



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Danielle Siegel

**Triagem molecular para o sistema Vel utilizando DNA obtido de *pools* de plasma de doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina.**

Florianópolis  
2024

Danielle Siegel

**Triagem molecular para o sistema Vel utilizando DNA obtido de *pools* de plasma de doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmácia  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Maria Luiza Bazzo, Dr<sup>a</sup>.  
Coorientador: Everaldo José Schörner, Me.

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.  
Dados inseridos pelo próprio autor.

Siegel, Danielle

Triagem molecular para o sistema Vel utilizando DNA obtido de pools de plasma de doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina / Danielle Siegel ; orientadora, Maria Luiza Bazzo, coorientador, Everaldo José Schörner, 2024.

69 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Sistema Vel. 3. Sangue Raro. 4. Doadores de sangue. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Schörner, Everaldo José. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Danielle Siegel

**Triagem molecular para o sistema Vel utilizando DNA obtido de *pools* de plasma de doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado, em 28/02/2024, por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Professora Jussara Kasuko Palmeiro, Dr<sup>a</sup>  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Márcia Regina Dezan, Dr<sup>a</sup>  
Membro externo ao Programa de Pós-graduação em Farmácia

Professora Maria Luiza Bazzo, Dr<sup>a</sup>  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

---

Professora Thaís Cristine Marques Sincero, Dr<sup>a</sup>  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

---

Professora Maria Luiza Bazzo, Dr<sup>a</sup>  
Orientadora

Florianópolis, 2024

Este trabalho é dedicado aos doadores e receptores de sangue.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho de mestrado teve importantes apoios e incentivos. Gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização dessa pesquisa. Por isso, expresso aqui, através de palavras, um pouco da importância que elas possuem nessa conquista e a minha gratidão a todas elas.

À Professora Doutora Maria Luiza Bazzo e ao Mestre Everaldo José Schörner, por suas orientações pautadas por elevado nível científico, apoio, disponibilidade, pela transmissão de conhecimento, pelas opiniões e críticas, resolução no solucionar de dúvidas e problemas que surgiram ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo, que contribuíram para enriquecer todas as etapas subjacentes ao trabalho realizado.

Aos pertencentes do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LBMMS - UFSC), Fernando H. Barazzetti, Mestre Hanalydia M. Machado, Henrique B.S. Grisard, Christinni Machado Ventura, Jhonatan Augusto Ribeiro entre outros que não menciono o nome mas que sabem quem são, pelo auxílio no processamento das amostras e demais contribuições ao trabalho, reconheço principalmente ao Doutor Marcos André Schörner, que considero como um terceiro orientador deste trabalho, fundamental para a realização.

À Fundação de apoio ao HEMOSC/CEPON e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Extensão Universitária pelo financiamento do projeto.

Aos membros do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), especialmente à Diretora Geral Mestre Patrícia Carsten e a Gestora do setor de Imuno-hematologia Paula Roberta de Cezaro de Souza pelo suporte, aprovação e reconhecimento do trabalho desenvolvido; à Mestre Adriana Brejinski de Almeida pelo apoio, auxílio e companheirismo durante os plantões realizados; à Luana Sandrini Saft Pereira pela agilidade na extração dos dados do sistema e aos pertencentes aos setores de Sorologia, Imuno-hematologia, Imunogenética, Captação de doadores pela colaboração e disponibilidade para o desenvolvimento do projeto.

Aos Farmacêuticos, Nathalia Lugnani e Gustavo Catarina de Jesus que auxiliaram na separação e no processamento inicial das amostras.

Aos doadores das amostras de referência, pela disponibilidade para coleta e compreensão da importância do projeto.

À Caroline Prochaska, do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), pelo auxílio na coleta das amostras de referência e encaminhamento ao HEMOSC.

À Doutora Marcia Dezan, sempre disponível para auxiliar nas dúvidas decorrente a metodologia aplicada, sua contribuição foi essencial.

À Mestre Bruna Cunha Mendes, pela amizade, disponibilidade e auxílio na seleção da revista para submissão do artigo e dos dados estatísticos.

Ao Professor Doutor Emil Kupek e a Professora Doutora Ana Carolina Rabello de Moraes, docentes na Universidade Federal de Santa Catarina, pela clareza e total disponibilidade na colaboração do tratamento estatístico dos resultados e solucionar dúvidas.

Dirijo um agradecimento especial aos meus pais, Cléia Maria de Souza Siegel e Vicente Júlio Siegel, e ao meu marido, Alessandro Miguel Domingos, pelo amor, companheirismo e apoio, agradeço a compreensão, generosidade e alegria com que me brindaram, contribuindo para chegar ao fim deste percurso. E claro, ao meu filho, Eric Siegel Domingos, que amo incondicionalmente e que veio dar um novo colorido à minha vida, espero doravante compensá-lo das horas de atenção e brincadeira que lhe devo.

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

“Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Tudo isso é posto em sua mão como sua herança para que você a receba, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos” (Einstein)

## RESUMO

O sistema sanguíneo Vel possui relevante importância clínica e seu aloanticorpo está envolvido em reações transfusionais hemolíticas. Esse antígeno possui alta frequência populacional. O fenótipo Vel negativo é resultado da deleção homocigótica de 17 pares de base na região codificadora do gene *SMIM1* (c.64\_80del) e impede a expressão da proteína SMIM1. Os métodos sorológicos para determinar o fenótipo Vel negativo requerem o uso de soros raros e podem apresentar resultados falso-negativos. O objetivo desse estudo foi rastrear doadores de sangue Vel negativos do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) e determinar a frequência do fenótipo Vel negativo, deduzido do genótipo. Neste estudo, foi aplicada uma estratégia de triagem molecular de baixo custo, por meio da metodologia PCR em tempo real e utilização do DNA extraído de *pools* de plasma provenientes da rotina do NAT - Teste de Ácido Nucléico - que seriam descartados. Posteriormente os homocigotos para o alelo *SMIM1*\*64\_80del foram identificados pela metodologia PCR convencional seguida de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) em paralelo com amostras de referência. A triagem molecular foi realizada em 17.472 amostras de doadores de sangue utilizando os protocolos previamente padronizados. Dessas, 309 amostras apresentaram a deleção pesquisada e foram testadas por PCR-RFLP para determinar a zigocidade e cinco foram identificadas como Vel negativas (0,03%). Considerando a tipagem sanguínea B do soro utilizado, após a realização da PCR em tempo real, 146 amostras de doadores também foram submetidas à triagem sorológica utilizando um soro com a presença de anti-Vel do inventário do hemocentro. Diferentes padrões de reatividade foram observados nos testes sorológicos variando de negativo a 2+ e com frequência de 98,63%. A frequência encontrada do alelo *SMIM1*\*64\_80del foi de 0,90%, sendo que o local de doação de Blumenau possui a maior frequência (1,14%) e Lages a maior probabilidade (7,53%) entre as regiões estudadas. Há uma relação entre a autodeclaração étnico-racial branca com a frequência da deleção. Foi realizado estudo familiar dos doadores Vel negativos e dois indivíduos foram identificados com a presença em homocigose da deleção estudada. Ambos os métodos de genotipagem, TaqMan-PCR e PCR-RFLP, representam métodos confiáveis e complementares para a detecção do alelo *SMIM1*\*64-80del. A triagem molecular de doadores de sangue para o tipo sanguíneo Vel é eficiente e evita as limitações da tipagem sorológica que pode apresentar resultados falso-negativos. Os dados obtidos neste estudo foram registrados no Cadastro Nacional de Sangue Raro do Ministério da Saúde e irão contribuir significativamente para o suprimento sanguíneo adequado e seguro de receptores aloimunizados com anti-Vel.

**Palavras-chave:** Sangue raro, Vel, doadores de sangue.

## ABSTRACT

The Vel blood system has relevant clinical importance and its alloantibody is involved in hemolytic transfusion reactions. This antigen has a high population frequency. The Vel negative phenotype is the result of a homozygous deletion of 17 base pairs in the coding region of the *SMIM1* gene (c.64\_80del) and prevents the expression of the SMIM1 protein. Serological methods to determine the Vel-negative phenotype require the use of rare serum and may yield false-negative results. The objective of this study was to screen Vel-negative blood and platelet donors from the Santa Catarina Hematology and Hemotherapy Center (HEMOSC) and determine the frequency of the Vel-negative phenotype, deduced from the genotype. In this study, a low-cost molecular screening strategy was applied, using real-time PCR methodology and using DNA extracted from pools of plasma from NAT Nucleic Acid Test) routine - which would otherwise be discarded. Subsequently, homozygotes for the *SMIM1*\*64\_80del allele were identified by conventional PCR methodology followed restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in parallel with reference samples. Molecular screening was performed on 17,472 blood donor samples using previously standardized protocols. Of these, 309 samples presented the investigated deletion and were tested by PCR-RFLP to determine zygosity and five were concluded as Vel negative (0,03%). Considering the B blood type of the serum used, after performing real-time PCR, 146 donor samples were also subjected to serological screening using a serum with the presence of anti-Vel from the blood center's inventory. Different reactivity patterns were observed in serological tests ranging from negative to 2+ and with a frequency of 98,63%. The frequency found for the *SMIM1*\*64\_80del allele was 0.90%, with the Blumenau donation site having the highest frequency (1.14%) and Lages presents the highest probability (7.53%) among the regions studied. There is a relationship between white ethnic-racial self-declaration and the frequency of the deletion. A family study of Vel-negative donors was carried out and two individuals were identified with the homozygous presence of the studied deletion. Both genotyping methods, TaqMan-PCR and PCR-RFLP, represent reliable and complementary methods for the detection of the *SMIM1*\*64-80del allele. Molecular screening of blood donors for Vel blood type is efficient and avoids the limitations of serological typing that can present false-negative results. The data obtained in this study were registered in the National Rare Blood Registry of the Ministry of Health and will significantly contribute to the adequate and safe blood supply of recipient's alloimmunized with anti-Vel.

**Keywords:** Rare blood, Vel, blood donors.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1 - DESENHO ILUSTRATIVO DE UMA HEMÁCIA COM ANTÍGENOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS REPRESENTATIVOS.....   | 22 |
| FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO DAS ESTRUTURAS ONDE ESTÃO LOCALIZADOS OS GRUPOS SANGUÍNEOS E AS FUNÇÕES ATRIBUÍDAS A ESTES. ....  | 23 |
| FIGURA 3. GENES CODIFICADORES DE ALGUNS ANTÍGENOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS POR LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA.....  | 26 |
| FIGURA 4 - PROTEÍNA SMIM1. ESTRUTURA EM 3D MOSTRANDO O DOMÍNIO EXTRACELULAR (EM VERDE), A HÉLICE TRANSMEMBRANAR (EM AMARELO) E O DOMÍNIO CITOSÓLICO (EM AZUL).....  | 28 |
| FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DOS QUATRO ÉXONS DO GENE <i>SMIM1</i> QUE CODIFICAM A PROTEÍNA SMIM1. DELEÇÃO c.64_80DEL17 INDICADA NO ÉXON 3 (EM VERMELHO) É RESPONSÁVEL PELO FENÓTIPO VEL NEGATIVO NA MEMBRANA DAS HEMÁCIAS. ....   | 29 |
| FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DEMONSTRANDO A METODOLOGIA APLICADA PARA A LOCALIZAÇÃO DE DOADORES VEL NEGATIVO.....  | 33 |
| FIGURA 7 – ILUSTRAÇÃO DO DESENHO DA SONDA UTILIZADA PARA TRIAR OS DOADORES COM A PRESENÇA DA DELEÇÃO c.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIM1</i> E ESQUEMA DE COMO OCORRE PARTE DA REAÇÃO, COM A FLUORESCÊNCIA ESPERADA. O DESTAQUE EM AZUL CORRESPONDE AO GENÓTIPO <i>VEL*01.01</i> E EM VERMELHO <i>VEL*01.01/01N.01</i> OU <i>VEL*01N.01/01N.01</i> . .... | 37 |
| FIGURA 8 - ILUSTRAÇÃO DO LOCAL DE CORTE DA ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>StyI</i> -HF EM AMOSTRA COM A PRESENÇA DA DELEÇÃO c.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIM1</i> EM HETEROZIGOSE, <i>VEL*01.01/01N.01</i> , FORMANDO UM PRODUTO COM 800 PB E 400 PB. EM <i>VEL*01N.01/01N.01</i> HÁ A DELEÇÃO DOS 17 NUCLEOTÍDEOS E NÃO HÁ O SÍTIO DE RESTRIÇÃO.....           | 39 |
| FIGURA 9 – SUBDIVISÃO DO MAPA DE SANTA CATARINA DE ACORDO COM A RESIDÊNCIA E O LOCAL ONDE OCORREU MAIS DOAÇÃO DE SANGUE NO PERÍODO (01/01/2024 A 31/12/2023). OS HEMOCENTROS E UNIDADES DE COLETAS ESTÃO DESTACADOS COM A SUA LOCALIZAÇÃO APROXIMADA. ....  | 40 |
| FIGURA 10 – GRÁFICOS DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL UTILIZADA PARA DETECTAR A DELEÇÃO c.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIM1</i> EM AMOSTRAS HETEROZIGOTAS E HOMOZIGOTAS. ...  | 42 |
| FIGURA 11 - GRÁFICOS DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL UTILIZADA PARA DETECTAR A DELEÇÃO c.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIM1</i> COM UTILIZAÇÃO DE AMOSTRA DILUÍDA.....  | 43 |
| FIGURA 12 - GRÁFICO DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL UTILIZADA PARA DETECTAR A DELEÇÃO c.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIM1</i> COM UTILIZAÇÃO DE DNA EM <i>POOL</i> DE PLASMA COM UMA AMOSTRA GENÓTIPO VEL NEGATIVO, UMA AMOSTRA COM GENÓTIPO VEL POSITIVO EM HETEROZIGOSE E CINCO AMOSTRAS COM GENÓTIPO VEL POSITIVO EM HOMOZIGOSE. ....             | 43 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 13 – ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR PARA DEFINIÇÃO DA ZIGOSIDADE DA DELEÇÃO C.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIMI</i> .....   | 44 |
| FIGURA 14 - PCR CONVENCIONAL TRATADA COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>StyI</i> -HF UTILIZADA PARA VERIFICAR A ZIGOSIDADE DA DELEÇÃO DE 17 NUCLEOTÍDEOS NO ÉXON 3 DO GENE <i>SMIMI</i> COM DIFERENTES TEMPOS DE DIGESTÃO. ....  | 45 |
| FIGURA 15 – COMPARATIVO ENTRE OS GRÁFICOS DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL UTILIZADA PARA DETECTAR A DELEÇÃO C.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIMI</i> EM HETEROZIGOSE E EM HOMOZIGOSE. ....   | 47 |
| FIGURA 16 - FENOTIPAGEM REPRESENTATIVA UTILIZANDO SORO ANTI-VEL HUMANO COM A SUSPENSÃO DE HEMÁCIA COM TIPAGEM B OU O EM TESTE EM GEL-CENTRIFUGAÇÃO. A AGLUTINAÇÃO FOI CATEGORIZADA EM INTENSIDADES DE REAÇÃO, VARIANDO DE NEGATIVA (0) A POSITIVA (2+) - PODENDO AINDA SER SUBCLASSIFICADA COMO FORTE (S) OU FRACA (W). .... | 49 |
| FIGURA 17 - MAPA À ESQUERDA APRESENTA A COR/RAÇA PREDOMINANTE NO BRASIL E À DIREITA A PROPORÇÃO DA POPULAÇÃO BRANCA RESIDENTE NO BRASIL. DADOS PROVENIENTES DO CENSO DE 2022.....  | 50 |
| FIGURA 18. MAPAS GEOGRÁFICO DO ESTADO DE SANTA CATARINA DEMONSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO ÉTNICO-RACIAL BRANCA SEGUNDO DADOS DO CENSO 2022 E A NATURALIDADE E A FREQUÊNCIA DA DELEÇÃO C.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIMI</i> EM HETEROZIGOSE E HOMOZIGOSE NOS DOADORES DE SANGUE, SEGUNDO O ESTUDO REALIZADO. ....     | 53 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| GRÁFICO 1 – RELAÇÃO (LINHA VERMELHA) ENTRE A FREQUÊNCIA ALÉLICA DA DELEÇÃO C.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIMI</i> E A PROBABILIDADE DE LOCALIZAR O VEL MUTADO, CONSIDERANDO OS HEMOCENTROS DE DOAÇÃO DE SANGUE DE SANTA CATARINA. ....  | 46 |
| GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA POPULAÇÃO RESIDENTE, POR COR OU RAÇA, NO BRASIL, NAS GRANDES REGIÕES E NO ESTADO DE SANTA CATARINA. ....  | 51 |
| GRÁFICO 3. GRÁFICO DE DISPERSÃO RELACIONANDO A PROPORÇÃO DE INDIVÍDUOS IDENTIFICADOS COMO PORTADORES DA DELEÇÃO C.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIMI</i> EM HETEROZIGOSE E HOMOZIGOSE E A IDENTIFICAÇÃO ÉTNICO-RACIAL BRANCA COM OS DADOS EXTRAÍDOS DO CENSO DE 2022 (IBGE, 2023). .... | 52 |
| GRÁFICO 4 – PROBABILIDADE DE LOCALIZAR A DELEÇÃO C.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIMI</i> CONSIDERANDO O ESTADO BRASILEIRO DE ESTUDO.....   | 54 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| QUADRO 1 – PROTOCOLO PARA PCR EM TEMPO REAL PARA PESQUISA DA DELEÇÃO C.64_80DEL17 E SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E DA SONDA UTILIZADOS..... | 36 |
| QUADRO 2– PROTOCOLO PARA PCR-RFLP PARA PESQUISA DA ZIGOSIDADE DA DELEÇÃO C.64_80DEL17.....   | 38 |
| QUADRO 3 - ESTUDO FAMILIAR DOS DOADORES IDENTIFICADOS COMO VEL NEGATIVOS. ....   | 56 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1 - DETERMINAÇÃO DO <i>CICLO DE QUANTIFICAÇÃO (CQ)</i> MÉDIO DA PCR EM TEMPO REAL UTILIZADA PARA DETECTAR A DELEÇÃO DE 17 NUCLEOTÍDEOS NO ÉXON 3 DO GENE <i>SMIMI</i> EM HOMOZIGOSE E EM HETEROZIGOSE.....  | 42 |
| TABELA 2 – DESCRIÇÃO, DE ACORDO COM O LOCAL DE DOAÇÃO DE SANGUE, DO NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS COM A ATRIBUIÇÃO DA ZIGOSIDADE PARA A DELEÇÃO c.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIMI</i> , DEFINIÇÃO DA FREQUÊNCIA E A PROBABILIDADE POR 100.000 HABITANTES. IDENTIFICAÇÃO POR ESCALA GRADUAL DE CORES.....   | 46 |
| TABELA 3. DADOS, POR HEMOCENTRO, DA POPULAÇÃO TOTAL E COM IDENTIFICAÇÃO ÉTNICO-RACIAL BRANCA DE SANTA CATARINA; RELACIONADO COM O NÚMERO DE ALELO MUTADO (DELEÇÃO c.64_80DEL17 NO GENE <i>SMIMI</i> EM HETEROZIGOSE E HOMOZIGOSE) E A FREQUÊNCIA ALÉLICA. IDENTIFICAÇÃO POR ESCALA GRADUAL DE CORES. DADOS DA POPULAÇÃO EXTRAÍDOS DO CENSO DE 2022 (IBGE, 2023). ..... | 54 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|          |  |
|----------|--|
| ADCC     | Citotoxicidade mediada por Célula dependente de Anticorpos   |
| CEPSH    | Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos   |
| CGSH/MS  | Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde   |
| CI       | Controle Interno   |
| CLT      | Teste de quimiluminescência  |
| CNSR     | Cadastro Nacional de Sangue Raro   |
| Cq       | Ciclo de quantificação   |
| DHFRN    | Doença hemolítica do feto e do recém-nascido   |
| FAM      | Fluoróforo <i>Carboxyfluorescein</i>   |
| HBV      | Vírus da hepatite B  |
| HCV      | Vírus da hepatite C  |
| HEMOSC   | Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina  |
| HIV      | Vírus da imunodeficiência humana   |
| IBGRL    | Laboratório Internacional de Referência de Grupos Sanguíneos   |
| IC       | Intervalo de confiança   |
| IRDP     | Painel Internacional de Doadores de Sangue Raro  |
| ISBT     | Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue  |
| LISS     | solução de baixa força iônica  |
| MMA      | Ensaio da monocamada de monócitos  |
| NAT      | Teste de Ácido Nucleico  |
| OMS      | Organização Mundial da Saúde   |
| PB       | Pares de bases   |
| PCR      | Reação em cadeia da polimerase   |
| PCR-RFLP | Reação em Cadeia da Polimerase seguida de Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição ( <i>Restriction fragment length polymorphism</i> ) |
| SC       | Santa Catarina   |
| SMIM1    | Pequena proteína integral de membrana 1  |
| SNPs     | Polimorfismos de nucleotídeo único   |
| TAD      | Teste de antiglobulina direto  |
| TCLE     | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido   |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>  | <b>21</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL .....  | 21        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 21        |
| <b>3</b> | <b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>  | <b>22</b> |
| 3.1      | GRUPOS SANGUÍNEOS E ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS.....                                 | 22        |
| 3.2      | ALOIMUNIZAÇÃO .....   | 24        |
| 3.3      | GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGUÍNEOS.....   | 26        |
| 3.4      | SANGUE RARO .....   | 27        |
| 3.5      | SISTEMA VEL .....   | 28        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA.....</b>   | <b>31</b> |
| 4.1      | AMOSTRAGEM E LOCAL DE ESTUDO .....  | 31        |
| 4.2      | ESTRATÉGIA DE BUSCA PARA IDENTIFICAÇÃO DE DOADORES COM GENÓTIPO VEL NEGATIVO..... | 32        |
| 4.2.1    | <i>Preparo do pool e extração do material genético .....</i>                      | <i>34</i> |
| 4.2.2    | <i>Validação das metodologias moleculares.....</i>                                | <i>35</i> |
| 4.2.3    | <i>Triagem molecular.....</i>   | <i>36</i> |
| 4.2.4    | <i>Triagem sorológica .....</i>   | <i>37</i> |
| 4.2.5    | <i>Classificação da zigozidade.....</i>   | <i>38</i> |
| 4.2.6    | <i>Estudo familiar .....</i>  | <i>39</i> |
| 4.3      | ANÁLISE DE DADOS .....  | 39        |
| 4.4      | ASPECTOS ÉTICOS .....   | 40        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>41</b> |
| 5.1      | VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS MOLECULARES.....                                       | 41        |
| 5.1.1    | <i>PCR em tempo real .....</i>  | <i>41</i> |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.1.2 | <i>PCR seguida de análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição</i> .....            | 44 |
| 5.2   | ANÁLISE DOS RESULTADOS MOLECULARES.....  | 45 |
| 5.3   | TRIAGEM SOROLÓGICA PARA O ANTÍGENO VEL.....  | 49 |
| 5.4   | ASSOCIAÇÃO COM A NATURALIDADE.....   | 50 |
| 5.5   | APLICABILIDADE DO RESULTADO.....   | 55 |
| 5.6   | ESTUDO FAMILIAR .....  | 55 |
| 5.7   | ANÁLISE SOCIAL E DE CUSTO .....  | 56 |
| 6     | <b>PERSPECTIVAS</b> .....  | 57 |
| 7     | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | 58 |
| 8     | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 59 |
|       | <b>APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido amostra de referência</b> ..... | 63 |
|       | <b>APÊNDICE B – Termo de compromisso para uso de dados</b> .....                           | 65 |
|       | <b>APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido estudo familiar</b> .....       | 67 |
|       | <b>APÊNDICE D – Informativo Sangue Raro</b> .....  | 69 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os antígenos eritrocitários têm um papel importante na medicina transfusional, na incompatibilidade materno-fetal, nos casos de indivíduos portadores de hemopatias e entre outras situações. Desde a descoberta do grupo sanguíneo ABO, 392 antígenos eritrocitários foram classificados em sistemas de grupos sanguíneos – 359 antígenos em 45 sistemas de grupos sanguíneos e 23 antígenos em coleções e séries (ISBT, 2023). A base molecular para a maioria desses antígenos foi estabelecida e pode auxiliar na seleção de hemocomponentes para transfusão (Fasano; Chou, 2016; Costa, 2016).

