



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

Luis Felipe Nunes

**Triagem sorológica exploratória para o sistema Lan e análise das mutações
mais prevalentes do gene *ABCB6* nos doadores de sangue do Centro de
Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina**

Florianópolis

2026

Luis Felipe Nunes

**Triagem sorológica exploratória para o sistema Lan e análise das mutações
mais prevalentes do gene *ABCB6* nos 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 como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Maria Luiza Bazzo, Dra.
Coorientador: Everaldo José Schörner, Me.

Florianópolis

2026

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

Nunes, Luis Felipe

Triagem sorológica exploratória para o sistema Lan e análise das mutações mais prevalentes do gene ABCB6 nos doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina / Luis Felipe Nunes ; orientadora, Maria Luiza Bazzo, coorientador, Everaldo José Schörner, 2026.
119 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Sistema Lan. 4. Sangue raro. 5. 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.

Luis Felipe Nunes

Triagem sorológica exploratória para o sistema Lan e análise das mutações mais prevalentes do gene *ABCB6* nos doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina

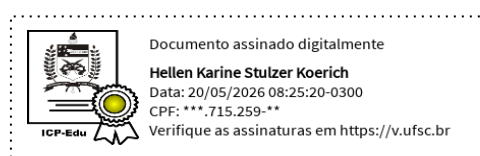
O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 16 de março de 2026, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Ana Carolina Rabello De Moraes, Dra.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

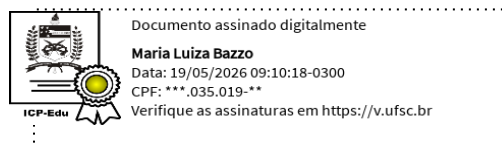
Profa. Patricia Hermes Stoco, Dra.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Maria Luiza Bazzo, Dra.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

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



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Profa. Maria Luiza Bazzo, Dr.(a)
Orientadora

Florianópolis, 2026.

Dedico este trabalho aos doadores e receptores de sangue, cuja generosidade e esperança transformam um gesto simples em vidas renovadas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho está longe de representar um esforço isolado; ao contrário, é fruto de uma construção coletiva, desenvolvida ao longo de anos, por diversas mãos e mentes. Assim, busco expressar minha sincera gratidão a todos que contribuíram não apenas para a obtenção deste título, mas também para a formação do meu Eu pessoal, discente e profissional.

À Professora Doutora Maria Luiza Bazzo, por proporcionar mais uma etapa de crescimento acadêmico e profissional, após minha trajetória no LBMMS desde a iniciação científica, passando pelo Trabalho de Conclusão de Curso, até a presente conquista do título de Mestre. Agradeço por ter me acolhido novamente, sendo ponte e alicerce nesta nova fase, compartilhando ensinamentos valiosos, contribuições essenciais e palavras de incentivo nos momentos em que as respostas não pareciam simples. A ela devo, igualmente, minha paixão pela pesquisa, pelo ensino e pelo pensamento crítico.

Ao Mestre Everaldo José Schörner, pela coorientação dedicada e pela inestimável contribuição técnica e científica em imuno-hematologia e hemoterapia. Mais do que coorientador, agradeço pelos anos de parceria iniciados ainda na graduação, quando me recebeu como estagiário no setor de Imuno-hematologia do HEMOSC. A ele devo também o apreço e o entusiasmo por essa área que hoje integra minha trajetória profissional.

Aos alunos e colaboradores do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Registro agradecimento especial ao Doutor Marcos André Schörner, cuja participação foi fundamental para a conclusão desta dissertação. Sou profundamente grato pelo tempo dedicado, pelo apoio constante e pelas valiosas contribuições, que se estenderam da prática laboratorial à construção e revisão do texto.

À Fundação de Apoio ao HEMOSC/CEPON, pelo financiamento deste projeto. Aos colaboradores e colegas do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), que contribuíram, direta e indiretamente, para a execução deste estudo. Agradeço, de modo particular, aos setores de Imuno-hematologia — por novamente abrirem suas portas para a realização desta pesquisa, especialmente à Mestra Danielle Siegel, pela participação direta na anonimização dos dados e na

etapa do estudo familiar; de Imunogenética — pelas extrações e quantificações do material genético; e ao setor de Sorologia/NAT — pelo apoio diário, pelos momentos de descontração, pelo café compartilhado, pela escuta e pela compreensão das ausências.

Ao setor de Imunofenotipagem do HU/UFSC, pelo apoio na realização voluntária da citometria de fluxo deste estudo, em especial a Heloísa e Chandra, pela dedicação e disponibilidade. E ao Laboratório de Protozoologia, especialmente à Profa. Patricia, por disponibilização do anticorpo utilizado na citometria de fluxo.

Aos colaboradores dos hemocentros participantes do estudo familiar, que prontamente se dispuseram a auxiliar no atendimento, na coleta e no envio das amostras.

Ao Hemocentro Kinki Block da Cruz Vermelha Japonesa, especialmente aos senhores Yoshihiko Tani e Hiroyuki Ishii, pela disponibilização do anticorpo monoclonal anti-Lan, insumo indispensável para a realização deste trabalho e decisivo para que este estudo se concretizasse.

