

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Uso da genotipagem de grupos sanguíneos como alternativa à fenotipagem  
eritrocitária em pacientes com Síndrome Mielodisplásica atendidos no Hospital de  
Clínicas de Porto Alegre**

BRUNA BLOS

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Uso da genotipagem de grupos sanguíneos como alternativa à fenotipagem  
eritrocitária em pacientes com Síndrome Mielodisplásica atendidos no Hospital de  
Clínicas de Porto Alegre**

BRUNA BLOS

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber

Dissertação apresentada como requisito parcial para  
obtenção de título de Mestre em Medicina: Ciências  
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências  
Médicas.

Porto Alegre

2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Blos, Bruna

Uso da genotipagem de grupos sanguíneos como alternativa à fenotipagem eritrocitária em pacientes com Síndrome Mielodisplásica atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Bruna Blos. -- 2019.  
62 f.

Orientador: Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Antígenos de Grupos Sanguíneos. 2. Técnicas de Genotipagem. 3. Transfusão de Eritrócitos. 4. Formação de Anticorpos. I. Adolpho Moreira Faulhaber, Gustavo, orient. II. Título.

*Epígrafe:*

*“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.*

*Fazer da interrupção um caminho novo.*

*Fazer da queda um passo de dança,  
do medo uma escada, do sonho uma ponte,  
da procura um encontro.” – Fernando Sabino*

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Uirassu e Rosangela, pela excelente criação e ensinamentos para a vida. Eles me mostraram que é possível alcançar nossos sonhos, se acreditarmos em nós mesmos, através de seus exemplos de superação. Agradeço imensamente pelo amor e apoio incondicional.

Agradeço à equipe do Laboratório de Imunologia do HCPA, biomédica Joice e Prof. Jobim, pelo apoio e parceria cada vez mais fortalecida. Que venham mais projetos e parcerias, com a certeza de um trabalho sério e de qualidade.

Agradeço também à equipe do Banco de Sangue, da Unidade de Terapia Transfusional, pela compreensão da minha ausência durante aulas e compromissos referentes a esse trabalho. Em especial agradeço a Luciana e Laís, pelo apoio e exemplo. Agradeço também à equipe de enfermagem pela ajuda no recrutamento dos pacientes e coleta das amostras.

Meu muito obrigada aos meus instrutores Dra. Juliana e Dr. Leo pelo auxílio na parte de desenho, execução e revisão do trabalho. Vocês são exemplos de profissionais, e fico feliz por vocês terem embarcado nesse trabalho comigo.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Gustavo Faulhaber, por acreditar no meu trabalho e me dar essa oportunidade. Fico muito orgulhosa em ter sua confiança.

Agradecimentos também ao Banco de Sangue do Hospital Albert Einstein, Prof. Carolina Bub, Marília e Maria Giselda pela parceria na realização dos exames de genotipagem, mesmo com tempo curto. Que esta parceria se mantenha.

À equipe do Ambulatório de Mielodisplasias, que sob os cuidados da Dra. Rosane Bittencourt, permitiram que eu selecionasse os pacientes durante as consultas.

Por último, não poderia deixar de agradecer ao meu namorado Rafael por ter me apoiado, compreendido meus horários restritos e por ter auxiliado nas tabelas e revisão do texto. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

## Resumo

Transfusão de sangue promove a exposição de antígenos não-próprios que podem estimular uma resposta imune e formação de anticorpos nos receptores, chamada aloimunização. Síndrome Mielodisplásica (SMD) é uma desordem das células-tronco hematopoéticas (CTH) e, em 80-90% dos casos, os pacientes possuem indicações de transfusão. Métodos de prevenção à aloimunização incluem transfusões fenótipo compatíveis para os sistemas Rh e Kell e para os sistemas Duffy, Kidd e MNS, quando possível. A genotipagem pode ser utilizada para predição de fenótipo eritrocitário, eliminando limitações da técnica sorológica. Foram selecionados dezesseis pacientes com SMD em suporte transfusional, e realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os genes dos sistemas Rh e Kell. Para os genes *RHD* e *RHCE*\*C/c, através da técnica de PCR multiplex alelo específico e gene *RHCE*\*E/e e *KEL* através da técnica de PCR seguida de digestão com enzimas de restrição. Treze pacientes foram fenotipados através da técnica de hemaglutinação com antissoros comerciais no momento da transfusão para comparação entre as técnicas de genotipagem e fenotipagem. As frequências genóticas entre esta população e uma população de doadores de sangue etnicamente e geograficamente próxima foram comparadas através do teste de qui-quadrado. Discrepâncias entre fenótipo e genótipo foram encontradas em sete testes de seis pacientes, dentre os quais quatro possuíam transfusão recente. Em três casos foram detectadas reações negativas no teste molecular e positivas na fenotipagem para os antígenos D, E e K. Em um caso o teste molecular foi positivo para *KEL*\*2, e o teste sorológico inconclusivo. Dois testes obtiveram resultados negativos na genotipagem e inconclusivos na sorologia, para os antígenos c e E. As frequências encontradas foram comparadas com uma população de doadores de sangue da região do Paraná, região do sul do Brasil. As frequências genóticas foram semelhantes, exceto para *RHCE*\*D ( $p=0,034$ ) e *RHCE*\*C/C ( $p=0,046$ ), que foram mais altas. É importante observar as limitações da técnica de genotipagem, como possíveis variantes que podem não ser detectadas pelos polimorfismos selecionados e da fenotipagem, como transfusões recentes. A determinação do fenótipo através do genótipo foi possível, porém, idealmente deve-se aliar ambas as técnicas e nos casos de discrepância selecionar outro método como genotipagem estendida para outros polimorfismos ou sequenciamento de DNA.

## Abstract

Blood transfusion promotes non-self antigens exposition that can stimulate the immune response and antibodies development in receptors, called alloimmunization. Myelodysplastic syndrome (MDS) is a stem-cell disorder and, for 80-90% of cases, patients require blood transfusion. Prevention methods include phenotype compatible erythrocyte transfusion for Rh and Kell systems, and for Duffy, Kidd and MNS systems, when possible. Genotyping can be used to predict erythrocyte phenotype, diminishing serological techniques limitations. Sixteen MDS patients in transfusion support were selected and Polymerase Chain Reaction (PCR) for Rh and Kell systems genes was executed. To *RHD* and *RHCE*\*C/c genes, through a multiplex allele specific PCR and for *RHCE*\*E/e and *KEL* genes through a PCR follow by restriction enzymes digestion. Thirteen patients were phenotyped using the hemagglutination technique with commercial antisera at time of transfusion to compare results obtained by genotyping and phenotyping methods. Genotype frequencies between this population and a blood donors' population ethnic and geographically close were compared using a chi-square test. Discrepancies between phenotype and genotype were found in seven tests from six patients, from which four had recent transfusions. In three cases, negative reactions were detected in molecular testing and positive in phenotyping for D, E and K antigens. In one case, molecular test was positive for *KEL*\*2, but serologic result was inconclusive. Two tests obtained negative results in genotyping and inconclusive in serology for c and E antigens. Frequencies found were compared with a blood donors population from Parana, region of South Brazil. Genotype frequencies were similar, except for *RHCE*\*D (p=0,034) and *RHCE*\*C/C (p=0,046), which were higher. It is important to observe genotyping methods limitations, like the presence of variants that could not be detected by polymorphisms chosen in the test design and phenotyping limitations, such as recent transfusions. Phenotype determination using genotyping methods was possible, although, ideally both techniques should be performed, and in cases of discrepancies another method such as extended genotype to include other polymorphisms or DNA sequencing could be performed.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Estratégias para localizar e selecionar as informações

**Figura 2** – Localização dos genes envolvidos nos grupos sanguíneos

**Figura 3** – Bases moleculares de variantes de RhD

**Figura 4** – Representação esquemática dos genes *RHD* e *RHCE*, e formação do fenótipo D negativo através da deleção do gene *RHD* e formação do pseudogene.

**Figura 5** – Bases moleculares de formação dos antígenos C, c, E e e no gene *RHCE*

**Figura 6** – Bases moleculares de formação dos antígenos K e k no gene *KEL*

**Figura 7** – Marco conceitual da prevenção à aloimunização eritrocitária

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** – Diagnósticos diferenciais em SMD e testes diagnósticos

**Tabela 2** - Sistemas de grupos sanguíneos

**Tabela 3** – Relação dos grupos sanguíneos, polimorfismos e antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos Rh e Kell

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ADP** Adenosina Difosfato

**AINE** anti-inflamatórios não esteroidais

**Asn** Asparagina

**CD** Grupo de Diferenciação, do (inglês, *Cluster of Differentiation*)

**Cys** Cisteína

**CH** Concentrado de Hemácias

**DHPN** Doença Hemolítica Perinatal

**DNA** Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Desoxirribonucleic Acid*)

**Exon** Região codificadora de um gene

**HCPA** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**HLA** Sistema de Antígeno Leucocitário Humano (do inglês, *Human Leukocyte Antigens*)

**HPN** Hemoglobinúria Paroxística Noturna

**Intron** Região não codificadora de um gene

**ISBT** Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (do inglês *International Society of Blood Transfusion*)

**IPSS-R** Sistema Internacional de Classificação de Prognóstico (do inglês *Revised International Prognostic Scoring System*)

**Leu** Leucina

**Met** Metionina

**MO** Medula óssea

**PCR** Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

**Primer** sequência de oligonucleotídeos sintéticos para iniciação da PCR

**Pro** Prolina

**RHT** Reação Hemolítica Transfusional

**Ser** Serina

**SNP** Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*)

**TAD** Teste de Antiglobulina Direto ou *Coombs* Direto

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 14 |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | 16 |
| <b>2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações</b> .....                          | 16 |
| <b>2.2 Síndrome Mielodisplásica</b> .....  | 17 |
| <b>2.3 Antígenos Eritrocitários</b> .....  | 19 |
| <b>2.4 Aloimunização Eritrocitária</b> .....   | 24 |
| <b>2.5 Sistema Rh</b> .....  | 26 |
| <b>2.5.1 O Antígeno D</b> .....  | 26 |
| <b>2.5.2 Os Antígenos C e c</b> .....  | 28 |
| <b>2.5.3 Os Antígenos E e e</b> .....  | 29 |
| <b>2.6 Sistema Kell</b> .....  | 29 |
| <b>2.6.1 Os Antígenos K e k</b> .....  | 30 |
| <b>3. MARCO CONCEITUAL</b> .....   | 31 |
| <b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....  | 32 |
| <b>5. OBJETIVOS</b> .....  | 33 |
| <b>5.1 Objetivo primário</b> .....   | 33 |
| <b>5.2 Objetivos secundários</b> .....   | 33 |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 34 |
| <b>7. ARTIGO</b> .....   | 37 |
| <b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | 46 |
| <b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....   | 48 |
| <b>10. ANEXOS</b> .....  | 49 |
| <b>10.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....                                     | 49 |
| <b>10.2 Normas para publicação de artigos na revista Transfusion and Apheresis Science</b> ..... | 51 |
| <b>11. STROBE</b> .....  | 61 |

## 1. INTRODUÇÃO

A transfusão de sangue, mais precisamente de concentrado de hemácias (CH) é utilizada como terapia médica para aumentar o aporte de oxigênio nos tecidos nos casos em que este é baixo. Ela é indicada em anemias crônicas ou agudas, hemorragias ativas ou previstas [1]. Pacientes que realizam transfusão de CH estão recebendo células alogênicas com informações genética e fenotípica diferentes das suas. As células presentes nestas transfusões podem apresentar antígenos não-próprios ao receptor e desencadear uma resposta imune através da apresentação de antígenos e formação de anticorpos irregulares, chamada de aloimunização. Quanto maior a necessidade transfusional, maior a chance de aloimunização. Pacientes com doenças crônicas que recebem transfusão de concentrado de hemácias estão, portanto, constantemente sendo expostos a estes antígenos e mais predispostos a aloimunização [2–5].

Aloimunização eritrocitária é uma preocupação em pacientes que recebem múltiplas transfusões [6] e deve ser evitada, pois pode levar a situações de risco à vida como reações hemolíticas transfusionais (RHT) agudas e tardias, doença hemolítica perinatal (DHPN), atraso transfusional e necessidade de testes adicionais devido à dificuldade de compatibilização de bolsas de sangue com os receptores, o que causa um aumento de trabalho, tempo e custos [3].

Síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo de desordens das células-tronco hematopoéticas que resultam em falência da medula óssea. Os sinais e sintomas da doença são citopenias, fadiga, fraqueza, infecções e sangramentos. Devido a isso, 80-90% dos pacientes com SMD necessitam transfusões de concentrados de hemácias [7].

Os serviços de hemoterapia devem estabelecer protocolos para prevenir a aloimunização em pacientes politransfundidos ou que sejam classificados como bons respondedores. Uma das medidas destes protocolos é a determinação dos antígenos eritrocitários de importância clínica, usualmente sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS, através de testes sorológicos de fenotipagem para transfusão fenótipo compatível [3].

