituições de aminoácidos que codificam D parciais estão em azul, aquelas que codificam para D fraco são em vermelho.

Fonte: Transfus Sangue, v.5, n.2, p. 50-57, 2007.

A proteína E difere da proteína “e” em apenas um aminoácido (preto na figura 1), mas em posição importante quando da substituição de uma prolina (E) na posição 226, para uma alanina (e), na quarta alça extracelular (Pro226Ala). Polimorfismo produzido por mutação missense em apenas um nucleotídeo do gene (CREDIDIO, 2010; GIRELLO, KUHN, 2002; RODRIGUES; CASTILHO, 2002; RODRIGUES, 2005).

A proteína D (presente em indivíduos Rh positivos) difere da proteína CcEe em 35 aminoácidos (amarelo na Figura 1). Devido a esta grande diferença, o antígeno D é tão imunogênico para os indivíduos que não o possuem, sendo que isto pode explicar porque o sistema Rh frequentemente induz uma resposta imune muito forte (WESTHOFF, 2005).

O antígeno C^w, do sistema Rh, é produzido por um gene variante de RHCE. Não se trata de um antígeno C fraco, mas de um novo antígeno que pode estar presente independentemente dos fenótipos C/c., é um antígeno de baixa frequência, estimado em menos de 2% em brancos (GIRELLO, KUHN, 2002). Este antígeno foi descoberto em 1946, por Callender e Race (1946), em um doente de genótipo Cde/CDe, que tinha recebido várias transfusões. Demonstrou-se, posteriormente, que este antígeno, encontrado várias vezes em indivíduos Rh (D) positivo, estava ligado ao fator C(rh⁻), sendo um terceiro alelo da série C-c ao qual seus descobridores denominaram C^w, sendo o símbolo W a inicial do doador (Willis), cujos glóbulos continham o referido antígeno que estimulava a formação do anticorpo anti-C^w (LIMA et al., 2001).

Tabela 5 – Diferença estrutural entre os antígenos C, c, C^w

Antígenos	Posição na proteína	Aminoácidos
C/c	41	Glicina
C ^w	41	Arginina

Fonte: Girello e Kuhn, 2002.

Várias nomenclaturas foram anteriormente desenvolvidas: Fischer-Race (CDE), Wiener (Rh-hr), Rosenfield (numérico), sendo as duas primeiras baseadas em modelos genéticos postulados para explicar a origem dos antígenos desse sistema.

O modelo genético de Fischer e Race (CDE) propõe que a produção dos antígenos é controlada por três pares de genes alelos (sendo os genes D, C,c,E,e),

cujos loci estão estreitamente ligados, formando complexo genético que é transmitido em bloco durante a meiose (haplótipos). Cada haplótipo forma, sobre a membrana da hemácia, uma combinação específica de três antígenos, e cada indivíduo herda dois haplótipos (um materno, outro paterno). Se os dois haplótipos são idênticos, o indivíduo é homocigoto, se são diferentes, heterocigoto (GIRELLO; KUHN, 2007).

Na atualidade, sabe-se que essa teoria genética não é verdadeira, porém sua nomenclatura para os antígenos Rh permaneceu, sendo muito utilizada em bancos de sangue (GIRELLO; KUHN, 2002).

Wiener com base em seu modelo genético estabeleceu a nomenclatura Rh-Hr, que é de mais difícil compreensão. Pela sua teoria, existe apenas um par de genes alelo no locus Rh que produz um só antígeno (aglutinógeno) com múltiplas especificidades, chamadas de fatores do sistema Rh (GIRELLO; KUHN, 2002). Cada gene e cada aglutinógeno com suas especificidades (fatores) são representados conforme Tabela 6 (GIRELLO; KUHN, 2007).

Como se sabe, herda-se um par de genes alelos dos progenitores e, assim, o fenótipo de cada indivíduo é representado, na terminologia Rh (Wiener), de acordo com a combinação dos genes herdados dos pais: R^1R^1 , R^1R^2 , R^2r , rr , etc (GIRELLO; KUHN, 2002, 2007).

Atualmente, embora os estudos comprovem que ambas as teorias estão incorretas, permaneceram as nomenclaturas. Na realidade dois genes RHD e RHCE (e alelos) são os responsáveis pela formação das proteínas RhD e RhCE(ce), conforme sugerido na teoria desenvolvida por Patrícia Tippett em 1986 (GIRELLO; KUHN, 2002, 2007).

Foi, então, observada a necessidade de uma linguagem universal pela ISBT que formou o grupo de Trabalho sobre Terminologia dos Antígenos de superfície da Hemácia. Sua intenção era estabelecer uma nomenclatura uniforme que tanto as pessoas como os aparelhos pudessem compreender e que seguissem a base genética dos grupos sanguíneos.

A ISBT adotou um número de seis dígitos para cada especificidade de grupos sanguíneo autenticada. Os primeiros três números representam o sistema, e os três restantes representam a especificidade antigênica. O número 004 foi atribuído ao sistema Rh. Os bancos de sangue devem estar familiarizados com as nomenclaturas

de Fischer-Race, Wiener, Rosenfield e ISBT e devem ser capazes de compará-las, quando lendo, escrevendo ou discutindo o sistema Rh (Tabela 6).

Tabela 6 – Teorias Genéticas e nomenclaturas do Sistema Rh

<i>Tippett</i>	<i>Tippet</i>	<i>Fischer-Race</i>	<i>Fischer - Race</i>	<i>Wiener</i>	<i>Wiener</i>	<i>ISBT</i>	<i>Incidência (%)</i>	<i>Incidência (%)</i>
1º locus	2º locus	Gene	Antígenos	Gene	Fenótipo		Branco	Negros
RHce	RHD	Dce	D,c,e	R ⁰	R ₀	RH1,2,3,4,5	6,93	38,45
RHCe	RHD	DCe	D,C,e	R ¹	R ₁	RH1,2,-3,4,5	40,63	18,78
RHcE	RHD	DcE	D,c,E	R ²	R ₂	RH1,-2,3,4,5	13,88	14,37
RHCE	RHD	DCE	D,C,E	R ^z	R _z	RH1,2,3,-4,5	0,38	0,00
RHce		dce	d,c,e	r	r	RH-1,2,3,4,5	35,96	24,37
RHCe		dCe	d,C,e	r'	r'	RH-1,2,3,4,5	1,07	3,31
RHcE		dcE	d,c,E	r''	r''	RH-1,2,3,4,5	0,52	0,48
RHCE		dCE	d,C,E	r ^y	r _y	RH-1,2,3,4,5	0,00	0,00

Fonte: Girello e Kuhn, 2007.

No Quadro 2, encontram-se os tipos comuns e raros de genótipos Rh, conforme a nomenclatura de Wiener e Fischer-Race, mais utilizados e a frequência com que aparecem.

	<i>Wiener (Gene)</i>	<i>Fischer-Race (Gene)</i>	<i>Frequência (%) (aprox. em brancos)</i>
Genótipos comuns	R ¹ r	DCe/dce	33
	R ¹ R ¹	DCe/DCe	18
	rr	dce/dce	15
	R ¹ R ²	DCe/DcE	11
	R ² r	DcE/dce	9
	R ² R ²	DcE/DcE	2
Genótipos raros	r'r	dCe/dce	1
	r'r'	dCe/dCe	0,01
	r''r	dcE/dce	1
	r''r''	dcE/dcE	0,03
	R ⁰ r	Dce/dce	2
	R ⁰ R ⁰	Dce/Dce	0,1
	ryr	dCE/dce	raro

Quadro 2 – Tipos comuns de Genótipos Rh, segundo as nomenclaturas e frequências

Fonte: Harmening, 2006.

Quanto ao antígeno D, do sistema Rh, é o mais importante deste sistema, devido ao seu envolvimento na doença hemolítica do recém-nascido, nas reações transfusionais hemolíticas e nas anemias hemolíticas autoimunes (CASTILHOS, 2005; CREDIDIO, 2010; RODRIGUES; CASTILHO, 2002; RODRIGUES, 2005; ROSA).

A presença ou ausência do antígeno Rh D nas hemácias determina o fenótipo conhecido. Portanto, o indivíduo considerado Rh positivo possui os dois genes (RHD e RHCE), enquanto Rh negativo, quase em sua totalidade, o RHD está deletado (CREDIDIO, 2010; GIRELLO; KUHN, 2002; RODRIGUES; CASTILHO, 2002; ROSA; CASTILHOS, 2005). Aproximadamente 55% dos indivíduos Rh D positivos são heterozigotos em seu locus Rh D (BAIOCHI; NARDOZZA, 2009).

O antígeno D pode variar de expressão fenotípica devido a alterações qualitativas/ quantitativas: D normal, D fraco (antigamente designado Du) e D parcial (Figura 2). O limite para a diferenciação entre antígenos D fraco e parcial, dependendo de sua categoria, é muito tênue (GIRELLO; KUHN, 2002, 2007).

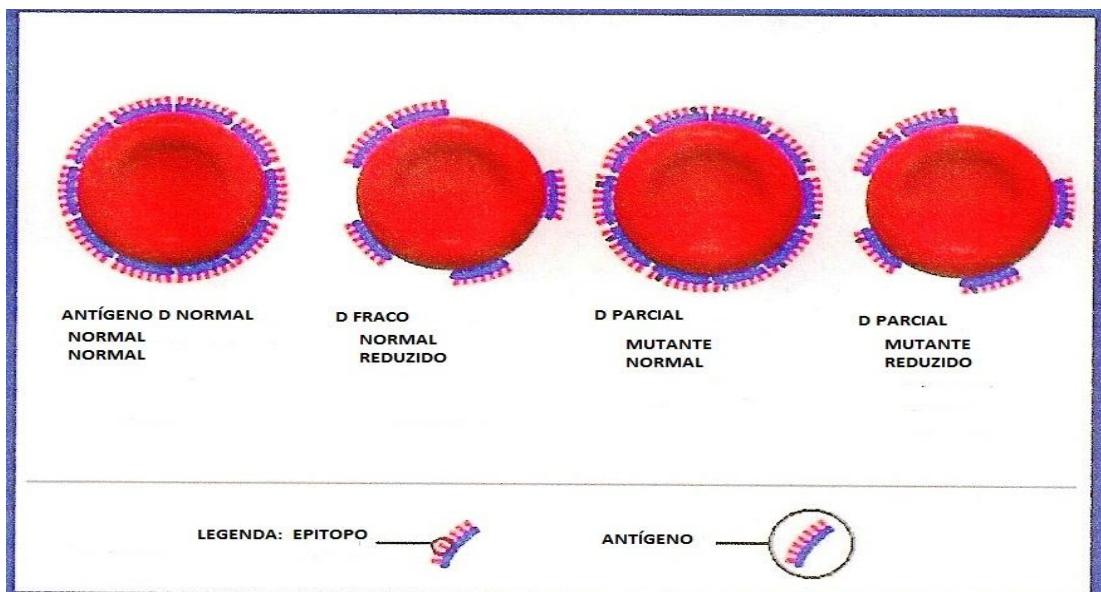


Figura 2 - Variantes Rh D nas hemácias. A 1ª hemácia representa uma hemácia Rh D normal, a qual contém número adequado de antígenos e a presença de todos os epítopos D. A 2ª hemácia representa uma hemácia com o fenótipo Rh D fraco, onde há quantidade reduzida de antígenos, porém com todos os epítopos Rh D presentes. A 3ª hemácia representa o fenótipo Rh D parcial, o qual possui quantidade completa de antígenos, porém com um ou mais epítopos alterados em cada antígeno. A 4ª hemácia possui o fenótipo Rh D parcial fraco, onde há número reduzido de antígenos por hemácia e também epítopos alterados nestes antígenos.

Fonte: Sabino, 2008.

O indivíduo com fenótipo D fraco apresenta um enfraquecimento de reatividade em função de um número menor de sítios antigênicos expressos na membrana eritrocitária (MELO; SANTOS, 1996). A densidade antigênica do antígeno RhD normal varia entre 10.000 a 25.000 sítios por hemácias, enquanto que os antígenos RhD fraco apresentam densidades antigênicas que variam de 66 a 5000 sítios antigênicos por hemácia (CASTILHO, 2008; WESTHOFF, 2004) .

O antígeno RhD Fraco foi descrito por Stratton (1946) e por apresentar fraca expressão do antígeno RhD, dependendo do antisoro Anti-D utilizado, reage apenas pelo teste de antiglobulina humana (CREDIDIO, 2010; ROSA; CASTLHOS, 2005).

A Figura 3 mostra a variação da densidade antigênica dos antígenos D fraco mais comuns:

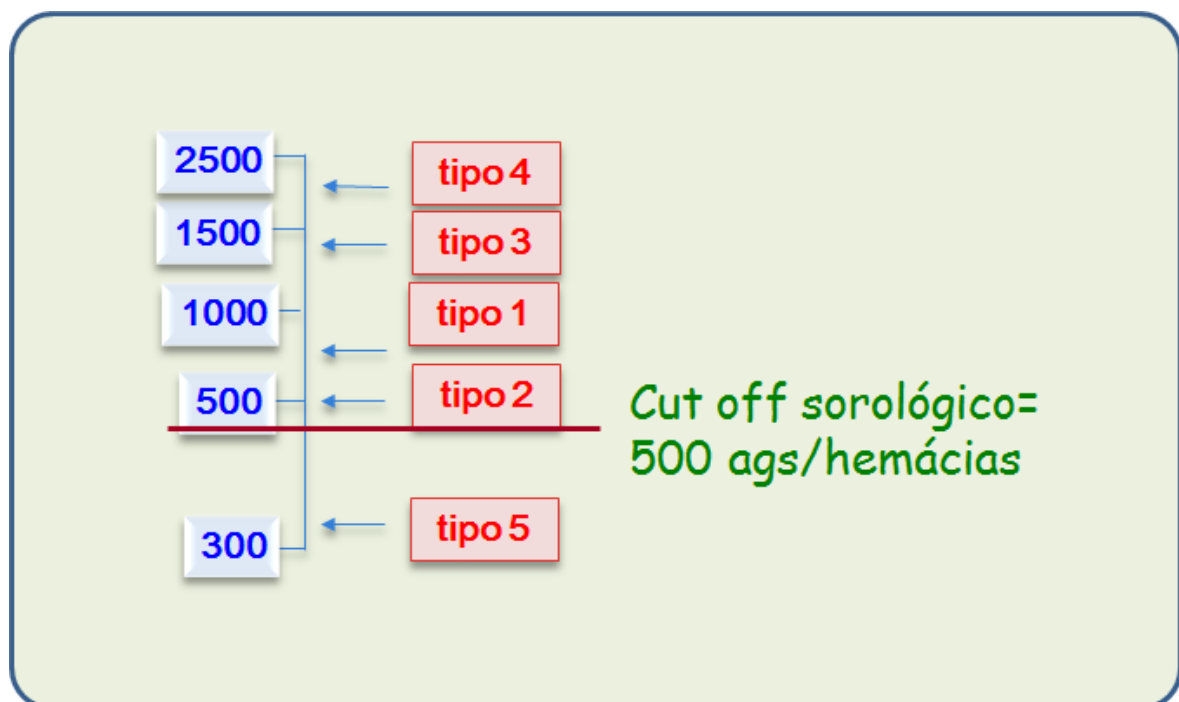


Figura 3 - Densidades antigênicas de antígenos RhD fraco mais comuns.