Ao meu marido, Mestre Diego Ailton Prudêncio, meu companheiro de vida e de sonhos, deixo minha mais profunda gratidão. Ele que está comigo para tudo, contra tudo e contra todos. Obrigado por caminhar ao meu lado em cada etapa desta jornada, por compreender minhas ausências e se fazer ausente junto a mim nos imersivos momentos da área acadêmica, acolher minhas inseguranças e celebrar comigo cada pequena conquista. Seu apoio incondicional, sua paciência e seu amor foram e são meu porto seguro nos dias difíceis e minha inspiração para seguir adiante. Esta conquista também é sua, porque sem você nada disso teria sido possível.

À minha família, base de tudo o que sou, expresso minha eterna gratidão. À minha mãe e à minha avó, por serem minhas maiores referências de força, coragem e amor incondicional. Seus ensinamentos me sustentaram até aqui e me fortalecem até o infinito e além. Ao meu irmão, à minha afilhada e ao meu sobrinho por trazerem leveza, alegria e a lembrança constante do que realmente importa. Às minhas cunhadas, pelo carinho, apoio e presença generosa ao longo dessa caminhada. Às minhas duas estrelinhas no céu, meus fiéis companheiros de quatro patas, Nick e Darth, que deixam saudades, mas também memórias de amor puro que sempre me acompanham. E aos meus amigos, por compreenderem minhas

ausências e permanecerem ao meu lado, tornando a jornada mais leve e cheia de significado.

“Tudo o que é excelente é tão difícil quanto raro.”
— Baruch Spinoza

RESUMO

De acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), o antígeno Lan (ISBT 001033), pertencente ao sistema de grupo sanguíneo Lan (ISBT 033), é um antígeno eritrocitário de alta prevalência codificado pelo gene *ABCB6*. O fenótipo Lan negativo é extremamente raro, mas pode levar à formação de aloanticorpos anti-Lan clinicamente significativos. Dados sobre a distribuição desse fenótipo no Brasil ainda são limitados. Foi realizado um estudo transversal com 8.600 doadores de sangue selecionados aleatoriamente na hemorrede do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC). A triagem sorológica para o antígeno Lan foi realizada por teste de antiglobulina indireta em gel (LISS/Coombs), utilizando anticorpo monoclonal anti-Lan (OSK43). Amostras com reatividade reduzida foram submetidas a testes confirmatórios, incluindo adsorção e eluição, citometria de fluxo e análise molecular do gene *ABCB6*. Estudos familiares foram conduzidos quando aplicável. Após exclusões, 8.441 amostras foram analisadas. Cinco doadores apresentaram reatividade persistente $<3+$ após confirmação, correspondendo inicialmente a quatro indivíduos Lan positivo fraco (0,047%) e um classificado como Lan negativo (0,012%). No entanto, análises sorológicas complementares, citometria de fluxo e investigação molecular demonstraram expressão antigênica residual na amostra previamente classificada como Lan negativa, resultando em sua reclassificação como Lan positivo fraco. Dessa forma, a frequência final de indivíduos Lan negativo foi de 0/8.441 (0%), enquanto os fenótipos Lan positivo fraco totalizaram 5/8.441 ($\approx 0,059\%$). Entre essas amostras, foram identificadas seis variantes no gene *ABCB6*, incluindo mutações sinônimas, *missense* e *nonsense*, sendo duas *novel*, incluindo uma com potencial efeito nulo. Este estudo demonstra a viabilidade de uma estratégia de triagem sorológica de baixo custo para a identificação e caracterização de fenótipos raros do sistema Lan em uma grande população de doadores. A identificação de variantes no gene *ABCB6*, incluindo alterações *novel*, evidencia a heterogeneidade genética associada à expressão do antígeno Lan e reforça a importância da integração entre abordagens sorológicas e moleculares. Além disso, os achados destacam o papel de estratégias sistemáticas de triagem na detecção de fenótipos raros e na identificação de doadores com potencial relevância transfusional, contribuindo para o fortalecimento do Cadastro Nacional de Sangue Raro e para a segurança transfusional em populações miscigenadas.

Palavras-chave: Sangue raro; Lan; Doadores de sangue.

EXPLORATORY SEROLOGIC SCREENING FOR THE LAN BLOOD GROUP SYSTEM AND ANALYSIS OF THE MOST PREVALENT *ABCB6* GENE MUTATIONS IN BLOOD DONORS FROM THE SANTA CATARINA HEMATOLOGY AND HEMOTHERAPY CENTER