A fenotipagem é uma técnica de hemaglutinação que utiliza antissoros comerciais e, portanto, é limitada pela escassez de reagentes específicos para alguns antígenos raros. O método de hemaglutinação é simples, barato e, quando executado adequadamente, suficiente para a maioria dos casos. Entretanto, é também subjetivo e

possui limitações. O paciente deve estar livre de transfusões de hemácias por, no mínimo, três meses, pois há o risco de contaminação da amostra pelas hemácias do doador; e há a necessidade de utilização da antiglobulina humana (AGH), portanto teste de antiglobulina direta (TAD) positivo nas amostras pode interferir nos resultados [2,3,8–10].

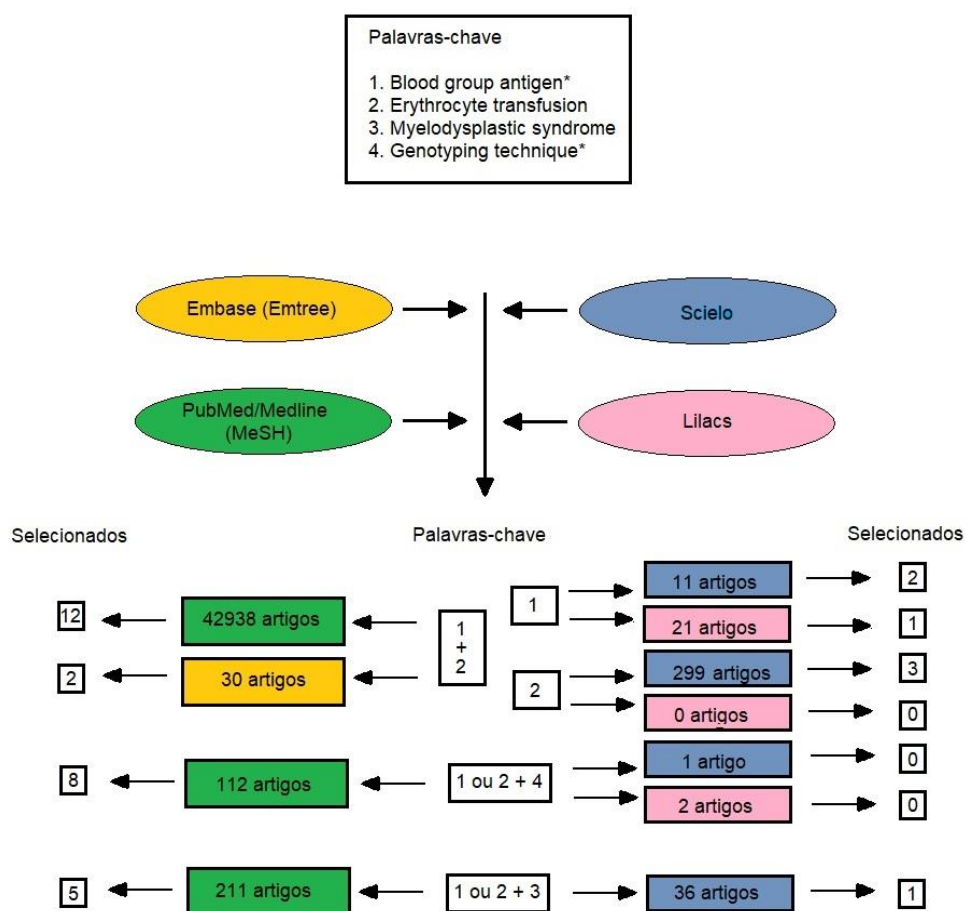
Esses vieses da técnica de fenotipagem não ocorrem na técnica de genotipagem [11]. Esta, por sua vez, utiliza testes moleculares de PCR para determinar os genes presentes, que causarão a expressão de proteínas ou enzimas, resultando nos antígenos de interesse [3,8,12].

A utilização das técnicas moleculares auxilia, então, a determinação dos grupos sanguíneos em pacientes politransfundidos, evitando a formação de múltiplos anticorpos. Por fim, a genotipagem é extremamente útil para serviços de referência, para auxiliar a resolução de discrepâncias ou outras dificuldades sorológicas [8,10]. As técnicas moleculares para grupos sanguíneos possibilitam: prever fenótipo de pacientes com TAD positivo; prever fenótipo de pacientes recentemente transfundidos; realizar pesquisa de doadores para procura de fenótipo negativos para alguns antígenos; resolver casos de discrepâncias e identificar alelos silenciosos e novos [9].

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada na população de estudo, na importância de protocolos de prevenção de aloimunização para assegurar transfusões fenótipo-compatíveis e assegurar a qualidade do atendimento ao receptor de sangue e nos testes disponíveis para genotipagem. A estratégia de busca envolveu três livros-texto do acervo pessoal, e artigos das seguintes bases de dados: LILACS (<http://lilacs.bvsalud.org>), SciELO (<http://www.scielo.org>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Embase (<https://www.embase.com>) e banco de teses da CAPES (<http://www.capes.gov.br>), no período de 2007 a 2019. Foram realizadas buscas através dos termos “blood group antigen” ou “blood group antigens”, “erythrocyte transfusion”, “genotyping technique” ou “genotyping techniques”, “myelodysplastic syndrome” e suas combinações.



**Figura 1.** Estratégias para localizar e selecionar informações.



## 2.2 Síndrome Mielodisplásica

Síndromes mielodisplásicas são doenças malignas das células-tronco hematopoéticas caracterizadas por distúrbios na sua diferenciação e maturação, assim como alterações no estroma da medula óssea [13]. São geralmente diagnosticadas em pacientes idosos com quadro de anemia ou, menos comumente, bi ou pancitopenia. Na população geral, a incidência é de 4 a cada 100000 pessoas por ano e a prevalência é de 7 a cada 100000. A incidência aumenta com a idade, até chegar a 50 novos casos a cada 100000 pessoas por ano em pessoas acima dos 80 anos [13]. Os sintomas são referentes a ineficaz hematopoese e incluem: anemia, susceptibilidade a infecções e sangramentos. O curso da doença é bastante variável e cerca de um quarto dos pacientes acaba desenvolvendo leucemia aguda [13]. SMD é diagnosticada por citologia, considerando o grau de displasia e a porcentagem de blastos presentes no sangue periférico e na medula óssea, e por citogenética, que é importante para o prognóstico da doença. O diagnóstico diferencial envolve anemia aplástica, toxicidade na MO, doenças autoimunes, hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), leucemias agudas entre outros, dispostos na Tabela 1 [13].

**Tabela 1.** Diagnósticos diferenciais em SMD e testes necessários para o diagnóstico.

| <b>Diagnóstico diferencial</b>   | <b>Teste diagnóstico</b>                                 |
|--|--|
| Anemia aplástica, aplasia pura de células vermelhas  | Histologia, citologia e parvovírus B19                   |
| Dano na MO por toxicidade (álcool, chumbo, AINEs)  | Histórico, testes laboratoriais                          |
| Hiperplasia da MO (sepsis, HIV, infecções crônicas, tuberculose, doenças autoimunes, deficiência de cobre) | Citologia, histórico, testes laboratoriais               |
| Monocitose por outras causas   | Histórico, testes laboratoriais, genéticos e moleculares |
| HPN  | Imunofenotipagem   |
| Trombocitopenia imune  | Histórico, curso   |
| Anemia megaloblástica  | Vitamina B12 e ácido fólico                              |
| Síndrome hiperesplênica  | Histórico e clínica (esplenomegalia)                     |
| Leucemia aguda   | Citologia, testes genéticos e moleculares                |
| Doenças mieloproliferativas  | Histologia, citogenética, testes genéticos e moleculares |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Leucemia de células pilosas       | Citologia, imunogenotipagem, testes genéticos e moleculares, receptor de células T |
| Anemia deseritropoética congênita | Testes genéticos e moleculares   |

---

Adaptada de Germing et al, 2013.

O Sistema Internacional de Classificação de Prognóstico (IPSS-R) fornece uma predição mais acurada do curso da doença dividindo os casos em baixo ou alto risco. A sobrevida varia entre poucos meses e muitos anos [13].

A idade do paciente, performance e prognóstico são as variáveis que influenciam na escolha do tratamento. O objetivo deste é a melhora das contagens hematológicas e da qualidade de vida do paciente ou alteração do curso da doença nos casos mais severos. Transfusões crônicas de concentrados de hemácias são comuns, já que a maior parte dos pacientes é anêmica [14]. Além da terapia transfusional, pode-se utilizar drogas imunomoduladoras e antineoplásicos, além do transplante de células-tronco hematopoéticas para pacientes de até 60 anos em SMD de alto risco, com chance de cura de 30 a 50% [13,15].

Entretanto, os parâmetros transfusionais para pacientes com SMD ainda não foram bem estabelecidos, e a dosagem mínima de hemoglobina, na unidade internacional de medida, que indica a necessidade de transfusão varia de 70 a 120g/L [16]. De acordo com uma pesquisa realizada com médicos hematologistas na Austrália e Nova Zelândia, a decisão de transfundir dependia de: aspectos individuais para cada paciente (72%), decisões em casos semelhantes (17%), decisão de médicos ou enfermeiras (5%), protocolos padrões para todos os pacientes ou combinações entre estes (6%). Fatores a considerar a fim de obter os alvos transfusionais foram: sintomas (93%), histórico cardiovascular (78%), conveniência logística (49%), fragilidade (46%), idade (46%) e preferências dos pacientes (41%) [16].

Apesar de seu efeito positivo, há estudos que demonstram complicações associadas à transfusão nos casos de SMD, embora não esteja claro se a transfusão de sangue é causa ou consequência destas complicações. Alguns sugerem que a transfusão de hemácias está associada a falência de órgãos e maior mortalidade. Em um estudo realizado nos Estados Unidos, encontrou-se uma maior frequência de eventos cardíacos, diabetes, dispneia e progressão para leucemia aguda nos pacientes com dependência

transfusional. Este estudo também reportou uma chance duas vezes maior de morte quando o paciente recebe transfusão nos primeiros três anos após o diagnóstico [14].

Transfusões causam impactos econômicos também, encontrou-se que um paciente que realiza transfusões cronicamente possui uma média de custo para o sistema médico de saúde quase três vezes mais alta que um paciente sem dependência transfusional. Outras terapias podem ser utilizadas para estimular a hematopoese e o uso de quimioterápicos para combater a expansão clonal das células displásicas [14].

Pacientes com SMD recebem transfusões a fim de corrigir a anemia ou citopenias e estão, portanto, correndo risco de sofrer reações transfusionais. Em um levantamento destas reações através de dados de hemovigilância em pacientes SMD na França, encontrou-se a reação febril não hemolítica como a mais frequente. Aloimunização também foi comum, ocorrendo em 22,3% dos casos reportados. As especificidades dos anticorpos incluíram os sistemas Rh e Kidd, e também o sistema Kell [17]. Portanto, a indicação de transfusão deve ser rigorosamente avaliada, e estratégias para redução de eventos adversos devem ser adotadas.

### **2.3 Antígenos Eritrocitários**

A membrana plasmática dos eritrócitos possui diversas proteínas que cruzam a bicamada lipídica uma ou mais vezes ou estão ancoradas a ela por uma cauda lipídica. Muitas dessas proteínas expressam atividade de grupos sanguíneos [18]. Os antígenos eritrocitários estão presente nestas proteínas, glicoproteínas ou em glicolipídeos, e podem ser reconhecidos pelo sistema imune, causando a formação de anticorpos [2,8,9,19].

Os antígenos eritrocitários são separados nos grupos sanguíneos, de acordo com as suas características bioquímicas e genéticas. Alguns são produtos primários dos genes como os antígenos do sistema Rh, outros são modificados antes de serem expostos na membrana plasmática como os antígenos do sistema ABO, e outros ainda são adsorvidos à membrana plasmática como os antígenos do sistema Lewis [8,9]. Cada sistema de grupos sanguíneos é representado por um único gene, ou por um grupo de dois ou três genes ligados e homólogos. Cada um deles possui um símbolo, seguidos por uma numeração única que representa cada antígeno [20]. Antígenos eritrocitários

possuem uma grande importância biológica, pois suas descobertas trouxeram conhecimentos na área bioquímica e genética. Existem fenótipos nulos para alguns sistemas, geralmente causados por mutações inativadoras, que geram produtos não funcionais [21].

Os sistemas de grupos sanguíneos estão divididos em 36, segundo a Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (ISBT) [20] (Tabela 2) e são estudados por sua importância clínica transfusional, tanto na implicação de RHT quanto de DHPN. Além do sistema ABO, os mais importantes e mais imunogênicos envolvidos em tais reações são os sistemas: Rh, Kell, Kidd, Duffy e MNS. A grande maioria dos antígenos eritrocitários possuem distribuição bi-alélica e os seus polimorfismos são diferenciados por mutações do tipo SNP [8,10,19,22]. A localização destes nos cromossomos está apresentada na figura 2.