Estes fenótipos D Fraco podem surgir como uma consequência de mutações de ponto *missenses* em diferentes exons do gene RHD. Mais de 70 tipos de D fracos já foram descritos (<http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/>). As substituições dos aminoácidos dos diferentes tipos de D fraco estão localizados nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína Rh D (não reconhecida pelos

anticorpos) (Figura 4). Este fato explica a fraca expressão do antígeno RhD na membrana da hemácia, bem como a ausência de aloanticorpo anti-D na maioria dos indivíduos D fracos (CASTILHO, 2007; COUTINHO, 2008; CREDIDIO, 2010; MÜLLER et al., 2001; RODRIGUES, 2005; ROSA, 2005).

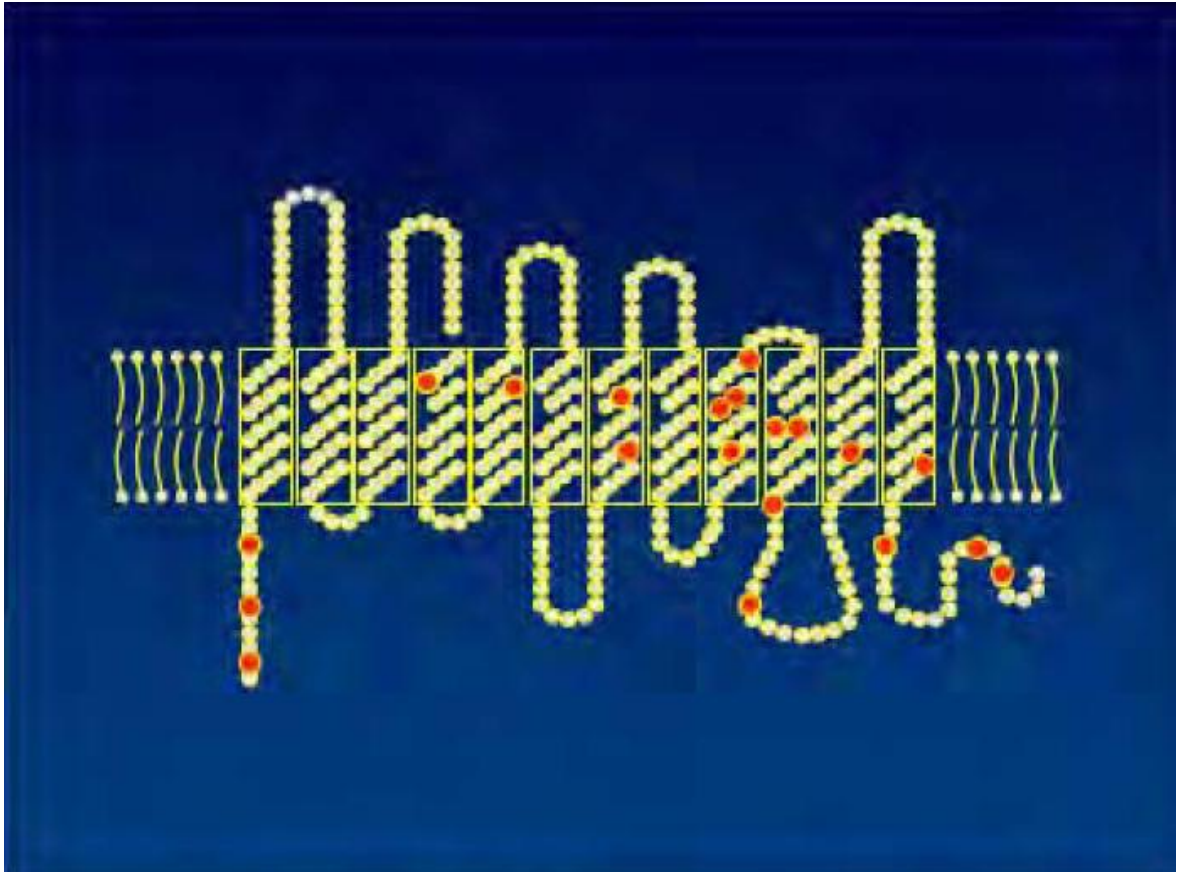


Figura 4 - Proteína Rh D fraco. Aminoácidos em vermelho indicam que as substituições na proteína Rh D fraco ocorrem nas regiões transmembranares e intracelulares
Fonte: Sabino, 2008.

O Antígeno D é considerado como um mosaico composto por 37 epítomos, onde pelo menos 9 epítomos já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais, o indivíduo D normal possui todos os epítomos (BARROS et al., 2006; CASTILHO, 2007; CREDIDIO, 2010; GIRELLO; KUHN, 2002, 2007; RODRIGUES, 2005).

O indivíduo D parcial é caracterizado pela presença, ausência e/ou alteração de um ou mais epítomos do antígeno D. Os epítomos Rh são altamente conformacionais, sendo que qualquer alteração de aminoácidos em uma parte da

proteína pode afetar a expressão da sequência de epítomos ou resultar em novos epítomos (AVENT; REID, 2000).

A análise molecular das variantes do antígeno RhD mostrou que a perda de expressão de certos epítomos está associada a mutações de ponto no gene RHD ou a rearranjos gênicos entre os RHD e RHCE. As variantes DII, DIIIa, DIVa, DVII, DAR, DHMi, DAU, entre outras, ocorrem pela presença de mutações de ponto no gene RHD, enquanto as variantes DIIIb, DIIIc, DIVb, DVI, DFR, DBT e outras ocorrem pela formação de genes híbridos, em que um fragmento do gene RHD é substituído por um fragmento genômico do gene RHCE (CREDIDIO, 2010; RODRIGUES, 2005).

Estas alterações ocorrem nos segmentos extracelulares da proteína RhD, as alças onde estão localizadas os epítomos Rh, mudando a sua conformação e a exposição dos epítomos de RhD (Figura 5). Este fato explica porque os indivíduos com o fenótipo RhD parcial perdem a expressão de alguns epítomos do antígeno D e podem desenvolver aloanticorpos anti-D ao entrar em contato com hemácias RhD positivas normais (BARROS et al, 2006; CASTILHO, 2007; COUTINHO, 2008; CREDIDIO, 2010; RODRIGUES, 2005; ROSA, 2005; SABINO, 2008).

Uma particularmente fraca expressão do antígeno D é denominada DEL, pois só poderia ser demonstrada através de eluição ou biologia molecular; as alterações genéticas são mais severas do que as observadas no D fraco. Todos alelos DEL são raros na Europa, mas até 30% dos indivíduos D negativos, do leste da Ásia são portadores de alelo DEL RHD (FLEGEL, 2007).

Ao analisar as variantes D parcial, a densidade antigênica é de 500 a 25.000 e na variante Del esta densidade pode ser menor que 50 sítios/hemácias, o que torna a identificação passível de técnicas específicas (CASTILHO, 2008; CREDIDIO, 2010).

O reconhecimento de amostras com fraca expressão do antígeno RhD depende do método e da qualidade do reagente anti-D empregado.

Como a diferenciação entre os antígenos RhD fraco e parcial é difícil de ser caracterizada na rotina sorológica, muitos pacientes têm produzido anti-D, pelo fato de terem sido considerados RhD positivo (BARROS et al., 2006; CREDIDIO, 2010; RODRIGUES, 2005).

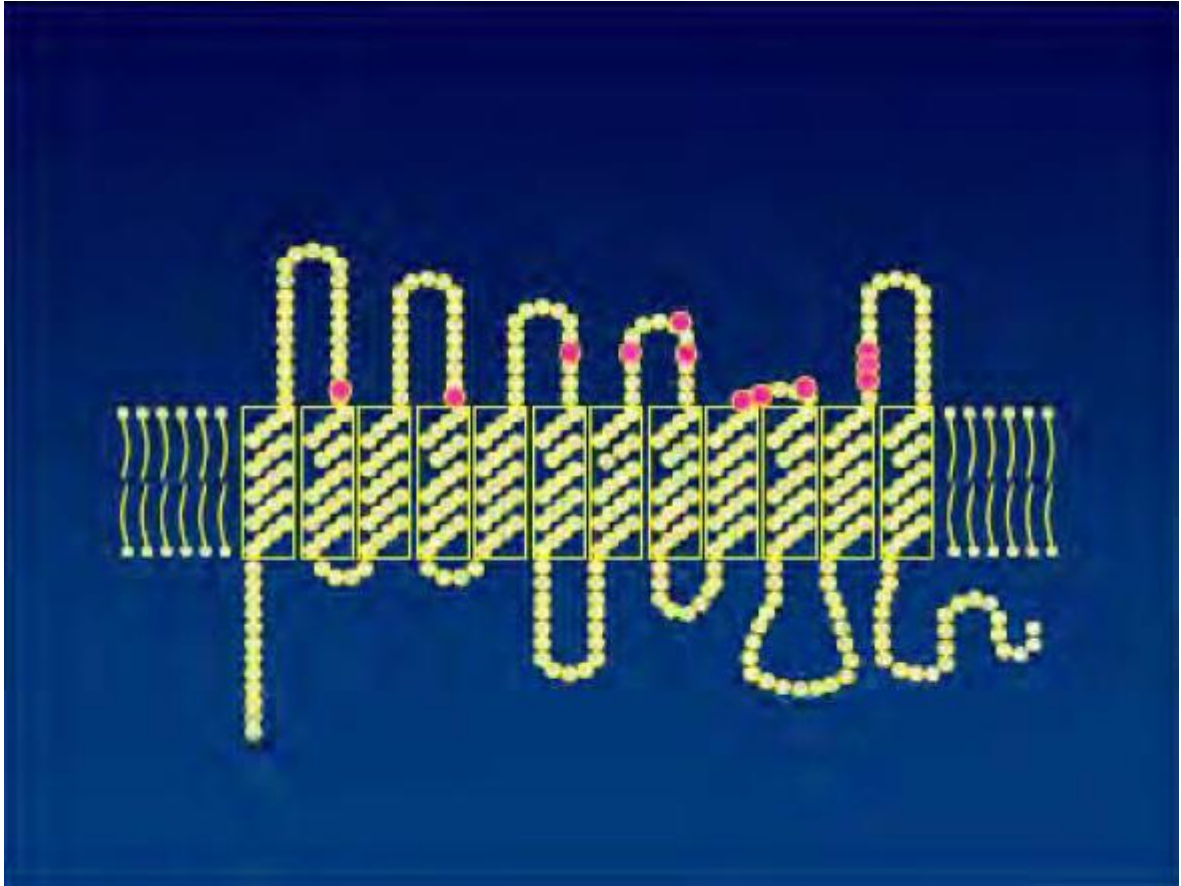


Figura 5 — Proteína Rh D parcial. Aminoácidos em rosa indicam que as substituições na proteína Rh D parcial ocorrem nas alças extracelulares onde se localizam os epítomos RhD.
Fonte: Sabino, 2008.

Sorologicamente, o fenótipo D parcial é determinado de acordo com a reatividade obtida com painel de soros monoclonais anti-D, sendo então divididos em categorias. Até o momento, nove categorias foram definidas, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7 – Categorias dos antígenos D parciais

Categorias	Epítomos presentes								
	epD1	epD2	epD3	epD4	epD5	epD6	epD7	epD8	epD9
II	+	+	+	-	+	+	+	+	-
III a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
III c	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IV a	-	-	-	+	+	+	+	+	-
IV b	-	-	-	-	+	+	+	+	-
V a	-	+	+	+	-	+	+	+	+
VI	-	-	+	+	-	-	-	-	+
VII	+	+	+	+	+	+	+	-	+
DFR	-	-	+	+	-	-	-	-	+
DBT	-	-	-	-	-	+	-	+	-

Fonte: Girello e Kuhn, 2002.

A perda da expressão antigênica da proteína D, nas hemácias de indivíduos Rh negativos, é gerada por três mecanismos principais; nos caucasóides o mecanismo é a deleção total do gene RHD. Na raça negra ocorre o chamado pseudogene (RHD ψ), analisando-se molecularmente, este gene apresenta-se mutado, portanto, fenotipicamente estes indivíduos são identificados como Rh negativos, mas genotipicamente possuem a presença de um alelo denominado RHD ψ , (pseudogene RHD).

Além disso, foi observado em 15% dos africanos, a presença de um gene RHD híbrido (RHD-CE-D). Esse gene codifica uma proteína alterada com fraca expressão do antígeno RhC e nenhuma expressão do antígeno RhD. Assim, a correta dedução do fenótipo RhD em africanos deve levar em consideração a presença do RHD ψ e do gene híbrido RHDCED (CASTILHO, 2007; GIRELLO; KUHN, 2002; RODRIGUES, 2005; ROSA, 2005).

Em asiáticos, 10% a 30% dos fenótipos Rh negativos são D Del, que expressam fracamente o antígeno D, e assim são erroneamente, enquadrados como Rh negativos nos teste convencionais para tipagem sanguínea (BAIOCHI et al., 2009). Segundo NARDOZZA (2010), a variante D mais comum nos Asiáticos D negativos é o fenótipo Del RhD.

A ausência de expressão dos antígenos Rh na membrana das hemácias determina o raro fenótipo Rh null. O complexo Rh é crítico para a estrutura da membrana. Os eritrócitos Rh null, que faltam esta proteína, apresentam uma anemia crônica de grau variável associada a estomatócitos e esferócitos e aumento da permeabilidade a íons. Estudos familiares mostraram que a deficiência Rh está associada com consanguinidade e surge de diferentes origens genéticas (CASTILHO, 2007).

A frequência fenotípica e genotípica do sistema Rh pode diferir entre populações como uma consequência da miscigenação entre os indivíduos de diferentes grupos raciais (BEIGUELMAN, 2003).

A aplicação de estudos sorológicos e moleculares se faz necessária e se complementa para esclarecer e definir o perfil de doadores e/ou receptores de hemocomponentes (CASTILHO, 2007).

As técnicas moleculares permitem distinguir as hemácias que perdem ou apresentam epítomos alterados (RhD parcial) daqueles que possuem níveis reduzidos do antígeno RhD (RhD fraco). Esta diferenciação é importante para prevenir a aloimunização em receptores e gestantes, uma vez que indivíduos com variantes de D apresentam risco de aloimunização.

2.2.3 Sistema Kell

O sistema de grupo sanguíneo Kell é uma interessante mescla de antígenos de alta e baixa frequências (HARMENING, 2006). Atualmente, os 24 antígenos conhecidos fazem do sistema de grupo sanguíneo Kell o terceiro sistema de antígenos eritrocitários mais polimórficos (BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007). Estão bem desenvolvidos ao nascimento e são expressos, principalmente, na superfície da membrana dos eritrócitos e, também, em órgãos linfóides, cérebro, coração e músculo esquelético, entre outros (GIRELLO; KUHN, 2002).