A transfusão de hemocomponentes é fundamental para a assistência de receptores em situações clínicas e cirúrgicas, assim como outras intervenções terapêuticas, porém não é isenta de riscos. O desenvolvimento de anticorpos antieritrocitários é uma das significativas complicações associadas à terapia transfusional. A aloimunização eritrocitária pode resultar na diminuição da sobrevivência de hemácias por meio de reações transfusionais hemolíticas agudas e tardias, bem como na doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN), o que pode levar ao comprometimento da condição clínica e até mesmo da vida do receptor (Ministério da Saúde, 2022).

A seleção do concentrado de hemácias torna-se mais difícil quando o receptor apresenta anticorpos contra antígenos de alta frequência populacional ou, ainda, a combinação de múltiplos anticorpos de diferentes especificidades. O atendimento à demanda transfusional desses receptores é de grande desafio para os serviços de hemoterapia, visto que o suporte depende da disponibilidade de unidades de concentrados de hemácias de doadores com fenótipos raros de grupos sanguíneos (Storry, 2013; Ministério da Saúde, 2022). O suporte transfusional em receptores com aloanticorpos contra antígenos de alta frequência é desafiador devido à dificuldade de encontrar sangue compatível, pela indisponibilidade de reagentes para fenotipagem dos doadores ou pelo elevado custo, considerando a necessidade de fenotipagem em larga escala (Seltsam *et al.*, 2003). A determinação dos antígenos eritrocitários, através da análise de DNA, tem trazido benefícios na prevenção da aloimunização, e na disponibilidade de doadores fenótipo compatíveis (Castilho; Júnior, 2004; Guelsin, 2010; Dezan *et al.*, 2019). O Vel foi o primeiro antígeno de alta frequência descrito e anticorpos anti-Vel podem causar reações hemolíticas graves. O mecanismo molecular responsável pelo fenótipo Vel negativo ou diminuição da sua expressão está relacionado a deleção, inserção e/ou mutações de nucleotídeos

(Storry *et al.*, 2013; Ballif *et al.*, 2013).

O fornecimento de concentrado de hemácias com fenótipo Vel negativo é um dos mais difíceis em muitas regiões do mundo. Isso se deve, em parte, à baixa frequência da deleção c.64\_80del17 em homozigose no gene *SMIM1*, que acarreta no fenótipo Vel negativo, mas também à falta de triagem sistemática em doadores de sangue (Ballif *et al.*, 2013). Métodos laboratoriais de amplificação de ácidos nucleicos têm permitido o rastreamento molecular em grande escala, seja para agentes infecciosos ou mesmo para mutações de implicação na saúde e na busca de polimorfismos de grupos sanguíneos raros (Dezan, 2019).

A frequência do fenótipo Vel negativo está relacionada com a composição étnica da população e embora seja mais comum em indivíduos caucasianos, este fenótipo é considerado raro em todas as regiões do mundo. No sudeste do Brasil foi demonstrado que a alteração estava presente em aproximadamente 1 a cada 12.000 amostras analisadas (Dezan, 2019). Estudos populacionais estimam uma frequência de indivíduos Vel negativos de 1 a cada 4.000 na Europa, sendo maior no norte da Escandinávia (1 a cada 1.700) (Storry *et al.*, 2013).

A identificação de doadores com fenótipo Vel negativo é crucial para os receptores de concentrados de hemácias que sejam sensibilizados com anticorpos anti-Vel. Na maioria dos serviços de hemoterapia, a busca de doadores raros é realizada utilizando antissoros humanos policlonais, quando disponíveis. As técnicas sorológicas, no entanto, são trabalhosas, com possíveis erros de interpretação dos resultados, pois o antígeno Vel possui variabilidade na densidade antigênica (Haer-Wigman *et al.*, 2015).

Considerando a importância do antígeno Vel na medicina transfusional e que o Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) é responsável por aproximadamente 99% da coleta e distribuição de sangue no estado (Governo de Santa Catarina, 2023), a implantação de técnicas de biologia molecular para a realização de genotipagem desse antígeno nos doadores de sangue do HEMOSC representa uma grande relevância e aumento da qualidade e segurança dos procedimentos, além de poder contribuir para a composição do banco de dados nacional de sangue raro.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar doadores de sangue com o fenótipo Vel negativo, deduzido do genótipo, do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) por meio de triagem molecular utilizando material genético obtido de *pools* de plasma.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

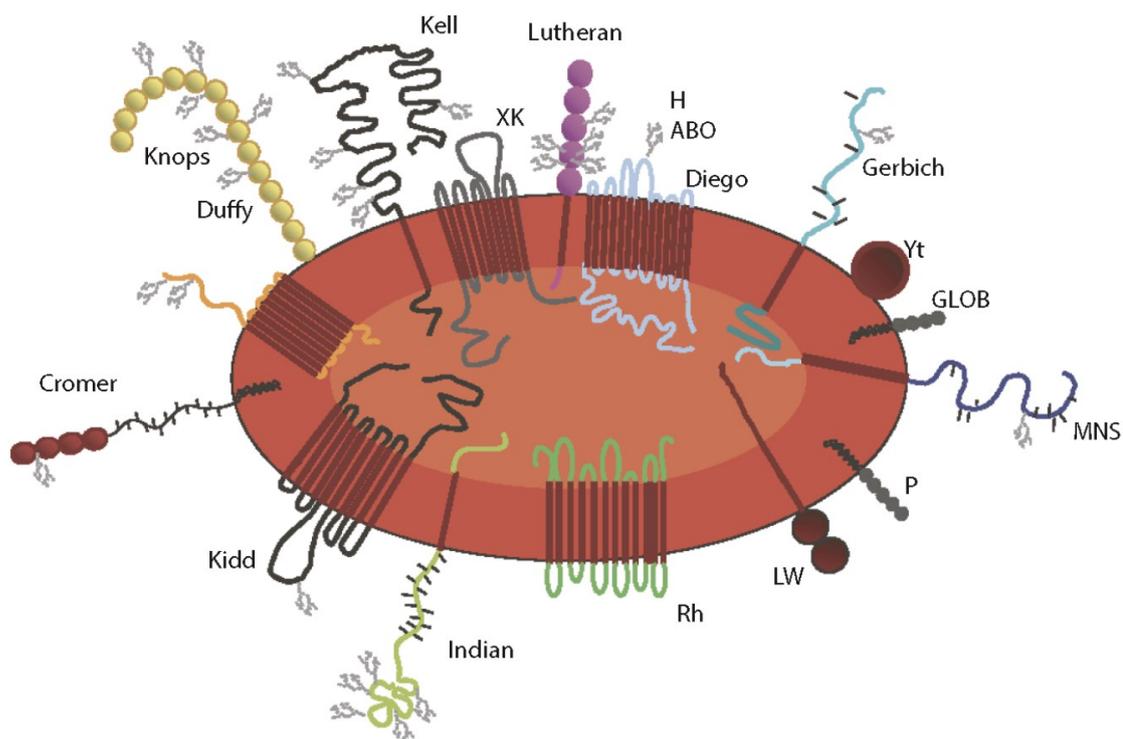
- Determinar a frequência alélica da deleção de 17 pares de bases (pb) no gene *SMIMI* (c.64\_80del), que caracteriza o fenótipo Vel negativo e Vel em heterozigose nos doadores de sangue atendidos pelo Hemocentro de Santa Catarina;
- Estabelecer a frequência da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* em diferentes regiões do estado de Santa Catarina de acordo com o local de doação;
- Associar a naturalidade com os resultados encontrados para o fenótipo Vel negativo, deduzido do genótipo, e Vel em heterozigose para a deleção c.64\_80del no gene *SMIMI*;
- Pesquisar por sorologia os doadores com a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI*, considerando a tipagem sanguínea do soro humano com a presença de anticorpos de especificidade anti-Vel disponível;
- Realizar estudo familiar dos doadores identificados como Vel negativos;
- Apresentar análise de custo considerando a utilização do material genético em *pool*;
- Contribuir para o incremento do banco de dados de doadores raros a nível nacional;
- Elaborar um informativo sobre sangue raro a ser divulgado aos doadores com esta característica.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 GRUPOS SANGUÍNEOS E ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS

Os antígenos eritrocitários são definidos por anticorpos que ocorrem naturalmente devido ao encontro de antígenos no ambiente ou são formados como resultado da imunização ativa para antígenos de hemácias não próprias após exposição a hemácias de outro indivíduo (Daniels, 2014; ISBT, 2022). São estruturas funcionalmente importantes, constituídos por sequências de aminoácidos específicos formando uma proteína ou, por carboidratos ligados a estas proteínas ou a lipídios. Os antígenos formam partes da membrana das hemácias e podem ser expressos em outros tecidos (Figura 1) (Torney; Hendrickson, 2019).

Figura 1 - Desenho ilustrativo de uma hemácia com antígenos de grupos sanguíneos representativos.



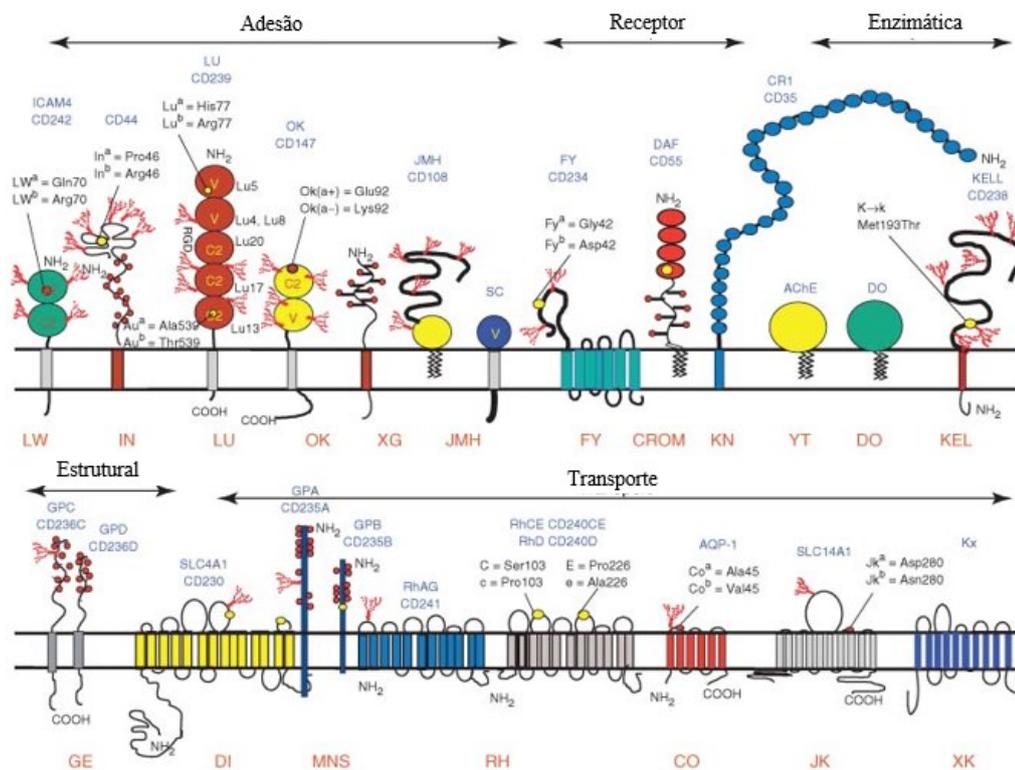
Fonte: Torney; Hendrickson, 2019

Os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados pela presença ou ausência de antígenos, com características polimórficas bem definidas na membrana eritrocitária e consistem em um ou mais antígenos governados por um único gene ou por um complexo de dois ou mais genes homólogos que são intimamente ligados, sendo que, geneticamente, os sistemas de grupos sanguíneo devem ser distintos entre si (Daniels, 2014; ISBT, 2022). Assim,

é a presença ou a ausência, devido à variação herdada geneticamente dos antígenos de superfície das hemácias, que define o grupo sanguíneo de um indivíduo (Daniels, 2014; Torney; Hendrickson, 2019).

Atualmente, os genes de todos os sistemas de grupos sanguíneos já foram identificados e localizados em regiões cromossômicas específicas. Também conhecidos são os alelos que codificam os polimorfismos nos grupos sanguíneos, a estrutura dos produtos gênicos e, em muitos casos, a sua função, sendo essencialmente: componente estrutural, transporte, receptor ou molécula de adesão, enzimática, regulador do sistema complemento, proteína regulatória e dentre outras (Figura 2) (Anstee, 2011; Baptista *et al.*, 2011; Daniels, 2014; Bettinotti; Caruccio, 2015; Torney; Hendrickson, 2019).

Figura 2 – Ilustração das estruturas onde estão localizados os grupos sanguíneos e as funções atribuídas a estes.



Fonte: Adaptado de Avent, 2018

O principal sistema sanguíneo na prática transfusional é o ABO, descrito por Karl Landsteiner em 1900, o qual observou que ocorria aglutinação dos glóbulos vermelhos quando misturados aos soros de outros indivíduos devido à incompatibilidade entre antígenos nas

hemácias e anticorpos no soro. Em 1902, Alfredo Castello e Adriano Sturli descreveram o grupo AB, cuja nomenclatura foi oficializada em 1927 (Daniels, 2014; Girelo; Kühn, 2016).

Com o desenvolvimento da Imuno-hematologia, novos antígenos foram descobertos e agrupados em sistemas, coleções e séries. O Grupo de Trabalho da Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (ISBT) de Imunogenética de Células Vermelhas e Terminologia de Grupos Sanguíneos mantém um registro oficial de todos os sistemas de grupos sanguíneos. Atualmente existem 392 antígenos de grupos sanguíneos, sendo que, 359 antígenos estão completamente caracterizados em 45 (001 a 045) sistemas de grupos sanguíneos. A ISBT mantém três categorias para antígenos que ainda não foram associados a sistemas de grupos sanguíneos. As coleções (série 200) foram projetadas para agrupar antígenos que são bioquimicamente, geneticamente ou sorologicamente semelhantes, mas cujas bases moleculares ainda não foram elucidadas. Existem também duas séries de antígenos: a Série 700 que contém antígenos que não se encaixam em nenhum sistema ou coleção e que têm uma frequência inferior a 1% em todas as populações étnicas humanas, e a Série 901 que contém antígenos que têm uma frequência superior a 90% em populações de diferentes ancestrais étnicos (ISBT, 2023).

Os polimorfismos de grupos sanguíneos originam-se predominantemente de mutações de ponto, principalmente os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs); mas recombinações gênicas, deleções e inserções também podem ocorrer ao longo da evolução dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos. A ocorrência natural de genótipos variantes dos grupos sanguíneos ou dos genes que codificam os antígenos eritrocitários pode causar alterações qualitativas e quantitativas na expressão dos antígenos na membrana dos eritrócitos, o que contribui para aumentar a complexidade desses sistemas (Daniels, 2005; Denomme, 2011).

O conhecimento dos antígenos eritrocitários é essencial na prática transfusional, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos contra estes antígenos pode se tornar um problema na clínica, principalmente no caso em que o receptor é portador de hemoglobinopatias ou outras doenças que requerem transfusões sanguíneas periódicas (Costa, 2016).

### 3.2 ALOIMUNIZAÇÃO

O desenvolvimento de anticorpos pode ocorrer quando há exposição do indivíduo a antígenos não próprios. Isso acontece em transfusões de sangue, sendo resultado da disparidade

genética entre doador e receptor, e em gestantes, cujos fetos expressam em suas células sanguíneas antígenos de origem paterna (Webb; Delaney, 2018; Torney; Hendrickson, 2019).

O risco de aloimunização depende da exposição do receptor ao antígeno estranho, do número e da frequência de transfusões ou do número de gestações, do diagnóstico e da imunogenicidade, definida como a capacidade de um dado antígeno estimular a produção de anticorpos em um receptor que não possua o antígeno em questão (Torney; Hendrickson, 2019; Gerritsma *et al.*, 2021).

A aloimunização eritrocitária é uma complicação grave e frequente da terapia transfusional. Isso dificulta os procedimentos de seleção de doadores para futuras transfusões, resultando em disponibilidade limitada de sangue compatível e possível atraso no fornecimento de transfusões em emergências médicas, podendo resultar em reações transfusionais hemolíticas caso não sejam localizados concentrados de hemácias compatíveis; ou ainda, nas gestações, podendo acarretar em DHFRN (Torney; Hendrickson, 2019; Castleman; Kilby, 2020; Kukar, 2020; Gerritsma *et al.*, 2021).