According to the International Society of Blood Transfusion (ISBT), the Lan antigen (ISBT 001033), belonging to the LAN blood group system (ISBT 033), is a high-prevalence red blood cell antigen encoded by the *ABCB6* gene. The Lan-negative phenotype is extremely rare but may lead to the development of clinically significant anti-Lan alloantibodies. Data regarding the distribution of this phenotype in Brazil remain limited. A cross-sectional study was conducted including 8,600 randomly selected blood donors from the blood center network of the Santa Catarina Hematology and Hemotherapy Center (HEMOSC), Southern Brazil. Serologic screening for Lan antigen expression was performed using indirect antiglobulin gel testing (LISS/Coombs) with the monoclonal anti-Lan reagent OSK43. Samples showing reduced reactivity underwent confirmatory testing, including adsorption and elution assays, flow cytometry, and molecular analysis of the *ABCB6* gene. Family studies were performed when applicable. After exclusions, 8,441 samples were analyzed. Five donors showed persistent reactivity $<3+$ upon confirmatory testing, initially corresponding to four Lan weak-positive individuals (0.047%) and one donor classified as Lan-negative (0.012%). However, complementary serologic analyses, flow cytometry, and molecular investigation demonstrated residual antigen expression in the sample previously classified as Lan-negative, leading to its reclassification as Lan weak-positive. Therefore, the final frequency of true Lan-negative individuals was 0/8,441 (0%), whereas Lan weak-positive phenotypes totaled 5/8,441 ($\approx 0.059\%$). Among these samples, six *ABCB6* variants were identified, including synonymous, missense, and nonsense mutations, two of which were novel, including one with a potential null effect. This study demonstrates the feasibility of a low-cost serologic screening strategy for the identification and characterization of rare Lan phenotypes in a large donor population. The identification of *ABCB6* variants, including novel alterations, highlights the genetic heterogeneity underlying Lan antigen expression and reinforces the importance of integrating serologic and molecular approaches. Furthermore, these findings emphasize the role of systematic screening strategies in the detection of rare phenotypes and in the identification of donors with potential transfusion relevance, contributing to the strengthening of the Brazilian Rare Blood Donor Registry and to transfusion safety in admixed populations.

Keywords: Rare blood type; Lan; Blood donors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da membrana da hemácia com antígenos representativos de grupos sanguíneos.....	36
Figura 2 - Modelo dos componentes da membrana dos glóbulos vermelhos que carregam antígenos de grupos sanguíneos.....	37
Figura 3 - Desenho esquemático da proteína de multipassagem ABCB6 (antígeno Lan) na membrana plasmática.....	39
Figura 4 - Diagrama topológico do monômero hABCB6 com os domínios transmembranares (A), representação da superfície do hABCB6 em vistas inferior e lateral (B) e representação esquemática do hABCB6 (C).	40
Figura 5 - Desenho esquemático do gene <i>ABCB6</i> diferenciando regiões de éxons (verde) e íntrons (linhas).	41
Figura 6 - Fluxograma demonstrativo da estratégia de busca por doadores Lan negativo e Lan positivo fraco.	48
Figura 7 - Representação dos resultados obtidos na reação de hemaglutinação por gelcentrifugação no teste de especificidade do anticorpo monoclonal anti-Lan (OSK43; IgG1κ).....	51
Figura 8 - Representação gráfica do gene <i>ABCB6</i> incluindo éxons e íntrons e do esquema da estratégia de sequenciamento.	54
Figura 9 - Mapa de abrangência da Hemorrede do HEMOSC, sinalizando o Hemocentro Coordenador, os HR e as UC.	67
Figura 10 - Géis de agarose impregnados com brometo de etídio contendo produtos amplificados da PCR A (A) e após purificação do produto de PCR A (B). .	76
Figura 11 - Alinhamento e eletroferograma da mutação c.826C>T (homo) encontrada em indivíduos do estudo.....	80
Figura 12 - Alinhamento e eletroferograma da mutação c.1762G>R (hetero) encontrada em indivíduos do estudo.....	80
Figura 13 - Alinhamento e eletroferograma da mutação c.2148C>M (hetero) encontrada no indivíduo cinco do estudo.	84
Figura 14 - Comparação entre os eletroferogramas e alinhamentos das variantes c.2215C>Y (hetero) e c.2216G>R (hetero).	87
Figura 15 - Desenho esquemático da proteína ABCB6 mapeando as mutações encontradas nos indivíduos do estudo.	88

Figura 16 - Imagem do cartão gel das intensidades de reação do sobrenadante e eluato após adsorção/eluição da amostra previamente classificada como Lan-.....89