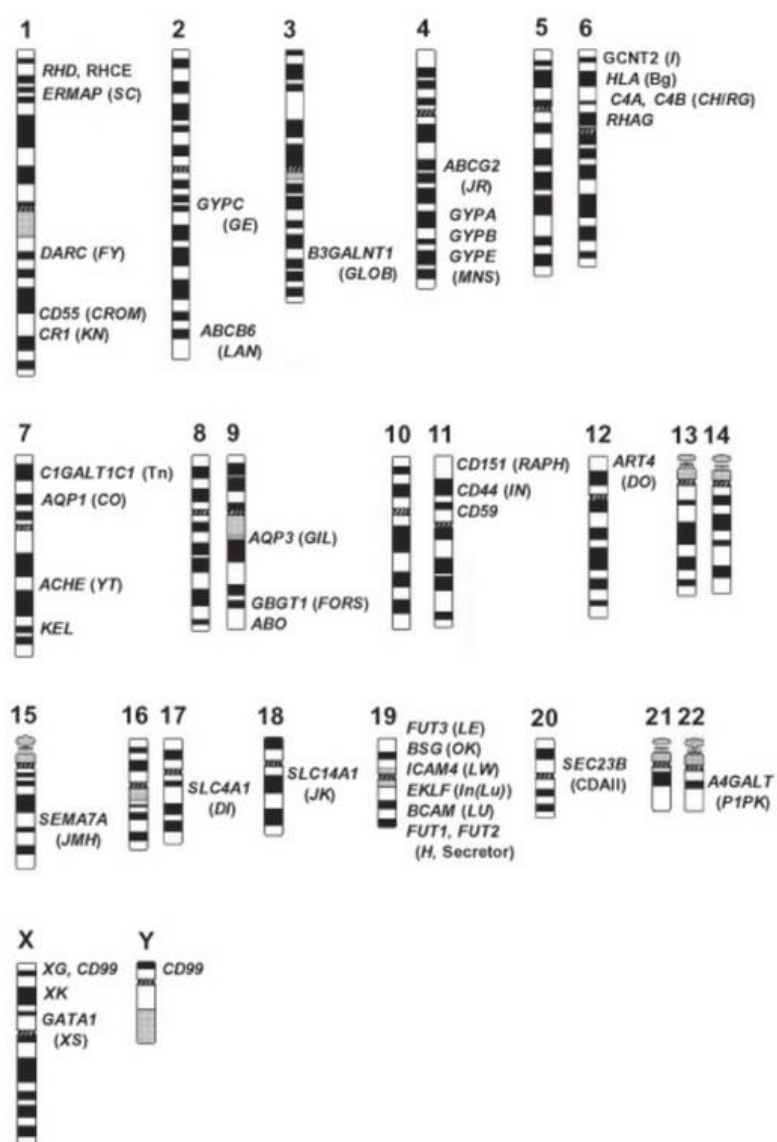
**Tabela 2.** Classificação dos grupos sanguíneos, nomenclatura, gene responsável e sua localização.

| Nº  | Nome     | Símbolo | Gene  | Nº de antígenos | CD nº            | Estrutura associada na membrana              | Localização cromossomo |
|-----|----------|---------|---|-----------------|------------------|--|------------------------|
| 001 | ABO      | ABO     | <i>ABO</i>                                      | 4               |                  | Carboidrato                                  | 9q34.2                 |
| 002 | MNS      | MNS     | <i>GYPA</i> ,<br><i>GYPB</i><br>( <i>GYPE</i> ) | 49              | CD235a<br>CD235b | Glicoforinas,<br>GPA, GPB                    | 4q31.21                |
| 003 | P1PK     | P1PK    | <i>A4GALT</i>                                   | 3               | CD77             | Carboidrato                                  | 22q13.2                |
| 004 | Rh       | RH      | <i>RHD</i><br><i>RHCE</i>                       | 55              | CD240            | Família Rh, RhD,<br>RhCcEe                   | 1p36.11                |
| 005 | Lutheran | LU      | <i>BCAM</i>                                     | 25              | CD239            | IgSF   | 19q13.2                |
| 006 | Kell     | KEL     | <i>KEL</i>                                      | 36              | CD238            | Endopeptidase                                | 7q33                   |
| 007 | Lewis    | LE      | <i>FUT3</i>                                     | 6               |                  | Carboidrato                                  | 19p13.3                |
| 008 | Duffy    | FY      | <i>ACKR1</i>                                    | 5               | CD234            | Receptor de quimiocina acoplado a proteína-G | 1q21-q12               |
| 009 | Kidd     | JK      | <i>SLC14A1</i>                                  | 3               |                  | Transportador de ureia                       | 18q11-q12              |
| 010 | Diego    | DI      | <i>SLC4A1</i>                                   | 22              | CD233            | Banda 3, trocador de ânions                  | 17q21.31               |
| 011 | Yt       | YT      | <i>ACHE</i>                                     | 6               |                  | Acetilcolinesteras e                         | 7q22                   |
| 012 | Xg       | XG      | <i>XG</i> , <i>MIC2</i>                         | 2               | CD99*            | Glicoproteínas                               | Xp22.32                |

|     |                            |       |                  |    |       |  |             |
|-----|----------------------------|-------|------------------|----|-------|--|-------------|
| 013 | Scianna                    | SC    | <i>ERMAP</i>     | 7  |       | IgSF, Proteína associada à membrana de eritroblastos | 1p34.2      |
| 014 | Dombrock                   | DO    | <i>ART4</i>      | 10 | CD297 | ADP-ribosiltransferase 4                             | 12p13-p2    |
| 015 | Colton                     | CO    | <i>AQP1</i>      | 4  |       | Aquaporina SF Aquaporina-1                           | 7p14        |
| 016 | Landsteiner -Wiener        | LW    | <i>ICAM4</i>     | 3  | CD242 | IgSF, molécula de adesão intercelular-4              | 19p3.2      |
| 017 | Chido/Rodgers              | CH/RG | <i>C4A, C4B</i>  | 9  |       | Componentes de complemento C4A, C4B                  | 6p21.3      |
| 018 | H                          | H     | <i>FUT1</i>      | 1  | CD173 | Carboidrato tipo 2 H                                 | 9q13.33     |
| 019 | Kx                         | XK    | <i>XK</i>        | 1  |       | Proteína Xk  | Xp21.1      |
| 020 | Gerbich                    | GE    | <i>GYPE</i>      | 11 | CD236 | Glicoforinas, GPC, GPD                               | 2q14-q2     |
| 021 | Cromer                     | CROM  | <i>CD55</i>      | 20 | CD55  | Fator de aceleração de decaimento (DAF), CCP SF      | 1q32        |
| 022 | Knops                      | KN    | <i>CR1</i>       | 9  | CD35  | Regulador de complemento-1, CCP SF                   | 1q32.2      |
| 023 | Indian                     | IN    | <i>CD44</i>      | 6  | CD44  | Módulo de ligação SF a proteoglicanas                | 11p13       |
| 024 | Ok                         | OK    | <i>BSG</i>       | 3  | CD147 | IgSF, basigina                                       | 19p13.3     |
| 025 | Raph                       | RAPH  | <i>CD151</i>     | 1  | CD151 | Tetrapanina SF                                       | 11p15.5     |
| 026 | John Milton Hagen          | JMH   | <i>SEMA7A</i>    | 6  | CD108 | Semaforina SF  | 15q22.3-q23 |
| 027 | I                          | I     | <i>GCNT2</i>     | 1  |       | Carboidrato  | 6p24.2      |
| 028 | Globosídeo                 | GLOB  | <i>B3GALNT 1</i> | 2  |       | Carboidrato, globosídeo                              | 3q25        |
| 029 | Gill                       | GIL   | <i>AQP3</i>      | 1  |       | Aquaporina SF, Aquaporina-3                          | 9p13        |
| 030 | Rh-associated glycoprotein | RHAG  | <i>RHAG</i>      | 3  | CD241 | Família Rh, Glicoproteína associada ao Rh            | 6p12.3      |
| 031 | Forssman                   | FORS  | <i>GBGT1</i>     | 1  |       | Carboidrato Glicolípido                              | 9q34.13-    |

|     |           |      |                |   |       |  |         |
|-----|-----------|------|----------------|---|-------|--|---------|
|     |           |      |                |   |       | Forssman   | q34.3   |
| 032 | Junior    | JR   | <i>ABCG2</i>   | 1 | CD338 | Transportador de cassete de ligação ao ATP ABCG2 | 4q22.1  |
| 033 | LAN       | LAN  | <i>ABCB6</i>   | 1 |       | Transportador de cassete de ligação ao ATP ABCG6 | 2q36    |
| 034 | Vel       | VEL  | <i>SMIM1</i>   | 1 |       |  | 1p36.32 |
| 035 | CD59      | CD59 | <i>CD59</i>    | 1 | CD59  |  | 11p13   |
| 036 | Augustine | AUG  | <i>SLC29A1</i> | 4 |       |  | 6p21.1  |

Adaptada de Daniels G, 2013 e ISBT website (acesso em 21/05/2019)



Fonte: Daniels, G., 2013.

**Figura 2.** Localização dos genes envolvidos nos grupos sanguíneos

Grupos sanguíneos foram descobertos em Viena em 1901, quando Landsteiner demonstrou através de cruzamentos entre hemácias e soro de diversos indivíduos a hemaglutinação. Descobriu-se que as pessoas poderiam possuir tipos de sangue diferentes entre si, e que as reações de aglutinação eram causadas pelo que conhecemos hoje como antígenos e anticorpos do sistema ABO. Os sistemas descobertos posteriormente, foram decorrentes de eventos transfusionais, com a detecção dos anticorpos, após a ocorrência de RHT ou DHPN. Posteriormente foram descobertos os antígenos consequentes a estes anticorpos. Durante 90 anos, a determinação de grupos sanguíneos foi realizada por hemaglutinação, e o genótipo era predito, sugerindo que havia polimorfismos nos genes que os representam. Atualmente, o contrário é bastante comum, é possível determinar o genótipo através do DNA estudando-se os polimorfismos, alelos silenciosos e anomalias genéticas, e prever o fenótipo. Tais estruturas presentes na membrana das células estão envolvidas em alguns processos celulares. As funções de algumas destas proteínas e carboidratos é conhecida, enquanto de outras pode-se supor devido a sua estrutura ou através de evidências provenientes de experimentos ainda limitados. Elas estão divididas em quatro categorias: transportadores, moléculas de adesão ou receptores, enzimas e proteínas estruturais. Algumas delas possui mais de uma função, algumas estão ativas durante a hematopoese, outras podem ser importantes apenas em situações adversas, e outras ainda podem ser relíquias evolutivas e não ter mais função significativa. O significado biológico dos polimorfismos existentes e da pressão evolutiva para sua permanência, na grande parte dos grupos sanguíneos, não é conhecida [18].

Os genes e antígenos dos sistema Rh e Kell estão resumidos na tabela 3 [21]. Como a maior parte dos genes envolvidos na formação dos antígenos eritrocitários está sequenciada, torna-se viável a determinação destes através de técnicas moleculares [8,9,19].

**Tabela 3.** Relação do nome, alelos e antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos Rh e Kell.

| <b>Grupo Sanguíneo</b> | <b>Principais alelos</b> | <b>Antígenos (Fenótipo)</b> |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| RH                     | RH*D                     | D (RH1)                     |
|                        | RHCE*Ce                  | C (RH2)                     |
|                        | RHCE*CE                  | E (RH3)                     |
|                        | RHCE*cE                  | c (RH4)                     |
|                        | RHCE*ce                  | e (RH5)                     |
| KELL                   | KEL*K                    | K (KEL1)                    |
|                        | KEL*k                    | k (KEL2)                    |

Elaborada pelo autor

#### **2.4 Aloimunização Eritrocitária**

A transfusão de concentrado de hemácias expõe o paciente a células diferentes das próprias. Devido aos polimorfismos presentes nos grupos sanguíneos, há uma grande chance de exposição a moléculas alogênicas. Tais moléculas são chamadas de antígenos e são capazes de desencadear uma resposta imune. A aloimunização é uma delas, e consiste na produção de anticorpos contra antígenos, nesse caso eritrocitários [2]. Anticorpos antieritrocitários possuem a capacidade de destruir eritrócitos e causar RHT. Estes eventos podem ser imediatos e intravasculares, imediatos e extravasculares ou tardios e extravasculares. Se o anticorpo possuir a capacidade de atravessar a barreira placentária, também possui a capacidade de causar DHPN [21].