O Sistema Kell foi o primeiro a ser descoberto, por meio do teste de antiglobulina humana, em 1946, pela demonstração do anticorpo anti-K em caso de doença hemolítica perinatal. O antígeno K (Kell, K1) foi o primeiro a ser descrito,

seguido do antígeno k (Cellano, K2) três anos mais tarde. Este anticorpo evidenciou pertencer ao sistema Kell porque é antitético em relação ao anti-K, já que a maioria dos indivíduos K- são k+, do mesmo modo que, praticamente, todos os indivíduos k- são K+ (HARMENING-PITTIGLIO; FLYNN, 1992).

Kell permaneceu como sistema de dois antígenos até que Allen et al. descreveram os antígenos antitéticos Kpa, e Kpb em 1957 e 1958, respectivamente. Padrões de hereditariedade e estudos estatísticos confirmaram sua relação com o sistema Kell. Do mesmo modo, foi constatado que Jsa, descrito em 1957 por Giblett, e Jsb, descrito por Walker et al., em 1963, eram antitéticos e estavam relacionados ao sistema Kell. A descoberta do fenótipo nulo em 1957, designado Ko, ajudou a associar muitos antígenos ao sistema Kell (HARMENING, 2006). Os raros indivíduos em que a proteína Kell não se forma manifesta o fenótipo Ko, por não haver a possibilidade de existência dos antígenos Kell (BEIGUELMAN, 2003).

Os alelos Kpa e Kpc são mutações de baixa frequência do seu correlato de alta frequência Kpb. O antígeno Kpa é encontrado em 2% dos brancos. O antígeno Jsa, antitético para o antígeno de alta frequência Jsb, é encontrado em cerca de 20% dos negros, mas em menos de 0,1% de brancos (HARMENING, 2006).

Assim, antígenos K e k, determinados por um par de alelos K e k, constituem uma série; os antígenos Kpa, Kpb, Kpc, dependentes dos alelos Kpa, Kpb, Kpc, constituem outra série, e os antígenos Jsa e Jsb, determinados pelos respectivos alelos, compõem outra série (BEIGUELMAN, 2003).

Os estudos populacionais mostram que o fenótipo Kp (a-b+c-) é encontrado em praticamente 100% dos negros e em cerca de 98% dos caucasóides. Os 2% restantes apresentam fenótipo Kp (a+b+c-) (BEIGUELMAN, 2003).

Os antígenos do sistema Kell são altamente imunogênicos e os anticorpos anti-K são, na maioria das vezes, imunes, mas podem ocorrer de forma natural (LEVINE et al., 1949), e também descoberto em um caso de Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN). Podem causar graves Reações e Transfusões incompatíveis, assim como anemia fetal e Doença Hemolítica do Recém-Nascido (BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007).

Os antígenos deste sistema estão localizados em uma glicoproteína N-glicosilada de 93 KDa, produto de um único gene, KEL, que contém 19 éxons, situado no braço longo do cromossomo 7 e que interage com a proteína XK (GIRELLO; KUHN, 2002).

Foram descritos, posteriormente, diversos antígenos de menor frequência. O sistema associa-se ao sistema Kx ---, o qual apresenta apenas um antígeno, o Kx. A glicoproteína que contém os antígenos Kell se liga ao antígeno Kx por meio de pontes dissulfídicas, produzido por um gene localizado no cromossomo X (BEIGUELMAN, 2003). A relação entre o sistema Kell com o Kx foi notada pela primeira vez por Allen et al. (1961) em um doador.

As manifestações que foram chamadas inicialmente de fenótipo McLeod, em alusão ao nome desse doador, e que ocorrem apenas em indivíduos do sexo masculino, passaram a receber a designação de síndrome de McLeod, a qual inclui entre seus sinais a manifestação de acantócitos eritrocitários, ou seja, hemácias com maior densidade e com espículas irregulares, graus variados de atrofia progressiva das fibras musculares e redução da expressão de todos os antígenos do sistema Kell (BEIGUELMAN, 2003; GIRELLO; KUNH, 2007).

Com o emprego de antissoros anti-K, foi possível constatar que cerca de 9% dos indivíduos caucasóides possuem o antígeno K (fenótipo K+), sendo esta porcentagem menor em negros (entre 1 a 3%) e, praticamente nula nas populações do extremo oriente. Além disso, as medidas preventivas - contra imunização pelo antígeno D do sistema Rh negativo reforçaram a importância do antígeno Kell entre as causas de Doença Hemolítica do Recém-Nascido, a presença do anticorpo anti-Kell no feto e posteriormente no recém-nascido, podendo levá-lo à anemia grave devido ao efeito inibitório da eritropoiese, independente da concentração do anticorpo (BEIGUELMAN, 2003).

Recomenda-se estimar os níveis de hemoglobina fetal nos casos de grande probabilidade de DHRN por anti-K. Aproximadamente 50% dos bebês acometidos requerem fototerapia associada a exsanguineo-transfusão. A maioria dessas crianças necessita de transfusão periódica após o nascimento até que a eritropoiese seja totalmente restabelecida. Eritropoetina recombinante tem sido empregada com sucesso para evitar transfusões. Os anticorpos Kell têm sido reportados como supressores da mielopoese e megacariopoese, podendo causar trombocitopenia nos fetos com DHRN (BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007; GIRELLO; KUNH, 2007).

Tabela 8 – Frequência dos fenótipos Kell

Fenótipo	Branços (%)	Negros (%)
K-k+	91,0	96,5
K+k+	8,8	3,5
K+k-	0,2	<0,1
Kp(a+b-)	<0,1	0
Kp(a+b+)	2,3	Raro
Kp(a-b+)	97,7	100
Js(a+b-)	0	1
Js(a+b+)	raro	19
Js(a-b+)	100	80

Fonte: Harmening, 2006.

Os intensos processos de miscigenação que ocorreram no Brasil desde o período de sua colonização, atribuiu à população brasileira um antecedente étnico, devido ao grande fluxo gênico de indivíduos Africanos, Europeus e Asiáticos entre a população.

2.2.4 Prevalência dos Grupos Sanguíneos Encontrados em Doadores e Pacientes

Uma grande variedade de testes permite a realização da tipagem e fenotipagem dos grupos sanguíneos. Entre eles tem-se o método de aglutinação em microplacas, que usa hemácias magnetizadas, a técnica de gel centrifugação e a técnica em tubos, tida como referência (GIRELLO; KUNH, 2007).

Sabe-se que a transfusão correta, quanto ao grupo sanguíneo, evita a ocorrência de reações de incompatibilidade sanguínea, que causam hemólise, e até mesmo a morte do receptor. Há vários trabalhos no Brasil e em outros países que avaliam a prevalência da distribuição dos sistemas sanguíneos. Estudos desta natureza podem contribuir para um melhor planejamento da demanda de derivados sanguíneos necessários à população.

Em um estudo feito em colaboração com serviços franceses de sangue, em 2002, foi demonstrada a frequência nos grupos do sistema ABO, em doadores, pacientes e recém-nascidos (RN), naquela região. O resultado obtido em doadores indicou: 45,6% pertencentes ao grupo “O”; 41,8% ao grupo “A”; 8,24% ao grupo “B”;

e, 4,41% ao grupo “AB”. Os pacientes tiveram como resultado fenotípico: 40,6% pertencentes ao grupo “O”; 43,8% ao grupo “A”; 10,5% ao grupo “B”; e 4,89% ao grupo “AB”. Enquanto os RN mostraram uma fenotipagem de: 49,7% pertencentes ao grupo “O”; 30,8% ao grupo “A”; 10,5% ao grupo “B”; 5,59% ao grupo “AB” (JOCE, 2002).

Estudos realizados por Pacheco e Hidalgo (2002), em La Paz, na Bolívia, demonstraram que a fenotipagem do grupo sanguíneo para o sistema ABO, naquela região, era de: 58,49% pertencente ao grupo “O”; 31,4% ao grupo “A”. A prevalência do grupo “B” foi de 8,4% e a do “AB” foi de 1,71 % .

Viamonte e Manguart (1997) determinaram a frequência dos grupos ABO, em um serviço de Hemoterapia, na cidade de Havana, onde foi encontrada a prevalência de 49,2% do grupo sanguíneo “O”; 35,5% do grupo “A”; 11,5% do grupo “B”; e 3,8% do grupo “AB”, e que estes dados não apresentam variações significativas quando comparados a outras regiões de Cuba.

Novaretti, Dorlhia e Chamone (2000) realizaram estudos de grupos sanguíneos em doadores de sangue da Fundação Pró Sangue/Hemocentro, na cidade de São Paulo. Foram estudados 2.462 doadores e classificados em caucasóides ou negróides, de acordo com suas características antropológicas e pela informação de seus ancestrais. Quanto ao sistema ABO, os resultados apontaram: 49,23% do tipo sanguíneo “O”; 33,71% do tipo “A”; 13,93% do tipo “B”; e 3,13% do tipo “AB”.

Estudos realizados com doadores de sangue em São Paulo, por Mattos et al. (2001), apresentaram uma frequência fenotípica para os grupos do sistema ABO de: 46,13% de indivíduos do tipo “O”; 36,4% do tipo “A”; 9,8% correspondente ao tipo “B”; e 7,5% do tipo “AB” .

Bonini-Domingos et al. (2003), em estudos realizados no período de agosto a dezembro de 2000, avaliaram 200 amostras de sangue de alunos da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), em São José do Rio Preto, SP. Destes indivíduos, 187 apresentavam características caucasóides e 13 não caucasóides, descendentes de japoneses. As análises para o sistema ABO mostraram que: 78 (39,0%) alunos pertenciam ao grupo sanguíneo “A”; 15 (7,5%) ao grupo “B”; 5 (2,5%) ao grupo “AB”; e 102 (51,0%) ao grupo “O” .

Baiochi et al. (2007) verificaram a frequência fenotípica e o risco de incompatibilidade Materna Rh D, na população da zona oeste de São Paulo. Neste

estudo descreveram a fenotipagem de 2.372 puérperas e seus RN vivos, no período de um ano. Este estudo mostrou os seguintes resultados: mães do grupo sanguíneo “O” foram 50,67%; do grupo “A”, 32,17%; do grupo “B”, 13,45; e, do grupo “AB”, 3,71%. A fenotipagem dos RNs demonstrou que 47,88% eram do tipo “O”; 34,44% do tipo “A”; 14,67% tipo “B”; e 3,01% do tipo “AB”, num total de 2.427 RNs, devido aos gemelares e trigêmeos.

No Rio Grande do Sul, um estudo realizado por Merele et al. (2006), em 5.529 doadores de sangue, entre julho de 2001 e setembro de 2002, em um hospital universitário de Porto Alegre-RS, constatou que 1.755 (39,01%) pertenciam ao tipo sanguíneo “A”; 427 (9,49%), ao grupo sanguíneo “B”; 136 (3,02%), ao grupo “AB”; e, 2.181 (48,48%), ao grupo “O”.

Ao comparar-se a prevalência da distribuição do Sistema ABO, encontrada nestes estudos, os resultados são equivalentes aos encontrados por Davey e Henry (1999), sendo considerada a frequência fenotípica em 45,0% pertencentes ao grupo “O”; 40,0%, ao grupo “A”; 11,0%, ao grupo “B”; e, 4,0%, ao tipo “AB”.

Quanto ao sistema RH e Kell, em estudos realizados em doadores de um serviço francês, por Joce (2002), a frequência fenotípica do sistema RH e Kell encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Diferença fenotípica do sistema Rh e Kell

Fenótipo	Doadores		Pacientes		Recém-nascidos	
	N	%	N	%	N	%
DCCEe	06	1,15	04	0,19		
DCCee	83	15,90	430	20,80	11	12,40
DCcEE	2	0,38	2	0,10		
DCcEe	74	14,20	246	11,90	15	16,90
DCcee	167	32,00	704	34,00	30	33,70
DccEE	18	3,45	46	2,22	3	3,37
DccEe	61	11,70	211	10,20	7	7,87
Dccee	8	1,53	89	4,30	6	6,74
dCcEe	2	0,38	1	0,05		
dCcee	12	2,30	13	0,63		
dccEe	5	0,96	16	0,77		
dccee	84	16,10	310	15,00	17	19,10
Kell +	42	8,00	172	8,30	06	6,59
Kell -	480	92,00	1902	91,70	85	93,40

Fonte: Joce, 2002.

No estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue, na cidade de São Paulo, realizado por Novaretti, Dorlhia e Chamone (2000), a frequência fenotípica do sistema Rh encontra-se na Tabela 10, e do sistema Kell, na Tabela 11.

Tabela 10 – Frequência do sistema Rh

<i>Fenótipo</i>	<i>Caucasóides</i>		<i>Mulatos</i>		<i>Negros</i>		<i>Total</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
ddccee	5	10,19	51	6,17	37	4,62	173
Dccee	69	8,27	183	22,13	293	36,58	545
ddccEe	0	0,00	4	0,48	1	0,12	5
DccEe	116	13,91	107	12,94	109	13,61	332
DccEE	20	2,40	21	2,54	13	1,62	54
ddCcee	4	0,48	9	1,09	7	0,87	20
DCcee	311	37,29	283	34,22	234	29,21	828
ddCcEe	1	0,12	0	0,00	0	0,00	1
DCcEe	87	10,43	90	10,88	60	7,49	237
DCcEE	2	0,24	1	0,12	2	0,24	5
DCCee	123	14,75	69	9,34	36	4,49	228
DCCEe	3	0,36	1	0,12	3	0,37	7
DCC ^w EE	0	0,00	0	0,00	1	0,12	1
DCC ^w Ee	0	0,00	2	0,24	0	0,00	2
DCC ^w ee	10	1,20	6	0,73	5	0,62	21
DC ^w C ^w EE	2	0,24	0	0,00	0	0,00	2
DC ^w cEE	1	0,12	0	0,00	0	0,00	1

Fonte: Novaretti, Dorlhia e Chamone, 2000.

Tabela 11 – Frequência do sistema Kell

<i>Fenótipo</i>	<i>Caucasóides</i>		<i>Mulatos</i>		<i>Negros</i>		<i>Total</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
K+k-	05	0,60	02	0,24	06	0,75	13
K+k+	61	7,31	33	3,99	17	1,21	111
K-k+	768	92,09	792	95,77	778	97,13	2.338

Fonte: Novaretti, Dorlhia e Chamone, 2000.

Sendo a fenotipagem estudada por Novaretti, Dorlhia e Chamone (2000), também para o sistema Lewis, Lutheran, Kidd, Duffy, P, MNSs, a importância do

conhecimento das diferenças nas freqüências dos grupos sanguíneos entre as populações pode ser refletida na agilização para o encontro de unidades negativas de sangue raro.