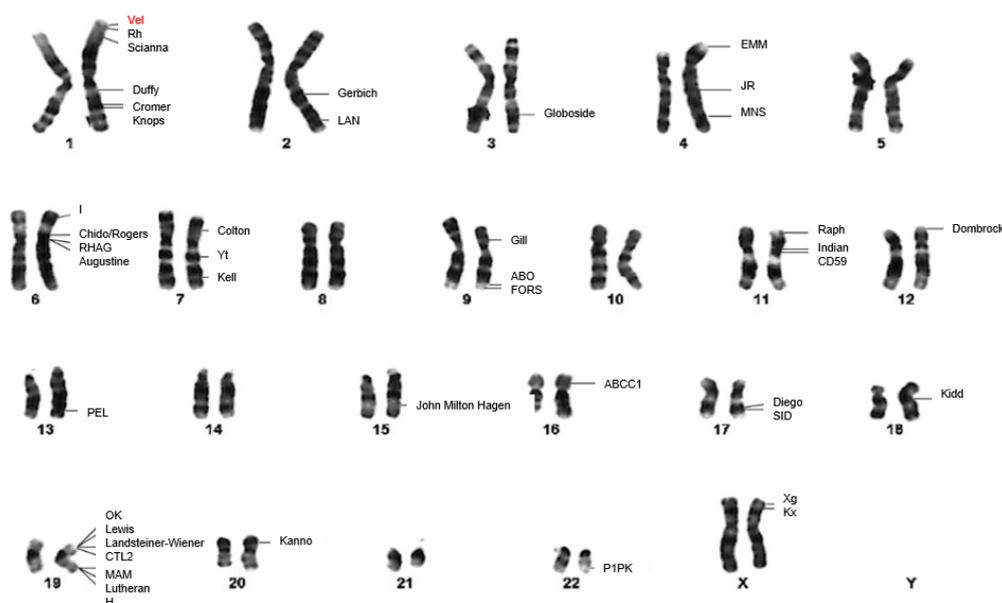
A frequência dos anticorpos antieritrocitários varia de acordo com o diagnóstico, idade, histórico de transfusões, etnia, frequências dos antígenos nos receptores em relação aos doadores na região geográfica, polimorfismo genético e outros fatores de risco que levam à aloimunização (Gerritsma *et al.*, 2021; Garraud; Chiaroni, 2022). Existem alguns estudos que consideram esses ou alguns desses fatores e determinam a probabilidade de produzir um ou mais anticorpos antieritrocitários. Em 1996, Redman e colaboradores avaliaram 452 amostras de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva antes e após receberem transfusão de concentrado de hemácias. Neste estudo foi concluído que a probabilidade de um indivíduo produzir anticorpos antieritrocitários é de aproximadamente 8,4% por unidade de sangue transfundida. Outro estudo, publicado em 2012 por Alves e colaboradores, avaliou 143 indivíduos e 10,49% desenvolveram aloanticorpos irregulares, demonstrando uma correlação com o número de transfusões. As incidências de aloimunizações são significativamente maiores na anemia falciforme em comparação com a população geral e variam de 18 a 65% em estudos de coortes pareados (Sins *et al.*, 2016).

Considerando o risco associado às transfusões, tem-se procurado minimizar o risco de um indivíduo formar aloanticorpos antieritrocitários. Dessa maneira, recomenda-se a transfusão de sangue fenotipicamente compatível com antígenos eritrocitários mais imunogênicos aos receptores com maior risco de formar anticorpos (Gerritsma *et al.*, 2021).

### 3.3 GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGUÍNEOS

A utilização das ferramentas de biologia molecular tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da Imuno-hematologia, aumentando a segurança e a eficácia transfusional. Os testes de hemaglutinação detectam o produto do gene e a genotipagem identifica o código genético (Figura 3), podendo ser uma excelente alternativa para os casos onde os testes de sorológicos não apresentam eficiência; seja devido à ausência de antissoros comerciais para fenotipagem ou nos casos de receptores com transfusão recente, quando há hemácias do doador ainda circulantes no receptor; ou ainda, em receptores que possuam autoanticorpos (Westhoff, 2019; Dezan *et al.*, 2019; Sullivan; Gleadall; Lane, 2022).

Figura 3. Genes codificadores de alguns antígenos de grupos sanguíneos por localização cromossômica.



Fonte: Adaptado de Sullivan; Gleadall; Lane (2022)

A genotipagem pode ser realizada sempre que a sequência de um gene for conhecida e que as mutações responsáveis por um antígeno tenham sido determinadas. Os protocolos comumente utilizados na determinação de antígenos de grupos sanguíneos são baseados em iniciadores alelo-específicos e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ou ainda na análise de arranjo de DNA ou sequenciamento do DNA (Hyland; Roulis; Schoeman, 2019; Sullivan; Gleadall; Lane, 2022; Li; Guo, 2022). Os resultados devem ser cuidadosamente interpretados, principalmente na aplicação clínica. Existem situações em que a genotipagem detecta a presença de um gene que não é expresso e, portanto, a proteína carregando o antígeno não será expressa (Castilho, 2007).

Em larga escala, a genotipagem de grupos sanguíneos, pode ser útil para a criação de bancos de dados eletrônicos de doadores de sangue com características raras, possibilitando a identificação de doadores compatíveis com os receptores em tempo reduzido, permitindo a determinação de polimorfismos em uma única reação com redução de tempo e custo (Tournamille, 2013; Sullivan; Gleadall; Lane, 2022).

### 3.4 SANGUE RARO

De acordo com a ISBT, um tipo sanguíneo é considerado raro quando a frequência do fenótipo na população é inferior a um para cada mil indivíduos e inclui grupos sanguíneos de fenótipo negativos para antígenos de alta frequência ou negativos para múltiplos antígenos comuns. Como a distribuição dos grupos sanguíneos varia entre os diferentes grupos étnicos, um fenótipo considerado raro para uma determinada população pode não ser raro para outras populações (ISBT, 2022; Ministério da Saúde, 2022; Schörner, 2015).

O fornecimento de sangue compatível para receptores com glóbulos vermelhos que não possuem um antígeno de alta incidência e que produziram o aloanticorpo correspondente, ou para aqueles que produziram uma combinação de aloanticorpos de diferentes especificidades é um desafio. Em algumas situações, como cirurgias eletivas, dependendo do quadro clínico, o próprio indivíduo pode ser candidato à doação. Em casos nos quais somente é possível considerar doações do tipo alogênicas para a transfusão, a busca familiar passa a ser uma estratégia recomendada para encontrar o fenótipo raro de interesse ou ainda pode-se recorrer ao banco de dados nacional ou internacional de doadores de sangue com fenótipos raros (Ministério da Saúde, 2022; Nance, 2016).

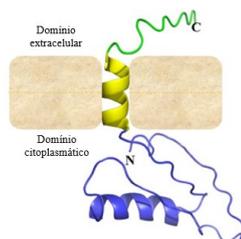
Considerando a importância do fornecimento de sangue compatível, em 2016, o Ministério da Saúde, por meio da Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH/MS) instituiu o Cadastro Nacional de Sangue Raro (CNSR), um banco de dados centralizado que conta com informações sobre doadores com fenótipos eritrocitários raros cadastrados nos hemocentros públicos do Brasil (Ministério da Saúde, 2022). A nível internacional, em 1965, a ISBT instituiu o Painel Internacional de Doadores de Sangue Raro (IRDP) da Organização Mundial da Saúde (OMS) por meio da cooperação do Laboratório Internacional de Referência de Grupos Sanguíneos (IBGRL) e do grupo de trabalho da Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue. A disponibilidade do banco de dados permite a localização rápida e precisa das unidades de sangue raro para atendimento aos receptores (Schörner, 2015).

### 3.5 SISTEMA VEL

O antígeno Vel foi o primeiro antígeno de alta frequência descrito há mais de 70 anos, por Sussman e Miller (1952). A identificação do anticorpo com uma nova especificidade foi realizada no soro da Sr<sup>a</sup> 'Vel', que, após receber transfusão de um concentrado de hemácias não compatível, sofreu reação transfusional hemolítica intravascular aguda. Esse antígeno é expresso nas hemácias da maioria dos indivíduos, de modo que, uma triagem subsequente em 10.000 doadores de sangue identificou apenas quatro indivíduos cujas hemácias não reagiram com o soro da receptora (Sussman; Miller, 1952; Storry; Peyrard, 2017). O antígeno Vel, inicialmente, foi incluso na Série 901 e, em 2008, tornou-se parte de uma coleção. Em 2013, a base genética do antígeno Vel foi determinada e esse antígeno teve sua classificação reorganizada, passando a fazer parte do sistema Vel (ISBT 034) (Storry *et al.*, 2013; Balif *et al.*, 2013; Dezan, 2019).

O mecanismo molecular responsável pelo fenótipo Vel negativo foi determinado por grupos independentes que mostraram que o antígeno Vel está associado a uma proteína de membrana de passagem única, conhecida como pequena proteína integral de membrana 1 (SMIM1) (Ballif *et al.*, 2013; Cvejic *et al.*, 2013; Storry *et al.*, 2013; Arnaud *et al.*, 2015). O gene correspondente está localizado na extremidade do braço curto do cromossomo 1 (1p36.32), é composto por quatro éxons e três íntrons, sendo que códon de iniciação ATG está no éxon 3, produzindo uma proteína de 78 aminoácidos (Storry *et al.*, 2013; Arnaud *et al.*, 2015; Aniweh *et al.*, 2019). Anteriormente foi descrito que a proteína era transmembranar tipo I (Storry *et al.*, 2013), posteriormente foi demonstrado ser uma proteína do tipo II com aminoácidos nas posições 1 a 47 previstas para constituir o domínio citoplasmático, enquanto as posições 68 a 78 formam a haste extracelular (Figura 4) (Arnaud *et al.*, 2015; Aniweh *et al.*, 2019).

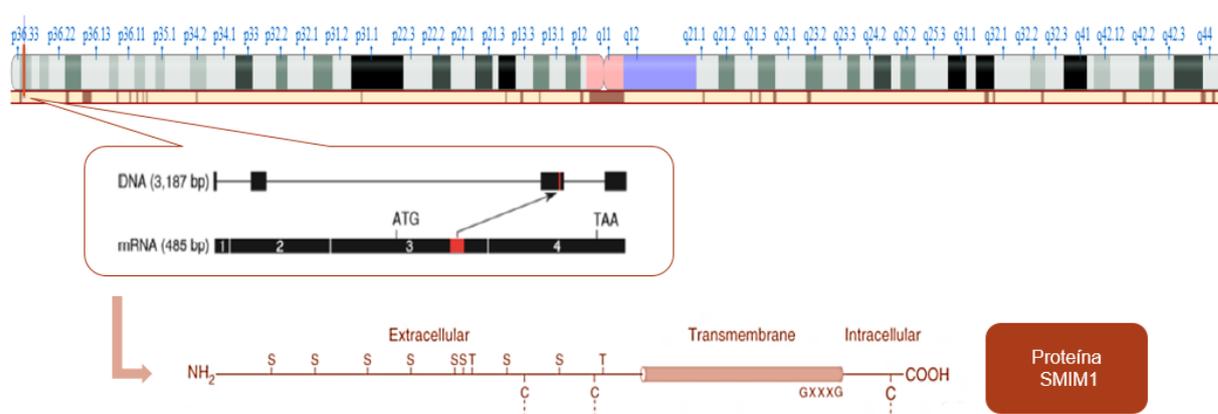
Figura 4 - Proteína SMIM1. Estrutura em 3D mostrando o domínio extracelular (em verde), a hélice transmembranar (em amarelo) e o domínio citosólico (em azul).



Fonte: Adaptado de Aniweh *et al.*, 2019

O fenótipo Vel negativo é resultado da deleção homozigótica de 17 pares de bases (pb) em *SMIM1*(c.64\_80del), que acarreta na formação do alelo *c.64\_80del17* e impede a expressão da proteína SMIM1 (Figura 5) (Storry *et al.*, 2013; Dezan *et al.*, 2019; Arnoni *et al.*, 2019; Aniweh *et al.*, 2019). A expressão do antígeno Vel nos eritrócitos pode variar pela deleção heterozigótica dos 17 pb, SNPs e sequências de inserção ou mutações no gene *SMIM1* (Aniweh *et al.*, 2019; Rijst *et al.*, 2019).

Figura 5 - Localização cromossômica dos quatro éxons do gene *SMIM1* que codificam a proteína SMIM1. Deleção c.64\_80del17 indicada no éxon 3 (em vermelho) é responsável pelo fenótipo Vel negativo na membrana das hemácias.



Fonte: Adaptado de Storry *et al.*, 2013; The Human Protein Atlas, 2023

No íntron 2 do gene *SMIM1*, região que modula a expressão do antígeno Vel, podem ocorrer SNPs; assim a diminuição da expressão do antígeno Vel pode estar correlacionada com a variante rs117555, correspondente a substituição do alelo A pelo alelo G, ou ainda pode estar relacionado com outros polimorfismos, como: rs143702418, rs1181893, rs191041962, rs6673829, rs9424296, entre outros. Além disso mutações de sentido único heterozigóticas no éxon 4 de *VEL\*01 W.01* (c.152T>A, p.Met51Lis), de *VEL\*01 W.02* (c.152T>G, p.Met51Arg) e *VEL\*01 W.03* (c.161T>C, p.Leu54Pro) também podem acarretar em expressão fraca do antígeno Vel (Cvejic *et al.*, 2013; Dezan *et al.*, 2019; Rijst *et al.*, 2019; Aniweh *et al.*, 2019; Rijst *et al.*, 2020; Gnommad, 2023).

O fenótipo Vel negativo é transmitido por herança autossômica recessiva. Atualmente, nenhuma condição fisiopatológica foi relacionada à falta de SMIM1 em humanos, em grande parte, atribuível a ausência de função fisiológica conhecida (Aniweh *et al.*, 2019). No entanto, experimentos em peixes-zebra associaram a ausência da proteína a baixos níveis de hemoglobina (Cvejic *et al.*, 2013). Além disso, estudos sugerem uma possível relação da

proteína SMIM1 com a patogênese da malária. Há indícios que os sítios de fosforilação na região citoplasmática da proteína podem estar relacionados à invasão e desenvolvimento de *Plasmodium falciparum* nos eritrócitos humanos (Christophersen *et al.*, 2017; Aniweh *et al.*, 2019).

A avaliação do significado clínico é obtida através da literatura, definido, de maneira geral, quando é frequentemente associado com DHFRN, reação hemolítica transfusional ou com diminuição da sobrevivência das hemácias transfundidas e subsequente queda da hemoglobina. (American Association of Blood Banks, 2020). Indivíduos previamente sensibilizados com anticorpos anti-Vel podem sofrer reação transfusional hemolítica aguda ou tardia caso sejam transfundidos concentrados de hemácias Vel positivo ou positivo fraco, que podem induzir a insuficiência renal com risco de evolução à óbito. Da mesma maneira, mulheres grávidas com fenotipagem Vel negativo sensibilizadas possuem o risco de aborto por DHFRN, caso o feto seja Vel positivo (Rijst *et al.*, 2019; Aniweh *et al.*, 2019; Dutra *et al.*, 2023).

Existem algumas metodologias laboratoriais que mensuram o significado clínico dos anticorpos, pelo rastreamento automatizado através de plataformas que analisam a fluorescência e também pela quantificação da fagocitose (Kahl, 2021). O teste de Citotoxicidade mediada por Célula dependente de Anticorpos (ADCC) apresenta resultados preditivos positivos, porém é um método invasivo aos receptores e utiliza um elemento radioativo administrado na corrente sanguínea, o que torna a implementação desta metodologia não passível a maioria dos laboratórios. Como alternativa tem-se o teste de quimioluminescência (CLT) e o Ensaio da Monocamada de Monócitos (MMA), que apresentam uma simulação *in vitro* do comportamento dos anticorpos. Essas metodologias utilizam monócitos primários e hemácias do possível doador opsonizadas pelos anticorpos do receptor, a fim de avaliar se haverá fagocitose ou não destes eritrócitos sensibilizados. O diferencial do teste CLT é a quantificação da fagocitose de maneira automatizada (Tong, 2018). Nos casos de estudo avaliados com receptores que possuem anticorpos anti-Vel, o MMA apresenta um índice monocitário superior a 5%, o que está relacionado ao risco de reação hemolítica (Dutra *et al.*, 2023).

O fenótipo Vel negativo é comumente mais associado à população de etnia caucasiana e é considerado raro em todas as regiões do mundo. O concentrado de hemácias Vel negativo é um dos tipos sanguíneos mais difíceis de fornecer em muitas regiões. Isso se deve em parte à raridade, mas também à falta de triagem sistemática em doadores de sangue (Balif *et al.*, 2013).

A determinação sorológica do fenótipo Vel é pouco confiável devido aos níveis variáveis de expressão do antígeno Vel. Dessa forma, alguns indivíduos podem ser

incorretamente classificados como Vel negativo por essa metodologia, podendo causar reações transfusionais hemolíticas em receptores previamente sensibilizados. (Haer-Wigman *et al.*, 2015; Aniwah *et al.*, 2019; Dezan *et al.*, 2019; Rijst *et al.*, 2020). Não existe, até o momento, nenhum reagente padronizado no Brasil e disponível comercialmente para a fenotipagem Vel (Dezan *et al.*, 2019).

Em 2015, Danger e colaboradores caracterizaram um novo anticorpo monoclonal humano dirigido contra o antígeno Vel, que demonstrou um nível heterogêneo de expressão nos diferentes painéis de hemácias utilizados. Outro estudo também propôs um anticorpo monoclonal anti-Vel recombinante com um desempenho superior aos reportados em outros estudos publicados (Rijst *et al.*, 2019). De acordo com os autores, os reagentes podem ser usados de forma confiável a critério de pesquisa, porém o elevado custo ainda é uma limitação para a fenotipagem em larga escala (Danger *et al.*, 2015; Rijst *et al.*, 2019).

Após a elucidação das bases moleculares do sistema Vel, a genotipagem tem sido a técnica de escolha para identificar o fenótipo Vel negativo, deduzido do genótipo, associada com as investigações moleculares que têm contribuído para explicar a variabilidade da expressão de Vel em algumas amostras (Storry *et al.*, 2013). Podem ser aplicados alguns métodos de genotipagem, incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR) com sequência de iniciador específico e PCR convencional seguida de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Além disso, o sequenciamento de DNA também é uma abordagem que pode ser utilizada e permite a avaliação das variantes (Storry *et al.*, 2013; Ballif *et al.*, 2013; Dezan *et al.*, 2016).

Considerando a importância clínica do aloanticorpo, a identificação de doadores Vel negativos é de extrema relevância para a segurança das transfusões de sangue em receptores aloimunizados (Rijst *et al.*, 2019; Aniwah *et al.*, 2019).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 AMOSTRAGEM E LOCAL DE ESTUDO

Para a amostragem foi utilizada a equação (1), na qual  $q$  é a frequência suposta da alteração (Dezan, 2019).

Equação 1 – Fórmula para calcular o tamanho amostral necessário para a localização de um doador Vel negativo considerando a frequência do local de estudo.

$$N=(1,96)^2 \times p \times q/E^2 \quad (1)$$

$$p = 1 - q \quad (2)$$

$$E \text{ (erro tolerado)}= q \times \text{precisão da estimativa em percentual} \quad (3)$$

Fonte: Dezan, 2019.

Com a aplicação do cálculo, para possivelmente localizar um doador, são necessárias 8.500 amostras de doadores de sangue do Hemocentro de Santa Catarina. Visando a localização de mais doadores, esse valor foi extrapolado para 17.000 amostras.