Das formas de se adquirir anticorpos contra antígenos eritrocitários estão a transfusão sanguínea, a gestação e os transplantes [2]. A aloimunização depende de fatores como: diferenças fenotípicas entre os eritrócitos do doador e receptor e imunogenicidade dos antígenos, idade, sexo, tipagem RhD e etnia do paciente, assim como diagnóstico. Estima-se que a cada mil e duzentas transfusões de hemácias, uma resulte em RHT decorrente da aloimunização [22,23]. A DHPN, situação na qual os anticorpos antieritrocitários maternos estão dirigidos ao feto ou recém-nascido, também pode ocorrer em decorrência da aloimunização. Neste caso, é possível observar anemia do recém-nascido, que pode ser severa, hiperbilirrubinemia e hidropsia fetal [24,25].



A frequência destes anticorpos é de aproximadamente 0,3 a 2% na população em geral, enquanto em politransfundidos está em torno de 9%. Pacientes com Anemia Falciforme e Talassemias possuem uma prevalência ainda maior, estima-se que seja 36% nos primeiros e 10% nos segundos [8,23,26]. Cerca de 30 a 80% dos pacientes com SMD tornam-se dependentes de transfusão e estão, portanto, em risco de aloimunizar-se. A frequência de aloimunização varia de 15 a 32% nestes pacientes [27].

A transfusão de hemácias fenótipo compatíveis, independentemente da presença de anticorpos prévios, previne a aloimunização. São detectadas reduções expressivas na prevalência de anticorpos, especialmente em pacientes falciformes, nos quais a presença de anticorpos pode ser encontrada em cerca de 15% dos pacientes quando há a compatibilização para os Sistema Rh e Kell, de maior importância transfusional. Quando se utiliza hemácias compatíveis para outros sistemas como Kidd e Duffy, a prevalência reduz para aproximadamente 0,7% [28].

Nas síndromes mielodisplásicas, políticas de prevenção também reduzem a aloimunização. É encontrada uma taxa média de 17% de novas aloimunizações durante a terapia transfusional, sendo que a maioria (87%) são anticorpos contra os sistemas Rh e Kell. A transfusão de hemácias fenótipo compatível pode reduzir a taxa de aloimunização a 11%. Entretanto, a aloimunização contra antígenos Rh ou Kell pode chegar a 7% [27].

Um estudo de coorte no sul da Austrália encontrou uma incidência cumulativa de anticorpos antieritrocitários de 11%, sendo que foi mais alta nos casos de risco baixo ou médio pelo Sistema Internacional de Classificação de Prognóstico (IPSS-R). Os anticorpos mais comuns encontrados foram contra o sistema Rh e Kell [29]. Em um estudo com seguimento de 20 anos, a incidência de formação de aloanticorpos encontrada foi 1 a cada 10,5 pessoas por ano ou 0,7 a cada 100 unidades transfundidas [30]. O número total de unidades transfundidas foi maior no grupo aloimunizado, e a frequência transfusional aumentou significativamente após a aloimunização, assim como o desenvolvimento de autoanticorpos, que foram mais frequentemente encontrados nos pacientes que adquiriram aloanticorpos em um curto período após a aloimunização. Dependência transfusional de hemácias é associada a uma pior sobrevida independentemente do escore de risco da IPSS-R. Aloimunização pode induzir a formação de autoanticorpos e causar RHTs subclínicas e sorológicas [29]. No

Brasil, foram avaliados 43 pacientes com SMD em terapia transfusional com e sem anticorpos formados. A aloimunização aconteceu em 44% dos pacientes, quase a metade dos anticorpos (49%) eram dirigidos ao sistema Rh [31].

## 2.5 Sistema Rh

O Sistema Rh é o mais complexo dos grupos sanguíneos, compreendendo 54 antígenos, numerados de RH1 a RH61. O RH1, conhecido como RHD, produz a proteína D, que caracteriza o que é comumente chamado de Rh. Dos demais antígenos deste sistema, os mais importantes para a medicina transfusional são os antígenos C (RH2), E (RH3), c (RH4), e e (RH5). RH2 e RH4, RH3 e RH5 são pares de antígenos antitéticos, causados por polimorfismos do gene *RHCE*. A sua expressão é específica da série eritroide [8,22].

Os genes *RHD* e *RHCE* possuem 10 exons, com 93,8% de homologia, e expressam polipeptídeos semelhantes RhD e RhCE. Possuem orientação opostas, com suas extremidade 3' proximais separadas por uma região de 30 kpb, chamada de SMD1, flanqueada por duas caixas Rhesus [22], e provavelmente foram formados a partir da duplicação de um gene ancestral [32]. Diversos genes do sistema Rh sofreram mutações de ponto ou rearranjos e trocas entre *RHD* e *RHCE*, o que resulta em variantes e genes híbridos [32].

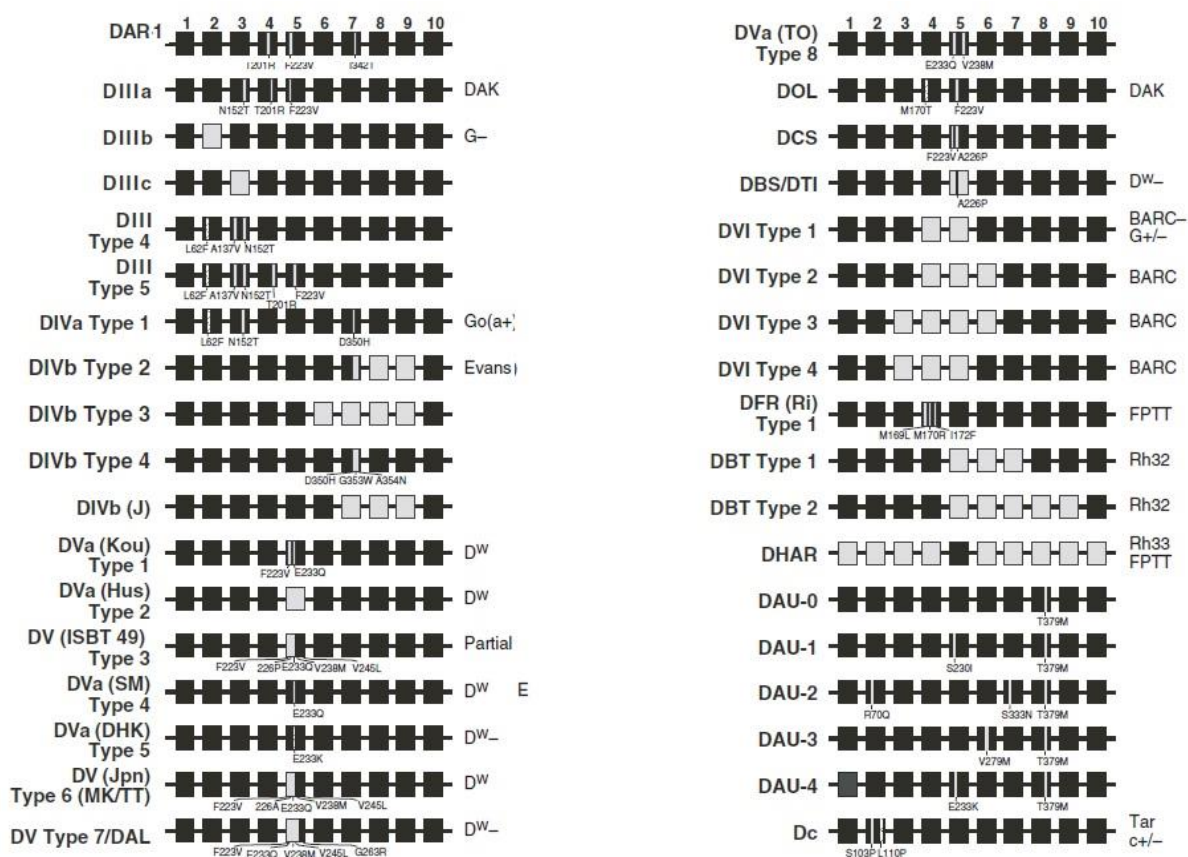
RHD e RHCE estão presentes no macrocomplexo Rh, ligado a banda 3 da hemácia. Esta glicoproteína é um trocador de ânions, e possui uma forma um pouco modificada nos rins. A banda 3 possui um papel extremamente importante no transporte de gases da respiração nos eritrócitos, transferindo o íon  $\text{HCO}_3^-$  para o interior das células, para então promover a liberação de  $\text{O}_2$ . Também possui funções de ancoragem da membrana plasmática ao citoesqueleto e na remoção de células senescentes através da ação de anticorpos naturais contra a banda 3 [18].

### 2.5.1 O Antígeno D

O antígeno D é o mais imunogênico do sistema Rh e também o de maior importância clínica. Antes da introdução da imunoglobulina anti-D como profilaxia para gestantes D negativas, anti-D imune era a principal causa de DHPN [8].

Sua prevalência está entre 82 e 88% em europeus e norte-americanos caucasianos e 95% em negros africanos. Em algumas populações como chineses, japoneses e no leste asiático, chega próximo a 100% [8]. No Brasil, a sua prevalência está em torno de 63%, mas varia de acordo com a população da região [33]

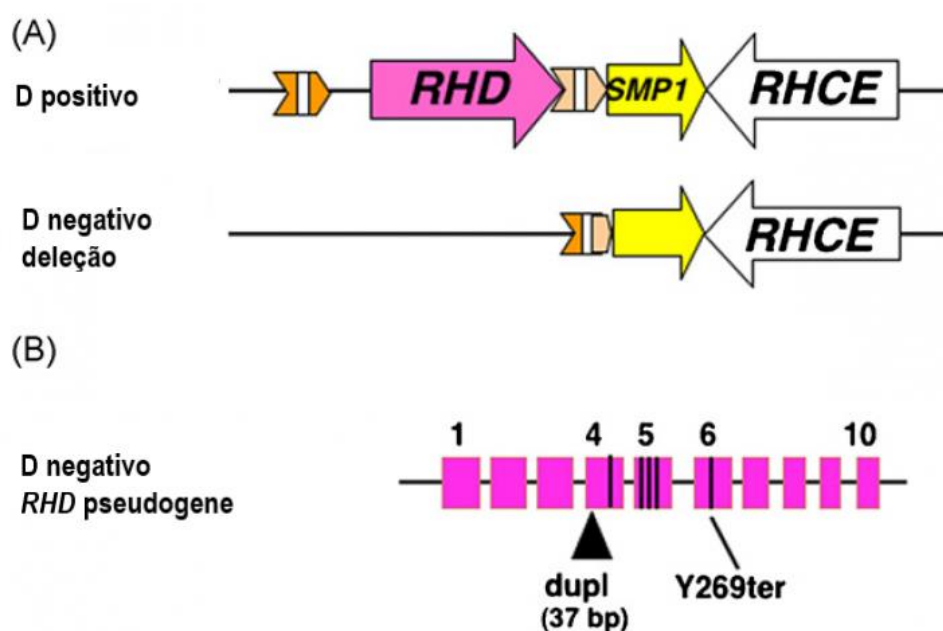
A sua expressão pode variar entre os indivíduos D positivos, pois existem diversas mutações que alteram a proteína RHD, tanto quantitativa quanto qualitativamente. Essas mutações são responsáveis pelos fenótipos RhD variantes [8]. A Figura 3 mostra algumas dessas variantes e suas bases moleculares. Quadrados pretos são exons provenientes do gene *RHD* e brancos do *RHCE*. Mutações de ponto estão demonstradas abaixo de cada local de mutação. A redução da expressão de D em caucasianos D positivos é de cerca de 0,2 a 1% [32].



Fonte: Reid et al. 2012.

**Figura 3.** Bases moleculares de variantes de RhD

O fenótipo negativo mais comum, exceto nas populações africanas, é causado pela deleção total do gene *RHD* (Figura 4). Também pode ocorrer por outros mecanismos, como o pseudogene *RHD* ou *RHD\*Ψ*, comum em africanos. Essa mutação consiste na duplicação de uma sequência de 37 nucleotídeos entre o intron 3 e o exon 4, que modifica a fase de leitura e gera um códon de parada, gerando a proteína RHD truncada (figura 4) [8,22,34].



Adaptada e Rouillac-Le Sciellour et al. 2007

**Figura 4.** Representação esquemática dos genes *RHD* e *RHCE*, e formação do fenótipo D negativo através da deleção do gene *RHD* e formação do pseudogene.