Bonini-Domingos et al. (2003), em sua avaliação do polimorfismo de grupos sanguíneos, obtiveram para o sistema Rh: 180 indivíduos Rh positivos (90%) e 20 Rh negativos (10%); em relação ao grupo sanguíneo Kell 200 indivíduos portadores do fenótipo k+ (cellano) (100%), sendo os 200 Kp (a-b+), o que difere da literatura, onde o grupo Kell (K) fica em torno de 9 a 10% e o cellano (k) de 91% (TOOD; SANFORD; DAVISON, 1989). Com o emprego de anti-soros anti-K foi possível constatar que cerca de 9% dos indivíduos caucasóides possuem o antígeno K (fenótipo K+), sendo esta porcentagem menor em negróides (entre 1% a 3%) e, praticamente, nula nas populações do oriente (BONINI-DOMINGOS et al., 2003).

Segundo estudos de Zanini et al. (2006), realizados no Hospital das Clínicas Botucatu-SP, no período de abril a julho de 2006, foram analisadas 626 amostras quanto à fenotipagem, Rh e Kell, sendo que a frequência encontra-se na Tabela 12.

Tabela 12 – Frequência do sistema Rh e Kell

Fenótipo	Nº de amostras	%
CcDee,K-k+	215	34,34
CCDee,K-k+	101	16,13
ccddee,K-k+	78	12,46
CcDEe,K-k+	73	11,66
ccDee,K-k+	53	8,47
ccDEe,K-k+	44	7,03
ccDEE,K-k+	13	2,07
CcDee,K+k+	11	1,76
ccDee,K+k+	07	1,12
CCDee,K+k+	07	1,12
Ccddee,K-k+	05	0,80
Ccddee,K+k+	04	0,64
CcDEe,K+k+	04	0,64
ccDee,K+k+	03	0,48
CCDEe,K-k+	03	0,48
CcDEe,K-k+	03	0,48
ccDEe,K+k+	01	0,16
CcddEe,K-k+	01	0,16

Fonte: Zanini et al., 2006.

Em um grupo de puérperas e seus RNs, em estudo realizado por Baiocchi et al. (2007), a frequência encontrada para o sistema Rh foi de que 2.143 (90,14%)

das puérperas eram Rh Positivo e 229 (9,66%) Rh Negativas, já os seus RNs tiveram como frequência fenotípica 2.212 (91,14%) do tipo Rh Positivo e 215 (8,86%), Rh Negativo.

A realização da fenotipagem se justifica por seus benefícios à população, com uma fenotipagem mais abrangente de seu tipo sanguíneo que ficará registrada na carteira do doador e que estará colaborando com muitas pessoas que necessitam, diariamente, do uso de diversos componentes do sangue e também, pelo aconselhamento genético, de extrema importância para a saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Analisar a prevalência antigênica eritrocitária, dos doadores de sangue, do Hemocentro Regional de Santa Maria, RS.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a frequência dos antígenos ABO nos doadores de sangue fenotipados, de Santa Maria, RS;
- Analisar a frequência dos antígenos do sistema Rh nos doadores fenotipados, de Santa Maria, RS;
- Analisar os tipos de doadores D Fraco e D Parcial, assim como sua frequência , através de genotipagem;
- Analisar a frequência dos antígenos Kell nos doadores de sangue fenotipados, de Santa Maria, RS;
- Construir um Banco de Sangue Vivo de doadores cadastrados, fenotipados e conscientizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras utilizadas foram dos doadores de sangue do Hemocentro de Santa Maria, no período compreendido entre março de 2009 e outubro de 2010 foi realizada a fenotipagem nos doadores selecionados, conforme perfil analisado, residentes em Santa Maria. Neste estudo foram fenotipados 2351 doadores, estimando-se um total de cem doadores fenotipados ao mês.

Com o propósito de identificar o perfil do doador que participaria do Programa de Fenotipagem de Doadores, foi aplicado um questionário (Apêndice B) pela equipe de triagem do Hemocentro, situação na qual foi assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

A coleta da amostra foi feita por venopunção, após consentimento informado, por ocasião da coleta de exames imunohemátológicos de rotina, sendo que não foi realizada nenhuma coleta adicional e o anticoagulante utilizado foi EDTA.

4.2 Aspectos éticos

O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal de Santa Maria (CONEP/MS), tendo sido aprovado no dia 5 de dezembro de 2008, sob o nº do processo: 23081.013622/2008-14, e o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 0183.0.243.000-08.

Como considerações éticas, os procedimentos foram executados segundo a Resolução n.196/96, sobre pesquisa envolvendo seres humanos (BRASIL, 1996). A amostra para exames foi coletada em frascos com EDTA e sem EDTA (Soro). Foi realizada após o processo de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), com a assinatura do termo pelo sujeito de pesquisa e realizados todos os esclarecimentos que se fizeram pertinentes no ato de triagem

de doadores, realizada pela equipe médica e/ou por enfermeiros (Apêndice A).

Os dados foram coletados mediante aquiescência da instituição e dos sujeitos de pesquisa, aos quais foram garantidos o sigilo e o anonimato por meio do TCLE.

Os participantes do programa receberam uma carta de orientação denominada Carta ao Doador (Apêndice F).

4.3 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada por Tabelas Periódicas pelo teste de qui-quadrado, Testes não Paramétricos com significância de 5%. O *software* foi o *Statistical Analysis System* versão 9.1.

4.4 Destino dos materiais

Todas as amostras provenientes do Hemocentro, ao término dos testes laboratoriais, foram descartadas juntamente com os resíduos do Hemocentro.

4.5 Técnicas laboratoriais

Na rotina imunohematológica do Hemocentro, foram utilizadas as técnicas de Gel-teste Centrifugação ID-*Micro Typing System* (Diamed Latino Americana) para a tipagem direta e reversa dos doadores, na fenotipagem eritrocitária e na pesquisa de D Fraco/Parcial. Amostras para genotipagem foram encaminhadas para Unicamp, mensalmente, onde foram realizadas técnicas de PCR-Alelo Específica (AS-PCR) e PCR Multiplex.

4.5.1 Tipagem Direta usando cartões ABD Confirmação ou ABD Rh (TECHNICAL MANUAL OF AABB, 1993)

Estes testes utilizaram sangue total coletado com anticoagulante EDTA. Foi preparada uma suspensão de Hemácias a 5% em diluente- 2 (Liss), dispensado em tubos identificados, 0,5 ml do diluente e 25µl do concentrado de hemácias ou 50µl de sangue total.

Para este teste foi utilizado cartões Diaclon ABD-Confirmação, contendo anticorpos monoclonais Anti-A linhagem celular LM 297/628(LA-2), Anti-B linhagem celular LM 306/686(LB-2), e Anti-D linhagens celulares ESD-1M, 175-2 suspenso em gel, que detecta hemácias com fenótipo D VI+. Pipetou-se 10 µl da suspensão para os microtubos.

A seguir os cartões foram centrifugados a 910rpm por 10 minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões da aglutinação em gel teste. Os resultados podem ser classificados de acordo com diferentes padrões de reação, que variam de 0 (negativo) a +4 (positivo forte), como indica a Figura 6.

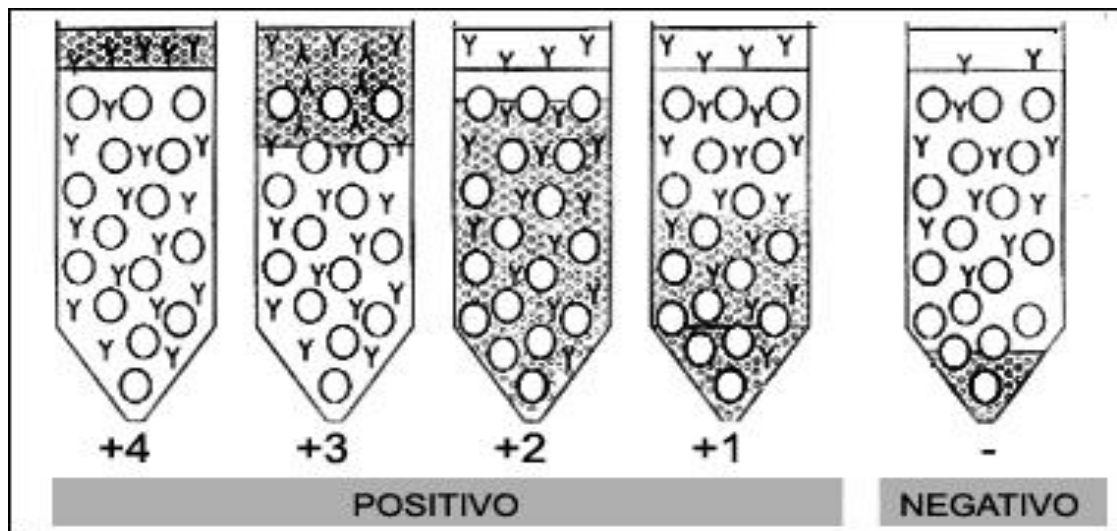


Figura 6 – Representação dos diferentes padrões de reação em microtubos.
Fonte: Manual de Técnicas Diamed, 1994

4.5.2 Tipagem Reversa em Cartão NaCl (TECHNICAL MANUAL OF AABB, 1993)

Este teste utiliza soro ou plasma. Foram utilizadas hemácias Diacell ABO, que são de origem humana, e estão em suspensão a 0,8%. Os cartões utilizados foram cartões de NaCl contendo gel neutro. Pipeta-se 50µl da suspensão de hemácias, para os microtubos respectivos marcados com A e B. Adiciona-se 50 µl de soro ou plasma do doador. Após incubação por dez minutos em temperatura ambiente (18 a 25 °C), centrifuga-se durante dez minutos a 910rpm. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões da aglutinação em gel teste.

4.5.3 Pesquisa de D-Parcial e D-Fraco (TECHNICAL MANUAL OF AABB, 1993)

Após identificação do cartão Anti-D, 10µl das hemácias em teste suspensas a 5% em diluente 1 (bromelina) e incubadas por dez minutos a temperatura ambiente foram adicionados aos microtubos contendo gel e soro Anti-D policlonal, de origem humana. Os cartões foram centrifugados a 910rpm por dez minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões da aglutinação em gel. Os doadores que apresentaram fenótipo sugestivo de D Fraco ou D Parcial (1 a 3 cruces) foram enviados para São Paulo (Unicamp), onde foram realizadas as genotipagens por técnicas de PCR.

4.5.4 Fenotipagem Rh (C,Cw ,c , E, e) e Kell (TECHNICAL MANUAL OF AABB, 1993)

Prepara-se uma suspensão de hemácias a 5% com diluente -1 (bromelina). Pipeta-se 0,5ml do diluente-1 e 25 µl do concentrado de hemácias ou 50 µl de sangue total. Incuba-se por dez minutos à temperatura ambiente (18 a 25 °C). O cartão utilizado é o cartão RH-subgrupo + Cw + K contendo anticorpos anti-C, anti-Cw, anti-c, anti-E, anti-K e anti-e de origem humana, suspenso em gel. Pipeta-se

10µl nos microtubos. A seguir, os cartões foram centrifugados a 910rpm por dez minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação em gel teste.

4.5.5 Genotipagem

4.5.5.1 Extração do DNA:

O QiAMP DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA foram utilizados na extração de DNA de amostras de sangue periférico, previamente fenotipados como D fraco ou parcial e D negativo com CDE positivo. Os DNA foram extraídos de leucócitos de sangue periférico, utilizando-se o QiAMP DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA, de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes, e os DNAs foram quantificados com o equipamento Nanodrop para se obter as concentrações.

Eletroforese em gel de agarose foram realizadas para identificação dos fragmentos obtidos por PCRs realizados. Estas técnicas foram realizadas no laboratório de imunohematologia da UNICAMP.

4.5.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Neste estudo foram utilizadas técnicas de reações em cadeia de polimerase *alelo específica* (PCR-ASP) e PCR multiplex para genotipar os doadores do Hemocentro de Santa Maria, os quais apresentaram na fenotipagem duas situações: ser D fraco e/ou D parcial ou D Negativo com o antígeno C e/ou E positivo.

A caracterização molecular dos antígenos RhD fraco e RhD parcial HMi foi realizada utilizando-se uma técnica de PCR alelo-especifico (MULLER et al., 2001) com o objetivo de identificar os tipos do antígeno RhD fraco que ocorrem com mais frequência, e detectar o antígeno RhD parcial HMi que pode ser confundido com

RhD fraco sorologicamente. As reações de PCR foram realizadas no laboratório de imunohematologia da UNICAMP.

Utilizaram-se as técnicas de PCR multiplex, que amplifica seis éxons específicos do gene *RHD*. As variantes híbridas foram identificadas pela ausência de uma dessas regiões (MAASKANT-van-WIJK, 1998) e os alelos *RHD* parciais que ocorrem pela presença de genes híbridos foram caracterizados conforme os exons amplificados. Estas técnicas foram realizadas no laboratório de imunohematologia da UNICAMP.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos estudos, foram analisados e selecionados candidatos para fazer parte de um programa de doadores fenotipados do Hemocentro de Santa Maria, conforme perfil analisado, onde um dos itens foi o de residir na cidade para que fosse possível seu retorno ao serviço caso fosse solicitado sua doação.

No período de março de 2009 a outubro de 2010, foram realizadas 11271 coletas de sangue no Hemocentro, e destes, foram selecionados 2351 doadores para ser fenotipados.

Estes doadores foram analisados quanto à freqüência fenotípica para os grupos do sistema ABO que, apesar de ter sido descrito em 1900, permanece até hoje como o sistema mais importante dentro da prática transfusional.

Foram encontradas neste estudo as seguintes freqüências: 62,56% do grupo sanguíneo "O"; 32,03% do grupo "A"; 4,47% do grupo "B"; e 0,94% foram "AB", conforme descrito na Tabela13 ou Figura 7.