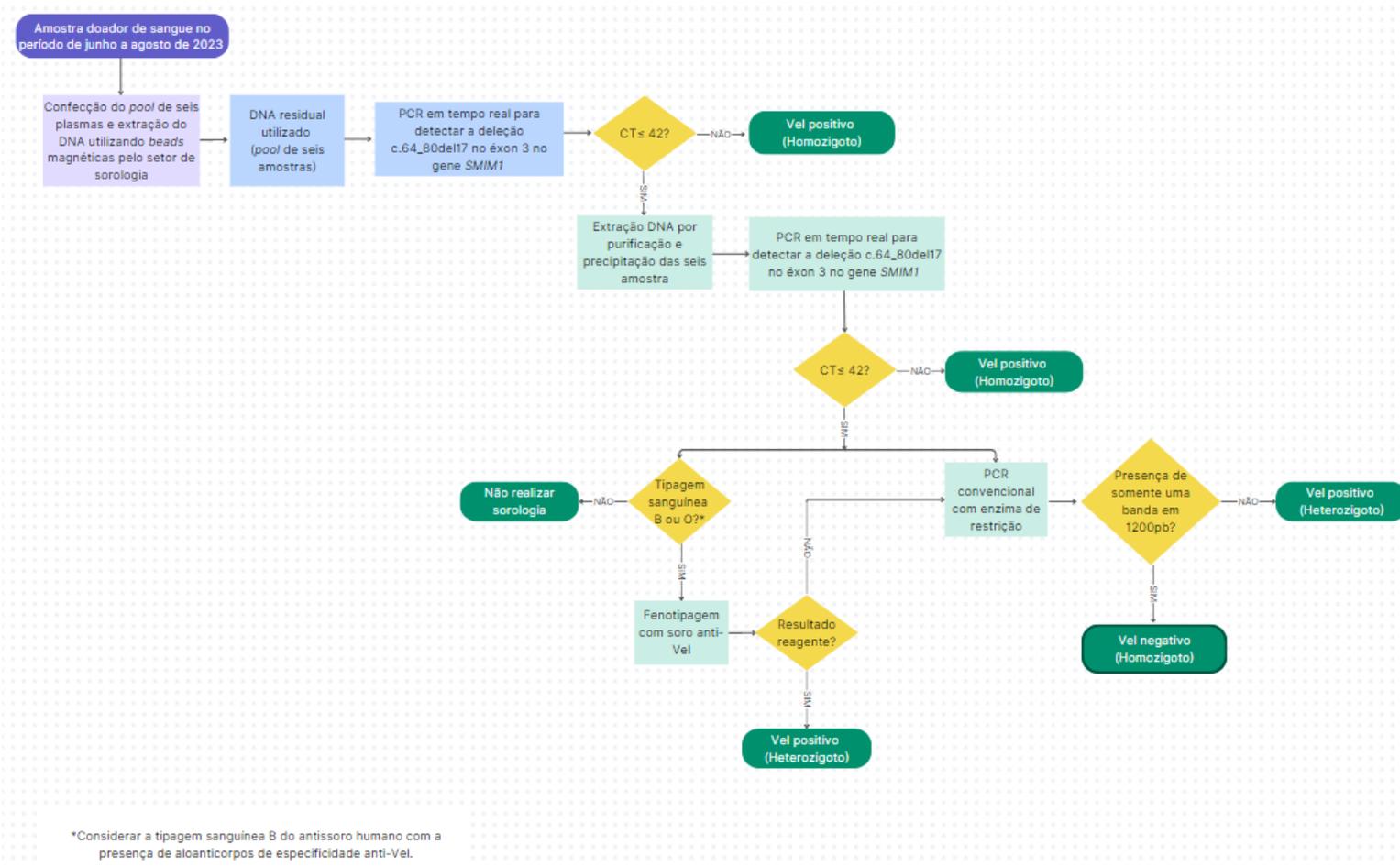
Considerando que são realizadas em média 10 mil doações de sangue em todo o estado de Santa Catarina, que são processadas em Florianópolis, foi possível alcançar o valor calculado em dois meses, divididos em dois períodos que compreenderam da segunda quinzena de junho à primeira quinzena de agosto de 2023. Primeiramente a pesquisa foi realizada com as amostras de doação de sangue provenientes de toda a hemorrede (segunda quinzena de junho a julho - Período 1) e em um segundo momento foi concentrada nas amostras dos hemocentros que apresentaram uma maior frequência para a deleção de 17 nucleotídeos (c.64\_80del17) no éxon 3 no gene *SMIM1*, tendo por base a média de doação de cada região (primeira quinzena de agosto - Período 2).

Cada doador participou da pesquisa uma única vez, ou seja, foi excluída a segunda amostra dos doadores de plaquetas obtidas por aférese.

#### 4.2 ESTRATÉGIA DE BUSCA PARA IDENTIFICAÇÃO DE DOADORES COM GENÓTIPO VEL NEGATIVO

O Fluxograma (Figura 6) apresenta a estratégia de busca para identificação de doadores raros com o genótipo Vel negativo.

Figura 6 - Fluxograma demonstrando a metodologia aplicada para a localização de doadores Vel negativo.



#### 4.2.1 Preparo do pool e extração do material genético

As amostras foram genotipadas por PCR em tempo real para detectar a deleção de 17 nucleotídeos (c.64\_80del17) no éxon 3 no gene *SMIMI* (Figura 5), que determina o fenótipo Vel negativo, utilizando DNA extraído de *pools* de plasmas provenientes de seis doadores rotineiramente descartados após a liberação dos resultados da rotina viral NAT (Teste de Ácido Nucleico). A confecção do *pool* que é utilizado para a rotina do NAT é realizada de maneira automatizada pelo equipamento Chemagic Prime<sup>®</sup> que engloba um pipetador automático (Janus<sup>®</sup>) e um extrator de material genético (Chemagic<sup>®</sup>) da Perkin Elmer<sup>®</sup>. A rotina do setor foi reformulada de modo que todos os *pools* utilizados fossem compostos por amostras de doadores de Santa Catarina, excluindo as amostras de não doadores e provenientes do Hemocentro do Rio Grande do Sul.

No equipamento Janus, acontece a etapa de preparação do *pool* de um conjunto de seis amostras (com a utilização de 167µL de cada plasma). As amostras são coletadas em tubos primários específicos ao NAT de flebotomia a vácuo do tipo K2 EDTA com gel de poliéster para separação de plasma e fração celular do sangue total. A transferência das amostras foi feita para uma placa com poços de 2 mL (96 poços).

A adição do Controle Interno (CI) na rotina do NAT tem o objetivo de controlar a condição da reação (intra-ensaio) validando o resultado das determinações. O CI é adicionado a cada determinação na rotina do NAT.

A extração de ácido nucléico das amostras biológicas (plasma) é totalmente automatizada de acordo com o protocolo do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos. No Janus, as amostras são lisadas com tampão de lise, poli(A) RNA e proteinase K sob condições desnaturantes. No extrator Chemagic<sup>®</sup> é realizado o isolamento de ácidos nucléicos. A extração aplica a tecnologia de *beads* (partículas) magnéticas e utiliza hastes magnetizadas para separar os ácidos nucléicos das soluções, fornecendo isolamento de alta qualidade, alto rendimento e diminuição do risco de contaminação das amostras. O produto final eluído é livre de albumina sérica, outras proteínas, nucleases, sais inorgânicos e orgânicos e outros possíveis interferentes.

O módulo Chemagic<sup>®</sup>, está programado para extrair 70 µL de material genético, sendo que as reações de PCR utilizam 10 µL de material genético para a reação de HIV/HBV e 10 microlitros para reação de HCV/Malária; dessa maneira, da placa de eluição da extração há um volume remanescente em torno de 50 µL (considerando a variação de volume). Assim, o DNA

foi fornecido pelo HEMOSC e os *pools* e o material genético de interesse foram obtidos conforme protocolo do fabricante.

Quando identificado um *pool* positivo por PCR em tempo real (indicando que há uma ou mais amostras com a presença da deleção c.64\_80del17 no éxon 3 no gene *SMIM1* em homozigose ou em heterozigose), descrito no item 4.2.2, as seis amostras foram cedidas do setor de Imuno-hematologia ou de Sorologia, dependendo da disponibilidade da amostra, e tiveram seu DNA extraído em amostra de sangue tratadas em EDTA ou do soro em amostras coletadas em tubo com gel separador por metodologia manual utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA purification (Promega®) empregando um processo de purificação e precipitação, conforme instruções do fabricante.

#### 4.2.2 Validação das metodologias moleculares

Os testes para a validação das metodologias de PCR em tempo real e PCR-RFLP foram realizados utilizando material genético de amostras de referência, conhecidamente portadores da mutação em heterozigose ou homozigose, considerando que o desenho dos iniciadores foi validado anteriormente por Dezan (2019).

A concentração e a pureza do DNA foram calculadas medindo a densidade óptica em 260 e 280 nm usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermal Scientific, Uniscience Inc., São Paulo, SP, Brasil). A concentração do DNA para as metodologias deve estar entre 20-150 ng/μL, com grau de pureza aproximadamente 1,80 da relação 260/280 nm.

Considerando que os *pools* de DNA, liberados pelo setor de sorologia do HEMOSC, são confeccionados com seis amostras, para a validação da PCR em tempo real, os *pools* foram montados com cinco amostras de plasma de doadores da rotina NAT e o plasma controle (Vel negativo ou Vel positivo em heterozigose), totalizando seis amostras, sendo esse processo de extração realizado em triplicata. Além disso, para avaliar a reprodutibilidade, foi realizada a comparação do Ciclo de quantificação (Cq) em triplicata em *pool*, com DNA extraído do plasma e DNA extraído do *buffy coat*, para amostras Vel negativo e Vel positivo em heterozigose. Para verificar o consumo de reagentes, o que poderia ocasionar resultados falso-negativos, foi realizado teste com DNA plasmático diluído na proporção 1:10 e 1:20 para amostra Vel negativo e Vel positivo em heterozigose. Foi considerada também na validação em *pool* a presença de duas amostras com a deleção que corresponde os fenótipos Vel negativo e Vel positivo em heterozigose.

A PCR-RFLP foi realizada considerando a concentração e o volume dos reagentes recomendados pelo fabricante da enzima e o protocolo descrito por Storry e colaboradores, 2013.

#### 4.2.3 *Triagem molecular*

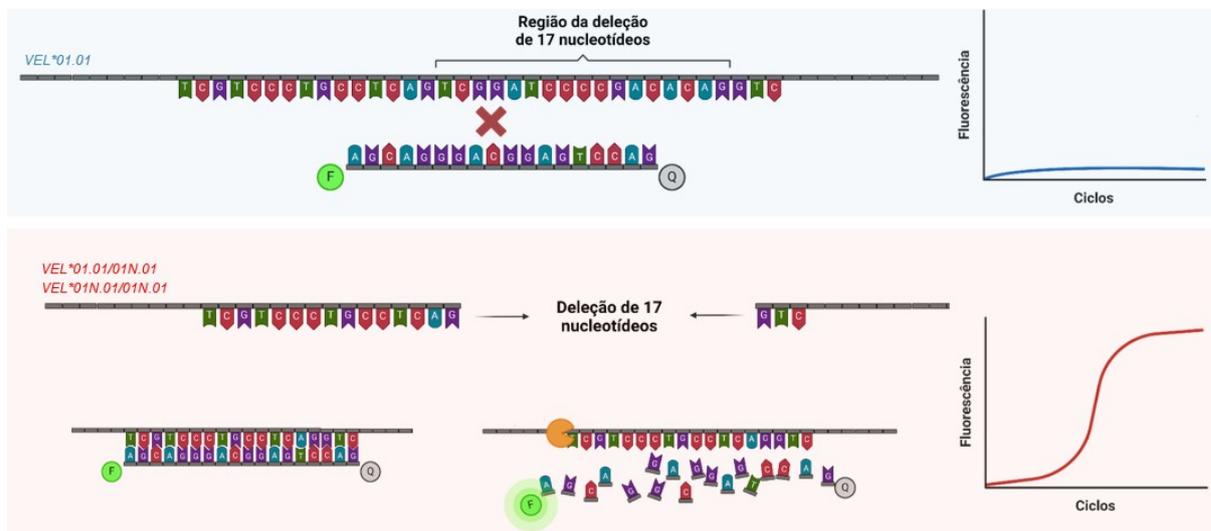
Conforme protocolo estabelecido por Dezan (2019), para a reação de amplificação por PCR em tempo real foi utilizada a enzima TaqMan Fast Advanced (Applied Biosystems – Thermo Fisher®); os iniciadores (Sigma®), desenhados abrangendo 127pb do éxon 3 do gene *SMIMI* (Quadro 1); a sonda (Sigma®) marcada pelo fluoróforo FAM (Carboxyfluorescein), desenhada para hibridizar a extremidade 3' e reconhecer a sequência de nucleotídeos existentes apenas nos indivíduos portadores da deleção de 17nt (Figura 7); e o DNA extraído do *pool* de seis plasmas de doadores de sangue (Quadro 1). A reação foi colocada no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher®) com programação de 95°C por 10 minutos e 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 62°C por 1 minuto. As amostras dos *pools* com resultados positivos tiveram seu DNA extraído de forma individual e foram genotipadas novamente por PCR em tempo real nas mesmas condições para selecionar a(s) amostra(s) que apresenta(m) a deleção em homozigose ou heterozigose.

Quadro 1 – Protocolo para PCR em tempo real para pesquisa da deleção c.64\_80del17 e sequência dos iniciadores e da sonda utilizados.

| <b>Insumo</b>  | <b>Volume / Concentração</b> |
|--|------------------------------|
| TaqMan Fast Advanced   | 10 µL                        |
| Iniciador: SMIM1 Vel senso<br>5'-CCACTATAGTAGGTGGGAGGA - 3'    | 0,5µL/250nM                  |
| Iniciador: SMIM1_Vel antissenso<br>5'- TCTCTGGAGGGAGACACC - 3' | 0,5µL/250nM                  |
| Sonda: SMIM1_Velneg/FAM<br>FAM-AGCAGGGACGGAGTCCAG-TAMRA        | 0,5µL/250nM                  |
| <b><i>Volume do MIX</i></b>                                    | <b><i>11,5 µL</i></b>        |
| Volume do DNA  | 8,5 µL                       |
| <b><i>Volume final</i></b>                                     | <b><i>20 µL</i></b>          |

Fonte: Extraído de Dezan, 2019.

Figura 7 – Ilustração do desenho da sonda utilizada para triar os doadores com a presença da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* e esquema de como ocorre parte da reação, com a fluorescência esperada. O destaque em azul corresponde ao genótipo *VEL\*01.01* e em vermelho *VEL\*01.01/01N.01* ou *VEL\*01N.01/01N.01*.



#### 4.2.4 Triagem sorológica

O teste sorológico para o antígeno Vel foi realizado nas amostras com tipagem ABO classificada como B ou O que apresentaram a deleção c.64\_80del17 identificadas por meio de PCR em tempo real, considerando que o antissoro humano com a presença de anticorpos de especificidade anti-Vel apresenta a tipagem sanguínea B. Foi realizada a metodologia indireta da antiglobulina na técnica de gel-centrifugação com um soro proveniente de um receptor aloimunizado com a presença de anticorpos de especificidade anti-Vel (título 4; escore 26)<sup>1</sup> e com tipagem sanguínea B.

Para a fenotipagem foi adicionada a suspensão de hemácias em solução de baixa força iônica a 1% ao cartão LISS-Coombs (Grifols®) e 25µL do soro humano com a presença de anticorpos de especificidade anti-Vel. Após incubação e centrifugação, a reatividade foi classificada por observação da presença ou ausência de aglutinação. Independentemente do resultado da sorologia a metodologia de PCR seguida de análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) foi aplicada.

<sup>1</sup> Escore: soma do valor numérico atribuído (pontuações) por observações macroscópicas que avaliam a característica da aglutinação e o sobrenadante da reação. Manual técnico da AABB, 2020.

#### 4.2.5 Classificação da zigosidade

Após identificar pela metodologia de PCR em tempo real a amostra com a presença da deleção, foi realizada a PCR convencional para classificar o doador em homocigoto ou heterocigoto para a deleção, empregando PCR-RFLP, conforme descrito por Storry e colaboradores (2013) e Dezan (2019). Todas as reações foram realizadas em paralelo com amostras controle que apresentam a presença da deleção em homocigose ou em heterocigose.

O protocolo consiste na adição dos reagentes, conforme descrito no Quadro 2, com o seguinte programa no termociclador: 94°C por 10 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C 30 segundos, 72°C por 72 segundos; e 72°C por 3 minutos. Após amplificação, o produto de aproximadamente 1.200 pb foi visualizado em eletroforese em gel de agarose a 2%. As bandas de DNA foram detectadas pela exposição à luz ultravioleta (UV) após utilização do corante fluorescente brometo de etídio.

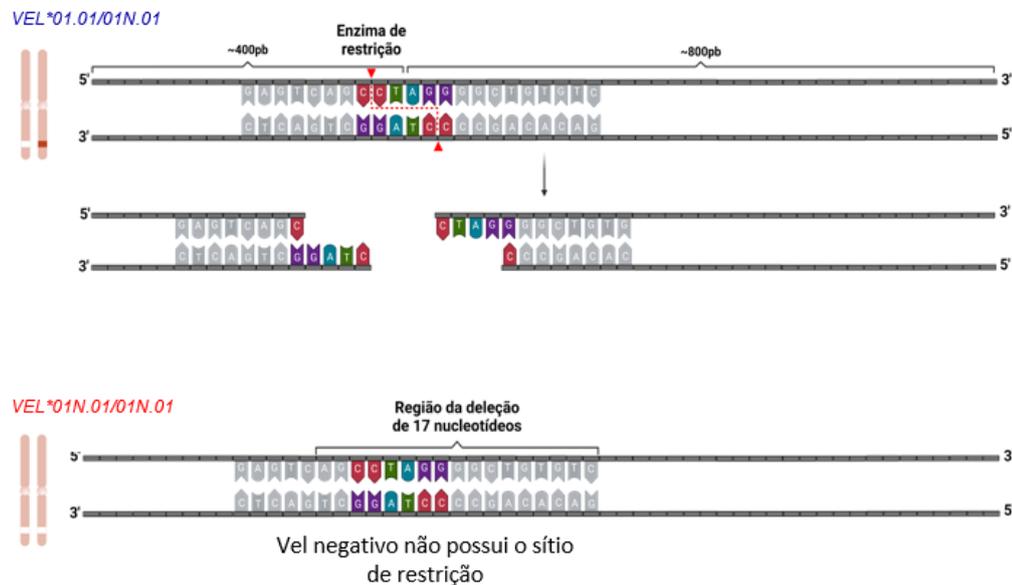
Quadro 2– Protocolo para PCR-RFLP para pesquisa da zigosidade da deleção c.64\_80del17.

| Insumo  | Concentração |
|---|--------------|
| Água livre de nuclease  |              |
| Tampão  | 10X          |
| MgCl <sub>2</sub>   | 50 mM        |
| dNTP  | 0,2 mM       |
| LOC388588-3 (Sigma <sup>®</sup> )<br>5'- CTGGAGTGTGCTGGAAGGA - 3' | 10 ng/μL     |
| LOC388588-5 (Sigma <sup>®</sup> )<br>5'- AGAGAGGAGGCTGTAGCTG - 3' | 10 ng/μL     |
| Taq Polymerase (Invitrogen <sup>®</sup> )                         | 5U/μL        |
| <b>Volume do MIX</b>  | <b>20 μL</b> |
| Volume do DNA   | 5 μL         |
| <b>Volume final</b>   | <b>25 μL</b> |

Fonte: Adaptado de Storry *et al.*, 2013 e Dezan, 2019

A etapa de fragmentação enzimática consiste em adicionar 10 μL do produto amplificado por amostra e incubar por 1 hora a 37°C com 0,5 μL da enzima de restrição *StyI-HF* (Biolabs<sup>®</sup>). A visualização foi realizada após a eletroforese em gel de agarose a 2%. Em amostras heterocigotas ocorreu a fragmentação na sequência C/CWWGG (Figura 8), sendo possível visualizar duas bandas (800 pb e 400 pb). Em amostras homocigotas não ocorre a digestão enzimática mantendo-se o fragmento de 1.200 pb.

Figura 8 - Ilustração do local de corte da enzima de restrição *Styl*-HF em amostra com a presença da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* em heterozigose, *VEL\*01.01/01N.01*, formando um produto com 800 pb e 400 pb. Em *VEL\*01N.01/01N.01* há a deleção dos 17 nucleotídeos e não há o sítio de restrição.



#### 4.2.6 Estudo familiar

Após identificar os doadores com o fenótipo, deduzido do genótipo, Vel negativo foi realizado o estudo familiar com anonimização dos dados (Apêndice B) e aplicação do TCLE (Apêndice C).

A comunicação foi realizada por meio do doador e foram convidados os irmãos para participarem da pesquisa. Foi explicado detalhadamente que possuem uma maior probabilidade de serem portadores desse fenótipo raro e informados os procedimentos necessários para a realização da coleta de amostra de sangue, com agendamento da data, horário e local.