### 2.5.2 Os Antígenos C e c

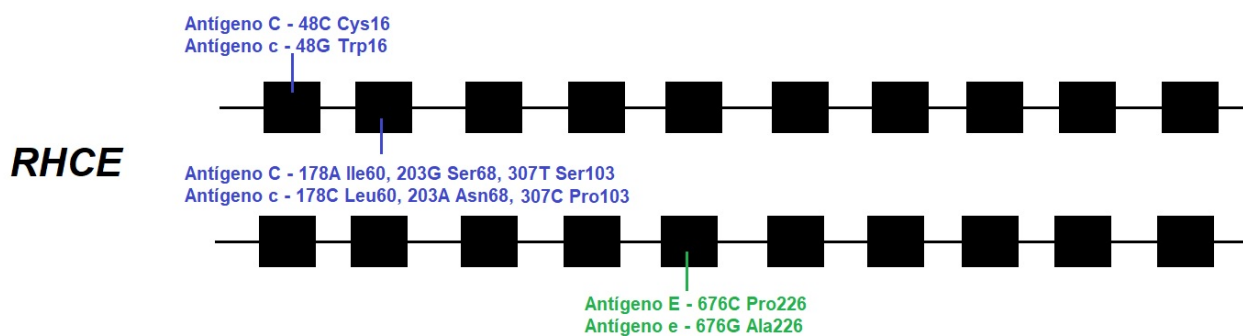
O antígeno C tem prevalência de 27 a 92% (frequência alélica de 0,19 a 0,73) e o antígeno c, de 46 a 89% (frequência alélica de 0,27 a 0,81) dependendo da população. Este polimorfismo está associado à troca de seis aminoácidos (C/c): Cys16Trp, causada pelas trocas 48C>G no exon 1, Ile60Leu (178A>C), Ser68Asn (203G>A) e Ser103Pro (307T>C) no exon 2 (Figura 5.) [8,9,19,22,33,35,36].

Para prever o fenótipo a partir do genótipo pode-se utilizar PCR com dois primers: um complementar a sequência específica no intron 2 para o *RHCE*\*C, e outro para a região 307C específica para o *RHCE*\*c no exon 2 [3,8,9].

### 2.5.3 Os Antígenos E e e

Para o antígeno E, a prevalência varia de 22,8 a 37,3% (frequência alélica de 0,11 a 0,22) e para o antígeno e, de 95 a 98% (frequência alélica de 0,78 a 0,89). O polimorfismo E/e está associado à troca de aminoácidos Pro226Ala, através da mutação de ponto 676C>G no exon 5 do gene *RHCE* (Figura 5.) [8,22,33,35,36].

Para prever o fenótipo, podem ser utilizados *primers* específicos para o gene *RHCE* adicionado à digestão pela enzima de restrição *MnlI* [3,8,9,19].



**Figura 5.** Bases moleculares de formação dos antígenos C, c, E e e no gene *RHCE*.

## 2.6 Sistema Kell

Um dos primeiros sistemas a ser descoberto após o advento do teste de antiglobulina humana, o Sistema Kell apresenta sete conjuntos de antígenos e 17 antígenos de alta frequência, que são numerados de KEL1 a KEL38. O mais importante é o antígeno K (KEL1). São expressos no início da eritropoese, e podem estar presentes em células progenitoras mieloides e, possivelmente, em megacariócitos, sistema nervoso central, órgãos linfoides, coração e músculos esqueléticos [8,22].

Os antígenos Kell estão expressos em uma glicoproteína de membrana localizada no CD238, e gene *KEL* possui 19 exons. Ele é responsável por codificar, além de KEL1, uma série de antígenos de baixa e alta prevalência [8,22].

Kell é uma glicoproteína com ação de endopeptidase. Sua expressão depende da presença de duas proteínas covalentemente ligadas, Kell e Xk. É uma enzima que processa uma grande variedade de peptídeos. A ausência de Kell não está associada a uma patologia, mas a ausência de Xk é compatível com a Síndrome de McLeod, situação na qual os antígenos do sistema não estão presentes [18].

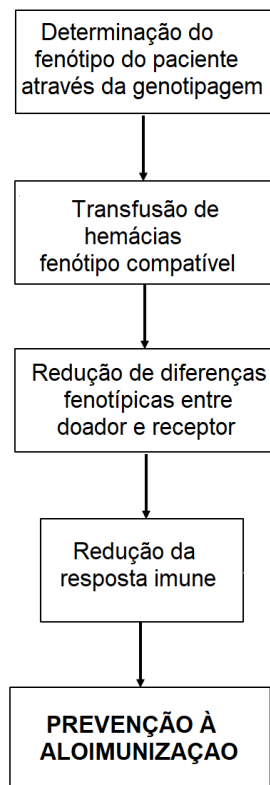
### 2.6.1 Os Antígenos K e k

O alelo *KEL\*01* apresenta o nucleotídeo C na posição 578, exon 6, que gera a presença do aminoácido Met. Esta sequência é um sítio de restrição para a enzima *BsmI*, sendo esta uma forma de detectar este polimorfismo. A prevalência do antígeno K é de 9% em caucasianos e 2% em africanos, e a frequência alélica de *KEL\*01* de cerca de 0,0462 [8,9,19,22,33,35,36].



**Figura 5.** Bases moleculares de formação dos antígenos C, c, E e e no gene *RHCE*.

### 3. MARCO CONCEITUAL



**Figura 7.** Marco Conceitual da prevenção à aloimunização

A determinação do fenótipo eritrocitário de pacientes previamente às transfusões de hemácias pode ser realizada através da genotipagem. Assim, é possível selecionar bolsas de concentrados de hemácias fenótipo compatíveis, reduzindo a resposta imune causada pela apresentação de antígenos diferentes aos próprios e prevenido a aloimunização.

#### 4. JUSTIFICATIVA

Pacientes politransfundidos estão continuamente sendo expostos a antígenos alogênicos e assim suscetíveis a aloimunização. Aloimunização é causa de RHTs, DHPN e de uma maior dificuldade em encontrar concentrados de hemácias compatíveis, especialmente em pacientes com presença de múltiplos anticorpos. Devido a isso, há a necessidade de centros especializados seguirem um protocolo transfusional que leve em conta a prevenção da aloimunização.

Protocolos geralmente utilizam a determinação de antígenos eritrocitários nos pacientes para a seleção de bolsa fenótipo compatíveis. Para esta determinação, usualmente utiliza-se a fenotipagem com antissoros específicos, mas esta técnica possui limitações.

Devido aos avanços da medicina, a expectativa de vida está aumentando, e conseqüentemente se observa um aumento na demanda transfusional. Há muitos pacientes com necessidade de transfusão crônica ou já aloimunizados. Resolver os problemas de compatibilidade nestes pacientes demanda tempo e dinheiro, devido às longas e complexas técnicas acessórias em imuno-hematologia. Além disso, essas técnicas não são capazes de contornar algumas limitações, como a ausência de antissoros específicos para alguns antígenos, a impossibilidade de realização de fenotipagem em pacientes politransfundidos e dificuldades de testes em pacientes com TAD positivo.

Por fim, devido à necessidade de especialização na área de hemoterapia para uma melhor qualidade no atendimento aos pacientes crônicos, é emergente a aplicação de técnicas mais avançadas, como a genotipagem de grupos sanguíneos.



## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo primário**

Realizar a determinação de grupos sanguíneos para os sistemas Rh e Kell na população de pacientes com Síndrome Mielodisplásica atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre através da técnica de genotipagem.

### **5.2 Objetivos secundários**

- Avaliar a frequência dos polimorfismos genéticos para os principais sistemas de grupos sanguíneos Rh e Kell;
- Comparar resultados sorológicos e moleculares e discutir discrepâncias encontradas;
- Comparar as frequências dos genótipos de cada um dos sistemas na nossa população e em outras populações;
- Criar um algoritmo que inclua o recurso da genotipagem no auxílio de resolução de casos complexos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Saúde M da. Guia para o uso de hemocomponentes. 2010.
- [2] Girello AL, Kuhn TIB de B. Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária. 4ª Ed. São Paulo: Senac; 2016.
- [3] Paccapelo C, Truglio F, Villa MA, Revelli N, Marconi M. HEA BeadChip™ technology in immunohematology 2015.
- [4] O'Suoji C, Liem RI, Mack AK, Kingsberry P, Ramsey G, A. TA, et al. Alloimmunization in Sick Cell Anemia in the Era of Extended Red Cell Typing. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:487–1491. <https://doi.org/10.1002/pbc.24530>.
- [5] Rujirojindakul P, Flegel WA. Applying molecular immunohaematology to regularly transfused Thalassaemic patients in Thailand. *Blood Transfus* 2014;12:28–35. <https://doi.org/10.2450/2013.0058-13>.
- [6] Cohen D, Hartung H, Evans P, Friedman DF, Chou ST. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with bone marrow failure syndromes. *Transfusion* 2016;56:1314–9. <https://doi.org/10.1111/trf.13608>.
- [7] DeZern AE, Binder G, Rizvi S, Corvino FA, Arikian SR, Surinach A, et al. Patterns of treatment and costs associated with transfusion burden in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2017;58:2649–56. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1312372>.
- [8] Daniels G. Human Blood Groups. 3rd ed. Bristol: Wiley-Blackwell; 2013.
- [9] Reid ME, Denomme GA. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfus Apher Sci* 2011;44:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.12.011>.
- [10] Denomme GA, Johnson ST, Pietz BC. Mass-scale red cell genotyping of blood donors. *Transfus Apher Sci* 2011;44:93–9. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.12.012>.
- [11] Rozman P, Dovc T, Gassner C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion* 2000;40:936–42. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40080936.x>.
- [12] Keller MA. The role of red cell genotyping in transfusion medicine. *Immunohematology* 2015;31:49–52.
- [13] Germing U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N. Myelodysplastische syndrome: Diagnostik, prognoseabschätzung und therapie. *Dtsch Arztebl Int* 2013;110:783–90. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2013.0783>.
- [14] Goldberg SL, Chen E, Sasane M, Paley C, Guo A, Laouri M. Economic impact on US Medicare of a new diagnosis of myelodysplastic syndromes and the incremental costs associated with blood transfusion need. *Transfusion* 2012;52:2131–8. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03626.x>.
- [15] Tabak DG. Transplante de medula óssea nas síndromes mielodisplásicas. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2002;24:166–81. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842002000300003>.
- [16] Mo A, McQuilten ZK, Wood EM, Weinkove R. Red cell transfusion thresholds in myelodysplastic syndromes: a clinician survey to inform future clinical trials. *Intern Med J* 2017;47:695–8. <https://doi.org/10.1111/imj.13434>.
- [17] Moncharmont P, Quittançon E, Barday G, Benamara A. Adverse transfusion reactions in patients with aplastic anaemia or myelodysplastic syndromes. *Vox Sang* 2019;114:349–54. <https://doi.org/10.1111/vox.12765>.
- [18] Daniels G. Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang* 2007;93:331–40. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.00970.x>.
- [19] Bianchi JVS. Genotipagem de grupos sanguíneos por meio de microarranjos líquidos. Universidade de São Paulo, 2016.
- [20] ISBT - International Society of Blood Transfusion n.d. <https://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/> (accessed May 21, 2019).

- [21] Daniels G, Reid ME. Blood groups: The past 50 years. *Transfusion* 2010;50:281–9. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02456.x>.
- [22] Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. *The Blood Group Antigens - FactsBook*. 3rd ed. Oxford: Elsevier; 2012.
- [23] Norris J, Roubinian NH, Wu Y, Triulzi DJ, Kleinman S. Epidemiology and Donor Evaluation Study ( REDS-III ) database. *Br J Haematol* 2019;181:672–81. <https://doi.org/10.1111/bjh.15182.Risk>.
- [24] Haimila K, Sulin K, Kuosmanen M, Sareneva I, Korhonen A, Natunen S, et al. Targeted antenatal anti-D prophylaxis program for RhD-negative pregnant women – outcome of the first two years of a national program in Finland. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2017;96. <https://doi.org/10.1111/aogs.13191>.
- [25] Delaney M, Matthews DC. Hemolytic disease of the fetus and newborn: managing the mother, fetus, and newborn. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2015;2015:146–51. <https://doi.org/10.1182>.
- [26] Boateng LA, Campbell A, Davenport R, Akoto A, Schonewille H, Hagan S. Red blood cell antigens and red cell alloimmunisation in SCD patients in Ghana. *Vox Sang* 2018;113:224–5. <https://doi.org/10.1111/vox.12658>.
- [27] Lin Y, Saskin A, Wells RA, Lenis M, Mamedov A, Callum J, et al. Prophylactic RhCE and Kell antigen matching: impact on alloimmunization in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes. *Vox Sang* 2017;112:79–86. <https://doi.org/10.1111/vox.12455>.
- [28] Fasano RM, Meyer EK, Branscomb J, White MS, Gibson RW, Eckman JR. Impact of Red Blood Cell Antigen Matching on Alloimmunization and Transfusion Complications in Patients with Sickle Cell Disease : A Systematic Review. *Transfus Med Rev* 2019;33:12–23. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2018.07.003>.
- [29] Singhal D, Kutyna MM, Chhetri R, Wee LYA, Hague S, Nath L, et al. Red cell alloimmunization is associated with development of autoantibodies and increased red cell transfusion requirements in myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2017;102:2021–9. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.175752>.
- [30] Sanz C, Nomdedeu M, Belkaid M, Martinez I, Nomdedeu B, Pereira A. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. *Transfusion* 2013;53:710–5. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03819.x>.
- [31] Guelsin GAS, Rodrigues C, Visentainer JEL, De Melo Campos P, Traina F, Gilli SCO, et al. Molecular matching for Rh and K reduces red blood cell alloimmunisation in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood Transfus* 2015;13:53–8. <https://doi.org/10.2450/2014.0332-13>.
- [32] Rizzo C, Castiglia L, Arena E, Gangi S, Mazzola G, Caruso C, et al. Weak D and partial D: Our experience in daily activity. *Blood Transfus* 2012;10:235–6. <https://doi.org/10.2450/2012.0060-11>.
- [33] Zacarias JMV, Langer IBV, Visentainer JEL, Sell AM. Profile of Rh, Kell, Duffy, Kidd, and Diego blood group systems among blood donors in the Southwest region of the Paraná state, Southern Brazil. *Transfus Apher Sci* 2016;55:302–7. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.08.001>.
- [34] Rouillac-Le Sciellour C, Serazin V, Brossard Y, Oudin O, Le Van Kim C, Colin Y, et al. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD. *Transfus Clin Biol* 2007;14:572–7. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2008.01.003>.
- [35] Silvy M, Filosa L, Chiaroni J, Bailly P. Apport du génotypage érythrocytaire à l'immunohématologie receveur à travers trois années d'activité à l'EFS Alpes-Méditerranée. *Transfus Clin Biol* 2014;21:289–95. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2014.06.001>.
- [36] Belsito A, Costa D, Fiorito C, De Iorio G, Casamassimi A, Perrotta S, et al. Erythrocyte genotyping for transfusion-dependent patients at the Azienda Universitaria Policlinico of Naples. *Transfus Apher Sci* 2015;52:72–7. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.12.006>.
- [37] Abdelrazik AM, Elshafie SM, Niazi M, Said E, Ahmed GME, Al-gamil AA, et al. Study of red blood cell alloimmunization risk factors in multiply transfused thalassemia patients: role in