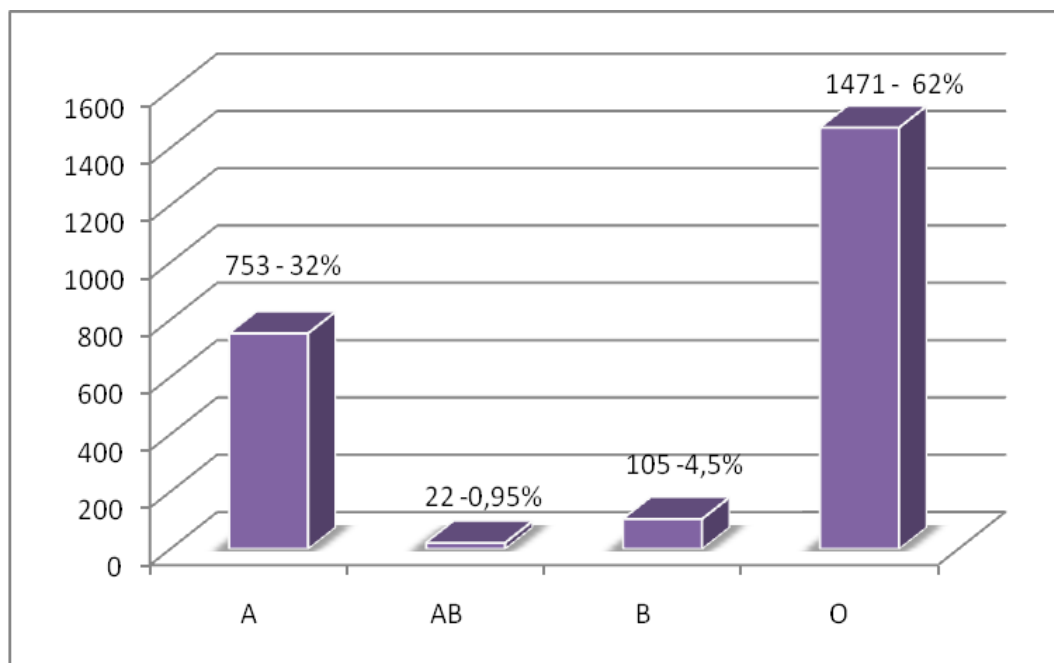


Figura 7 - Frequência sistema ABO

Tabela 13 – Frequência dos grupos ABO nos doadores fenotipados

<i>Tipagem</i>	<i>Quantidade</i>	<i>%</i>
A	753	32,03
AB	22	0,94
B	105	4,47
O	1471	62,56
Total	2351	100,00

A frequência dos grupos do sistema ABO encontrada foi diferente dos resultados apresentados em outras regiões mencionadas anteriormente, e ainda da frequência relatada na literatura, por Henry (1999), pois trata-se de um grupo selecionado de doadores cujos grupos sanguíneos são os mais utilizados e solicitados na rotina transfusional, ou seja, grupos “O” e “A” positivos e negativos, devido a isto a baixa frequência para os grupos AB e B.

Sabe-se que existem dois tipos de anticorpos: os de ocorrência natural e os imunes, devido a isso, sempre que possível, são realizadas transfusões isogrupos, principalmente para o sistema ABO.

Os 2351 doadores fenotipados, ao serem analisados quanto ao sexo, 1868 pertenceram ao sexo masculino (79,45%) e 487 ao sexo feminino (20,55%), como mostra a tabela 14.

Tabela 14 – Frequência dos doadores quanto ao sexo

<i>Sexo</i>	<i>Quantidade</i>	<i>%</i>
Feminino	487	20,55
Masculino	1868	79,45
Total	2351	100,00

Das amostras fenotipadas quanto ao sistema Rh, 1274 amostras (54,18%) foram fenotipadas como Rh positivos e 1077 amostras (45,82%) fenotipadas como Rh negativo, conforme mostrado na Figura 8.

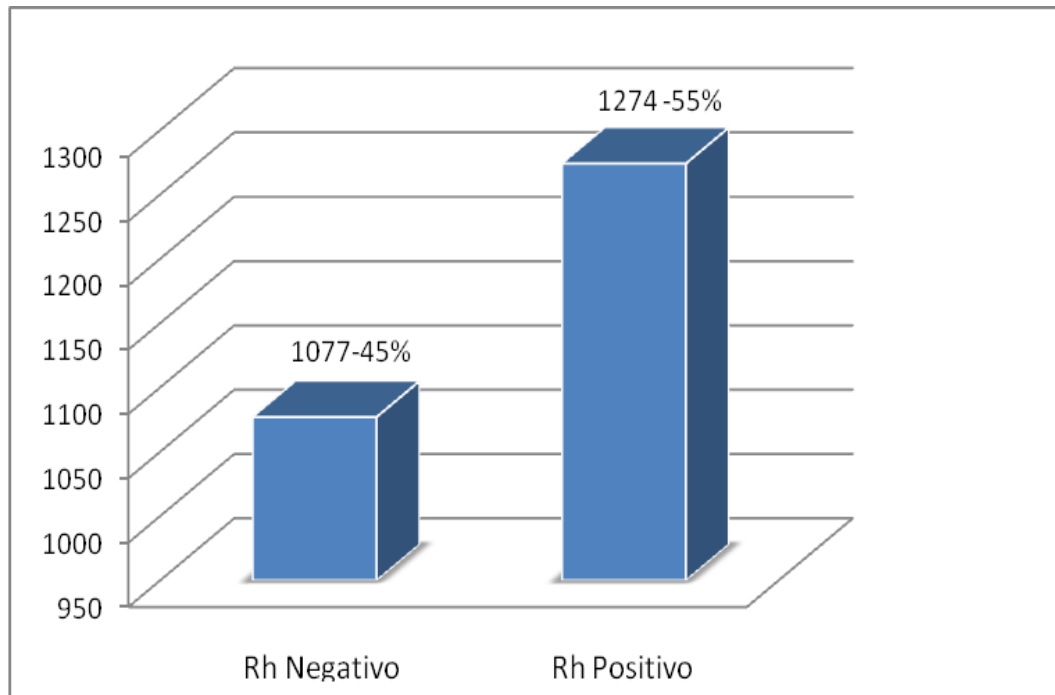


Figura 8 – Frequência do sistema Rh

Quando analisados para o sistema Rh, os 2351 doadores foram fenotipados para os antígenos D, C, C^w, c, E, e; foram encontrados 1274 (54,18%) Rh positivos e 1077 (45,82%) Rh negativos, cujos fenótipos estão descritos na Tabela 15.

Na pesquisa sobre o antígeno D e os demais antígenos deste sistema C,C^w,c,E,e, os resultados obtidos foram os fenótipos dccee (41,41 %), Dccee (12,51%), DCcee (11,70%), DCCee (11,27%). Este resultado mostra que nesta região, quanto aos doadores Rh positivos, existe uma maior frequência dos antígenos C, c, e em relação ao antígeno E.

Novaretti, Dorlhia e Chamone (2000) em seu estudo na região de São Paulo, encontrou uma maior frequência do antígeno E em seus doadores positivos. No presente estudo, foram encontrados muitos fenótipos considerados como menos comuns na literatura, como os fenótipos DccEE (1,15%), DC^wcee (0,08%), dccEe (0,60%), dCcEe (0,60%), considerados fenótipos raros por Harmening (2006).

A presença do antígeno C^w, que aparece como o terceiro alelo da série C,C^w,c, foi descrito em doadores com fenótipo Rh positivo e mais ligado ao antígeno C(rh'), conforme literatura (GIRELLO; KUNH, 2002; HARMENING, 2006; LIMA, 2001). Dos 1274 doadores Rh positivos, 0,8% possuem antígeno C^w, este percentual

é inferior ao descrito por Girello e Kuhn (2007), que foi estimado em 2,0% em brancos e muito raro em negros.

Tabela 15 – Frequência dos doadores fenotipados quanto ao sistema Rh

<i>Fenótipo</i>	<i>Quantidade</i>	<i>%</i>
DCCeE	12	0,51
DCCee***	265***	11,27
DCCwcEe	2	0,08
DCCwcee	5	0,20
DCCwee	10	0,42
DCcEE	3	0,13
DCcEe****	216****	9,19
DCcee**	275**	11,70
DCwcee	2	0,08
DccEE	27	1,15
DccEe	162	6,89
Dccee*	294*	12,51
dCcEe	14	0,60
dCcee	75	3,19
dccEe	14	0,60
dccee*	974*	41,41
Total	2351	100,00

Nos resultados, foi analisado que o fenótipo para o doador Rh Negativo desejado, ou seja, dccee, estava sofrendo uma alteração com a presença dos antígenos C e E positivos em uma população significativa, ou seja, dCcee, dccEe ou dCcEe, o que torna o doador CDE positivo, passando a ser considerados como Rh positivos para doação. De um total de 1077 doadores Rh negativos, 103 foram positivos para o antígeno C ou E, sendo 9,5% deste total, ocorrendo variações de 7 a 15% ao mês.

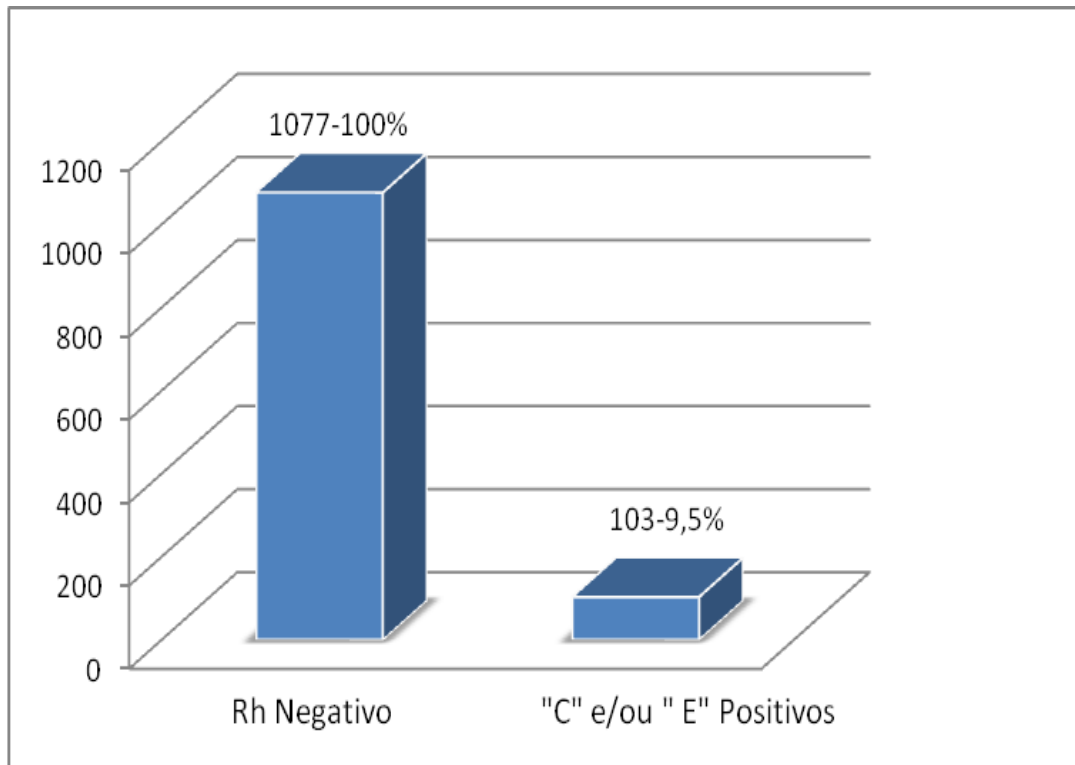


Figura 9 - Relação doadores Rh Negativos com C e/ ou E Positivos

Este fato teve tamanha importância que levou à decisão da modificação da rotina para escolha dos doadores a serem fenotipados, e, a partir do mês de setembro de 2009, passou-se a incluir todos os doadores negativos do dia para serem fenotipados, mesmo os que fossem de outras localidades, sem, porém, computar para este estudo. Aumentou-se, assim, o percentual de doadores fenotipados diários e a segurança dos receptores, evitando a aloimunização.

Tabela 16 – Frequência dos doadores fenotipados quanto ao sistema Kell

<i>Kell (K1)</i>	<i>Quantidade</i>	<i>%</i>
K +	160	7,00
K -	2191	93,00
<i>Total</i>	<i>2351</i>	<i>100,00</i>

Encontram-se, na Tabela 16, os resultados referentes ao sistema Kell, onde, dos 2351 doadores fenotipados, foram K1 positivos 160 (7,0%), enquanto 2191 (93,0%) foram K1 negativos. Este número de doadores Kell positivos é semelhante ao descrito na literatura por Beiguelman (2003) e Harmening (2006). Os números encontrados podem ser explicados pelo fato da região ser colonizada por uma população de italianos e alemães.

Novaretti (2000), em seus estudos na região paulista, obteve em seus resultados 7,3% de doadores Kell positivo em doadores brancos, 3,9% em doadores mulatos e 1,21% em negros; dados semelhantes ao nosso estudo.

Devido à importância do sistema Rh e Kell, por seus antígenos serem muito imunogênicos, destaca-se a importância de serem analisados em conjunto. A frequência destes antígenos, quando relacionados os sistema Rh negativo e Kell positivo, conforme resultados da Tabela 17, são extremamente reveladoras.

Foi observado que, de um total 2351 doadores fenotipados, 1077(45,82%) foram Rh negativos e 90 foram Kell positivos (8,3%). Isso demonstra que, mesmo o percentual de doadores Kell positivo estando dentro dos valores descritos na literatura, estes antígenos estão positivos nos doadores Rh negativos, formando o fenótipo dcceeK+, fator de relevância na clinica transfusional. Para este fenótipo, é necessário haver um protocolo específico para a utilização correta em receptores que possuem estes antígenos, e assim evitar futuras sensibilizações e descarte desnecessário de componentes sanguíneos.

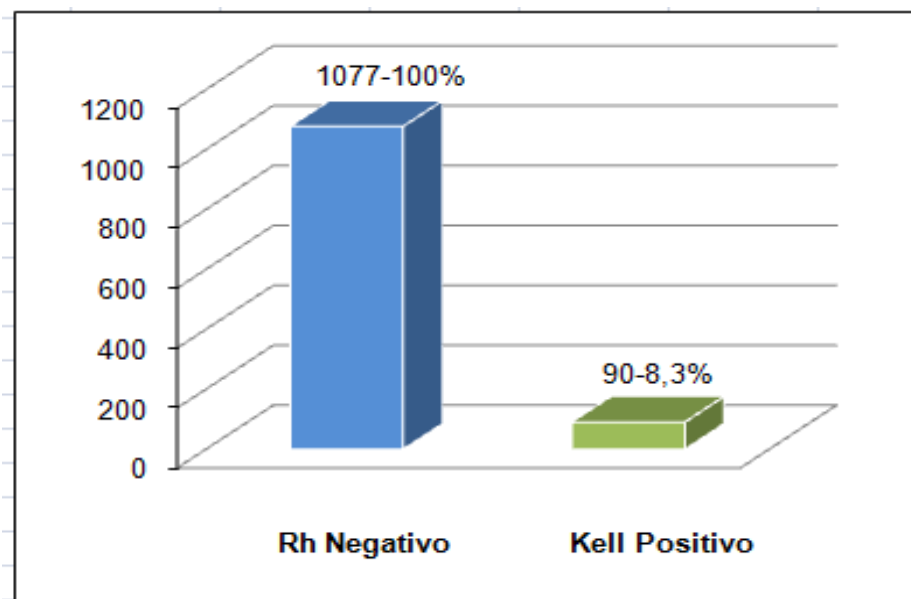


Figura 10 - Relação doadores Rh Negativo e Kell Positivo

Tabela 17 – Relação da frequência dos antígenos do Sistema Rh e Kell

<i>Fenótipo</i>	<i>Quantidade</i>	<i>%</i>
DCCeEK+	1	0,04
DCCeEK-	11	0,47
DCCeeK+	17	0,72
DCCeeK-	248	10,55
DCCwceEK-	2	0,16
DCCwceeK-	4	0,08
DCCwceeK+	1	0,04
DCCweeK+	1	0,04
DCCweeK-	9	0,38
DCcEEK-	3	0,13
DCcEeK+	12	0,51
DCcEeK-	204	8,68
DCceeK+	13	0,55
DCceeK-	262	11,14
DCwceeK-	2	0,08
DccEEK-	27	1,15
DccEeK+	9	0,38
DccEeK-	153	6,51
DcceeK+	15	0,64
DcceeK-	279	11,87
dCcEeK+*	2	0,09
dCcEeK-	12	0,51
dCceeK+*	2	0,09
dCceeK-	73	3,11
dccEeK+*	1	0,04
dccEeK-	13	0,55
dcceeK+*	86	3,66
dcceeK-	888	37,78
<i>Total</i>	<i>2351</i>	<i>100,00</i>

Neste estudo, foi analisada a importância e a relevância de ser fenotipado o maior número possível de doadores para os sistemas Rh e Kell, e que estes dados, ao serem mostrados separadamente, podem não ser tão conclusivos quanto aos analisados juntos. Está descrito na literatura e na RDC 57 que os pacientes devem ser transfundidos com fenótipos compatíveis. Os doadores Rh negativos, fenótipo dccee, são os doadores mais utilizados, mas ao analisar juntamente o sistema Kell, encontra-se uma grande presença destes antígenos nos doadores dccee que devem, então, ser usados somente nas pessoas que possuem este antígeno. O antígeno Kell, depois do antígeno D, é o que mais causa aloimunizações e DHRN,

segundo Beiguelman (2003), após as medidas preventivas contra a imunização pelo antígeno D, utilizadas atualmente.