A amostragem dessa etapa considerou os doadores que desejaram envolver a sua família e os familiares dispostos a participar.

#### 4.3 ANÁLISE DE DADOS

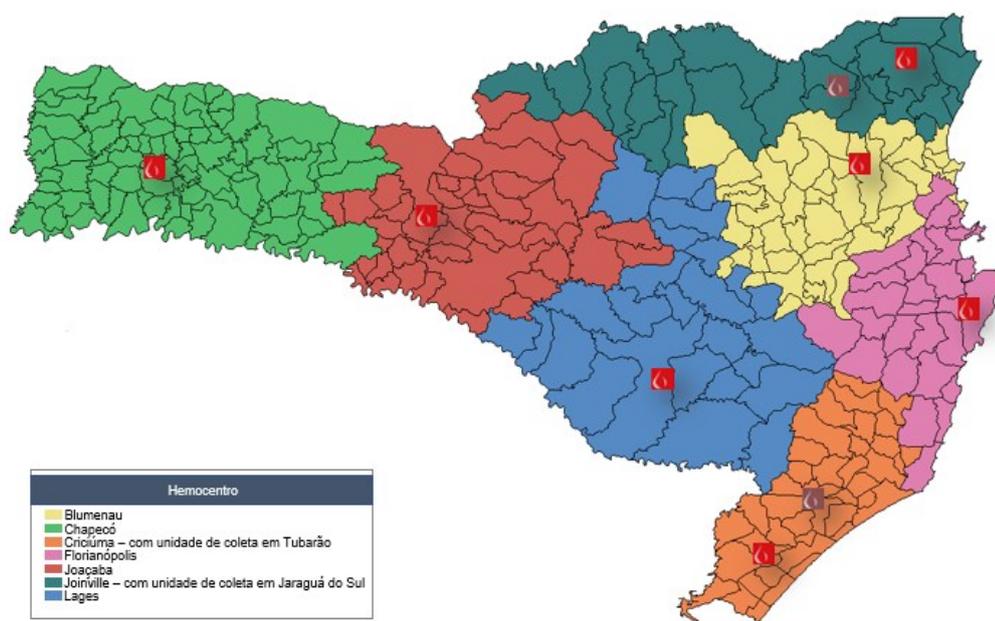
A confecção do banco de dados e a análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas Microsoft Excel 2016, Stata 13.0 e MedCalc 22.0. A razão dos riscos no segundo período comparado com o primeiro foi determinada por meio da regressão de Poisson com intervalo de confiança de 95%, enquanto a associação entre a frequência e a naturalidade dos doadores de sangue foi verificada pelo teste de Qui-quadrado. Para a análise descritiva dos

dados foi determinada a frequência da presença dos alelos mutados na população de Santa Catarina por contagem direta.

Considerando que a informação étnico-racial é um fator limitante na extração dos dados do sistema informatizado do HEMOSC, não sendo tratado como uma informação essencial no momento do cadastro dos doadores, foi definido um mapa de Santa Catarina com regiões relacionando a residência e o local de doação (Figura 9). Com essa informação foi possível determinar as regiões do estado e, assim, associar a presença da deleção c.64\_80del17 com a naturalidade dos doadores de sangue e com a característica étnico-racial autodeclarada branca da população de Santa Catarina do último censo (2022) publicado pelo IBGE (IBGE, 2023).

A definição dos municípios de abrangência para cada um dos hemocentros que compõem a rede estadual de serviços de hemoterapia foi estabelecida levando-se em consideração o local (hemocentro) em que as populações que não possuem hemocentro nas suas cidades realizaram mais doações de sangue nos últimos 10 anos (período entre 01/01/2014 e 31/12/2023) para cada um dos 295 municípios catarinenses (Figura 9).

Figura 9 – Subdivisão do Mapa de Santa Catarina de acordo com a residência e o local onde ocorreu mais doação de sangue no período (01/01/2024 a 31/12/2023). Os hemocentros e unidades de coletas estão destacados com a sua localização aproximada.



#### 4.4 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo teve início após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOSC e da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH). Foi aprovado pelos Comitês de Ética

em Pesquisa a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os doadores, por tratar-se de um estudo em que os dados serão obtidos de forma anônima e que não há intervenções clínicas ou alterações na rotina/tratamento do participante de pesquisa, sem adição de riscos ou prejuízos ao bem-estar dos participantes.

Considerando o baixo número de pessoas sabidamente com o fenótipo Vel negativo ou com baixa expressão, poderá haver o risco, mesmo que pequeno, de quebra de sigilo de forma involuntária ou não intencional. Dessa maneira, para os controles negativos ou com baixa expressão foi aplicado o Termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A). Mesmo assim, as amostras foram processadas através de código de barras, não permitindo a identificação nominal dos doadores.

As amostras são processadas rotineiramente no HEMOSC apenas com código de barras, não permitindo a identificação nominal dos doadores. Nas circunstâncias em que foi necessário acesso ao sistema, foi realizada a anonimização dos dados por dois colaboradores do HEMOSC, com composição de um banco de dados que não identificasse os doadores (APÊNDICE B).

Para o estudo familiar foi aplicado o TCLE (APÊNDICE C), assegurando a manutenção da privacidade e a confidencialidade dos dados acessados e/ou coletados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS MOLECULARES

#### 5.1.1 PCR em tempo real

A validação da estratégia de genotipagem em *pool* utilizada durante a atribuição dos resultados da PCR em tempo real para identificar a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* demonstrou ser eficaz e precisa na identificação de doadores com fenótipos Vel negativos e Vel positivo em heterozigose. Durante a validação, todos os *pools* contendo as amostras Vel com a deleção foram identificados corretamente. Não foram obtidos resultados de *pool* falso-positivos, proporcionando 100% de sensibilidade e especificidade para este teste.

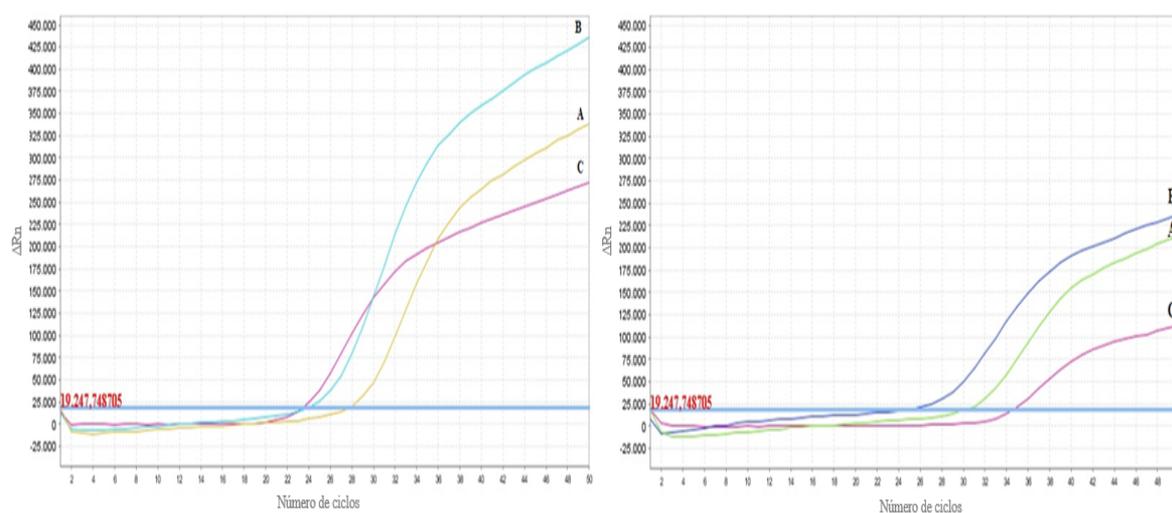
Com a validação foi possível demonstrar a reprodutibilidade e estabelecer o valor médio do Cq, considerando a média dos valores obtidos em triplicata, para DNA plasmático em *pool*, DNA extraído do plasma e DNA extraído do *buffy coat*, para amostras com a presença de deleção c.64\_80del17 no éxon 3 do gene *SMIMI* em homozigose e heterozigose (Tabela 1). A Figura 10 demonstra graficamente o comportamento ao término da reação, com a utilização da

atividade 5' exonuclease da Taq DNA polimerase em sondas marcadas com corantes fluorescentes para amostras com a presença de deleção dos 17nt mencionada em homozigose e em heterozigose.

Tabela 1 - Determinação do *Ciclo de quantificação (Cq)* médio da PCR em tempo real utilizada para detectar a deleção de 17 nucleotídeos no éxon 3 do gene *SMIMI* em homozigose e em heterozigose.

| c.64_80del17 no gene <i>SMIMI</i> | Determinação do Ciclo de quantificação (Cq)          |  |   | Controle negativo |
|-----------------------------------|--|--|---|-------------------|
|                                   | DNA em pool de plasma com 1 amostra com c.64_80del17 | DNA plasmático de amostra com c.64_80del17 | DNA extraído do <i>Buffy coat</i> de amostra com c.64_80del17 |                   |
| Homozigoto                        | 28,75  | 23,37                                      | 23,10   | Não detectado     |
|                                   | 27,79  | 24,21                                      | 23,57   |                   |
|                                   | 27,42  | 25,57                                      | 21,83   |                   |
| <b>Cq médio</b>                   | <b>27,99</b>   | <b>24,38</b>                               | <b>22,83</b>  |                   |
| Heterozigoto                      | 33,61  | 29,34                                      | 34,71   |                   |
|                                   | 30,44  | 25,29                                      | 35,98   |                   |
|                                   | 32,78  | 27,56                                      | 35,82   |                   |
| <b>Cq médio</b>                   | <b>32,28</b>   | <b>27,40</b>                               | <b>35,50</b>  |                   |

Figura 10 – Gráficos de amplificação da PCR em tempo real utilizada para detectar a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* em amostras heterozigotas e homozigotas.



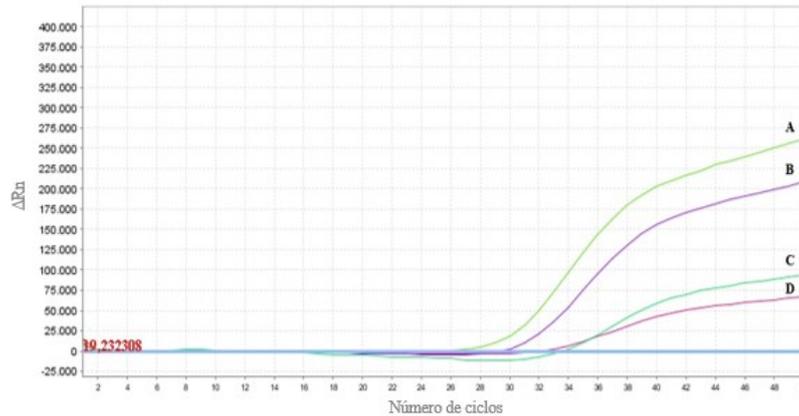
A: DNA em pool de plasma com uma amostra com genótipo *Vel* negativo e cinco amostras com genótipo *Vel* positivo em heterozigose. B: DNA plasmático de amostra com genótipo *Vel* negativo. C: DNA extraído do *Buffy coat* de amostra com genótipo *Vel* negativo.

A: DNA em pool de plasma com uma amostra com genótipo *Vel* positivo em heterozigose e cinco amostras com genótipo *Vel* positivo em heterozigose. B: DNA plasmático de amostra com genótipo *Vel* positivo em heterozigose. C: DNA extraído do *Buffy coat* de amostra com genótipo *Vel* positivo em heterozigose.

Resultados falsos negativos não são esperados, considerando a frequência esperada da alteração gênica e os resultados obtidos na validação. A diluição do DNA plasmático *Vel* negativo em heterozigose e homozigose na proporção 1:10 e 1:20 ainda demonstra reatividade

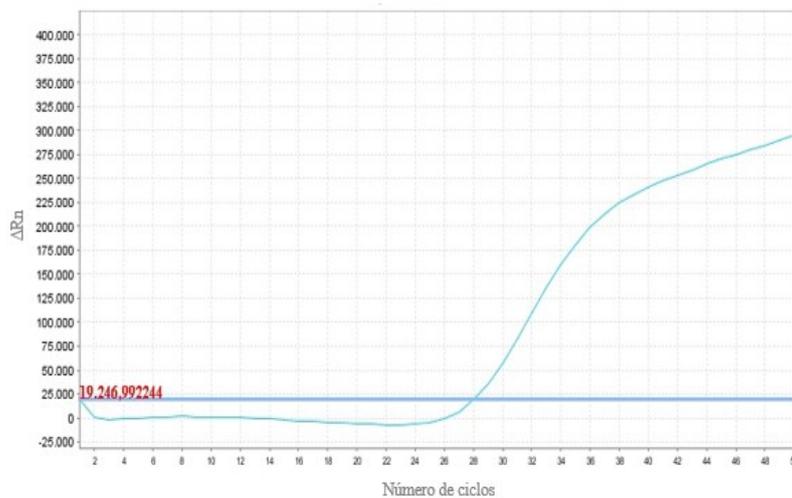
(Figura 11). A reação também demonstrou ser eficiente, com a utilização de duas amostras apresentando a deleção avaliada no mesmo *pool*, ou seja, com sete amostras (Figura 12).

Figura 11 - Gráficos de amplificação da PCR em tempo real utilizada para detectar a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIM1* com utilização de amostra diluída.



Legenda: **A:** DNA plasmático de amostra com genótipo *Vel* negativo e diluição de 1:10. **B:** DNA plasmático de amostra com genótipo *Vel* positivo em heterozigose e diluição de 1:10 **C:** DNA plasmático de amostra com genótipo *Vel* negativo e diluição de 1:20. **D:** DNA plasmático de amostra com genótipo *Vel* positivo em heterozigose e diluição de 1:20.

Figura 12 - Gráfico de amplificação da PCR em tempo real utilizada para detectar a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIM1* com utilização de DNA em *pool* de plasma com uma amostra genótipo *Vel* negativo, uma amostra com genótipo *Vel* positivo em heterozigose e cinco amostras com genótipo *Vel* positivo em homozigose.

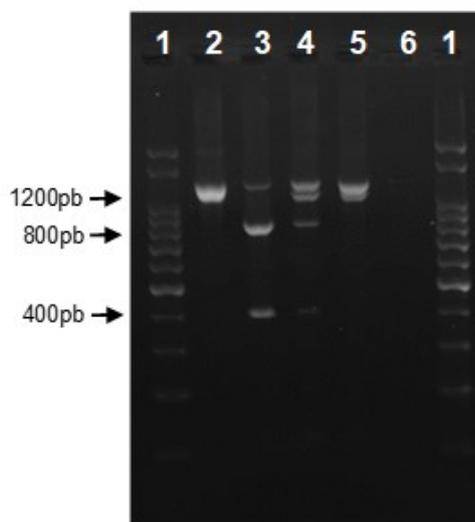


A validação da metodologia de PCR em tempo real para triagem de doadores com fenótipo Vel negativo utilizando *pools* de plasmas demonstra ser um método rápido e preciso quando comparado com as técnicas sorológicas.

### 5.1.2 PCR seguida de análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição

A PCR-RFLP foi validada considerando a concentração o volume dos reagentes e o tempo de incubação com a enzima de restrição recomendados pelo fabricante e o protocolo descrito por Storry e colaboradores, 2013. A especificidade do iniciador foi testada com os controles positivos (material genético contendo a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* em homozigose e em heterozigose) e negativo (material genético sem a presença da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI*). Foi utilizado também branco da reação contendo apenas os reagentes da PCR (Figura 13).

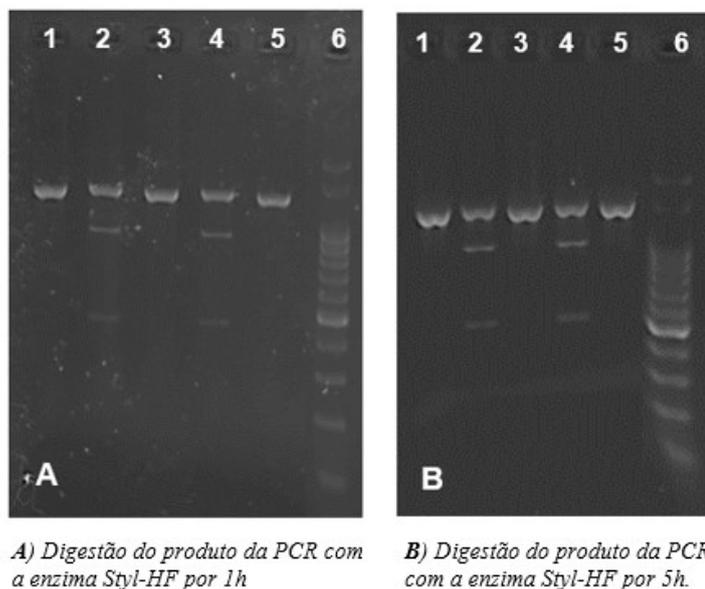
Figura 13 – Análise de restrição dos produtos de PCR para definição da zigosidade da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI*.



Legenda: 1 – padrão de tamanho molecular de 100 pb; 2 – produto da PCR; 3 - amostra sem a presença da deleção (positiva em homozigose), controle negativo; 4 – amostra com a deleção em heterozigose, controle positivo; 5 - amostra com a deleção em homozigose, controle positivo; 6 – branco da reação.

Para a digestão com a enzima *StyI*-HF não foi observada diferença utilizando os tempos de incubação de 1h e de 5h para as amostras testadas, sendo validado com os controles. Considerando que não houve diferença com os tempos de incubação, atribuiu-se o tempo de 1h de digestão para as análises (Figura 14).

Figura 14 - PCR convencional tratada com enzima de restrição *StyI*-HF utilizada para verificar a zigosidade da deleção de 17 nucleotídeos no éxon 3 do gene *SMIMI* com diferentes tempos de digestão.



Legenda: 1,3 – amostra com a deleção em homozigose; 2 – amostra com a deleção em heterozigose; 4 – controle positivo com a deleção em heterozigose; 5 – controle positivo com a deleção em homozigose; 6 - padrão molecular de 100 pb.

A validação da PCR com posterior digestão da enzima de restrição *StyI*-HF apresentou resultado suficiente para diferenciação das amostras com a presença da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* em homozigose (fenótipo Vel negativo) e em heterozigose (fenótipo Vel positivo).

## 5.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS MOLECULARES

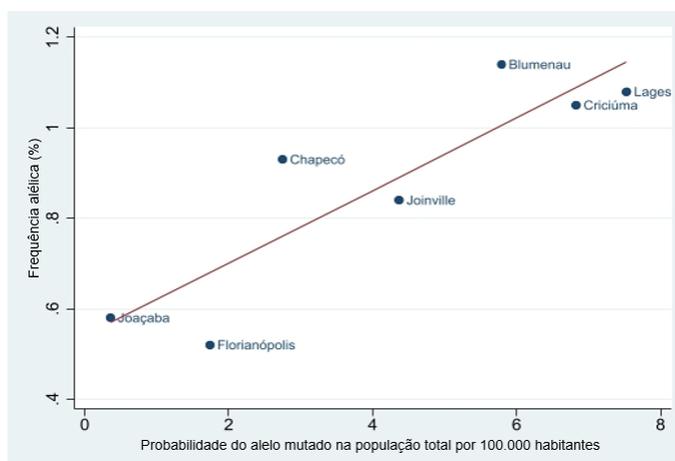
A triagem molecular para deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* foi realizada em 17.472 amostras de doadores de sangue. No período 1 foi realizada a pesquisa em 13.048 amostras de doadores de sangue da hemorrede de Santa Catarina que doaram sangue no período. Com esse número amostral foi possível determinar que os hemocentros de Blumenau, Criciúma, Joinville, Lages e Chapecó possuíam maior frequência para a característica avaliada. Dessa maneira, no segundo momento (período 2), a análise foi concentrada em 4.424 amostras dessas regiões (excluindo os doadores que realizaram a doação em Florianópolis e em Joaçaba). A tabela 2 apresenta o número amostral analisado, sendo que o local de doação de Blumenau possui a maior frequência para a deleção e Lages possui a maior probabilidade de localização do alelo

mutado na população por 100.000 habitantes; com uma relação linear entre a frequência alélica e a probabilidade (Tabela 2; Gráfico 1).