- improving thalassemia transfusion practice in Fayoum, Egypt. *Transfusion* 2016;56:2303–7. <https://doi.org/10.1111/trf.13695>.
- [38] Osman NH, Sathar J, Leong CF, Zulkifli NF, Raja Sabudin RZA, Othman A, et al. Importance of extended blood group genotyping in multiply transfused patients. *Transfus Apher Sci* 2017;56. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.03.009>.
- [39] Costa DC da. *Investigação do polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no Estado de Santa Catarina Florianópolis / SC*. 2016.
- [40] Ye Z, Zhang D, Boral L, Liz C, May J. Comparison of Blood Group Molecular Genotyping to Traditional Serological Phenotyping in Patients with Chronic or Recent Blood Transfusion. *J Biosci Med* 2016;04:1–8. <https://doi.org/10.4236/jbm.2016.43001>.
- [41] Kulkarni S, Choudhary B, Gogri H, Patil S, Manglani M, Sharma R, et al. Molecular genotyping of clinically important blood group antigens in patients with thalassaemia. *Indian J Med Res* 2018;148:713–20. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_455\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_455_17).

## 7. ARTIGO

### Profile of Rh and Kell systems in patients with Myelodysplastic Syndrome attended at a hospital from Southern Brazil

Bruna Blos<sup>1,2</sup>, Juliana Pires Marafon Franz<sup>2</sup>, Leo Sekine<sup>2,3</sup>, Joice Merzoni<sup>4</sup>, Luiz Fernando Jobim<sup>3,4</sup>, Rosane Eliane Bittencourt<sup>5</sup>, Marília Fernandes Mascarenhas Sirianni<sup>6</sup>, Carolina Bonet Bub<sup>6</sup>, Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber<sup>3,7</sup>

<sup>1</sup> Student from Postgraduate Program in Medical Science - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup> Transfusional Therapy Unit - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>3</sup> Professor from Postgraduate Program in Medical Science - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>4</sup> Immunology Service - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>5</sup> Hematology Service - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>6</sup> Hemotherapy and Cellular Therapy Department – Hospital Albert Einstein, Brazil

<sup>7</sup> Internal Medicine Service - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Address correspondence to: Bruna Blos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Transfusional Therapy Unit, Rua Ramiro Barcelos 2350, Bairro Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP 90035-007. Tel. (+55) 51 3359 8322, or e - mail: [bblos@hcpa.edu.br](mailto:bblos@hcpa.edu.br)

#### Abstract

Patients who receive blood transfusion are exposed to non-self antigens which can stimulate an immune response and development of anti-erythrocyte antibodies, called alloimmunization. Myelodysplastic Syndrome (MDS) is a disorder of hematopoietic stem cells (HSC) and, in 80-90% of cases, patients have transfusion indication. Blood banks should establish protocols to prevent alloimmunization, which include phenotyping for the Rh and Kell systems and for Duffy, Kidd and MNS systems, when possible, for compatible phenotype transfusion. Methods to determine erythrocyte phenotype serologically by hemagglutination use commercial antisera, but have limitations. Molecular biology can overcome limiting situations by determining polymorphisms and prediction of phenotype. In this study, patients with MDS in transfusion support were selected and Polymerase Chain Reaction (PCR) to predict phenotype for the Rh and Kell systems was performed. For RHD and RHCE\*C/c, multiplex allele-specific PCR was performed. For RHCE\*E/e and KEL, PCR-RFLP was executed. Sixteen patients were genotyped, and 13 were also phenotyped using the hemagglutination method. Frequencies of genotype found were compared to check similarities or discrepancies between donors and recipients with a population of blood donors from another region of South Brazil, Parana, using the chi-square test. Frequencies for RH and KEL genotypes were similar to the reference population, except for RHCE\*C/C ( $p=0.034$ ) and RH\*D ( $p=0.046$ ), which were higher. Discrepancies between phenotype and genotype were found in seven tests from six samples, and five of them have had recent transfusion. In 4 samples, D, E and K phenotyping was positive and no gene was detected in PCR. In 3 cases, the serological method was inconclusive and molecular test was conclusive, positive or negative. Those discrepancies may be because of serology compromise by erythrocytes from blood donors in recently transfused patients or the presence of polymorphisms not tested in this study. Determination of phenotype through genotyping is possible, although, ideally both techniques should be performed. If discrepancies are observed, another method should be executed such as extended genotype for other polymorphisms or DNA sequencing.

#### Keywords

*Blood groups; genotyping method; polytransfused patients*

## 1. Introduction

Erythrocyte transfusion is a therapy to enhance oxygen support in acute or chronic anemias and predicted or active bleeding [1]. Patients who take blood transfusion receive allogeneic cells and are exposed to non-self antigens that can lead to alloimmunization [2]. This can cause life threatening situations such as Hemolytic Transfusion Reactions (HTRs), Perinatal Hemolytic Disease (PHD) and transfusion delay due to additional testing [3]. Alloantibodies may be formed as a result of blood transfusions, pregnancy or even have natural occurrence and their prevalence is 0.3 to 2% in general population. Polytransfused patients have higher prevalence of them, around 9% [2,4].

Myelodysplastic Syndromes are a group of disorders from HSC that result in bone marrow failure. Signs and symptoms include cytopenia, fatigue, infections and bleeding. Treatment for 80-90% of patients involve blood transfusion [5].

Blood banks must establish protocols to prevent alloimmunization in polytransfused or already alloimmunized patients. Transfusion of phenotype compatible PRBC for clinical important antigens from Rh and Kell systems should be a part of these protocols [6,7].

Phenotyping by serological methods, although simple and inexpensive, has limitations, for example: scarcity of reagents, impossibility of execution in recently transfused patients or with a positive DAT [8–10].

Those biases do not affect genotyping methods, which uses Polymerase Chain Reaction (PCR) to determine the presence of polymorphisms and predict phenotype [6,11]. The use of molecular techniques helps to determine blood group in polytransfused patients and solve discrepancies or serological difficulties [9].

## 2. Material and Methods

### 2.1 Patient recruiting and sample collection

MDS patients were recruited from 2018 to 2019 at the transfusion service and the outpatient clinic from Hospital de Clinicas de Porto Alegre using data from medical records. Patients after stem cell transplantation or that were unable to collect samples were excluded. Those who met the research requirements were invited to participate and signed the Informed Consent Term. The study is in accordance with Declaration of *Helsinki* and Brazilian resolution n°466/2012 and approved by the Ethics Committee from HCPA, under registration number CAAE: 89049418.5.0000.5327. Blood samples were collected in two EDTA tubes, total volume of 10 mL.

### 2.2 Phenotyping

Phenotyping for D, C, c, E, e and K antigens was performed by gel column agglutination method using ID-cards and commercial antisera (BioRad®). Reactions were categorized as positive, negative or inconclusive due to dimorphic population (DP) of red blood cells.

### 2.3 DNA extraction

DNA was extracted through manual spin column separation using QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®). DNA quantification was measured using NanoDrop®, and volume was adjusted to a concentration of 100ng/μL.

## 2.4 PCR-SSP/Multiplex

DNA was amplified by PCR technique using sequence specific primers, described in table 1, to distinguish *RHCE*\*C/c and *RHD* polymorphisms [12]. PCR product was submitted to electrophoresis in a 2% agarose gel and revealed with an intercalating nucleic acid stain.

## 2.5 PCR-RFLP

After DNA amplification of a constant region for each gene, restriction enzymes were added to cleave allele specific regions and allow polymorphism detection for *KEL* and *RHCE*\* E/e. The primers and restriction enzymes used to detect each polymorphism are described in table 1 [12]. Digested PCR product was submitted to electrophoresis in a 4% agarose gel and revealed with an intercalating nucleic acid stain.

## 2.6 Statistical analysis

Frequencies were compared using the maximum likelihood ratio chi-square test considering a significance level of 5% ( $p < 0,05$ ). Statistical analysis was performed using SPSS v. 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## 3. Results

After recruiting, 18 patients agreed to participate in the study, but 2 were excluded due **Table 1**. Primers and enzymes used to determine each polymorphism responsible for blood groups.

|                                | Primer                    | Sequence 5'-3'                                 | Product length     | Enzyme      |
|--------------------------------|---------------------------|--|--------------------|-------------|
| <i>RHCE</i> *C                 | C/for                     | CAGGGCCACCACCATTTGAA                           | 320 bp             |             |
|                                | C/rev.                    | GAACATGCCACTTCACTCCAG                          |                    |             |
| <i>RHCE</i> *c                 | c/for                     | TCGGCCAAGATCTGACCG                             | 177 bp             |             |
|                                | c/rev                     | TGATGACCACCTTCCCAGG                            |                    |             |
| <i>RHD</i>                     | Exon 7 F                  | AGCTCCATCATGGGCTACAA                           | 97 bp              |             |
|                                | Exon 7 R                  | ATTGCCGGCTCCGACGGTATC                          |                    |             |
|                                | INTRON 3 F1<br>INTRON 4 R | GGGTTGGGCTGGGTAAGCTCT<br>GAACCTGCTCTGTGAAGTGCT | 498-535 bp         |             |
| <i>KEL</i> *01/ <i>KEL</i> *02 | KELS                      | AAGCTTGGAGGCTGGCGCCAT                          | KEL*01 - 100/56 bp | <i>BsmI</i> |
|                                | KELR                      | CCTCACCTGGATGACTGGTG                           |                    |             |
| <i>RHCE</i> *E/ <i>RHCE</i> *e | CEI4                      | GGCAACAGAGCAAGAGTCCA                           | RHCE*E - 148 bp    | <i>MnII</i> |
|                                | CEX5                      | CTGATCTTCCTTTGGGGGTG                           | RHCE*e - 111 bp    |             |

to no-show. Samples from 16 patients attended at HCPA with diagnosis of MDS were tested to *RHD*, *RHCE* and *KEL*. ABO and RhD blood group, sex, age, ethnicity are detailed in Table 2.

**Table 2.** ABO and RhD blood group phenotype and demographic data from MDS patients.

|                    |           | N    | %     |
|--------------------|-----------|------|-------|
| <b>ABO</b>         | A         | 11   | 68,75 |
|                    | B         | 1    | 6,25  |
|                    | O         | 4    | 25    |
| <b>RhD</b>         | Positive  | 15   | 93,75 |
|                    | Negative  | 1    | 6,25  |
| <b>Sex</b>         | Male      | 8    | 50    |
|                    | Female    | 8    | 50    |
| <b>Ethnicity</b>   | Caucasian | 16   | 100   |
|                    | Other     | 0    | 0     |
| <b>Age (years)</b> | Median    | 68,5 |       |
|                    | Min       | 59   |       |
|                    | Max       | 78   |       |

Genotypes found are presented in Table 3 and were: *RHD\*01* in 14 patients (87.5%) and not present in 2 patients (12.5%). For *RHCE* gene, *RHCE\*C/C* was present in 7 patients (43.75%), followed by *RHCE\*C/c* and *RHCE\*c/c* in 5 (31.25%) and 4 (25%) samples, respectively (figure 1). *RH\*e/e* was the most common genotype found in this population, with frequency of 81.25%, or 13 patients, and *RH\*E/e* was present in 3 samples (18.75%). *RH\*E/E* was not present. For Kell system, genotypes were *KEL\*02/KEL\*02* for the majority of patients, 13 or 93.75% and 1 patient (6.25%) was heterozygous for *KEL\*01/KEL\*02*. None of the patients were homozygous for *KEL\*01* (figure 2.).