Figura 17 - Sobreposição dos gráficos de dispersão bidimensional SSC x FSC (A) e histogramas de fluorescência dos controles (positivos e branco) e da amostra previamente classificada como Lan- (B). 91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -Iniciadores utilizados para amplificação por PCR das regiões do gene <i>ABCB6</i>	55
Quadro 2 - Iniciadores utilizados para sequenciamento dos fragmentos de PCR das regiões do gene <i>ABCB6</i>	58
Quadro 3 - Quantitativo de irmãos incluídos, local de coleta das amostras e seus números de identificação no estudo.	72
Quadro 4 - Determinação e classificação das mutações do gene <i>ABCB6</i> encontradas nos indivíduos do estudo.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cálculo para separação proporcional das amostras da hemorrede com base no número médio de coleta de cada hemocentro.....	46
Tabela 2 - Resultados obtidos no teste de especificidade do anticorpo monoclonal anti-Lan (OSK43; IgG1κ).....	51
Tabela 3 - Resultados por intensidade obtidos no teste de sensibilidade utilizando reagente contendo anticorpo monoclonal com especificidade anti-Lan (OSK43; IgG1κ).	52
Tabela 4 -Protocolo de PCR para amplificação de fragmentos do gene ABCB6 (PCR 1-5).....	56
Tabela 5 - Protocolo de condições de ciclagem do termociclador para reação de PCR para amplificação dos fragmentos do gene ABCB6 (PCR 1-5).....	56
Tabela 6 - Resultados obtidos durante etapa de fenotipagem eritrocitária...	69
Tabela 7 - Resultado da fenotipagem eritrocitária dos irmãos incluídos na etapa de estudo familiar.....	73
Tabela 8 - Resultados de MFI e razão MFI da citometria para os controles e amostra previamente classificada como Lan-.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AABB	<i>Association for the Advancement of Blood & Biotherapies</i>
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
AGH	Antiglobulina Humana
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CEPON	Centro de Pesquisas Oncológicas
CEPSES	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Secretaria de Estado da Saúde
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CGSH	Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados
CIOMS	<i>Council for International Organizations of Medical Sciences</i>
CNSR	Cadastro Nacional de Sangue Raro
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DHFRN	Doença Hemolítica do Feto e do Recém-Nascido
HEMOSC	Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
HR	Hemocentro Regional
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBGRL	<i>International Blood Group Reference Laboratory</i>
IRDP	<i>International Rare Donor Panel</i>
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
LISS	Solução de baixa força iônica
MFI	Intensidade mediana de fluorescência
MS	Ministério da Saúde
NAT	Teste de ácido nucleico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	Sequenciamento de nova geração
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI	Pesquisa de Anticorpos Irregulares
PBS	Tampão fosfato-salino tamponado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TA	Temperatura Ambiente

TAD	Teste da Antiglobulina Direto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UC	Unidade de Coleta
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UK	<i>United Kingdom</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	REFERENCIAL TEÓRICO	35
3.1	TRANSFUSÃO DE HEMÁCIAS E ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA.....	35
3.2	SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS E ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS	35
3.3	ANTÍGENOS DE ALTA PREVALÊNCIA E FENÓTIPOS RAROS	37
3.4	SISTEMA SANGUÍNEO LAN (ISBT 033).....	38
3.5	BASE MOLECULAR DO SISTEMA LAN: O GENE <i>ABCB6</i>	40
3.6	MUTAÇÕES DO <i>ABCB6</i> E FENÓTIPOS LAN NEGATIVO E LAN FRACAMENTE POSITIVO	41
3.7	ANTICORPO ANTI-LAN E IMPLICAÇÕES TRANSFUSIONAIS	42
3.8	ESTRATÉGIAS DE TRIAGEM E RELEVÂNCIA DO ESTUDO	42
4	METODOLOGIA	45
4.1	TIPO DE PESQUISA	45
4.2	PARTICIPANTES/POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	45
4.2.1	Seleção amostral.....	45
4.2.2	Estudo familiar	47
4.2.3	Estratégia de busca para identificação de indivíduos Lan- e Lan(+ ^{wk})...	48
4.3	FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA.....	49
4.3.1	Inspeção e validação	50
4.3.1.1	Especificidade	51
4.3.1.2	Sensibilidade	52
4.3.1.3	Padronização	52
4.4	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>ABCB6</i> (2q36).....	53
4.4.1	Extração, quantificação e avaliação da pureza do DNA genômico.....	54
4.4.2	Amplificação do gene <i>ABCB6</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	55
4.4.3	Purificação dos produtos de PCR	57
4.4.4	Sequenciamento do gene <i>ABCB6</i> pelo método de Sanger.....	58

4.4.5	Análise das sequências e caracterização das variantes genéticas dos éxons do gene <i>ABCB6</i>	59
4.5	ADSORÇÃO E ELUIÇÃO	60
4.5.1	Adsorção do anticorpo anti-Lan (OSK43)	61
4.5.2	Eluição do anticorpo anti-Lan (OSK43)	61
4.6	CITOMETRIA DE FLUXO	62
4.6.1	Validação e padronização do protocolo de sensibilização eritrocitária	62
4.6.2	Citometria de fluxo para detecção indireta de IgG em hemácias	63
4.6.2.1	<i>Sensibilização eritrocitária</i>	63
4.6.2.2	<i>Marcação com anticorpos fluorescentes</i>	64
4.6.2.3	<i>Lavagens e aquisição</i>	64
4.7	ASPECTOS ÉTICOS	65
4.7.1	Riscos	66
4.7.2	Benefícios	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	SELEÇÃO AMOSTRAL E TRIAGEM SOROLÓGICA	67
5.1.1	Seleção amostral	67
5.1.2	Triagem sorológica: Fenotipagem eritrocitária	68
5.1.2.1	<i>Estudo familiar</i>	72
5.2	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>ABCB6</i> E TRIAGEM DAS MUTAÇÕES	74
5.2.1	Correlação intrafamiliar genótipo–fenótipo	82
5.2.1.1	<i>Grupo Familiar B – variante c.826C>T (p.Arg276Trp)</i>	82
5.2.1.2	<i>Grupo Familiar C – variante novel c.2215C>T (p.Arg739Cys)</i>	83
5.2.1.3	<i>Grupo Familiar D – múltiplas variantes e mutação nonsense c.2148C>A (p.Trp716*)</i>	84
5.2.1.4	<i>Comparação entre indivíduos 3 e 4 – nucleotídeos 2215 versus 2216</i>	86
5.2.1.5	<i>Doador inicialmente classificado como Lan negativo</i>	87
5.3	ELUCIDAÇÃO DO ESTUDO SOBRE O INDIVÍDUO QUATRO	88
5.3.1	Adsorção e eluição do indivíduo quatro	88
5.3.2	Citometria de fluxo do indivíduo quatro	90
5.3.3	O indivíduo quatro e sua correlação fenótipo-genótipo após análises complementares combinadas	92
6	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	96
7	PERSPECTIVAS	98