Tabela 2 – Descrição, de acordo com o local de doação de sangue, do número de amostras analisadas com a atribuição da zigosidade para a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI*, definição da frequência e a probabilidade por 100.000 habitantes. Identificação por escala gradual de cores.

| Local de doação de sangue | Período | Genótipo Vel |                           |              |                               |              | Total de amostras |      | Probabilidade (%) de localizar o alelo mutado na população / 100.000 habitantes |                          |
|---------------------------|---------|--------------|---------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|-------------------|------|---|--------------------------|
|                           |         | Heterozigoto | Homozigoto para a deleção | Alelo mutado | Frequência alélica da deleção |              |                   |      |   | Homozigoto sem a deleção |
|                           |         | n.º          | n.º                       | n.º          | (%)                           | (%)          | n.º               | n.º  | n.º   |                          |
| Blumenau                  | 1       | 45           | 1                         | 42           | 0,98                          | 1,14         | 2361              | 2407 | 3581  | 5,59                     |
|                           | 2       | 35           | 0                         |              | 1,49                          |              | 1138              | 1174 |   |                          |
| Chapecó                   | 1       | 27           | 0                         | 13           | 0,98                          | 0,93         | 1345              | 1372 | 1783  | 2,75                     |
|                           | 2       | 6            | 0                         |              | 0,73                          |              | 405               | 411  |   |                          |
| Criciúma                  | 1       | 43           | 1                         | 34           | 1,01                          | 1,05         | 2176              | 2220 | 3205  | 6,83                     |
|                           | 2       | 22           | 0                         |              | 1,12                          |              | 963               | 985  |   |                          |
| Florianópolis             | 1       | 34           | 0                         | 14           | 0,52                          | 0,52         | 3220              | 3254 | 3254  | 1,74                     |
| Joaçaba                   | 1       | 7            | 0                         | 3            | 0,58                          | 0,52         | 595               | 602  | 602   | 0,36                     |
| Joinville                 | 1       | 35           | 2                         | 33           | 0,84                          | 0,84         | 2285              | 2322 | 3709  | 4,37                     |
|                           | 2       | 23           | 0                         |              | 0,83                          |              | 1364              | 1387 |   |                          |
| Lages                     | 1       | 18           | 0                         | 15           | 1,03                          | 1,08         | 853               | 871  | 1338  | 7,53                     |
|                           | 2       | 9            | 1                         |              | 1,18                          |              | 457               | 467  |   |                          |
| <b>Total (n.º)</b>        |         | <b>304</b>   | <b>5</b>                  |              |                               |              |                   |      |   |                          |
| <b>Total (%)</b>          |         | <b>1,74%</b> | <b>0,03%</b>              |              | <b>0,90%</b>                  | <b>0,90%</b> | <b>17162</b>      |      | <b>17472</b>  |                          |

Gráfico 1 – Relação (linha vermelha) entre a frequência alélica da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* e a probabilidade de localizar o Vel mutado, considerando os hemocentros de doação de sangue de Santa Catarina.

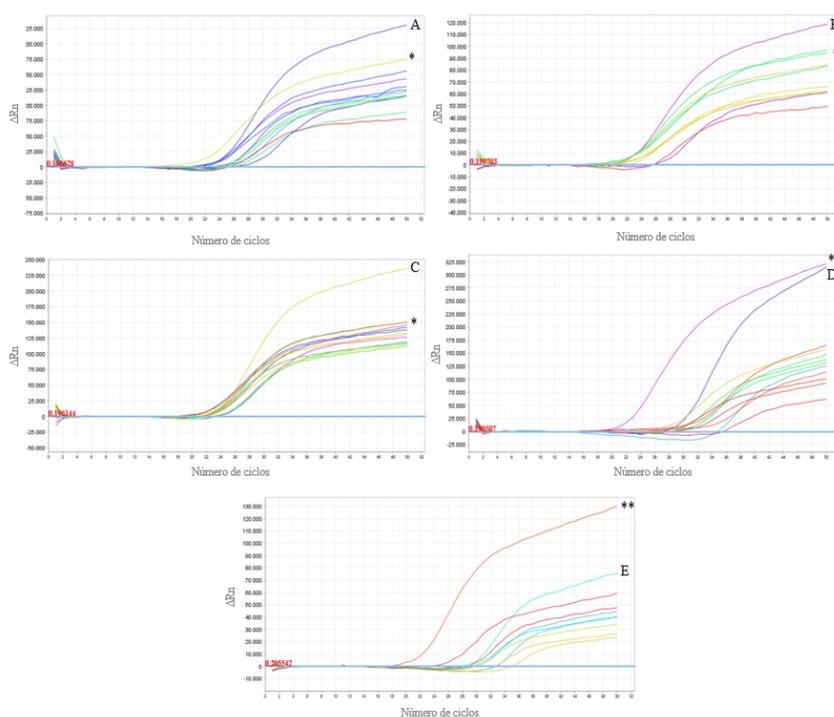


A probabilidade da localização da deleção c.64\_80del17 no período 1 foi de 0,8315% (IC 95%, 0,7281-0,9494) e no período 2 de 1,096% (IC 95%, 0,8985-1,336). A diferença dos

riscos (período 2 versus período 1) foi 0,2647% (IC 95%, 0,02142-0,5081) e a razão dos riscos 1,3184 (IC 95%, 1,034-1,6728). Dessa maneira é possível afirmar que a identificação da mutação aumentou, na média, 31,84% no período 2 comparado com o período 1. Isto demonstra que a estratégia de seleção dos hemocentros de acordo com os resultados do período 1, considerando maior frequência da mutação, foi eficiente.

Foi observado um aumento na altura da curva de amplificação nas amostras com a presença da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* em homozigose, quando comparado com as outras amostras que possuem a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* em heterozigose, podendo estar relacionado com a presença do alvo em maior quantidade considerando que há a deleção nos dois alelos (Figura 15) e ser um fator a ser considerado na priorização dessas amostras para classificação da zigozidade, quando há necessidade de localização mais rápida desses doadores. O Cq das amostras com a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* em homozigose variou de 20 a 28, sendo que algumas amostras em heterozigose também apresentaram esses valores, dessa maneira não é possível inferir que a homozigose está relacionada com o Cq da reação.

Figura 15 – Comparativo entre os gráficos de amplificação da PCR em tempo real utilizada para detectar a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* em heterozigose e em homozigose.



Legenda: A, B, C, D, E: DNA de amostra com genótipo Vel negativo. \*: DNA da amostra de referência com genótipo Vel em heterozigose para a deleção c.64\_80del17. \*\*: DNA da amostra de referência com genótipo Vel em homozigose para a deleção c.64\_80del17.

A média, mediana e a moda do Cq dos *pools* reativos para a deleção para as três categorias foi de 34, com valor máximo e mínimo de 42 a 24, respectivamente. As 17.472 amostras constituíram 2.912 PCRs realizadas em *pools*, sendo que 290 *pools* apresentaram a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* e as amostras foram estudadas individualmente. Havia 26 *pools* com mais de uma amostra com a deleção. A deleção c.64\_80del17 foi encontrada em homozigose em cinco amostras (0,03%; 1:3.994) e as outras 304 amostras (1,74%; 1:57) foram classificadas como heterozigotas para a deleção c.64\_80del17. Considerando o gene testado, 34.944 análises foram realizadas e 314 (1:111) apresentaram a deleção estudada em homozigose ou heterozigose, apresentando uma frequência alélica de 0,90% (Tabela 02).

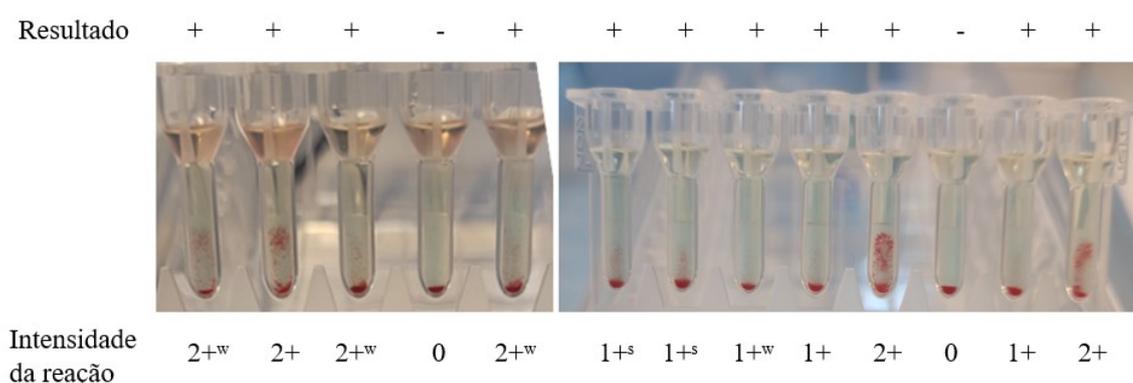
Os cinco doadores identificados como Vel negativos, respeitando a anonimização de dados, foram informados que possuem um sangue raro, consentiram o registro no CNSR e a coleta de outra amostra de sangue. Essa amostra foi utilizada para realização da fenotipagem estendida (para os antígenos: C, c, E, e, K, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S, s) e para a pesquisa de anticorpos irregulares por outras duas metodologias distintas a que é utilizada na triagem dos doadores. Além disso, os doadores de sangue raro foram esclarecidos que a doação de sangue é recomendada que seja realizada somente quando exista uma demanda transfusional e da importância de manter o cadastro atualizado (em caso de mudança de endereço ou telefone). Além disso, também foram esclarecidos sobre a relevância de informar à equipe clínica, caso precise receber transfusão de concentrado de hemácias (Apêndice D).

Diferentes alelos podem ser testados simultaneamente nos ensaios multiplex com PCR em tempo real ou em análise de arranjo de DNA, otimizando a busca genética de doadores raros. Até o momento, o antígeno Vel não está incluso em nenhum painel comercial dessas metodologias, limitando a análise pelas técnicas de PCR convencionais e sorologia. As técnicas sorológicas são trabalhosas com possíveis erros de interpretação dos resultados, considerando a variação na expressão antigênica. A metodologia aplicada neste estudo é uma alternativa para identificar doadores Vel negativos que utiliza uma estratégia de alto rendimento. A genotipagem com o material genético em *pool* utilizada no ensaio da PCR em tempo real para identificar a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* demonstrou ser eficaz na identificação de doadores com Vel negativo e Vel positivo em heterozigose, além de, economicamente atrativa, por utilizar o ácido nucleico purificado da rotina do NAT que seria descartado. O uso de ferramentas moleculares tem sido essencial na rotina dos laboratórios de Imuno-hematologia, aumentando a segurança e eficácia transfusional em receptores politransfundidos.

### 5.3 TRIAGEM SOROLÓGICA PARA O ANTÍGENO VEL

A expressão do antígeno do grupo sanguíneo Vel foi determinada em 146 amostras (com tipagem sanguínea B ou O e que apresentaram a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* identificada por PCR em tempo real) utilizando o ensaio de aglutinação à base de gel-centrifugação, com frequência de 98,63%. Nas amostras analisadas a reatividade variou de negativo a 2+ com intensidade forte, nenhuma amostra apresentou resultado falso negativo (Figura 16).

Figura 16 - Fenotipagem representativa utilizando soro anti-Vel humano com a suspensão de hemácia com tipagem B ou O em teste em gel-centrifugação. A aglutinação foi categorizada em intensidades de reação, variando de negativa (0) a positiva (2+) - podendo ainda ser subclassificada como forte (s) ou fraca (w).



A técnica sorológica para avaliação do antígeno Vel é propensa a variações na interpretação dos resultados e, portanto, pode acarretar resultados falso-negativos, principalmente devido à grande variação na expressão do antígeno, associado com polimorfismos específicos no íntron 2 do gene *SMIMI*. Estudos demonstram uma forte associação entre a expressão do antígeno Vel com a presença da deleção (c.64\_80del) no gene *SMIMI* em heterozigose e do SNP rs1175550 em haplótipos não deletados, embora outros polimorfismos possam estar relacionados e a causalidade não é totalmente clara (Cvejic *et al.*, 2013; Haer-Wigman *et al.*, 2015; Wieckhusen *et al.*, 2015; Christophersen *et al.*, 2017; Arnoni *et al.*, 2019). Para avaliação dos resultados encontrados seria necessário fazer o sequenciamento genético.

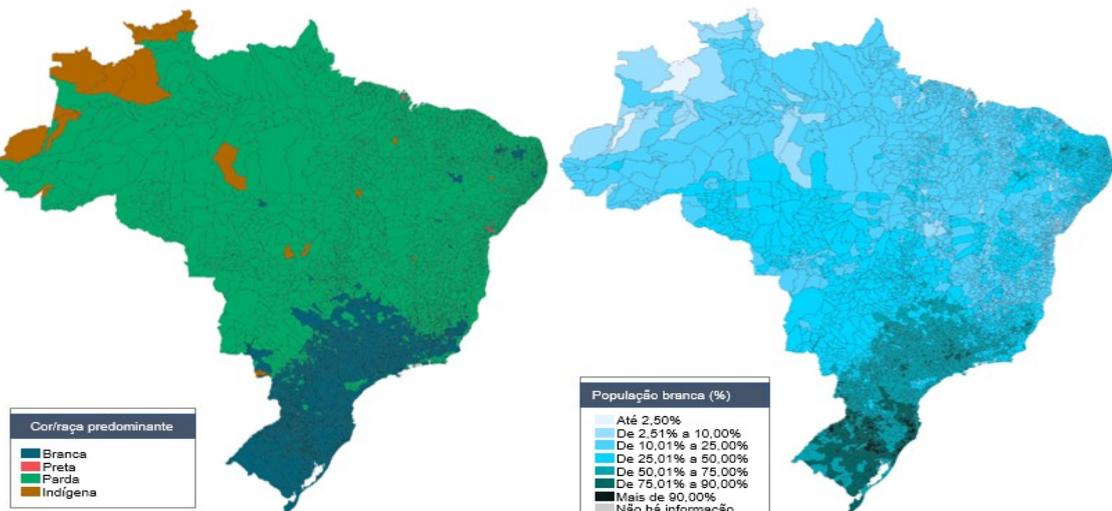
Os resultados apresentados da determinação sorológica são uma complementação após a triagem molecular com posterior determinação da zigozidade para a deleção c.64\_80del17 do

gene *SMIMI* e podem ser considerados complementares ao estudo, não sendo observados resultados falsos negativos.

#### 5.4 ASSOCIAÇÃO COM A NATURALIDADE

A população brasileira apresenta origem étnica heterogênea, resultante de intenso processo de miscigenação, caracterizado pelo alto grau de mistura entre indivíduos de descendência europeia, africana e indígena. Adicionalmente, a vasta extensão territorial do Brasil permitiu que a imigração dos diferentes grupos étnico-raciais ocorresse de forma desigual entre as regiões do país, o que contribuiu para a variação étnica regional também observada (Figura 17) (IBGE, 2023). Devido à grande variabilidade genética da população brasileira, encontrar sangue compatível para atender à demanda para os receptores que necessitam de sangue raro tem sido um desafio significativo no Brasil.

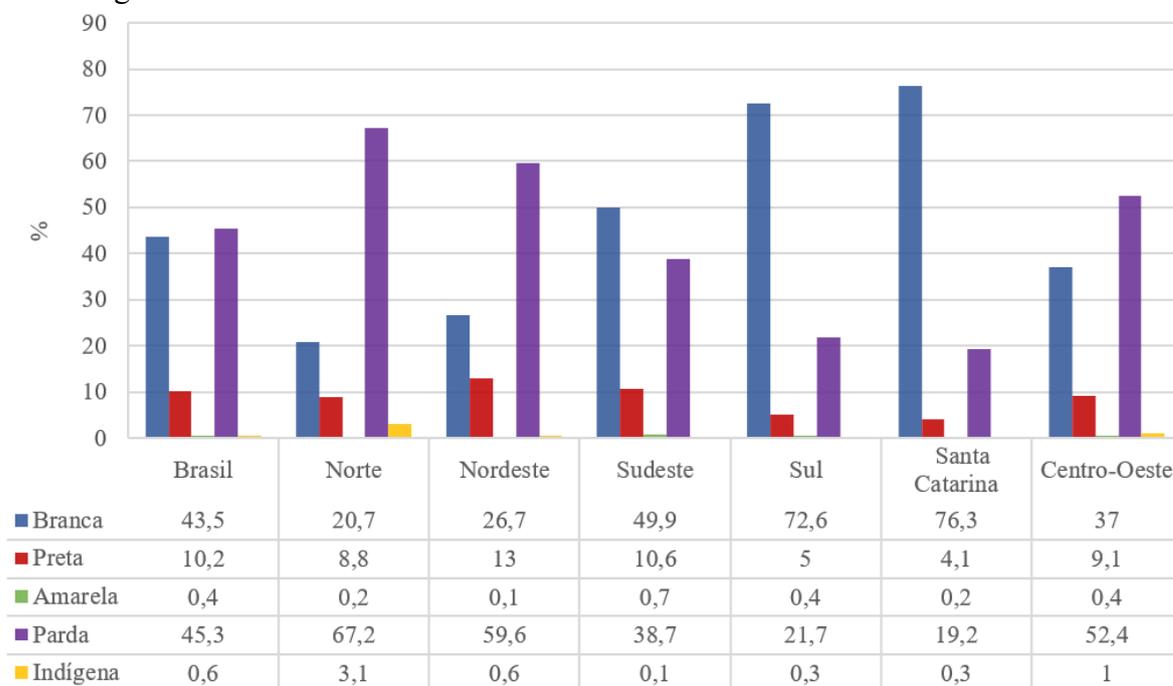
Figura 17 - Mapa à esquerda apresenta a cor/raça predominante no Brasil e à direita a proporção da população branca residente no Brasil. Dados provenientes do Censo de 2022.



Fonte: IBGE, 2023

Segundo uma meta-análise que compilou vários estudos sobre ancestralidade genética da população brasileira, a região Sul do Brasil teve uma maior contribuição de origem europeia quando comparada com as outras regiões brasileiras (Gráfico 2) (Moura *et al.*, 2015). De acordo com o último censo publicado, Santa Catarina é o segundo estado do país com maior percentual de população com identificação étnico-racial branca (76,3%) (Gráfico 2), atrás apenas do Rio Grande do Sul (78,4%) (IBGE, 2023).

Gráfico 2 – Distribuição percentual da população residente, por cor ou raça, no Brasil, nas grandes regiões e no estado de Santa Catarina.



Fonte: dados extraídos do Censo 2022 (IBGE,2023)

Há uma maior frequência do fenótipo Vel negativo no estado quando comparado com o único estudo equivalente em tamanho amostral realizado no país, o que está relacionada diretamente com os dados populacionais descritos. No estudo citado foram localizadas 208 amostras (0,4% 1:122) heterozigotas e duas amostras homozigotas (0,008 1:12.611) para a deleção em 25.322 amostras analisadas de doadores de sangue no sudeste do Brasil (Dezan, 2019). Outro estudo publicado por Arnoni e colaboradores (2019) utilizando quantidade menor de amostras de doadores de sangue do sudeste brasileiro (n: 1.995) não localizou nenhum doador homozigoto para o alelo *SMIM1\*64\_80del*. No sul do Brasil foi realizado em 2016 um estudo do tipo coorte com 448 amostras de doadores de sangue e foi determinada a frequência alélica de 1,12% e não foram localizados doadores com a deleção em homozigose (Costa *et al.*, 2016). Quando comparados os dados com estudos internacionais, é importante destacar que devido a miscigenação da população brasileira, podem ocorrer diferenças nos valores encontrados. Na população europeia há uma variação de 1,46% a 2,90% (Wieckhusen *et al.*, 2015), diferindo da variação encontrada em estudos realizados em países na África e na Ásia, nos quais foram relatadas frequências alélicas de 0,56 e 0,60%, respectivamente (Aniweh *et*

*al.*, 2019). Esses dados sugerem maior expressão de SMIM1 e menor frequência de indivíduos Vel negativos na população afro-americana em comparação com a caucasiana. Apesar de estar de acordo com a literatura, os tamanhos amostrais, particularmente para a África, usados nesses estudos podem ser considerados pouco representativos da população africana (Wieckhusen *et al.*, 2015; Aniweh *et al.*, 2019).