**Table 3.** Genotype frequencies for *RHD*, *RHCE* and *KEL* in MDS patients from Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

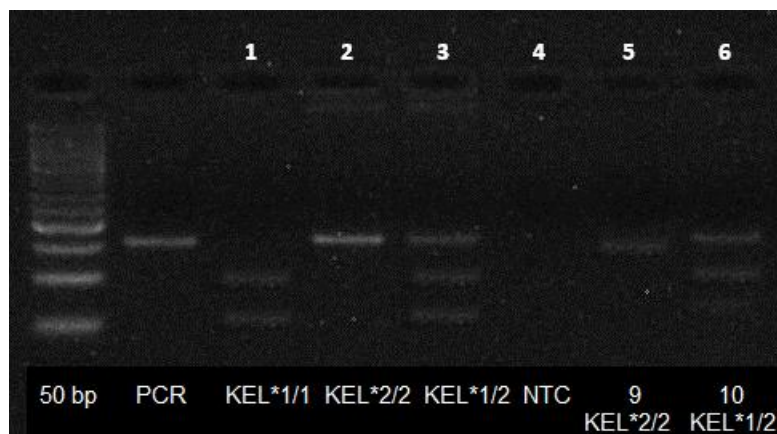
| Genotype and allele | Predicted phenotypes <sup>1</sup> | N  | (%)   |
|---------------------|-----------------------------------|----|-------|
| <b>Rh</b>           |                                   |    |       |
| <i>RHD*01</i>       | RhD+                              | 14 | 87.5  |
|                     | RhD-                              | 2  | 12.5  |
| <i>RHCE*C/C</i>     | C+c-                              | 7  | 43.75 |
| <i>RHCE*c/c</i>     | C-c+                              | 4  | 25    |
| <i>RHCE*C/c</i>     | C+c+                              | 5  | 31.25 |
| <i>RHCE*E/E</i>     | E+e-                              | 0  | 0     |
| <i>RHCE*e/e</i>     | E-e+                              | 13 | 81.25 |
| <i>RHCE*E/e</i>     | E+e+                              | 3  | 18.75 |



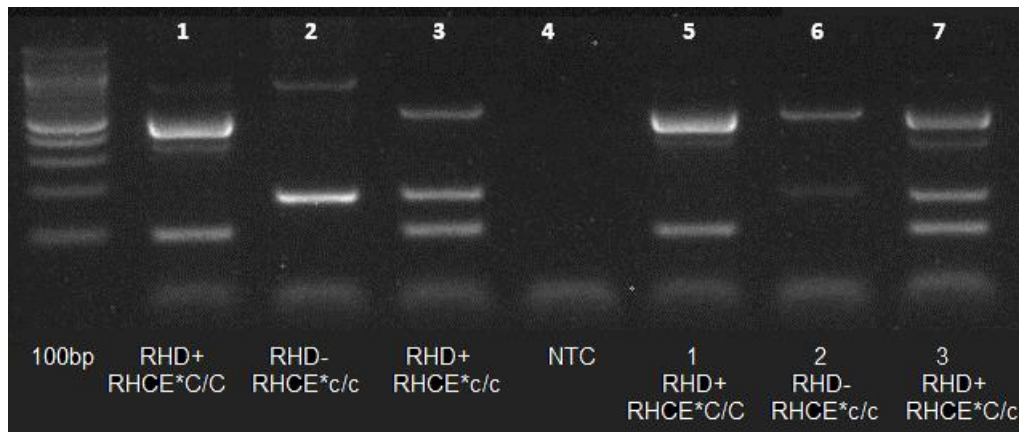
**Kell**

|                                |         |    |       |
|--------------------------------|---------|----|-------|
| <i>KEL</i> *01/ <i>KEL</i> *01 | K + k - | 0  | 0     |
| <i>KEL</i> *01/ <i>KEL</i> *02 | K + k + | 1  | 6.25  |
| <i>KEL</i> *02/ <i>KEL</i> *02 | K - k + | 15 | 93.75 |

<sup>1</sup>Phenotypes predicted from genotype.



**Figure 1.** PCR-RFLP for *KEL*. Columns 1, 2 and 3 are positive controls and column 4 corresponds to a negative control. Column 5 represents a sample homozygous *KEL*\*2/2. Sample in column 6 is heterozygous *KEL*\*1/2.



**Figure 2.** Multiplex PCR for *RHD*, *RHD* pseudogene and *RHCE*\**C* and *RHCE*\**c*. Columns 1, 2 and 3 are positive controls and column 4 corresponds to the negative control. Sample in column 5 is *RHD* positive, homozygous *RHCE*\**C*/*C*, column 6 is negative for *RHD*, homozygous *RHCE*\**c*/*c* and column 7 is also *RHD* positive, but heterozygous *RHCE*\**C*/*c*.

Serological phenotyping was executed in 13 patients. Two patients deceased before serologic test could be completed, and one lost contact. Discrepancies between phenotype and genotype were found in 7 antigens from 6 patients (Table 3.). In 4 cases (D antigen in sample 2, E antigen in sample 4 and 9 and K antigen in sample 13) the serological method tested positive, but there was a negative test by molecular biology. Serology in sample 2 and 13 was a weak positive reaction, that could be used as a trigger to pursue molecular testing. In 1 case, the molecular test was positive, and the serological method was inconclusive (K antigen in sample 10). For 2 antigens, the test

was negative for PCR, and inconclusive by the serological method (c antigen in sample 11 and E antigen in sample 13).

**Table 3.** Discrepancies found in genotype and phenotype from MDS patients.

| Sample | Recent transfusion* | Method    | D | C | c  | E  | e | K  |
|--------|---------------------|-----------|---|---|----|----|---|----|
| 2      | No                  | Serology  | 1 | 0 | 1  | 1  | 1 | 0  |
|        |                     | Molecular | 0 | 0 | 1  | 1  | 1 | 0  |
| 4      | Yes                 | Serology  | 1 | 0 | 1  | 1  | 1 | 0  |
|        |                     | Molecular | 1 | 0 | 1  | 0  | 1 | 0  |
| 9      | Yes                 | Serology  | 1 | 0 | 1  | 1  | 1 | 0  |
|        |                     | Molecular | 1 | 0 | 1  | 0  | 1 | 0  |
| 10     | Yes                 | Serology  | 1 | 1 | 0  | 0  | 1 | DP |
|        |                     | Molecular | 1 | 1 | 0  | 0  | 1 | 1  |
| 11     | Yes                 | Serology  | 1 | 1 | DP | 0  | 1 | 0  |
|        |                     | Molecular | 1 | 1 | 0  | 0  | 1 | 0  |
| 13     | Yes                 | Serology  | 1 | 1 | 1  | DP | 1 | 1  |
|        |                     | Molecular | 1 | 1 | 1  | 0  | 1 | 0  |

1 = positive; 0 = negative; DP = inconclusive due to dimorphic cells.

\* As recent transfusion, a time less than 3 months prior to sample collection was considered.

In our population, the frequency of genotypes for the Rh system were higher for *RHD\*01* ( $p = 0.034$ ) and *RHCE\*C/C* ( $p = 0.046$ ) than the reference population, from southwest Parana (Table 4).

**Table 4.** Comparison between allele and genotype frequencies from MDS patients from Hospital de Clínicas de Porto Alegre and blood donors from Southwest Paraná, Brazil

| Genotype and Allele        | Southwest Parana donors (Zacarias et al 2016) |       | MDS patients |       | P-value*     |
|----------------------------|---|-------|--------------|-------|--------------|
|                            | N   | %     | n            | %     |              |
| <b>Rh</b>                  |   |       |              |       |              |
| <i>RHD*01</i>              | 159   | 63,35 | 14           | 87,5  | <b>0,034</b> |
| <b>RHD negative</b>        | 92  | 36,65 | 2            | 12,5  | <b>0,034</b> |
| <i>RHCE*C/C</i>            | 52  | 20,72 | 7            | 43,75 | <b>0,046</b> |
| <i>RHCE*c/c</i>            | 121   | 48,21 | 4            | 25    | 0,064        |
| <i>RHCE*C/c</i>            | 78  | 31,07 | 5            | 31,25 | 0,988        |
| <i>RHCE*E/E</i>            | 6   | 2,39  | 0            | 0     | 0,386        |
| <i>RHCE*e/e</i>            | 200   | 79,68 | 13           | 81,25 | 0,879        |
| <i>RHCE*E/e</i>            | 45  | 17,93 | 3            | 18,75 | 0,934        |
| <b>Kell</b>                |   |       |              |       |              |
| <i>KEL*01.01/KEL*01.01</i> | 2   | 0,8   | 0            | 0     | 0,618        |
| <i>KEL*01.01/KEL*02</i>    | 18  | 7,17  | 1            | 6,25  | 0,887        |
| <i>KEL*02/KEL*02</i>       | 231   | 92,03 | 15           | 93,75 | 0,798        |

\* Statistic was calculated using the maximum likelihood ratio chi-square test. Variables with a P-value < 0.05 were considered significantly different and are highlighted.

#### 4. Discussion

Discrepancies between serologic phenotyping and presumed phenotype from genotyping are discussed in the literature by specialists, and were found in polytransfused patients by other authors like Belsito et al [14], Zhan et al [16] and Kulkarni et al [17]. In our study, 7 tests had different results in serology and molecular tests. In 3 samples, serology tests were inconclusive due to interference of donors' erythrocytes from recent transfusions and genotyping enabled the determination of the actual antigen profile helping reduce alloimmunization and allowing a better care in transfusion medicine with a faster and safer attendance. In other 4 samples, serology test was positive and molecular test, negative for: D, c, E and K. For RhD, there was a weak reaction in serology, and molecular biology was negative for the regions between introns 3 and 4 and for exon 7 from *RHD*. This sample is probably a D variant and a specific screening for *RHD* polymorphisms should be performed to determine the variant present. The other samples were collected from recently transfused patients. Whenever there is history of recent transfusion or an unexpected reaction in phenotype, such as dimorphic cells or weak reactions, another methodology should be used to determine the results. If the discrepancy is not solved, transfusion of a negative RBC unit for the inconclusive antigen should be studied. In weak reactions regarding RhD, negative units should be transfused if the variant is unknown, as some of them are susceptible to alloimmunization. Wrong interpretation of results could lead to inappropriate choice of PRBCs and incompatible transfusion. Antibodies like anti-D, anti-E, anti-c and anti-K are commonly involved in HTR [18].

Such discrepancies were expected, since patients had recent transfusions and this affect serology testing. Another possible explanation is that the polymorphisms tested in PCR methods were negative, but another may be present and is responsible for antigen expression. This is a limitation of molecular methods, since mutation can alter primers binding site or amplified regions and result in false negative results. To clarify this question, patients' transfusion history must be analyzed and extend the range of polymorphisms tested or perform a DNA sequencing could be considered.

Genotype frequency for blood groups varies according to population, since most of them are ethnic dependent. The State of Rio Grande do Sul has a history of European immigration, like others States from South Brazil. Nevertheless, results in our population seems to be different. Comparing with the reference population, there was a difference for *RH\*C/C* and *RH\*D* frequencies [13]. In a study from Italy, city of Naples, the frequencies for donors and patients were also different from ours, they found 32% for *RHCE\*C/C* in patients and 31% in blood donors [14].

Different antigen profiles between patients and blood donors may be a problem in choosing compatible PRBCs and preventing alloimmunization. In the State of Santa Catarina, the frequency of *RHCE\*C/C* in blood donors was 16,1% and they found a higher frequency, 29%, for hematological patients [15]. Similar increase was found in this study for MDS patients and blood donors from the reference population. Differences found can be a consequence of specific miscegenation factors from

patients' regions of origin or related to MDS. More studies, with a larger population, are needed to answer this question.