8	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS.....	102
	APÊNDICE A - TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS	106
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	
	ESTUDO FAMILIAR	108
	APÊNDICE C - FORMULÁRIO DE CONTATO COM DOADORES PARA	
	INCLUSÃO DE IRMÃOS NO ESTUDO FAMILIAR.....	110
	ANEXO A – RELATÓRIO INFORMATIVO DO ANTICORPO MONOCLONAL	
	ANTI-LAN (OSK43; IgG1κ).....	113
	ANEXO B – EXEMPLO DE RELATÓRIO DE RASTREABILIDADE DA	
	LEITORA SEMIAUTOMATIZADA DG READER NET (GRIFOLS®).....	115
	ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DOS COMITÊS DE ÉTICA EM	
	PESQUISA COM SERES HUMANOS	116

1 INTRODUÇÃO

A aloimunização eritrocitária permanece como uma das principais complicações imunológicas da terapia transfusional, especialmente em pacientes politransfundidos ou expostos a antígenos de alta frequência populacional. A presença de anticorpos dirigidos contra esses antígenos pode resultar em reações hemolíticas transfusionais e doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN), impondo desafios diagnósticos e logísticos significativos (Brasil, 2022; Tormey; Hendrickson, 2019). Nesse cenário, a identificação prévia de fenótipos raros em doadores de sangue constitui estratégia essencial para ampliar a segurança transfusional e fortalecer bancos de doadores raros (Brasil, 2022; Schörner, 2015).

Os antígenos eritrocitários, organizados em sistemas geneticamente determinados e reconhecidos pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), apresentam frequências variáveis entre populações, refletindo sua base genética e a heterogeneidade étnica. Fenótipos considerados raros são definidos pela ocorrência inferior a 1:1000 indivíduos e frequentemente correspondem à ausência de antígenos de alta frequência (ISBT, 2026a). Entre esses, destaca-se o sistema Lan (ISBT 033), cujo único antígeno é expresso na quase totalidade da população mundial.

O antígeno Lan é veiculado pela proteína codificada pelo gene *ABCB6*, e sua ausência caracteriza o fenótipo Lan- (LAN:-1), estimado internacionalmente em aproximadamente 1:20.000 indivíduos (Helias et al., 2012; Koszarska et al., 2014). Embora clinicamente silencioso em indivíduos saudáveis, o fenótipo Lan- adquire relevância quando há formação de anti-Lan, anticorpo associado a reações transfusionais hemolíticas e à doença hemolítica do feto e do recém-nascido (Brooks; Squires, 2014; Haer-Wigman et al., 2014). Além da ausência completa do antígeno, variantes do gene *ABCB6* podem resultar em expressão reduzida na membrana eritrocitária, configurando o fenótipo Lan positivo fraco (+^{wk}), cuja identificação pode ser dificultada por limitações metodológicas (Helias et al., 2012; Koszarska et al., 2014; McBean et al., 2015; Saison et al., 2013; Tanaka et al., 2014; Xu et al., 2025).

Apesar da importância clínica do sistema Lan, não há dados consolidados sobre a frequência do fenótipo Lan- ou de variantes associadas à expressão

enfraquecida do antígeno na população brasileira. A inexistência de triagem sistemática, aliada à ausência de doadores cadastrados no Cadastro Nacional de Sangue Raro (CNSR), evidencia uma lacuna no cenário nacional. Considerando a heterogeneidade genética da população brasileira e o potencial impacto transfusional do anti-Lan, torna-se relevante investigar a ocorrência desse fenótipo por meio de estratégias sensíveis de triagem sorológica associadas à confirmação molecular.

Diante desse contexto, o presente estudo propõe a triagem exploratória do sistema Lan em doadores de sangue do estado de Santa Catarina, integrando abordagem sorológica em larga escala e investigação do gene *ABCB6*, com o objetivo de estimar a frequência local dos fenótipos Lan- e Lan positivo fraco, contribuir para o fortalecimento do CNSR e fornecer informações para subsidiar novos estudos para localização de doadores Lan-.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar doadores de sangue com fenótipo Lan negativos (-) ou positivos fraco (+^{wk}) do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência do antígeno Lan nos doadores de sangue do Hemocentro de Santa Catarina;
- Realizar estudo familiar dos doadores de sangue do HEMOSC com fenótipo Lan negativo ou positivo fraco;
- Caracterizar as mutações presentes na população de doadores do HEMOSC que levam ao fenótipo Lan negativo ou positivo fraco;
- Realizar adsorção e eluição das amostras previamente caracterizadas como Lan negativo ou inconclusivo;
- Padronizar citometria de fluxo para detecção indireta do anticorpo monoclonal OSK43;
- Realizar citometria de fluxo das amostras previamente caracterizadas como Lan negativo ou inconclusivo e determinar os seus possíveis fenótipos;
- Estabelecer fluxograma para busca de doadores com fenótipo raro Lan negativo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 TRANSFUSÃO DE HEMÁCIAS E ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA

A transfusão de concentrado de hemácias é um dos procedimentos mais comuns realizados durante hospitalizações, sendo uma terapia indicada principalmente para o reestabelecimento da deficiência do transporte de oxigênio como em casos de anemias agudas e crônicas. Apesar de salvar vidas, a transfusão não é isenta de riscos e esses geralmente estão associados à aloimunização eritrocitária. Estima-se que 30% dos aloanticorpos não sejam identificados e torna-se um risco ainda maior quando o paciente recebe transfusões recorrentes e apresenta múltiplos anticorpos com especificidade diferentes ou contra antígenos de alta frequência populacional (Brasil, 2022; Tormey; Hendrickson, 2019).

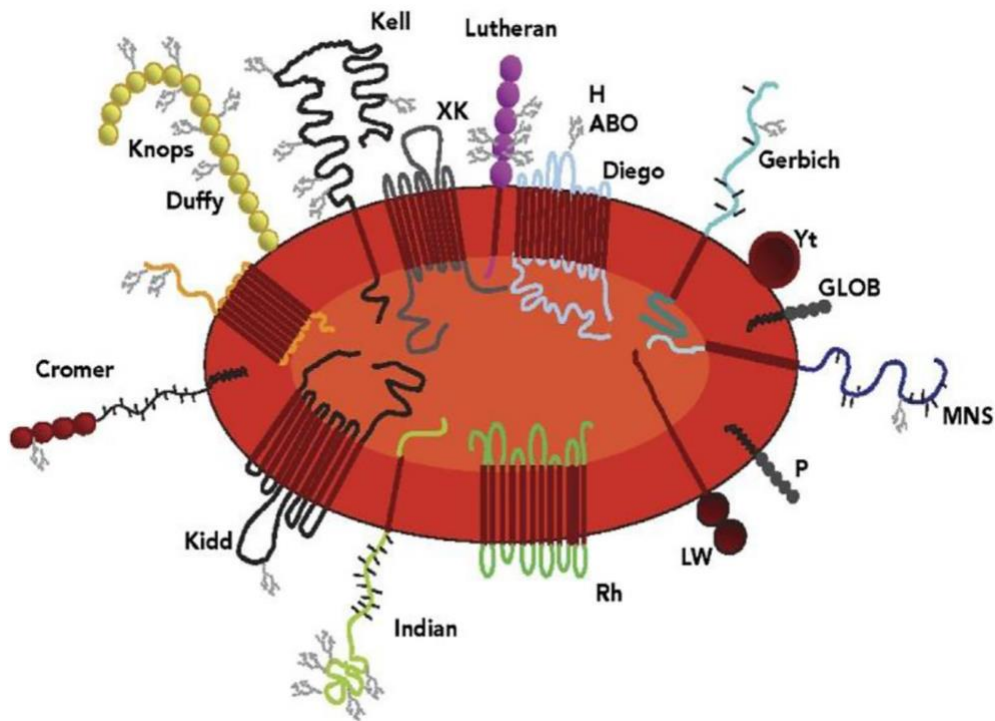
A aloimunização é uma complicação grave e frequente que pode culminar na redução da sobrevivência da hemácia devido aos quadros de anemia hemolítica agudas e tardias. Também pode ser desafiadora nos casos de DHFRN (Alves et al., 2012; Brasil, 2022; Moise, 2005; Redman; Regan; Contreras, 1996; Tormey; Hendrickson, 2019). A formação desses anticorpos pode ocorrer através do contato com o meio, de transfusões sanguíneas e/ou gestação, já que há uma exposição antigênica à determinantes não próprios localizados na superfície da membrana eritrocitária. Esses determinantes compõem os antígenos de grupos sanguíneos (Brasil, 2022; Daniels, 2013).

3.2 SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS E ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS

Em 1902, Landsteiner, descreveu o primeiro grupo sanguíneo (ABO) e desde então foram criados critérios, regras e nomenclaturas para caracterização e classificação desses antígenos. Já foram descritos 398 antígenos eritrocitários, sendo 371 deles classificados em 48 sistemas de grupo sanguíneo distintos e outros 27 enquadrados em coleções e séries (ISBT, 2026b; Reid; Lomas-Francis; Olsson, 2012). Os antígenos eritrocitários humanos estão presentes em estruturas da membrana da hemácia e desempenham naturalmente função para a célula, também sendo capazes de estimular o sistema imune a produzir anticorpos (Figura 1). Podem ser constituídos por uma proteína a partir da formação de cadeias de

aminoácidos, mas também podem apresentar natureza glicoproteica e glicolípídica (Figura 2).

Figura 1 - Desenho esquemático da membrana da hemácia com antígenos representativos de grupos sanguíneos.