É possível observar que há uma correspondência entre a distribuição da população com identificação étnico-racial branca em Santa Catarina (Figura 18 A) e a localização dos doadores que apresentam a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIM1* em heterozigose e homozigose (Figura 18 B) (Gráfico 3). Quando analisada a Figura 18 C essa correlação não parece estar diretamente relacionada para todas as regiões, fato esse que pode ser explicado pela influência da naturalidade de outros locais, principalmente pessoas vindas do Paraná, do Rio Grande de Sul e de São Paulo, além da própria migração dentro do estado (Tabela 3). Para região de Joinville não é observada uma correlação direta entre a porcentagem de indivíduos caucasianos e a presença da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIM1* em heterozigose e homozigose; porém a alteração dos doadores de Joinville foi identificada em indivíduos com naturalidade principalmente de Blumenau, Chapecó e Criciúma. O mesmo ocorre para a região de Lages, onde há uma contribuição do estado de São Paulo (Tabela 3).

Gráfico 3. Gráfico de dispersão relacionando a proporção de indivíduos identificados como portadores da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIM1* em heterozigose e homozigose e a identificação étnico-racial branca com os dados extraídos do Censo de 2022 (IBGE, 2023).

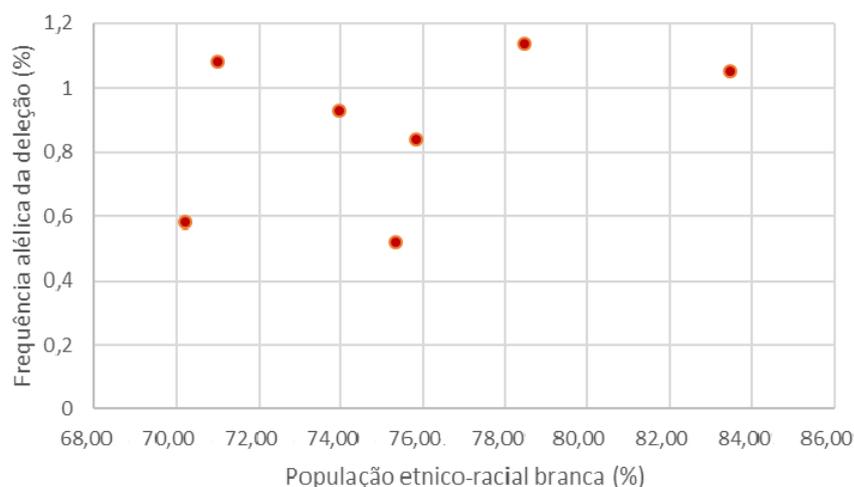
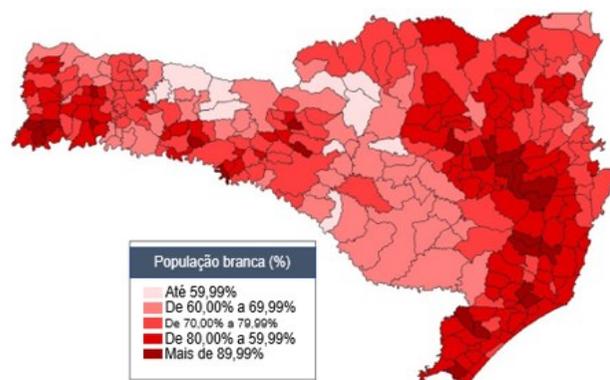
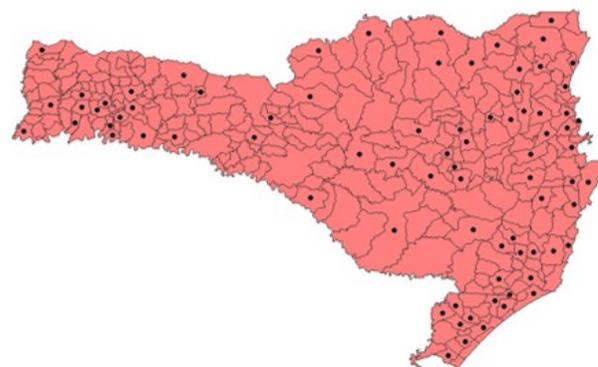


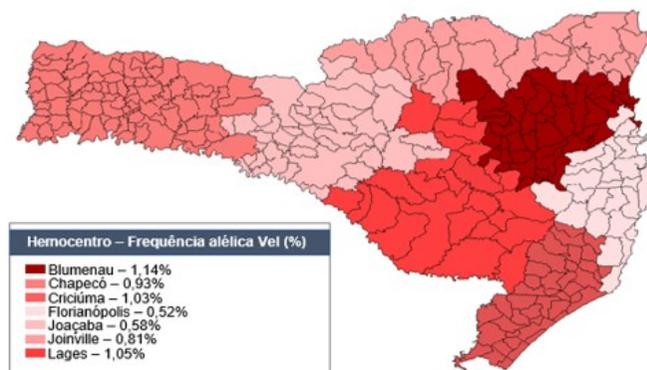
Figura 18. Mapas geográficos do estado de Santa Catarina demonstrando a distribuição da identificação étnico-racial branca segundo dados do Censo 2022 e a naturalidade e a frequência da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIM1* em heterozigose e homozigose nos doadores de sangue, segundo o estudo realizado.



A) Distribuição da população residente no estado de Santa Catarina por cor/raça branca. Dados extraídos do Censo, 2022 (IBGE, 2023)



B) Distribuição da naturalidade dos doadores de sangue (representados pelo pontos) que apresentam a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIM1* em heterozigose e homozigose



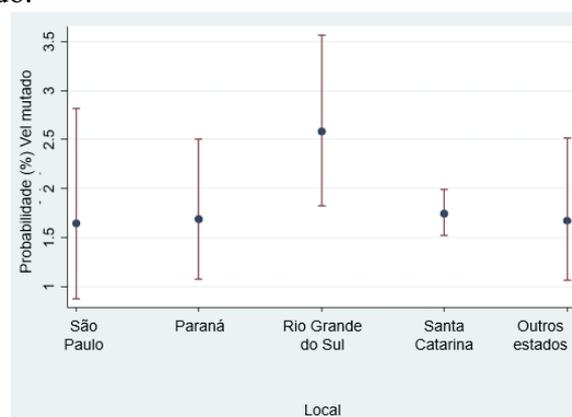
C) Mapa de distribuição da frequência da deleção c.64\_80del17 de acordo com a subdivisão do mapa de Santa Catarina considerando a residência e o local onde ocorreu mais doação de sangue nos últimos 10 anos.

Tabela 3. Dados, por hemocentro, da população total e com identificação étnico-racial branca de Santa Catarina; relacionado com o número de alelo mutado (deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* em heterozigose e homozigose) e a frequência alélica. Identificação por escala gradual de cores. Dados da população extraídos do Censo de 2022 (IBGE, 2023).

| Hemocentro    | População total | População branca |        | Alelo mutado (n.º) | Alelo mutado com naturalidade externa à Santa Catarina |      |     |        | Alelo mutado / população branca (‰) | Frequência alélica (%) |
|---------------|-----------------|------------------|--------|--------------------|--|------|-----|--------|-------------------------------------|------------------------|
|               |                 | Número           | %      |                    | RS   | PR   | SP  | Outros |                                     |                        |
|               |                 |                  |        |                    | Total de amostras testadas                             |      |     |        |                                     |                        |
|               |                 |                  |        |                    | 1432   | 1423 | 790 | 1374   |                                     |                        |
| Blumenau      | 1434122         | 1125043          | 78,45% | 42                 | 14   | 12   |     | 11     | 3,73%                               | 1,14                   |
| Chapecó       | 980580          | 725134           | 73,95% | 13                 | 4  |      |     |        | 1,79%                               | 0,93                   |
| Criciúma      | 938458          | 783219           | 83,46% | 34                 |  |      |     |        | 4,34%                               | 1,05                   |
| Florianópolis | 1956590         | 1474169          | 75,34% | 17                 |  |      |     |        | 1,15%                               | 0,52                   |
| Joaçaba       | 497198          | 349120           | 70,22% | 3                  |  |      |     | 1      | 0,86%                               | 0,58                   |
| Joinville     | 1418219         | 1075469          | 75,83% | 33                 |  |      |     |        | 3,07%                               | 0,84                   |
| Lages         | 385194          | 273398           | 70,98% | 15                 |  |      |     | 6      | 5,49%                               | 1,08                   |

A análise estatística comparando a probabilidade de localizar a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* com Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo ou com outros estados (Tabela 3) apresentou resultado significativo apenas quando comparado com Rio Grande do Sul ( $p=0,0161$ ). O *Odds Ratios* (OR) com intervalo de confiança de 95% demonstra que os doadores com naturalidade do Rio Grande do Sul têm 1,54 (1,08-2,19) vezes mais chances de possuírem a deleção. Isso pode estar relacionado com a maior frequência da população com identificação étnico-racial branca na região, mas também com o tamanho amostral dos outros locais. O gráfico 4 demonstra a probabilidade (com IC 95%) da localização a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* considerando o estado de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e outros estados.

Gráfico 4 – Probabilidade de localizar a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* considerando o estado brasileiro de estudo.



## 5.5 APLICABILIDADE DO RESULTADO

O fluxo para abastecimento da demanda de sangue raro é direcionado pelas atividades exercidas, em diferentes níveis de complexidade, pelos serviços de hemoterapia que compõem a Rede de Serviços de Hemoterapia.

O serviço de hemoterapia, ao identificar a necessidade de transfusão de um paciente portador de sangue raro, deve solicitar suporte técnico-laboratorial ao Serviço de Hemoterapia de Referência Estadual de seu estado para confirmação diagnóstica e discussão sobre possíveis alternativas terapêuticas à transfusão. Após a confirmação da demanda justificada de sangue raro e não havendo a possibilidade de recrutar doadores a nível regional, cabe ao Serviço de Hemoterapia de Referência Estadual solicitar formalmente a consulta ao CNSR. Para solicitação formal de consulta ao CNSR, o Serviço de Hemoterapia de Referência Estadual, em conjunto com o serviço de hemoterapia solicitante, deve fornecer informações clínicas e laboratoriais relevantes para o processo de atendimento à demanda por sangue raro (Ministério da Saúde, 2022).

Durante o desenvolvimento deste trabalho houve uma demanda de sangue com fenotipagem Vel negativo em outro estado. Somente três, dos cinco doadores identificados anteriormente e cadastrados no CNSR possuíam a tipagem sanguínea necessária, porém nenhum estava apto para a doação. Por meio da solicitação da CGSH/MS foi fornecido em caráter emergencial um concentrado de hemácias Vel negativo identificado nesse estudo, que segundo a equipe clínica que atendia ao receptor, auxiliou diretamente no aporte de oxigênio necessário naquele momento.

## 5.6 ESTUDO FAMILIAR

Existem diferentes maneiras de triagem para localização de um sangue com característica rara. A busca familiar é uma das principais estratégias recomendadas para encontrar o fenótipo raro de interesse quando comparada com a busca aleatória nos doadores. Quando se trata de antígeno de alta frequência, a probabilidade de irmãos apresentarem o fenótipo negativo para o antígeno correspondente é de no mínimo 25% (Ministério da Saúde, 2022), frequência essa muito maior do que a triagem aleatória na população de doadores.

Com a busca familiar nos irmãos foi possível localizar mais dois indivíduos Vel negativos (Quadro 3), que também consentiram a inclusão dos seus dados no CNSR. Considerando que um deles não reside em Santa Catarina, a solicitação de inserção desse

indivíduo foi realizada ao Hemocentro de referência do Rio de Janeiro, para o qual foram repassadas as informações.

O estudo familiar demonstrou ser cerca de 1.400 vezes mais efetivo quando comparado com o rastreio realizado com os doadores de sangue, confirmando que a busca em grupos com consanguinidade com um doador que possui sangue com característica rara é uma estratégia mais eficaz. Porém foi necessária a realização desse estudo inicial da população de doadores de Santa Catarina para a localização desses doadores de sangue.

Quadro 3 - Estudo familiar dos doadores identificados como Vel negativos.

| Doador/a | Estudo Familiar             | Resultado da genotipagem para o antígeno Vel (c.64_80del17 no gene <i>SMIMI</i> ) / observação |
|----------|-----------------------------|--|
|          | Número de irmãos/ãs (local) |  |
| 1        | 1 (Portugal)                | Estudo familiar não realizado considerando a logística para transporte da amostra              |
| 2        | 1 (Criciúma/SC)             | Vel positivo (heterozigoto)  |
| 3        | 1 (Joinville/SC)            | Estudo familiar não realizado por decisão do doador/a  |
| 4        | 1 (Minas Gerais)            | Vel positivo (heterozigoto)  |
|          | 1 (Rio de Janeiro)          | <b>Vel negativo (homozigoto)</b>   |
| 5        | 1 (São José/SC)             | <b>Vel negativo (homozigoto)</b>   |

## 5.7 ANÁLISE SOCIAL E DE CUSTO

Os efeitos clínicos da imunização e impactos sobre a gestão e custos do sistema de saúde são potencializados nos casos complexos, como aqueles que envolvem anticorpos contra antígenos de alta frequência na população ou combinações de anticorpos contra antígenos clinicamente significativos. A busca de fenótipos raros precisa ser constante e antecipada à demanda, para que haja um atendimento de qualidade, com eficácia e segurança.

Com este estudo foi possível genotipar 17.472 amostras de doadores no período de estudo para a deleção c.64\_80del17 no gene *SMIMI* com um custo aproximado R\$ 2,28 por amostra e uma economia de cerca de R\$ 4,77 por amostra, considerando a utilização do material genético da rotina do NAT.

O investimento econômico é uma estratégia que precisa ser adotada para atender os receptores aloimunizados com presteza e agilidade. Outro fator importante a ser considerado é a idade média dos doadores identificados como Vel negativo é de 35 anos, o que possibilita, quando é realizada a análise desse critério, a realização de várias outras doações que sejam necessárias e podendo ser aplicadas estratégias de fidelização desses doadores.

## 6 PERSPECTIVAS

O conhecimento das características étnico-raciais da população é útil para projetar métodos que concentrem a pesquisa em locais onde há uma maior probabilidade de localização de doadores de sangue com a característica estudada e posterior realização de estudo familiar. A inclusão dessa informação no sistema informatizado do HEMOSC com capacitação da hemorrede auxiliará diretamente nessa correlação.

O DNA remanescente pode ser utilizado para identificar outros genótipos raros de importância transfusional pelos hemocentros. O desenvolvimento de painéis comerciais de genotipagem que incluam diferentes antígenos raros para uso fora de laboratórios de pesquisa, tornando esta tecnologia mais acessível para aplicação clínica, é uma estratégia que pode ser adotada para o rastreamento em determinadas populações.

Além disso, a realização do sequenciamento genético nas amostras com a presença da deleção c.64\_80del17 no gene *SMIM1* em heterozigose pode possibilitar a associação de novos polimorfismos que ainda não estão descritos na literatura.

É importante também o desenvolvimento de projetos de financiamento por parte do Ministério da Saúde com o objetivo de realizar estudos de importância para a saúde pública.

## 7 CONCLUSÃO

A estratégia de genotipagem do *pool* de DNA usando ensaio de PCR em tempo real com posterior análise de restrição por PCR-RFLP projetado para identificar a deleção c.64\_80del no gene *SMIM1* mostrou-se eficaz e precisa na identificação da deleção pesquisada. A utilização do material genético que seria descartado após os testes de rotina do NAT torna esta técnica economicamente atraente e superior às técnicas sorológicas para busca deste fenótipo raro.

Foi possível determinar a frequência do genótipo que corresponde ao fenótipo Vel negativo e Vel positivo em heterozigose nos doadores de sangue de Santa Catarina (SC), sendo que a região atendida pelo hemocentro de Blumenau apresenta a maior frequência, quando comparada com as demais. Os doadores com o fenótipo raro Vel negativo foram registrados no cadastro informatizado do HEMOSC e catalogados na base de dados do CNSR, aumentando de cinco (5) para 12 o número de doadores com esse genótipo, contribuindo para o atendimento aos receptores sensibilizados.

Ressalta-se, ainda, a relevância do desenvolvimento de estratégias educativas para captação e fidelização de doadores de sangue raro, conscientizando a respeito da importância da condição do doador.

## 8 REFERÊNCIAS

- AMERICAN ASSOCIATION BLOOD BANKING. Technical manual. 20th ed. Illus, 816 p, 2020
- ANIWEH, Y, *et al.* SMIM1 at a glance; discovery, genetic basis, recent progress and perspectives. **Parasite Epidemiology And Control**, [S.L.], v. 5, p. 1-7, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00101>.
- ARNONI, C. P. *et al.* SMIM1 polymorphisms in a donor population from Southeast Brazil and their correlation with VEL expression. **Blood Transfusion**, [S.L.], p. 60-65, 8 jan. 2019. Edizioni SIMTI. <http://dx.doi.org/10.2450/2018.0192-17>.
- ARNAUD, L. *et al.* SMIM1 is a type II transmembrane phosphoprotein and displays the Vel blood group antigen at its carboxyl-terminus. **Febs Letters**, [S.L.], v. 589, n. 23, p. 3624-3630, 9 out. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.09.029>.
- ALVES, *et al.* Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 206-211, 2012. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (RBHH). <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20120051>.
- BALLIF, B. A. *et al.* Disruption of SMIM1 causes the Vel- blood type. **Embo Molecular Medicine**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 751-761, 15 abr. 2013. EMBO. <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201302466>.
- BETTINOTT, Maria P; CARUCCIO, Lorraine. Conceitos da Biologia Molecular. In: HARMENING, Denise M. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transusão**. Rio de Janeiro: Revinter, 2015. p. 77-100.
- CASTILHO, L.; PELLEGRINO JÚNIOR, J. **Blood group genotyping**. 2004. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842004000200012](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842004000200012)>.
- CASTILHO, Lilian. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. **Transfusion**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 28-31, 16 jun. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01307.x>.
- CASTLEMAN, J. S.; KILBY, M. D.. Red cell alloimmunization: a 2020 update. **Prenatal Diagnosis**, [S.L.], v. 40, n. 9, p. 1099-1108, 7 mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.5674>.
- CHRISTOPHERSEN, M. K. *et al.* SMIM1 variants rs1175550 and rs143702418 independently modulate Vel blood group antigen expression. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-11, 13 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep40451>.
- COSTA, D.C. **Investigação do polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no estado de Santa Catarina**. 2016. 107 f. Monografia (Especialização) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/167658>>. Acesso em: out. 2021.
- COSTA, D.C. *et al.* **Screening for the SMIM1\*64\_80 del Allele in blood donors in a population from Southern Brazil**. *Transfusion Medicine*, 2016. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27328373/>>. Acesso em: nov. 2021.
- CVEJIC, A. *et al.* SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 45, n. 5, p. 542-545, 7 abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2603>.
- DANGER, Y.; *et al.* Characterization of a new human monoclonal antibody directed against the Vel antigen. **Vox Sanguinis**, [S.L.], v. 110, n. 2, p. 172-178, 18 set. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/vox.12321>.

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

DANIELS G: **Human Blood Groups**: John Wiley & Sons, 2008

DANIELS, G.; BROMILOW, I. **Essential Guide to Blood Groups**. 3. ed. Bristol: Wiley, 2014

DENOMME, G.A. **Molecular basis of blood group expression**. *Transfus Apher Sci*, v.44, p. 53–63, 2011.

DEZAN, M.R. **Sistema Vel: triagem molecular utilizando DNA obtido de pools de plasma de doadores de sangue**. 2019. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais e Saúde Internacional) - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. doi:10.11606/T.99.2019.tde-03062019-110816. Acesso em: nov. 2021.

DEZAN, *et al.* SMIM1 intron 2 gene variations leading to variability in Vel antigen expression among Brazilian blood donors. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, [S.L.], v. 77, p. 23-28, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2019.03.006>.

DUTRA, V.F. *et al.*, A challenge for blood management: a patient presenting anti :vel antibody undergoing orthotopic liver transplantation. **Transfusion Medicine**, [S.L.], v. 33, n. 5, p. 426-427, 6 set. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tme.12996>.

FASANO, R. M.; CHOU, S. T.. Red Blood Cell Antigen Genotyping for Sickle Cell Disease, Thalassemia, and Other Transfusion Complications. **Transfusion Medicine Reviews**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 197-201, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2016.05.011>

GARRAUD, O.; CHIARONI, J.. An overview of red blood cell and platelet *allo*immunisation in transfusion. **Transfusion Clinique Et Biologique**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 297-306, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2022.08.140>

GERRITSMA, J.J.; *et al.* Back to base pairs: what is the genetic risk for red blood cell alloimmunization?. **Blood Reviews**, [S.L.], v. 48, p. 100794, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2020.100794>

GNOMAAD. **SMIM1 pequena proteína de membrana integral 1 (grupo sanguíneo Vel)**. 2023. Disponível em: <https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000235169>. Acesso em: 29 jan. 2023.