## 5. Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

## 6. Acknowledgments

The authors wish to thank Hospital Albert Einstein Hemotherapy and Cellular Department for performing molecular testing. This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) from Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## 7. References

- [1] Ministério da Saúde. Guia para o uso de hemocomponentes. 2010.
- [2] O'Suoji C, Liem RI, Mack AK, Kingsberry P, Ramsey G, A. TA, et al. Alloimmunization in Sickle Cell Anemia in the Era of Extended Red Cell Typing. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:487–1491. <https://doi.org/10.1002/xbc.24530>.
- [3] Abdelrazik AM, Elshafie SM, Niazi M, Said E, Ahmed GME, Al-gamil AA, et al. Study of red blood cell alloimmunization risk factors in multiply transfused thalassemia patients: role in improving thalassemia transfusion practice in Fayoum, Egypt. *Transfusion* 2016;56:2303–7. <https://doi.org/10.1111/trf.13695>.
- [4] Rujirojindakul P, Flegel WA. Applying molecular immunohaematology to regularly transfused Thalassaemic patients in Thailand. *Blood Transfus* 2014;12:28–35. <https://doi.org/10.2450/2013.0058-13>.
- [5] DeZern AE, Binder G, Rizvi S, Corvino FA, Arikian SR, Surinach A, et al. Patterns of treatment and costs associated with transfusion burden in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2017;58:2649–56. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1312372>.
- [6] Paccapelo C, Truglio F, Villa MA, Revelli N, Marconi M. HEA BeadChip™ technology in immunohematology 2015.
- [7] Guelsin GAS, Rodrigues C, Visentainer JEL, De Melo Campos P, Traina F, Gilli SCO, et al. Molecular matching for Rh and K reduces red blood cell alloimmunisation in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood Transfus* 2015;13:53–8. <https://doi.org/10.2450/2014.0332-13>.
- [8] Reid ME, Denomme GA. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfus Apher Sci* 2011;44:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.12.011>.
- [9] Denomme GA, Johnson ST, Pietz BC. Mass-scale red cell genotyping of blood donors. *Transfus Apher Sci* 2011;44:93–9. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.12.012>.
- [10] Osman NH, Sathar J, Leong CF, Zulkifli NF, Raja Sabudin RZA, Othman A, et

- al. Importance of extended blood group genotyping in multiply transfused patients. *Transfus Apher Sci* 2017;56. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.03.009>.
- [11] Keller MA. The role of red cell genotyping in transfusion medicine. *Immunohematology* 2015;31:49–52.
- [12] Bugert P. *Molecular Typing of Blood Cell Antigens*. vol. 1310. 1st Ed. New York, NY: Springer New York; 2015. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2690-9>.
- [13] Zacarias JMV, Langer IBV, Visentainer JEL, Sell AM. Profile of Rh, Kell, Duffy, Kidd, and Diego blood group systems among blood donors in the Southwest region of the Paraná state, Southern Brazil. *Transfus Apher Sci* 2016;55:302–7. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.08.001>.
- [14] Belsito A, Costa D, Fiorito C, De Iorio G, Casamassimi A, Perrotta S, et al. Erythrocyte genotyping for transfusion-dependent patients at the Azienda Universitaria Policlinico of Naples. *Transfus Apher Sci* 2015;52:72–7. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.12.006>.
- [15] Costa DC da. *Investigação do polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no Estado de Santa Catarina Florianópolis / SC*. 2016.
- [16] Ye Z, Zhang D, Boral L, Liz C, May J. Comparison of Blood Group Molecular Genotyping to Traditional Serological Phenotyping in Patients with Chronic or Recent Blood Transfusion. *J Biosci Med* 2016;04:1–8. <https://doi.org/10.4236/jbm.2016.43001>.
- [17] Kulkarni S, Choudhary B, Gogri H, Patil S, Manglani M, Sharma R, et al. Molecular genotyping of clinically important blood group antigens in patients with thalassaemia. *Indian J Med Res* 2018;148:713–20. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_455\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_455_17).
- [18] Moncharmont P, Quittançon E, Barday G, Benamara A. Adverse transfusion reactions in patients with aplastic anaemia or myelodysplastic syndromes. *Vox Sang* 2019;114:349–54. <https://doi.org/10.1111/vox.12765>.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo foi possível prever o fenótipo através do genótipo, colaborando com a qualidade das transfusões. Em três casos, as amostras não estavam mais disponíveis para testes sorológicos e o único resultado disponível foi o da genotipagem. Conhecendo-se o fenótipo previamente às transfusões, é possível realizar o atendimento transfusional com mais segurança agilidade e manter um estoque de unidades fenótipo compatíveis disponível para quando houver necessidade.

Em três casos, foram encontrados resultados inconclusivos nos testes sorológicos causados por transfusões recentes. Nestes casos, houve interferência dos antígenos do doador, e não foi possível identificar o resultado, pois havia mais de uma população de hemácias na amostra. A biologia molecular proporcionou a identificação do fenótipo dos pacientes e a seleção de concentrados de hemácias compatíveis.

Resultados contraditórios entre testes sorológicos e moleculares ocorreram em três casos, todos apresentando sorologia positiva e genotipagem negativa. Nestes casos, a identificação incorreta do fenótipo poderia possibilitar a seleção de CH positivas para este antígeno e transfusão de unidades incompatíveis. Essa incompatibilidade pode causar a aloimunização do paciente e as complicações decorrentes disto: risco de RHT, maior dificuldade de encontrar hemácias compatíveis, risco de DHPN. As discrepâncias podem ter ocorrido devido a transfusões recentes ou presença de mutações não detectadas pelos *primers* utilizados. Avaliando o histórico transfusional destes pacientes, em dois casos os pacientes haviam recebido transfusão de concentrados de hemácias há menos de três meses, provavelmente houve a interferência das hemácias das unidades de CH transfundidas. Em um caso foi detectada a presença do antígeno D na sorologia, porém em fraca intensidade, e não foi detectada na biologia molecular. Provavelmente esta amostra possui uma variante de *RHD*, não detectada pelos polimorfismos testados, o que constitui uma limitação da técnica de genotipagem. Mutações gênicas ou estruturais que modificam ou removem a região amplificada ou de ligação com os *primers* podem causar resultados falso negativos. Testes mais específicos para outros polimorfismos desse gene são necessárias para a determinação desta variante.

Foram encontradas frequências diferentes na população dos nossos pacientes em comparação com outras populações brasileiras como o Paraná. Sabe-se que os grupos sanguíneos são resultados de herança genética e, portanto, relacionados com grupos étnicos, por isso as suas frequências variam entre as populações. As suas frequências na população do Rio Grande do Sul ainda não estão bem estabelecidas. O estado do Rio Grande do Sul recebeu imigrantes europeus, principalmente alemães, italianos e alguns açorianos, que vieram a se juntar aos povos e descendentes já existentes, constituído por índios, portugueses e africanos.

Paraná também possui uma população predominantemente europeia com pequena influência africana e indígena, sendo similar a população do Rio Grande do Sul. Apesar disso, foram encontradas diferenças nas frequências dos fenótipos para os antígenos D e C/c. Essas diferenças podem ser específicas da miscigenação da região de procedência dos nossos pacientes ou relacionadas à síndrome mielodisplásica. Novos estudos devem ser realizados para determinar essa causa.

## **9. PERSPECTIVAS FUTURAS**

A partir dos resultados encontrados, espera-se reproduzir estes testes no Laboratório de Imunologia, aumentar a amostragem, estender os testes para os demais sistemas de importância clínica e ampliar a sua indicação para outras patologias que dependem de transfusão crônica. Após a validação da genotipagem eritrocitária no HCPA, será possível implantar essa rotina e incluí-la no fluxo protocolo de prevenção de aloimunização.



## **10. ANEXOS**

### **10.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Nº do projeto CAAE: 89049418.5.0000.5327**

**Título do Projeto: Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos de fenotipagem eritrocitária em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é determinar a tipagem do seu sangue, além do ABO e Rh através de testes no material genético (DNA) para uma melhor escolha de bolsa de sangue para a transfusão. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Hemoterapia e de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: teste genético (no DNA), utilizando amostras já coletadas pelo banco de sangue na rotina de transfusão, análise de dados do seu cadastro em prontuário.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são os mesmos da coleta de sangue para os testes de compatibilidade de bolsas de sangue, já realizado pelo Banco de Sangue: dor ou hematomas no local da punção (mancha roxa no local de coleta da amostra).

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são a correta identificação do seu tipo sanguíneo, indisponível ou dificultado nos testes de rotina e uma melhor escolha das bolsas de sangue que serão transfundidas durante o seu tratamento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá ser ressarcido por despesas decorrentes de sua participação, como despesas com transporte, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Prof. Dr. Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber, pelo telefone 3359.8152, com o pesquisador Bruna Blos, pelo telefone 3359.7652 ou 99221.9839 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 3359.7640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

---

Assinatura

---

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

## 10.2 Normas para publicação de artigos na revista *Transfusion and Apheresis Science*

**Length Article** are full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form. An Original paper usually does not exceed 3,000 words, longer papers may be considered if relevant, limit of 50 references and no limit for figures and/or tables.

### **Article structure**

#### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

This should give the reasons for doing the work. The Introduction should preferably conclude with a final paragraph stating concisely and clearly the Aims and Objectives of the investigation.

#### ***Material and methods***

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

A full technical description of a method should be given in detail only when the method is new.

#### ***Results***

Results should be clear and concise.

This need only report results of representative experiments illustrated by Tables and Figures. Use well-known statistical tests in preference to obscure ones. Consult a statistician or a statistics text for detailed advice.

## *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

This section must not recapitulate results but should relate the authors' experiments to other work and give their conclusions, which may be given in a subsection headed Conclusions.

## **Essential title page information**

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## **Highlights**

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 250 words.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### ***Units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### ***Math formulae***

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

1. Formulae should be typewritten, if possible. Leave ample space around the formulae.
2. Subscripts and superscripts should be clear.
3. Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.
4. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
5. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
6. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
7. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.
8. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are \* P <0.05, \*\* P <0.01 and \*\*\* P <0.001.
9. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>.
10. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., <sup>18</sup>O.

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used.

Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Footnotes should only be used to provide addresses of authors or to provide explanations essential to the understanding of Tables.

## **Artwork**

### ***Electronic artwork***

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts..

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

***Illustration services***

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.



1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Drawn tables, from which blocks need to be made, should not be folded.
4. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
5. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
6. Tables and their footnotes should be typed using a readable uniform font of the same size as that used in the text. Each text should have a brief and self-explanatory title.
7. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
8. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
9. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.
10. Zero results must be represented by 0 and no determination by ND; the dash sign (-) is ambiguous. Report data in such a way that readers can assess the degree of experimental variation and estimate the variability or precision of the findings. Use the standard deviation SD and the mean to summarise data and to show the variability among individuals. Use the standard error of the mean SEM to show the precision of the sample mean. Always state the number of measurements on which means are based. In tables and figures use asterisks to indicate probability values (P). In footnotes or text show the degree of significance of P, e.g.  $P < 0.05^*$ .

## **References**

### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been

accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

### ***Reference links***

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### ***References in a special issue***

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### ***Reference management software***

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/transfusion-and-apheresis-science>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### ***Reference style***

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

### ***Journal abbreviations source***

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#)

## 11. STROBE

| <b>Ítem</b>            | <b>No</b> | <b>Descrição</b>   | <b>Pág.</b> |
|------------------------|-----------|--|-------------|
| Título e Resumo        | 1         | Indique o desenho do estudo no título ou no resumo, com termo comumente utilizado  | Capa        |
|                        |           | Disponibilize no resumo um sumário informativo e equilibrado do que foi feito e do que foi encontrado  | 7-8         |
| Introdução             | 2         | Detalhe o referencial teórico e as razões para executar a pesquisa.  | 14-15       |
| Contexto/Justificativa | 3         |  | 17-30, 32   |
| Objetivos              |           | Descreva os objetivos específicos, incluindo quaisquer hipóteses pré-existentes  | 33          |
| Métodos                |           |  | 38-39       |
| Desenho do estudo      | 4         | Apresente, no início do artigo, os elementos-chave relativos ao desenho do estudo.   | 38          |
| Contexto (setting)     | 5         | Descreva o contexto, locais e datas relevantes, incluindo os períodos de recrutamento, exposição, acompanhamento (follow-up) e coleta de dados   | 38          |
| Participantes          | 6         | Estudos de Caso-Controle: Apresente os critério-diagnóstico para identificação dos casos e os métodos de seleção dos critérios de elegibilidade, as fontes e os controles. Descreva a justificativa para a eleição dos casos e controles | 38          |
| Variáveis              | 7         | Defina claramente todos os desfechos, exposições, preditores, confundidores em potencial e modificadores de efeito. Quando necessário, apresente os critérios diagnósticos.  | 38-39       |

|                                |    |  |       |
|--------------------------------|----|--|-------|
| Fontes de dados/<br>Mensuração | 8  | Para cada variável de interesse, forneça a fonte dos dados e os detalhes dos métodos utilizados na avaliação (mensuração). Quando existir mais de um grupo, descreva a comparabilidade dos métodos de avaliação.   | 38-39 |
| Viés                           | 9  | Especifique todas as medidas adotadas para evitar potenciais fontes de viés.   | 38    |
| Tamanho do estudo              | 10 | Explique como se determinou o tamanho amostral.  | NA    |
| Variáveis quantitativas        | 11 | Explique como foram tratadas as variáveis quantitativas na análise. Se aplicável, descreva as categorizações que foram adotadas e por que.   | NA    |
| Métodos estatísticos           | 12 | Descreva todos os métodos estatísticos, incluindo aqueles usados para controle de confundimento. Descreva todos os métodos utilizados para examinar subgrupos e interações. Explique como foram tratados os dados faltantes (“missing data”). Estudos de Caso-Controlle: Se aplicável, explique como o pareamento dos casos e controles foi tratado. | 39    |