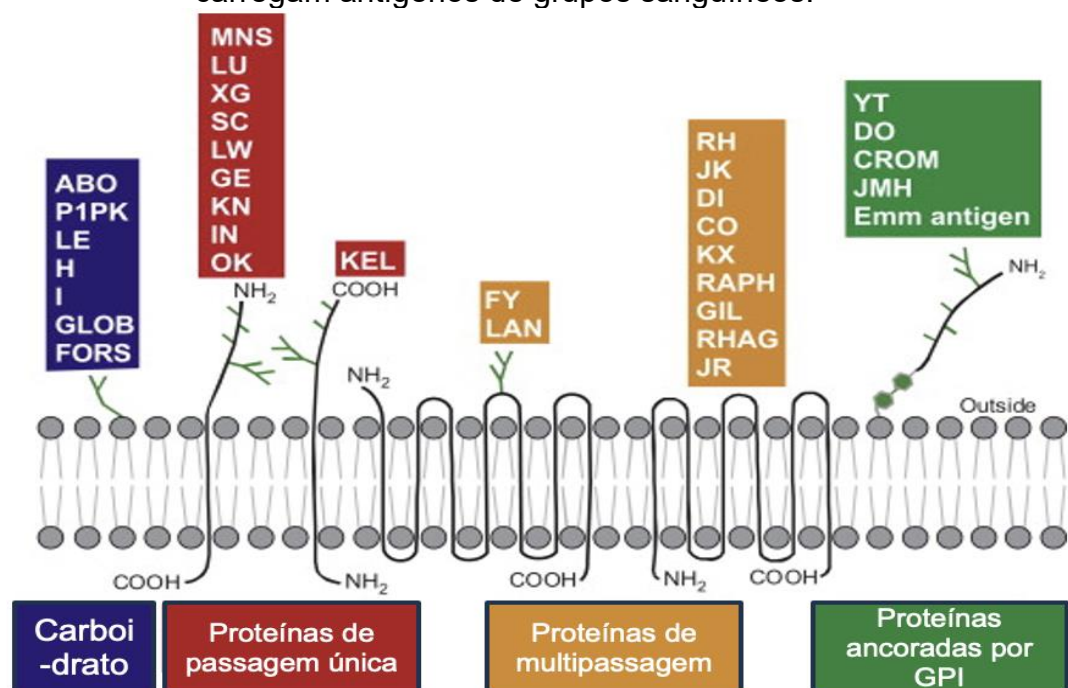
Fonte: Extraído de Smart; Armstrong (2020).

As principais funções desempenhadas pelas estruturas onde estão localizados os antígenos nos glóbulos vermelhos são: transporte de membrana; receptores e moléculas de adesão; regulador o complemento; enzimática; ser componente estrutural e do glicocálix; entre outros (Bonifácio; Novaretti, 2009; Brasil, 2022; Daniels, 2013; ISBT, 2026b; Reid; Lomas-Francis; Olsson, 2012).

A presença de um ou mais desses antígenos, controlados por um gene único ou pelo complexo de dois ou mais genes homólogos intimamente ligados e sem recombinação gênica, apresentando características polimórficas bem definidas na membrana eritrocitária compõem os sistemas de grupos sanguíneos, sendo que eles devem ser distintos entre si (Daniels, 2013; ISBT, 2026a). Todos os genes que caracterizam sistemas de grupos sanguíneos já foram identificados e sequenciados. A presença ou ausência de um antígeno de superfície da membrana eritrocitária relacionado a um sistema de grupo sanguíneo caracteriza o fenótipo de um indivíduo

e está intimamente relacionado ao seu genótipo herdado. Por isso, como os antígenos eritrocitários apresentam base genética, a frequência pode variar de uma população para outra, sendo passada de uma geração para a próxima (Daniels, 2013; ISBT, 2026b; Reid; Lomas-Francis; Olsson, 2012). Assim, mutações espontâneas, casamentos consanguíneos, subdivisões de populações em grandes isolados e até seleção por patógenos são possíveis efeitos causadores de mutações que podem levar ao surgimento de tipos de sangue raro (Brasil, 2022).

Figura 2 - Modelo dos componentes da membrana dos glóbulos vermelhos que carregam antígenos de grupos sanguíneos.



Fonte: Extraído e traduzido de Reid; Lomas-Francis; Olsson (2012).

3.3 ANTÍGENOS DE ALTA PREVALÊNCIA E FENÓTIPOS RAROS

Segundo a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT, 2026a), um tipo sanguíneo raro é a denominação para quando a frequência de dado fenótipo na população é inferior a um para cada mil indivíduos (<1:1000), incluindo grupos sanguíneos de fenótipo negativo para antígenos de alta frequência ou negativo para múltiplos antígenos de um mesmo sistema e/ou diferentes sistemas. Dessarte, um fenótipo considerado raro para uma população, não necessariamente será para outras populações (Brasil, 2022; ISBT, 2026a; Schörner, 2015). O desafio inicia quando os receptores de glóbulos vermelhos se enquadram nesses quesitos e

necessitam de uma bolsa de concentrado de hemácias compatíveis, principalmente após apresentarem aloimunização (Garraud; Chiaroni, 2022; Tormey; Hendrickson, 2019). Em cirurgias eletivas, em casos de quadro clínico compatível, é possível recorrer à doação autóloga, mas em outros é necessário partir para outras estratégias em busca do fenótipo raro desejado, sendo a busca familiar a mais recomendada, embora também seja possível recorrer ao banco de dados nacional ou internacional de doadores de sangue com fenótipos raros (Brasil, 2022; ISBT, 2026a; Nance et al., 2016; Westhoff, 2019).