GOVERNO DE SANTA CATARINA. **Responsável por 99% da coleta e distribuição de sangue, HEMOSC completa 36 anos em SC**. Disponível em: <<https://estado.sc.gov.br/noticias/responsavel-por-99-da-coleta-e-distribuicao-de-sangue-hemosc-completa-36-anos-em-sc/>>. Acesso em: 28 jan. 2024.

GUELSIN, G.A.; SELL, A.M.; CASTILHO, L *et al.* **Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil**. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(5):311-316. doi:10.1002/jcla.20407

HAER-WIGMAN, L. *et al.* Impact of genetic variation in the SMIM1 gene on Vel expression levels. **Transfusion**, [S.L.], v. 55, n. 62, p. 1457-1466, 3 fev. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.13014>.

HYLAND, C.A.; ROULIS, E.V.; SCHOEMAN, E.M.. Developments beyond blood group serology in the genomics era. **British Journal Of Haematology**, [S.L.], v. 184, n. 6, p. 897-911, fev. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.15747>.

IBGE. Censo demográfico de 2022: **Identificação étnico-racial da população, por sexo e idade**. Rio de Janeiro, 2023.

ISBT. **Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology**, 2022. Disponível em: <<https://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>>. Acesso em: dez. 2023.

ISBT. **Rare donors**, 2022. Disponível em: < <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rare-donors.html>>.

Acesso em: jan. 2023.

KAHL, J.H.N. **Implantação da técnica MMA (monocyte monolayer assay) na rotina de testes pré-transfusionais do laboratório de imunohematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina**. 2021. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021. Cap. 1.

KUKAR, N. *et al.*. Harkiran. Analysis of red cell alloimmunization in multi transfused patients at a Tertiary care teaching hospital. **Journal Of Family Medicine And Primary Care**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 2907, 2020. Medknow. [http://dx.doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe\\_351\\_20](http://dx.doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe_351_20).

LI, H.Y.; GUO, K.. Blood Group Testing. **Frontiers In Medicine**, [S.L.], v. 9, p., 11 fev. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2022.827619>.

MANTA, FS.N. *et al.*. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 1-11, 20 set. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075145>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Guia do cadastro nacional de sangue raro**. Brasília: 2022. 76 p. Disponível em: [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_cadastro\\_nacional\\_sangue\\_raro.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia_cadastro_nacional_sangue_raro.pdf). Acesso em: 04 jan. 2023.

MOURA, R. R., *et al.*. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. **American Journal Of Human Biology**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 674-680, 26 mar. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajhb.22714>.

NANCE, S. *et al.*. International rare donor panels: a review. **Vox Sanguinis**, [S.L.], v. 110, n. 3, p. 209-218, 21 dez. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/vox.12357>.

QUIRINO, M.G. *et al.*. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. **Hematology, Transfusion And Cell Therapy**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 44-49, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.htct.2018.06.006>.

REDMAN M, REGAN F, CONTRERAS M. **A prospective study of the incidence of red cell alloimmunization following transfusion**. *Vox Sang*. 1996;71(4):216-20

REID, M.E.; LOMAS-FRANCIA, C.; OLSSON, M.L. **The Blood Group Antigen Facts Book** (3rd edn), 2012. Academic Press, San Diego, California.

RIJST, M. V. *et al.*. Identification of a novel single-nucleotide mutation in SMIM1 gene that results in low Vel antigen expression. **Transfusion**, [S.L.], v. 59, n. 10, p. 8-10, 19 jun. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.15411>.

RIJST, M.V.E. *et al.*. SMIM1 missense mutations exert their effect on wild type Vel expression late in erythroid differentiation. **Transfusion**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 236-245, 30 out. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.16169>.

SELTSAM A., *et al.* **Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study**. *Transfusion*, 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1537-2995.2003.00565.x>>. Acesso em: nov. 2021

SINS, J.W.R. *et al.*., Saurabh. Early occurrence of red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease. **American Journal Of Hematology**, [S.L.], v. 91, n. 8, p. 763-769, 24 maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.24397>

SCHÖRNER, E.J.. **Guia Nacional para Implantação de Banco de Sangue com Fenótipos Raros: uma proposta para a hemorrede pública brasileira**. 2015. 40 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em

Hemoterapia e Biotecnologia, Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, 2015.

STORRY, J.R. *et al.* Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 45, n. 5, p. 537-541, 7 abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2600>.

STORRY, J.R.; PEYRARD, T.. The Vel blood group system: a review. **Immunohematology**, [S.L.], v. 33, p. 56-59, jun. 2017.

SULLIVAN, J.K.C.; GLEADALL, N.; LANE, W. J.. Blood Group Genotyping. **Clinics In Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 645-668, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2022.09.016>.

SUSSMAN LN, MILLER EB. **Un nouveau facteur sanguin: Vel** [New blood factor: Vel]. *Rev Hematol.* 1952;7(3):368-71. Undetermined Language. PMID: 13004554.

TONG, T.N.; CEN, S.; BRANCH, D.R.. The Monocyte Monolayer Assay: Past, Present and Future. *Transfusion Medicine Reviews*, [s.l.], p.1-5, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2018.07.004>. Disponível em: . Acesso em: 8 nov. 2018.

TORMEY, C.A.; HENDRICKSON, J. E.. Transfusion-related red blood cell alloantibodies: induction and consequences. **Blood**, [S.L.], v. 133, n. 17, p. 1821-1830, 25 abr. 2019. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2018-08-833962>.

TOURNAMILLE, C.. Les technologies de biologie moléculaire en immunohématologie. **Transfusion Clinique Et Biologique**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 72-79, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2013.02.012>.

WEBB, J.; DELANEY, M.. Red Blood Cell Alloimmunization in the Pregnant Patient. **Transfusion Medicine Reviews**, [S.L.], v. 32, n. 4, p. 213-219, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2018.07.002>.

WESTHOFF, C.M.. Blood group genotyping. **Blood**, [S.L.], v. 133, n. 17, p. 1814-1820, 25 abr. 2019. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2018-11-833954>.

WIECKHUSEN, C. *et al.* Molecular Screening for Vel- Blood Donors in Southwestern Germany. **Transfusion Medicine And Hemotherapy**, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 356-360, 2015. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000440791>.

## **APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AMOSTRA DE REFERÊNCIA**

Meu nome é Danielle Siegel, sou Farmacêutica/Bioquímica do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) e faço mestrado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “Triagem molecular para o sistema Vel utilizando DNA obtido de pools de plasma de doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina”, na qual sou a principal responsável. O objetivo desta pesquisa é identificar doadores de sangue considerados raros do HEMOSC. Os resultados oriundos desta pesquisa poderão ser aplicados, no futuro, para qualidade e segurança transfusional dos receptores de sangue e, também, para ampliar a composição do banco de dados nacional de sangue raro. Você foi selecionado por possuir um sangue com característica rara (fenótipo Vel negativo ou Vel positivo fraco) e que auxiliará na padronização e busca de mais doadores com essa característica. Sua participação é voluntária e você só precisa autorizar a coleta de 25 mL de sangue coletados em tubos contendo o anticoagulante EDTA, em sistema livre de possíveis contaminantes. As informações fornecidas para a pesquisa serão confidenciais, ou seja, seu nome e todos os seus dados serão mantidos sob sigilo durante toda a pesquisa. Todos os pesquisadores e colaboradores envolvidos na pesquisa comprometem-se com a manutenção da privacidade e a confidencialidade dos dados acessados e/ou coletados, sejam individuais ou institucionais, preservando sempre o anonimato, conforme preconizados na Resolução 466/12, bem como suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde e a Diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (CIOMS 2018). Declaramos entender que a integridade das informações, a garantia da confidencialidade dos dados e a privacidade dos indivíduos que terão suas informações acessadas estão sob nossa responsabilidade. Também declaramos que não repassaremos os dados coletados, o banco de dados em sua íntegra (ou em parte) a pessoas não envolvidas na equipe do presente projeto de pesquisa. Ainda, os pesquisadores confirmam haver ciência de que os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para este projeto. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado, será, obrigatoriamente, objeto de um novo projeto de pesquisa, o qual será submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. Os (as) pesquisadores (as) serão as únicas pessoas a terem acesso aos seus dados. No entanto há, mesmo que pequeno, o risco de ocorrer a quebra de sigilo de forma involuntária ou

não intencional, considerando o baixo número de pessoas sabidamente com o fenótipo Vel negativo ou com baixa expressão, mas tentaremos evitar ao máximo que isto ocorra. As amostras serão processadas codificadas, não permitindo a identificação nominal dos doadores. Os resultados dessa pesquisa serão divulgados com objetivo científico e poderão ser utilizados para a publicação em revistas científicas, apresentação em congressos, entre outros, onde seu nome ou alguma informação relacionada à sua privacidade não serão revelados. Os benefícios serão indiretos e irão auxiliar na composição do banco nacional de doadores raros. A sua participação poderá acarretar em riscos inerentes a coleta de sangue, como a formação de um possível hematoma. Você pode desistir da pesquisa a qualquer momento (o que é um direito seu), sem nenhum risco ou sofrer alguma penalidade. Você não terá nenhum custo ou vantagem financeira pela participação nesta pesquisa, como também não terá nenhuma despesa devido a sua participação na mesma e, caso isso venha a ocorrer de forma extraordinária e inesperada, você será ressarcido nos termos da lei. Se ocorrer algum prejuízo material ou imaterial decorrente da pesquisa, você poderá solicitar indenização de acordo com a legislação vigente. Ainda assim, a pesquisadora compromete-se com o cumprimento das exigências contidas nos itens IV. 3 e IV. 4 da resolução 466/12 que rege esse termo. Se você tiver dúvidas em relação à pesquisa ou não quiser mais que seus dados sejam utilizados, você poderá entrar em contato comigo pelo telefone (48) 99183-8394. Informo ainda o telefone (48) 3721- 6094 e e-mail (cep.propesq@contato.ufsc.br), do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, localizado no Prédio Reitoria II, na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 701, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88.040-400. Os resultados da pesquisa poderão ser repassados a você após sua conclusão, bastando apenas informar um e-mail para contato. Como garantia, este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será impresso em duas vias, sendo que você ficará com posse de uma, assinada e rubricada pela pesquisadora. Guarde sua via, pois esta lhe fornece informações de contato e garante seus direitos como participante na pesquisa. Para finalizar, declaro que toda esta pesquisa está adequada com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde sob o nº 466, de 12 de dezembro de 2012, que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisadora responsável (Danielle Siegel – Av. Prof. Othon Gama D'Eça, 756 - Centro, Florianópolis - SC, 88015-240 – Telefone (48) 3251-9717 – Laboratório de Imuno-hematologia do HEMOSC)

## **APÊNDICE B – TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS**

Termo de Compromisso para Uso de Dados Os pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina e do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina, do Programa de Pós-graduação em Farmácia, envolvidos no projeto de pesquisa intitulado “Triagem molecular para o sistema Vel utilizando DNA obtido de pools de plasma de doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina” comprometem-se com a utilização dos dados contidos na bases de dados de acesso restrito do HEMOSIS para fins de pesquisa científica, reiterando que tal acesso somente dar-se-á após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC). Todos os pesquisadores e colaboradores envolvidos na pesquisa comprometem-se com a manutenção da privacidade e a confidencialidade dos dados acessados e/ou coletados, sejam individuais ou institucionais, preservando sempre o anonimato, conforme preconizados na Resolução 466/12, bem como suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde e a Diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (CIOMS 2018). Declaramos entender que a integridade das informações, a garantia da confidencialidade dos dados e a privacidade dos indivíduos que terão suas informações acessadas estão sob nossa responsabilidade. Também declaramos que não repassaremos os dados coletados, o banco de dados em sua íntegra (ou em parte) a pessoas não envolvidas na equipe do presente projeto de pesquisa. Ainda, os pesquisadores confirmam haver ciência de que os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para este projeto. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado, será, obrigatoriamente, objeto de um novo projeto de pesquisa, o qual será submetido à apreciação do CEPSH-UFSC/CONEP. Devido à impossibilidade de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de parte ou totalidade dos indivíduos, todos os pesquisadores e colaboradores envolvidos na manipulação dos dados assinam esse Termo de Consentimento de Uso de Banco de Dados, de modo a salvaguardar os direitos dos participantes.

Nome: Danielle Siegel



Documento assinado digitalmente  
 Danielle Siegel  
 Data: 26/01/2022 22:47:16-0300  
 CPF: 056.003.829-10  
 Verifique as assinaturas em <https://x.ufsc.br>

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: Maria Luiza Bazzo



Documento assinado digitalmente  
 Maria Luiza Bazzo  
 Data: 27/01/2022 00:19:51-0300  
 CPF: 521.035.019-34  
 Verifique as assinaturas em <https://x.ufsc.br>

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: Everaldo José Schörner



Documento assinado digitalmente  
 Everaldo Jose Schorner  
 Data: 27/01/2022 08:21:25-0300  
 CPF: 028.866.019-69  
 Verifique as assinaturas em <https://x.ufsc.br>

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: Paula Roberta de Cezaro de Souza



Documento assinado digitalmente  
 PAULA ROBERTA DE CEZARO DE SOUZA  
 Data: 28/01/2022 11:37:44-0300  
 Verifique em <https://verificador.jti.br>

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: Adriana Brejinski de Almeida



Documento assinado digitalmente  
 ADRIANA BREJINSKI DE ALMEIDA  
 Data: 28/01/2022 10:47:15-0300  
 Verifique em <https://verificador.jti.br>

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ESTUDO FAMILIAR**

Meu nome é Danielle Siegel, sou Farmacêutica/Bioquímica do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) e faço mestrado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “Triagem molecular para o sistema Vel utilizando DNA obtido de pools de plasma de doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina”, na qual sou a principal responsável. O objetivo desta pesquisa é identificar doadores de sangue considerados raros do HEMOSC. Os resultados oriundos desta pesquisa poderão ser aplicados, no futuro, para qualidade e segurança transfusional dos receptores de sangue e, também, para ampliar a composição do banco de dados nacional de sangue raro. Você foi selecionado por possuir consanguinidade com um doador que possui sangue com característica rara (genótipo Vel negativo). Sua participação é voluntária e você só precisa autorizar a coleta de 5mL de sangue coletados em tubos contendo o anticoagulante EDTA, em sistema livre de possíveis contaminantes. As informações fornecidas para a pesquisa serão confidenciais, ou seja, seu nome e todos os seus dados serão mantidos sob sigilo durante toda a pesquisa. Todos os pesquisadores e colaboradores envolvidos na pesquisa comprometem-se com a manutenção da privacidade e a confidencialidade dos dados acessados e/ou coletados, sejam individuais ou institucionais, preservando sempre o anonimato, conforme preconizados na Resolução 466/12, bem como suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde e a Diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (CIOMS 2018). Declaramos entender que a integridade das informações, a garantia da confidencialidade dos dados e a privacidade dos indivíduos que terão suas informações acessadas estão sob nossa responsabilidade. Também declaramos que não repassaremos os dados coletados, o banco de dados em sua íntegra (ou em parte) a pessoas não envolvidas na equipe do presente projeto de pesquisa. Ainda, os pesquisadores confirmam haver ciência de que os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para este projeto. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado, será, obrigatoriamente, objeto de um novo projeto de pesquisa, o qual será submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. Os (as) pesquisadores (as) serão as únicas pessoas a terem acesso aos seus dados. No entanto há, mesmo que pequeno, o risco de ocorrer a quebra de sigilo de forma involuntária ou não intencional, considerando o

baixo número de pessoas sabidamente com o genótipo Vel negativo ou com baixa expressão, mas tentaremos evitar ao máximo que isto ocorra. As amostras serão processadas codificadas, não permitindo a identificação nominal dos doadores. Os resultados dessa pesquisa serão divulgados com objetivo científico e poderão ser utilizados para a publicação em revistas científicas, apresentação em congressos, entre outros, onde seu nome ou alguma informação relacionada à sua privacidade não serão revelados. Os benefícios serão indiretos e irão auxiliar na composição do banco nacional de doadores raros. A sua participação poderá acarretar em riscos inerentes a coleta de sangue, como a formação de um possível hematoma. Você pode desistir da pesquisa a qualquer momento (o que é um direito seu), sem nenhum risco ou sofrer alguma penalidade. Você não terá nenhum custo ou vantagem financeira pela participação nesta pesquisa, como também não terá nenhuma despesa devido a sua participação na mesma e, caso isso venha a ocorrer de forma extraordinária e inesperada, você será ressarcido nos termos da lei. Se ocorrer algum prejuízo material ou imaterial decorrente da pesquisa, você poderá solicitar indenização de acordo com a legislação vigente. Ainda assim, a pesquisadora compromete-se com o cumprimento das exigências contidas nos itens IV. 3 e IV. 4 da resolução 466/12 que rege esse termo. Se você tiver dúvidas em relação à pesquisa ou não quiser mais que seus dados sejam utilizados, você poderá entrar em contato comigo pelo telefone (48) 99183-8394. Informo ainda o telefone (48) 3721- 6094 e e-mail (cep.propesq@contato.ufsc.br), do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, localizado no Prédio Reitoria II, na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 701, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88.040-400. Os resultados da pesquisa poderão ser repassados a você após sua conclusão, bastando apenas informar um e-mail para contato. Como garantia, este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será impresso em duas vias, sendo que você ficará com posse de uma, assinada e rubricada pela pesquisadora. Guarde sua via, pois esta lhe fornece informações de contato e garante seus direitos como participante na pesquisa. Para finalizar, declaro que toda esta pesquisa está adequada com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde sob o nº 466, de 12 de dezembro de 2012, que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisadora responsável (Danielle Siegel – Av. Prof. Othon Gama D'Eça, 756 - Centro, Florianópolis - SC, 88015-240 – Telefone (48) 3251-9717 – Laboratório de Imuno-hematologia do HEMOSC).

## APÊNDICE D – INFORMATIVO SANGUE RARO



# DOADOR SANGUE RARO

### JUNTOS, SALVAMOS VIDAS.



### O QUE É O SANGUE RARO?

Conhecemos nosso tipo sanguíneo, o ABO. Mas temos mais informações – temos várias peças de quebra-cabeças em nosso sangue, em cada hemácia. Cada pecinha chamamos de antígeno. Temos duas definições para sangue raro: pode ser que falte uma peça do quebra-cabeça que quase todo mundo tem ou que você tenha uma combinação diferente de peças.

A definição de sangue raro depende da população. A Sociedade Internacional de Transusão de Sangue (ISBT) considera sangue raro aquele que aparece em menos de 1 pessoa em 1000 testadas.

### PARA QUEM É NECESSÁRIO UM SANGUE RARO?



Para a maioria dos receptores de sangue são selecionados hemocomponentes de acordo com a tipagem ABO e RhD. Porém, em alguns indivíduos, pode ser necessária essa seleção com outros testes, a fenotipagem. Isso porque esses podem ter desenvolvido (ou ter a maior probabilidade de desenvolver) anticorpos contra o sangue recebido e potencialmente apresentar reação transfusional, caso seja transfundido uma bolsa incompatível.

### EXISTE UM REGISTRO?



O Ministério da Saúde possui um cadastro nacional de doadores raros, visando o atendimento mais rápido e seguro para quem precisa. Há também um banco internacional, que pode ser solicitado caso o registro nacional não tenha disponível.

### COMO SURTEM OS SANGUES RAROS?



Geralmente herdamos da nossa mãe e do nosso pai uma característica, quando juntamos o que ganhamos dos dois, podemos ser raros. Dessa maneira, sangue raro é mais frequente entre irmãos.

### QUAIS OUTRAS INFORMAÇÕES SÃO IMPORTANTES?



Se for internado ou precisar realizar algum procedimento, é importante informar. Seu médico precisa saber que você tem sangue raro. Podemos convidar outros doadores raros para doar sangue para você ou coletarmos seu próprio sangue para transfundi-lo, se houver essa possibilidade, com tempo hábil e avaliação médica.



Você pode ser o único doador disponível. É recomendado que a doação seja realizada somente se for convidado e mantenha seu cadastro atualizado para que possamos entrar em contato, caso necessário.