Ao fazer a relação entre esses dois sistemas, foi extremamente alto o percentual de doadores Rh negativo com antígeno Kell positivo nos doadores, o que fez com que se adotasse uma conduta diferente para o uso deste hemocomponentes.

Outros trabalhos existem e foram descritos anteriormente sobre a fenotipagem dos antígenos do sistema Rh e Kell em doadores de outras regiões, porém em seus resultados não é feita esta abordagem, o que seria muito importante na clínica transfusional, pois se deve conhecer e saber como fazer o melhor uso dos doadores.

Dos 2351 doadores fenotipados no período, foram genotipados 46 doadores a fim de se avaliar a presença de possíveis variantes de D.

Essas amostras enviadas para genotipagem foram selecionadas em duas situações: 1º- Por pertencer a doadores do grupo Rh negativo que possuíam um antígeno C e/ou E positivos, são os doadores CDE positivos, pois alguns doadores podem apresentar o antígeno "D" tão fracamente expressos que só são detectados através de técnicas específicas, como a biologia molecular. Estes são os D variantes conhecidos como D Del, segundo Castilho (2010); 2º- As amostras que apresentam antígeno D com positividade entre 1 a 3 cruces no cartão ABD VI+ e cartão anti-D policlonal também foram analisados para verificar o tipo de D Fraco ou de Parcial presente.

Das amostras enviadas, 46 no total, duas foram consideradas inadequadas, não sendo possível sua genotipagem, uma delas era fenotipada como Rh positiva e outra negativa.

Pelo resultado da genotipagem, obteve-se 27 amostras Positivas e 17 genotipadas como negativas, como comprova o Quadro 3.

Amostras	Fenotipadas (n)	Genotipadas (n)
Rh Negativas	23	17
Rh Positivas	23	27
Amostras inadequadas		02
Total	46	46

Quadro 3 – Comparação entre os resultados das amostras fenotipadas e genotipadas

No Quadro 3, de amostras genotipadas, observa-se que ocorreu uma diferença entre a fenotipagem e a genotipagem. Essas diferenças ocorreram nas amostras enviadas, fenotipadas como Rh negativas e CDE positivas, que foram genotipadas como D Fraco tipo 1 e D Parcial. Com isso, seu genótipo foi de Rh positivo, como mostra a Tabela 18.

A densidade antigênica RhD normal varia entre 10.000 a 25.000 sítios por hemácias, enquanto os Rh D Fracos apresentam densidade antigênica entre 66 a 5000 sítios por hemácias (WESTHOFF, 2005). Isto explicaria o porquê do fenótipo Rh D Fraco poder muitas vezes apresentar-se como Rh D negativo em testes de rotina sorológica.

Okuda (1997 apud CREDIDIO, 2010, p.23) demonstrou a presença de um gene RHD intacto em Japoneses e Africanos RhD-negativo, que parecia estar associado com as frequências dos fenótipos RhD-negativo e RhC-positivo em diferentes populações.

Nesse estudo, em outra amostra fenotipada como Rh negativo, CDE positiva foi encontrado uma variante de D, um D parcial, tipo DBT e com isto foi genotipada como Rh Positivo. Esse fato demonstra a importância de se avaliar bem as amostras quanto ao sistema Rh, conhecer os reagentes utilizados na rotina, identificar se o clone de anti-D em uso é um monoclonal para pesquisar IgM (MS-201, RUM 1, ESD-1M, TH28) ou IgM e IgG (TH28, MS26), ou se é policlonal (MILLIPORE CORPORATION, 2011), principalmente se estiver pesquisando os doadores e a relevância da genotipagem das variantes D encontradas.

Tabela 18 – Resultados das amostras genotipadas

Genótipo	Fenótipo	D Fraco /D Parcial	CDE	ABO
Negativo	dCceeKn		cdep	O -
Positivo	DCceeKn	Tipo 1		A+
Positivo	DcceeKn			A+
Negativo	dCceeKn		cdep	O -
Negativo	dcceeKp			O -
Negativo	dCceeKn		cdep	O -
Positivo	DCCeeKn	Tipo 1		A+
Positivo	DCceeKn			O+
Positivo	DCceeKn	Tipo 2		O+
Negativo	dCceeKn		cdep	O -
Negativo	dcceeKn			O -
Negativo	dCceeKp		cdep	O -
Ruim	DcceeKn			O+
Positivo	DCceeKp	Tipo 1		A+
Positivo	DCceeKn	Tipo 1		A+
Ruim	dCceeKp		cdep	O -
Negativo	dCceeKn		cdep	O -
Positivo *	dCceeKn	DBT*	cdep	O -
Positivo	DCCeeKn			B+
Negativo	dCceeKn		cdep	A -
Negativo	dCcEeKn		cdep	O -
Negativo	dCceeKn		cdep	A -
Positivo	DCceeKn	Tipo 1*	cdep	A +
Positivo *	dCceeKn	Tipo 1*	cdep	O -
Positivo	DccEeKn	Tipo 2		A+
Positivo *	dCceeKn	Tipo 1*	cdep	A -
Positivo *	dCceeKn	Tipo 1*	cdep	O -
Positivo	DCceeKn	Tipo 1		B+
Positivo	DCceeKn	Tipo 1		O+
Positivo	DccEeKn	Tipo 2		O+
Negativo	dCceeKn		cdep	AB -
Positivo	DcceeKn	Tipo 4		A+
Negativo	dCceeKn		cdep	A -
Positivo	DcceeKn			O+
Positivo	DcceeKn	Tipo 4		A+
Positivo	DCceeKn	Tipo 1		A+
Negativo	dCceeKn		cdep	O -
Positivo	DcceeKn			B+
Positivo	DCceeKn	Tipo 3		O+
Negativo	dCceeKn		cdep	O -
Positivo *	dCceeKn	Tipo 1*	cdep	A -
Negativo	dCceeKn		cdep	A -
Positivo	DcceeKn			B+
Negativo	dccEeKn		cdep	A -
Positivo	DcceeKn	Tipo 4		O+
Positivo	DcceeKn			A+

Em estudo realizado por Petillo (2008), foi determinada a frequência de variantes de D em doadores fenotipados como Rh negativos na região de São Paulo, tendo-se obtido como resultados: na fenotipagem de 2046 doadores fenotipados com Rh negativos, 167 doadores possuíam antígeno C e/ou E; na

genotipagem RHD deste doadores, dois foram D Fraco tipo 1 e 2 e dois foram D parcial, semelhante ao encontrado no presente estudo.

Categorias	Número	Tipo	%
D Fraco 1	12		26,08
D Fraco 2	03		6,52
D Fraco 3	01		0,26
D Fraco 4	03		6,52
D Parcial	01	DBT	0,26
Amostras indeterminadas	02		0,52
Positivas normais	07		1,82
Negativas	17		4,43
Total	46		100,00

Quadro 4 – Resultado das variantes do antígeno D nos doadores genotipados

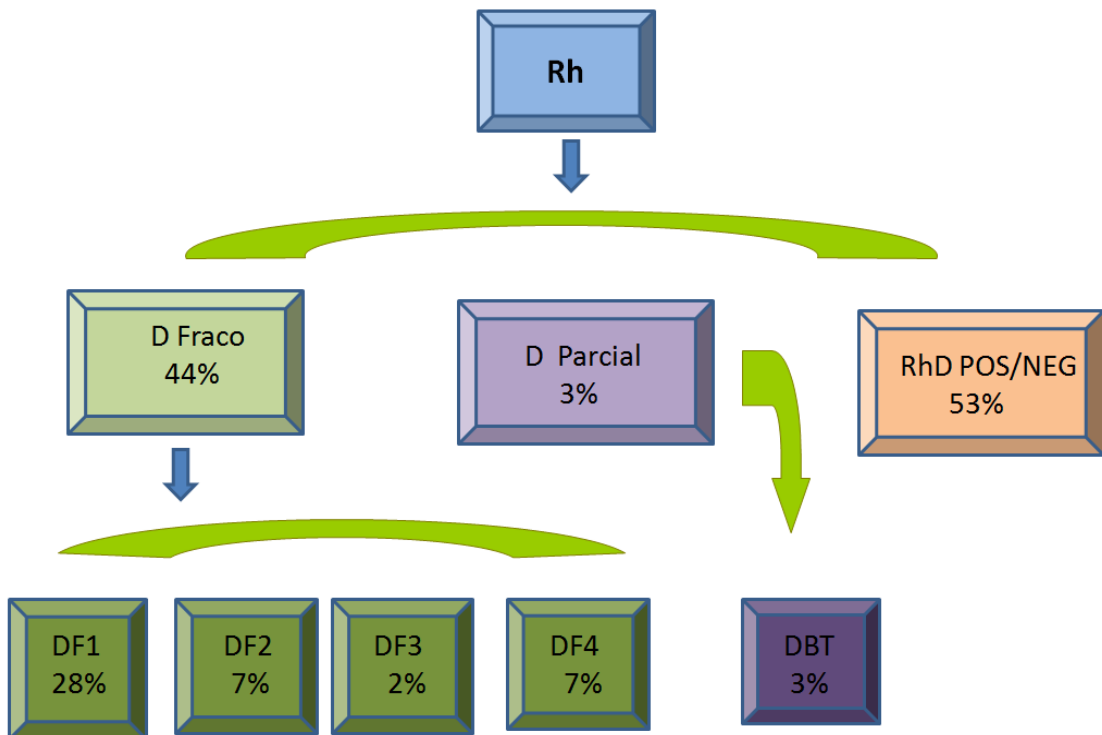


Figura 11 - Resultado das variantes do antígeno D

Na Figura 11, pode-se observar que a variante de D mais encontrada foi o D Fraco, e os tipos de D Fracos mais encontrados foram o 1, 2, 4. Rodrigues (2005), em estudo nos doadores de Campinas (SP), obteve como resultado os tipos de D Fraco tipo 1, 3 e 4 como mais frequentes naquela região.

Segundo Rodrigues (2011), na população estudada de Macapá (AP), foi encontrada uma grande porcentagem de doadores D fraco (31%) e o autor mostra, ainda, a necessidade da biologia molecular para identificar os tipos de D fracos naquela região.

Referindo-se aos tipos de D Fraco mais frequentes encontrados, Castilho (2010) mostrou uma pesquisa sobre vários países. Na pesquisa foi encontrada uma maior frequência de doadores D Fraco Tipo 1 e 2 em países como: Alemanha, França, Espanha; em Portugal foi encontrado os D Fraco Tipo 2 e 1; na República Checa os tipos 1 e 3; e no Brasil os tipos 1 e 4.

Em um outro estudo referente a região Sul do Brasil, Castilho (2010) mostra ser o D Fraco tipo 2 mais freqüente que o tipo 1, porém, no estudo aqui desenvolvido, analisou-se que, na região de Santa Maria a freqüência maior é de D Fraco tipo 1.

Credidio (2010), em seus estudos em doadores de várias regiões do país, relata que os tipos de D Fraco mais encontrado foi 1, 2 e 4, e o que difere a população brasileira da européia é a freqüência do D fraco Tipo 4, uma vez que o antígeno D fraco tipo 4 é mais frequente em populações africanas.

Ao referir-se à variante de D Parcial, Castilho (2010) coloca que existem mais de 40 tipos desta variante de D, e que os tipos D IIIa e DAR são, frequentemente, encontrados em Africanos e o DVI em Europeus. As variantes D DEL, que já existem mais de 15 tipos definidos, são encontradas em 30% dos povos asiáticos que são Rh D negativos com antígeno C e ou E positivos.

Em seus estudos utilizando técnicas moleculares, Rodrigues (2005) observou que a formação de genes híbridos ocorreu, predominantemente, em indivíduos de origem africana e seus descendentes. Esse fato pode explicar a baixa frequência na população da região de Santa Maria. Rodrigues (2010) mostrou que, em doadores de sangue de Coimbra – Lisboa, o tipo de D Fraco mais frequente é o tipo 2 (64%), seguido dos tipos 1,3 e 4, e apresentou, também, uma nova variante de D Fraco, o tipo D 38 presente em 6% daquela população.

Tabela 19 – Relação das variantes Rh D e fenótipos

<i>D Fracos e Parciais</i>	<i>Fenótipos</i>	<i>Número</i>
Tipo 1	DCceeKn	06
Tipo 1	DCceeKp	01
Tipo 1	dCceeKn	04
Tipo 1	DCCeeKn	01
Tipo 2	DCceeKn	01
Tipo 2	DcceeKn	02
Tipo 3	DCceeKn	01
Tipo 4	DcceeKn	03
DBT	dCceeKn	01

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, bem como nas informações da literatura, o fenótipo Rh “CceeKn” foi o mais encontrado em variantes de D. Assim como, Sabino (2008) encontrou em seus estudos com doadores de Botucatu (SP) uma maior frequência do fenótipo “CceeKn”, chamando a atenção para o fato de poder haver uma relação do antígeno “C” com a expressão alterada do antígeno Rh D.

Segundo estudos de Rodrigues (2010), em Portugal, a frequência da variante mais comum é do D Fraco tipo 2 (64%), sendo o fenótipo “DccEe” o mais encontrado nos doadores.

Rodrigues (2005) observou em seu estudo sobre “Caracterização molecular do antígeno RhD” que o fenótipo Rh D parcial, categoria IVa, e Rh D fraco tipo 4 estão presentes em africanos e seus descendentes, e geralmente ocorrem com o haplótipo *Dce* (Ro), como neste estudo para a variante Tipo 4.

Segundo Rodrigues e Castilho (2002), em seu estudo envolvendo variantes Rh em pacientes falciformes politransfundidos, a correlação entre o fenótipo e o genótipo podem aumentar a segurança transfusional destes pacientes, que muitas vezes desenvolvem anticorpos após transfusão de sangue.

Devido à densidade antigênica dos antígenos RhD parciais variar entre 500 a 25.000 antígenos por hemácias, muitos antígenos RhD parciais podem ser sorologicamente caracterizados como RhD normais, uma vez que a densidade antigênica da proteína varia entre 10.000 a 25.000 sítios por hemácias (CREDIDIO, 2010; WESTHOFF, 2004).

Tabela 20 – Resultados quanto ao grau de aglutinação

Tipo D Fraco/D Parcial	Fenótipo	Cartão ABDVI+ (ESD-1M,175-2)	Cartão anti-D (policlonal)
Tipo 1	DCceeKn	2+	1+
Tipo 1	DCCeeKn	3+	3+
Tipo 2	DCceeKn	3+	2+
Tipo 1	DCceeKn	3+	2+
Tipo 1	DCceeKn	2+	2+
DBT	dCceeKn	0	0
Tipo 1	DCceeKn	2+	2+
Tipo 1	dCceeKn	0	0
Tipo 2	DcceeKn	2+	2+
Tipo 1	dCceeKn	0	0
Tipo 1	dCceeKn	0	0
Tipo 1	DCceeKn	3+	3+
Tipo 1	DCceeKp	2+	2+
Tipo 2	DcceeKn	2+	2+
Tipo 4	DcceeKn	2+	2+
Tipo 4	DcceeKn	3+	2+
Tipo 1	DCceeKn	2+	2+
Tipo 3	DCceeKn	3+	3+
Tipo 1	dCceeKn	0	0
Tipo 4	DcceeKn	3+	2+

Na Tabela 20, observa-se que o D Fraco tipo 2 relacionado ao grau de aglutinação foi de 2+ no cartão ABDVI+, que utiliza anticorpos anti-D monoclonais (linhagens celulares ESD-1M, 175-2) que reagem com o fenótipo DVI parcial, confirmado com 2+ no cartão Anti-D policlonal de origem humana. O fenótipo D Fraco tipo 4, além de obter 2+ para os dois cartões utilizados, apresentou o fenótipo Dccee para todas as amostras. Nas amostras com o resultado de D Fraco tipo 1 houve uma maior variação quanto ao grau de aglutinação nos cartões que foram analisados.

Estes resultados vêm demonstrar a grande importância em se caracterizar molecularmente o antígeno D, pois não é possível distinguir sorologicamente o tipo de antígeno D presente nas amostras, necessitando serem melhor investigados estes doadores.

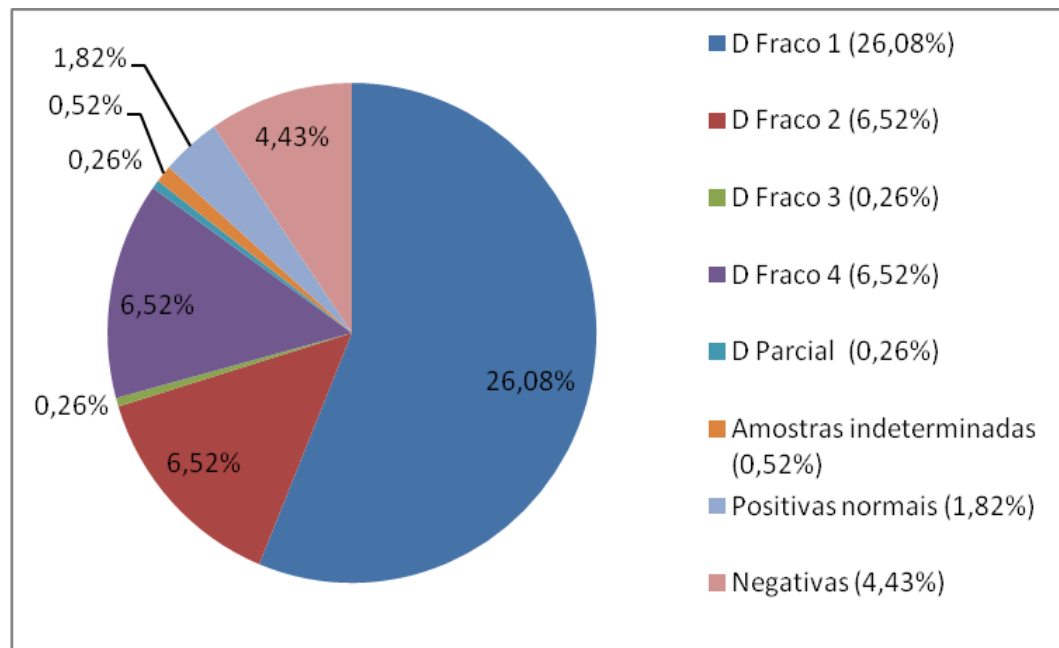


Figura 12 – Resultados das amostras analisadas molecularmente

Das 46 amostras(100%) estudadas e confirmadas molecularmente, 26% foram identificadas como D Fraco tipo 1, e 6,5% das amostras foram D fraco tipo 2, assim como foram encontradas 6,5% do D Fraco tipo 4. Estes resultados demonstram que na população estudada existe um maior número de doadores D Fraco em relação ao D Parcial.

Tabela 21 – Frequência dos grupos ABO nos doadores genotipados

<i>D Fracos e Parciais</i>	A+	O+	O-	A+	B+
Tipo 1	06	01	02	02	01
Tipo 2	01	02			
Tipo 3		01			
Tipo 4	02	01			
Total	09	05	02	02	01

Analisados quanto ao grupo ABO, a tabela 21 mostra uma frequência do grupo A (55%) maior que a do grupo O (40%) dos doadores genotipados. Isso chama a atenção porque no resultado do total de doadores fenotipados teve-se uma maior frequência do grupo O (62,5%) em relação ao grupo A (32%). Nos estudos de

Sabino (2008), na caracterização das variantes de RhD, foi encontrado como resultados uma frequência quanto os grupos ABO de 46% para grupo sanguíneo tipo, O e 40% do grupo tipo A, semelhante aos resultados da população da região.

O conhecimento dos antígenos eritrocitários é essencial na prática transfusional, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos contra esses antígenos pode se tornar problema na clínica, principalmente em casos onde os pacientes são portadores de doenças como hemoglobinopatias ou que requeiram transfusões periódicas. Neste estudo, foi mostrada a importância de serem pesquisados, além do antígeno D, que é o mais imunogênico do sistema Rh, os demais antígenos deste sistema.

Observa-se a necessidade da fenotipagem eritrocitária ser introduzida gradativamente na rotina dos bancos de sangue para todos os doadores. Esse procedimento reduziria o índice de aloimunizações e aumentaria a segurança transfusional, como também reduziria custos para a instituição. Recomenda-se, ainda, a importância de se caracterizar molecularmente as variantes do antígeno D, pois é impossível distinguir o antígeno D fraco do D parcial em estudos sorológicos como citado por Rodrigues (2011).

A investigação adequada para o gene RHD pode identificar doadores aparentemente D negativos, que na realidade são D fracos ou DEL, garantindo assim que o sangue será dado apenas para os destinatários D positivos, como explicado por Flegel (2007).

Em estudo realizado no Hemocentro regional de Londrina, Wedel et al. (2010) coloca que numerosos alelos D variantes foram descritos em indivíduos de descendência africanas e européias. Em seus resultados obtiveram discrepâncias nas suas tipagens RhD, e os D parcial: DAR, DOL, DAU só foram diferenciados com o uso de técnicas de PCR.

A correta determinação dos genótipos RHD é importante na definição da conduta transfusional e acompanhamento gestacional, especialmente quando há fenótipos RhD raros.

Este trabalho demonstrou a importância da análise conjunta entre os estudos sorológicos e moleculares e mostrou a grande variação étnica na população estudada, o que reforça a importância de se estabelecer protocolos e firmar parcerias com laboratórios de referência.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que quanto a freqüência antigênica eritrocitária do sistema Rh dos doadores fenotipados como Rh negativos, o fenótipo dccee (41%) foi o mais encontrado seguido do fenótipo dCcee; e quanto aos doadores Rh Positivos, a maior freqüência foi com fenótipo Dccee (12%), DCCee (11,7%), DCcee (11,2%).

Quanto ao grupo ABO, a freqüência encontrada foi diferente da relatada na literatura, sendo mais frequentes os grupos O e A e poucos doadores do grupo AB e B, pois estes doadores foram selecionados para serem fenotipados pela maior solicitação na rotina transfusional.

Relacionado ao sistema Rh, foi observado um percentual de antígenos C e/ou E positivos em uma população significativa dos doadores Rh negativos analisados .

Já quanto ao sistema Kell, foi observado que os antígenos KELL (K1) estão dentro dos valores encontrados na literatura, porém, ao serem analisados o sistema Rh e KELL juntos, foi encontrada uma freqüência importante do antígeno KELL presente em doadores Rh negativos.

Nos doadores genotipados, encontrou-se como resultados que a incidência da variante Rh D fraco foi maior que a de Rh D parcial. Os antígenos RhD fraco mais freqüentes na população estudada foram os tipos 1, 2 e 4.

O fenótipo Rh "CceeK neg" foi o mais encontrado nas variantes Rh D.

A utilização da fenotipagem em combinação com reagentes anti-D de alta afinidade é recomendada na detecção do antígeno Rh D fraco de baixa densidade antigênica em doadores de sangue.

Os resultados demonstram que a biologia molecular associada à hemaglutinação pode aumentar consideravelmente a segurança transfusional pela melhor caracterização das variantes do antígeno RhD na população .

REFERÊNCIAS

ALLEN, F.H.; KRABBE, S.M.R. ; CORCORAN, P.A. A New phenotype(McLeod) in the Kell blood-group system. **Vox Sang.** 6:555-560, 1961.

AVENT, N.D.; REID, M.E. The Rh blood groups system: a review. **Blood**, v.95, p.375-87, 2000.

BAIOCHI, E.; CAMANO, L.; SASS, N.; COLAS, O. Frequência dos Grupos Sanguíneos e Incompatibilidades ABO e RHD em Puérperas e seus Recém-Nascidos. **Rev Assoc Med Bras**, v. 53, n. 1, p. 44-6, 2007.

BAIOCHI, E.; NARDOZZA, L.M.M. Aloimunização. **Rev Bras Ginecol Obstetr**, v.31, n.6, 2009.

BARROS, C. et al. Avaliação de reagentes anti-D na detecção dos antígenos D fraco e D parcial. **Rev Bras Hematol Hemoter**, São José do Rio Preto, v. 4, p. 1-11, 2006.

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

BONINI-DOMINGOS C.; FERRARI, F.; MATTOS, L.; ALVES, R. Avaliação do polimorfismo de grupos sanguíneos e fenótipo de hemoglobinas em um grupo de universitários de São José do Rio Preto, **Rev Bras Hematol Hemoter**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 65-71, 2003.

BORDIN, J.O.; JUNIOR, D.M.L.; COVAS, D.T. **Hemoterapia fundamentos e Práticas**. São Paulo: Atheneu, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. RDC nº 57 de 16 de dezembro de 2010. Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. **Diário Oficial da União** Poder Executivo. 17 de dezembro de 2010. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/...>>. Acesso em 4 jan. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 1.353, de 13 de junho de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. **Diário Oficial da União** Poder Executivo. 14 de junho de 2011. Disponível em <<http://www.legisweb.com.br/legislacao/?legislacao=577866>>. Acesso em 15 jun. 2011.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº153, de 14 de junho de 2004. Brasília: Poder Executivo, 2004.

BRASIL. DIAMED ID. **Manual de Técnicas**. Belo Horizonte: IEA, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução 196/96** sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Educação à Distância. **Manual Telelab - Imunohematologia: Testes Pré-transfusionais**. Brasília: MS, 2001.

CALLENDER, S.T; RACE, R.R. A serological and genetical study of multiple antibodies formen in response to blood transfusion by a patient with lupus erithematosus difussus. **Ann Eugen**, v.13, p.102-17, 1946.

CASTILHO, L. Sistema de grupo sanguíneo Rh. In: BORDIN, J. O.; LANGHI JR., D. M.; COVAS, D.T. (Eds.). **Hemoterapia fundamentos e práticas**. São Paulo: Atheneu , 2007. p.137-146,

CASTILHO, L. Genotipagem de antígenos eritrocitários. Brasília: HEMO, 2010.

Disponível em:

<<http://www.hemo2010.org.br/aulas/alvorada/DIA7/8.30Genotipagemliliancastilho.pdf>

>. Acesso em 16 dez. 2010.

CASTILHO, L. Sistema Rh. In: SIMPÓSIO HEMOPASSO, 2008. Passo Fundo.

Anais ... Passo Fundo: Hemocentro Regional, 2008. Disponível em:

<www.pmpf.rs.gov.br/servicos/geral/files/portal/sgs.ppt>. Acesso 2m 16 dez. 2010.

.CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA. Florianópolis.

Disponível em: <<http://www.hemo2009.org.br>>. 2009. Acesso em 20 nov. 2009.

COUTINHO, M.C. **Diagnóstico do Fator RhD utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase convencional**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)- Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

CREDIDIO, D.C. **Variantes do antígeno Rh D: estudo sorológico e molecular**. 2010. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

DAVEY, F.R.; HENRY, J.B. Hematologia, Coagulação e Medicina Transfusional. In: HENRY, J.B. (ed.). **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19.ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 549-846.

DIAMED-ID **Manual de Técnicas**, Belo Horizonte-MG, 1994.

FLEGEL, W.A. The genetics of the Rhesus blood group system. **Blood Transfusion**, v.5, p. 50-7, 2007.

GIRELLO, A.L.; KUHN, T.I.B.B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. São Paulo: Senac, 2002.

GIRELLO, A.L.; KUHN, T.I.B.B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. São Paulo: Senac, 2007.

GOMES, M. **Imunohematologia Eritrocitária**. 4.ed. Porto Alegre, 2002.

HARMENING-PITTIGLIO, D.; FLYNN, J.C. O sistema de grupo sanguíneo ABO. In.: HARMENING, D.; CALHOEM, L.; POLESKY, H. F. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter,1992. p.81-106.

HARMENING, D. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

HEMO 2010. Brasília, DF. Acesso em: <<http://www.hemo2010.org.br/>>. Acesso em 12 dez. 2010.

JOCE. Etablissement Français Du Sang-Avaliação do desempenho da tipagem e fenotipagem sanguínea no método E.M. Technology Diagast, 2002. **CD ROOM**.

JUNQUEIRA, P.C.; ROSENBLIT, J.; HAMERSCHLAK, N. História da Hemoterapia no Brasil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 27, n. 3, p. 201-7, 2005.

KAGAN, E. Fundamentos da Imunologia para Hematologistas. In: HARMENING, D.; CALHOUN, L; POLESKY, F.H. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1992. p.45-66.

LEVINE, P.; BACKER, M.; WIGOD, M.; PONDER, R. A new human hereditary blood property (cellano) presents in 99,8% of all bloods. **Science**, v. 109, p. 464-6, 1949.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, cap. 22, p.19-26, 2001.

LORENZI, T.F. et al. Fisiologia das células do sangue e hemostasia. In: **Manual de Hematologia: propedêutica e clínica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

LUDWIG, S.T.; RODRIGUES, A.C.M. Doação de Sangue: Uma Visão de Marketing. **Cad Saúde Pública**, 2005.

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

MARIN, N. (coord.). Fazendo a diferença: captando doadores de sangue voluntários, não remunerados. Brasília: **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2004.

MATTOS, L.C.; SANCHEZ, F.E.; CINTRA Jr. Genotipagem do locus ABO em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo, **Rev Bras Hematol Hemoterapia** v. 23, n. 3, p. 259-63, 2001.

MELO, L.; SANTOS, J.A. **Imunohematologia eritrocitária**. Belo Horizonte: IEA, 1996.

MERELE, R.; BRIDI, A.T.; MARRONE, L.C.; FONTANA, B. Prevalência da distribuição do Sistema ABO entre doadores de sangue de um Hospital Universitário. **Rev AMRIGS**, Porto Alegre, v.50, n.4, p.277-9, 2006.

MILLIPORE CORPORATION. Disponível em: <<http://www.millipore.com/>>. Acesso em 12 jan. 2011

MOLLISON, P.L.; ENGELFRIET, C.P.; CONTRERAS, M. **Blood transfusion in clinical medicine**. 8th ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1987.

MÜLLER, T.H.; WAGNER, F.F.; TROCKENBACHER, A.; EICHER, N.I.; FLEGEL, W.; SCHÖNITZER, D.; SCHUNTER, F.; GASSNER, C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central Europeans populations. **Transfusion**, v.41, p.45-52, 2001.

NARDOZZA, L.M.; SZULMAN, A.; BARRETO, J.A. et al. Bases Moleculares e suas aplicações em obstetrícia e medicina transfusional. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 56, n. 6, 2010.

NOGUEIRA, O.Q.; SILVA, F.P.; CAMPOS, O.R.; GOMES, F.V.A.F. Incidência dos Antígenos Eritrocitários em Doadores de sangue do Programa de Fenotipagem do Hemoce. Fortaleza-Ceará. Disponível em: <<http://elis.npd.ufc.br/geral/unidades/hemoce.htm>>. Acesso em 20 jul. 2008.

NOVARETTI, M.C.Z.; DORLHIA, C.L.P.E.; CHAMONE, D.A.F. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo1 **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 22, n. 1, p. 23-32, 2000.

OLIVEIRA, R.R. **Imunohematologia e Transfusões Sanguíneas**. Monografia (Especialização em Imunologia Clínica) - Academia de Ciência e Tecnologia, São Paulo, 2003.

PACHECO, C.M.; HIDALGO, P.L. Frecuencias de grupos sanguíneos incompatibilidades ABO y RHD en La Paz.baja Califórnia Sur. **Med Salud Pública**, México, Cuernavaca, v. 44, n. 5, 2002.

PETILLO, M.L. Caracterização Sorológica e Molecular do Fenótipo D Fraco e Del em Doadores de Sangue Brasileiros. **Palestra**, São Paulo, SP, 8 nov. 2008. Disponível em: <<http://www.hemo2008.org.br>>. Acesso em 21 dez. 2008.

PORTAL Governo Cidadão São Paulo. **História da Doação**. 2008. Disponível em: <<http://www.pró-sangue.sp.gov.br>>. Acesso em 20 jul. 2008.

RHESUS. Disponível em: <<http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/>>. Acesso em 12 dez. 2010.

RODRIGUES, A. **Caracterização molecular dos antígenos RhD (RhD fraco e RhD parcial) e sua aplicação na prática transfusional**. 2005. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RODRIGUES, A.S.N.; SILVA, S.; LUZ, H.; GALENO, S.N. Identificação sorológica do Antígeno RhD Fraco no Município de Macapá- Ap. **Rev NewsLab**, v.104, p.124-128, 2011.

RODRIGUES, A; CASTILHO L.M. Caracterização molecular das variantes do sistema Rh em pacientes portadores de anemia falciforme. Resumo de tese, **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 24, n. 2, p. 151-2, 2002.

RODRIGUES, J.M. Caracterização de variantes RhD. Brasília: HEMO, 2010.

Disponível em:

<http://www.hemo2010.org.br/aulas/alvorada/DIA7/9.30_MariaJoseRodrigues.pdf>.

Acesso em 12 dez. 2010.

ROSA, K.A.R.; CASTILHOS, L.M. **Análise molecular do gene RHCE e suas variantes na população brasileira**. 2005. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SABINO, J.S. **Determinação da incidência de Rh D Fraco e Rh D parcial na população da área de abrangência do Hemocentro de Botucatu**. 2008.

Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2008.

SANTOS, J.A.; SARAIVA, J.C.; MALTEZ, J.C. Curso Imunohematologia Parte I/II/III. XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLINICA. **TV MED**. ago. 1996.

TECHNICAL MANUAL OF AABB. Diamed Latino America-Technical Manual of AABB. USA: Bethesda, Maryland, 1993.

TOOD; SANFORD; DAVISON. **Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais**. 16.ed. São Paulo: Manole, 1989.

VERRASTRO, T.; LORENZI T.F.; NETO, S.W. **Hematologia Hemoterapia-Fundamentos da Morfologia Fisiologia, Patologia e Clínica**. São Paulo: Atheneu, 2005.

VIAMONTE, R.F.; MANGUART, A. Frecuencia de los grupos ABO y RHen un servicio de hemoterapiade ciudade deLa Havana. **Rev Cubana Med Milit**, 1997.

VIEIRA, Z.M.; SILVA, M.C.F.; CRUZ, K.V.D.; MARTINS, M. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na eluição de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. 4, p.252-259, 2009.

WENDEL, S.; BRITO, M.; WENDEL-FONTÃO, R.; CARDOSO, R.; PIERROTTI, M.; NUCCI, C.; SIMÕES, A.; ARRIGHI, F.; DUARTE, K.; LARGURA, A.; PINHO, M.; SALTO, M. Complexidade na Tipagem RHD da população brasileira: experiências de um laboratório de referência. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, supl. 4, p.312, 2010.

WESTHOFF, C.M. Review: the Rh blood group D antigen...dominant, diverse, and difficult. **Immunohematol**, v. 21, p. 155-163, 2005.

WESTHOFF, C.M. The Rh blood group system in Review: a new face for the Next decade. **Transfusion**, v.44, p. 1663-1673, 2004.

ZANINI, J.M.; SECCO, V.N.D.P.; AZEVEDO, A.C.M.; GARCIA, A.S. Hospital das Clínicas de Botucatu: Divisão Hemocentro, 2006. CD ROOM.

APÊNDICE A



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM está desenvolvendo o projeto de pesquisa “ESTUDO DA PREVALÊNCIA E FENOTIPAGEM EM DOADORES DE SANGUE, NO HEMOCENTRO REGIONAL DE SANTA MARIA”, através da mestrandia Adriana Najai Stein Bortolotto, orientada pelo Prof. José Edson Paz da Silva.

Você, doador de sangue de Santa Maria, está sendo convidado a participar do primeiro banco de dados de doadores, por possuir o perfil necessário para participar, ou seja, o de residir em Santa Maria, que doe frequentemente, que não trabalhe em profissões de risco e se disponha a participar do Programa de Fenotipagem (tipos de sangue), foco deste estudo.

O Programa de Fenotipagem tem como objetivo qualificar melhor o sangue que será transfundido nas pessoas e evitar reações que podem ocorrer após a transfusão de sangue aos que possuem uma composição diferente da do receptor. Além disso, visa ressaltar a importância da fenotipagem para transfusões em geral e, principalmente, em receptores que fazem uso de transfusões de repetição e mulheres em idade fértil, estimulando a população a buscar uma transfusão sanguínea mais segura.

A realização deste programa pretende detectar a fenotipagem nos doadores de sangue de Santa Maria, RS. Dentre os principais objetivos da pesquisa está a determinação dos tipos sanguíneos dos doadores de sangue desta localidade, possibilitando, também, o aconselhamento dos familiares, com base nessas características.

A pesquisa será realizada com uma coleta de sangue (EDTA) quando você for ao banco de sangue fazer sua doação de rotina, usando a mesma amostra que é coletada para os exames realizados em todas as pessoas que doam sangue, sem acarretar-lhe nenhum custo. Caso decida não participar da pesquisa não sofrerá qualquer tipo de prejuízo.

Caso venhamos necessitar de sua presença no hemocentro para realização de coleta, será feito contato telefônico para ver sua disponibilidade e agendar este procedimento. Se por algum motivo não for possível realizar a coleta, isso não será motivo de exclusão do cadastro de doadores.

Todas as informações necessárias ao projeto serão utilizadas para estudo científico e publicações em revistas desta natureza. Todos os dados que possam identificar o doador serão mantidas em segredo (sigilo).

Esclarecemos que os possíveis danos que o participante possa vir a sofrer seria o do desconforto causado na hora da coleta da amostra, onde será necessário a coleta do sangue como em uma doação normal, podendo resultar em dor local ou no surgimento de um hematoma (mancha escura no local da punção), após a coleta, em seu braço.

Você que aceitar participar deste programa será beneficiado com uma fenotipagem mais abrangente de seu tipo sanguíneo, que será registrada em sua carteira de doador e também estará colaborando com muitas pessoas que necessitam diariamente do uso de diversos componentes do sangue.

Todo material utilizado para a coleta será descartável e/ou desinfetado. Este estudo não envolve risco adicional de vida ou contaminação aos participantes. As amostras serão tratadas de acordo com os protocolos experimentais estabelecidos, e destruídas após o uso.

Os dados resultantes do estudo passarão a constituir um Banco de Dados do Hemocentro e utilizados por tempo indeterminado, pois terão uso clínico (consultas).

A participação deste estudo é livre e voluntária. Esclarecemos que também não haverá nenhuma forma de compensação financeira ou custos para o participante. A recusa na participação não acarreta nenhum prejuízo ou comprometimento aos participantes.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eu,

_____, abaixo assinado, declaro que estou de acordo em participar deste projeto de pesquisa e fazer parte do Programa de Doadores Fenotipados, livre de qualquer constrangimento, pois fui informado de forma clara e detalhada dos objetivos e dos procedimentos que serão realizados. Fui igualmente informado da garantia de receber respostas a qualquer dúvida que ainda puder ter sobre assuntos relacionados à pesquisa, e da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízo de qualquer ordem.

Santa Maria, ____ de _____ 20__.

Nome	Identidade

Assinatura

Assinatura do pesquisador

Em caso de dúvidas, entrar em contato com Prof. Orientador Dr. José Edson Paz da Silva, fone: (55) 9976.0000; com Adriana Najai Stein Bortolotto (Pesquisadora Responsável), fone: (55) 3221.5262 ou no Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM, no endereço: Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - Sala 702 - Cidade Universitária - Bairro Camobi – CEP: 97105-900 - Santa Maria – RS, Tel.: (55)32209362, e-mail: comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br

APÊNDICE B



PROTOCOLO / QUESTIONÁRIO

Questionário aplicado aos participantes do Programa de Fenotipagem

Data da coleta			
Reside em Santa Maria	Sim ()	Não ()	
Nome completo			
Número de doador			

Idade				
Tipo sanguíneo mãe	O	A	B	AB
Tipo sanguíneo pai	O	A	B	AB

Endereço	Rua
Bairro	
CEP	
Cidade	

Telefone (residencial/celular)	
---------------------------------------	--

PROFISSÃO	
------------------	--

ETNIA	
--------------	--

DATA Teste triagem Clínica Hematológica Sorológica	
-----------------------------------------------------------------------	--

APÊNDICE C

TERMO DE COMPROMISSO



Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Projeto vinculado ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Santa Maria, __ de _____ de 20__

Por meio deste instrumento, comprometem-se, o coordenador do projeto, José Edson Paz da Silva e a aluna Adriana Najai Stein Bortolotto, a cumprir integralmente os termos da resolução CNS 196/96, de 10/10/1996, durante o desenvolvimento e divulgação dos dados do projeto de pesquisa intitulado: “ESTUDO DA PREVALÊNCIA E FENOTIPAGEM EM DOADORES DE SANGUE, NO HEMOCENTRO REGIONAL DE SANTA MARIA”, que será desenvolvido junto ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas no Departamento de Análises Clínicas do CCS e junto ao Hemocentro Regional de Santa Maria.

José Edson Paz da Silva
Dep. de Análises Clínicas/CCS/UFSM

APÊNDICE D

DECLARAÇÃO SOBRE A DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS



Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Projeto vinculado ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Santa Maria, ____ de _____ de 20__

Declaro que os resultados da presente pesquisa do projeto intitulado: “ESTUDO DA PREVALÊNCIA E FENOTIPAGEM EM DOADORES DE SANGUE, NO HEMOCENTRO REGIONAL DE SANTA MARIA”, serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não, preservando, porém, a confidencialidade e a identidade dos sujeitos da pesquisa. A divulgação para a comunidade científica será realizada em congressos científicos e em revistas especializadas da área.

José Edson Paz da Silva
Dep. de Análises Clínicas/CCS/UFSM

APÊNDICE E

DECLARAÇÃO SOBRE O DESTINO DO MATERIAL COLETADO



Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Projeto vinculado ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Santa Maria, ____ de ____ de 20__

Declaro que o material biológico utilizado na presente pesquisa do projeto intitulado: “ESTUDO DA PREVALÊNCIA E FENOTIPAGEM EM DOADORES DE SANGUE, NO HEMOCENTRO REGIONAL DE SANTA MARIA”, será descartado, após a publicação dos resultados, de acordo com as normas de biossegurança do Hemocentro Regional de Santa Maria.

José Edson Paz da Silva
Dep. de Análises Clínicas

APÊNDICE F

CARTA AO DOADOR

**Estado do Rio Grande do Sul
Município de Santa Maria
Hemocentro Regional de Santa Maria**

Caro Doador

Você é uma pessoa especial! Você se dispôs a doar e salvar vidas!

Você, doador de Santa Maria, está participando do primeiro banco de dados de doadores, com o Programa de Fenotipagem.

O que isso significa? Significa que a partir dessa doação o Hemocentro fará testes no seu sangue, e que com esses dados será possível evitar reações, em crianças e em pacientes, que necessitam de muitas transfusões, encontrando um doador compatível para os casos que com testes normais de rotina seria impossível realizar.

Você também será privilegiado, pois caso venha a necessitar de transfusão sanguínea, encontrará, neste banco de dados, o doador compatível.

Lembre-se: os seus dados atualizados no hemocentro são importantes para podermos entrar em contato com maior rapidez. Caso ocorra alguma alteração, ligue e identifique-se como sendo doador do Programa de Fenotipagem.

Queremos reiterar nosso agradecimento pela sua doação e participação no Programa. Colocamo-nos à disposição para esclarecer qualquer dúvida de Segunda à Sexta-feira, das 13h às 18h, com a Bioquímica Adriana, responsável pelo Laboratório de Imunohematologia.

HEMOCENTRO REGIONAL DE SANTA MARIA

Endereço: Alameda Santiago do Chile, 35 (próximo ao Fórum da cidade).