Há décadas, internacionalmente, essas questões já são uma preocupação e são debatidas. Com esse intuito, iniciou-se o planejamento da criação de um banco de dados que possibilitasse uma localização rápida e precisa de unidades de sangue raro para atender às necessidades desses receptores. Por consequência, em 1965, a ISBT instituiu o *International Rare Donor Panel* (IRDP) da Organização Mundial da Saúde (OMS) por meio da cooperação do *International Blood Group Reference Laboratory* (IBGRL) e do grupo de trabalho da ISBT, sendo bastante ativos no serviço de suporte às demandas que envolvem doadores de sangue raro. No Brasil, em 2016, o Ministério da Saúde vendo a importância da aplicabilidade desse serviço a nível nacional, através da Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH/MS), estabeleceu o Cadastro Nacional de Sangue Raro (CNSR). Este banco de dados centralizado contém informações sobre doadores com fenótipos eritrocitários raros registrados nos hemocentros públicos do Brasil (ISBT, 2026a; Schörner, 2015).

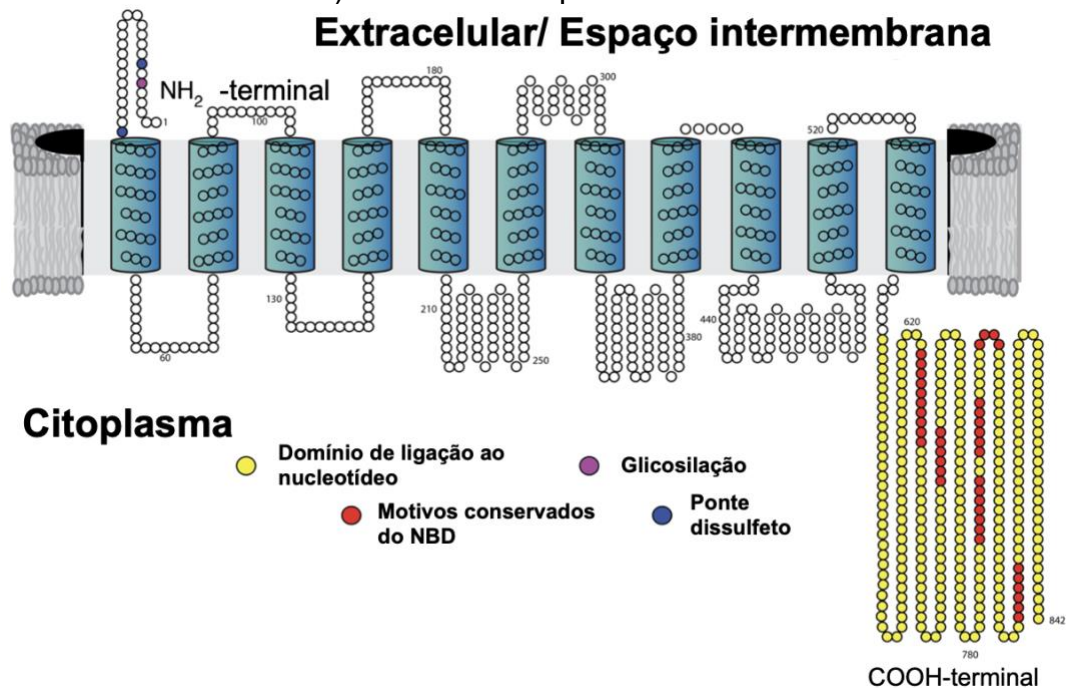
3.4 SISTEMA SANGUÍNEO LAN (ISBT 033)

Dentre os sistemas de grupos sanguíneos caracterizados por antígenos de alta prevalência, destaca-se o sistema Lan (ISBT 033).

O antígeno de grupo sanguíneo Lan (ISBT 001033) é considerado de alta frequência e, portanto, o fenótipo negativo (LAN:-1) é considerado raro com sua frequência estimada em 1:20000 e não há registros de doadores brasileiros Lan-cadastrados no CNSR. Internacionalmente, há ao menos 40 doadores Lan-cadastrados e 34 com fenótipo variante identificado (Brasil, 2022; Koszarska et al., 2014; Nance et al., 2016).

A primeira descrição do antígeno Lan ocorreu em 1962, quando van der Hart e colaboradores identificaram que um anticorpo causou reação transfusional severa e imediata, enquanto não reagia com a hemácia do paciente, Sr. Langereis, e de seu irmão. A partir desse momento mais casos foram descritos no mundo, apresentando reação transfusional hemolítica (de leves a severa) e DHFRN (de leves a média severidade) (Brooks; Squires, 2014; Rosa, 2018; Sharma et al., 2020; Smith et al., 1969). Em 1990, a ISBT, baseando-se na independência dos demais antígenos, incluiu o antígeno Lan na série 901 de Antígenos de Alta Incidência (901.002). Em 2012, a base molecular do antígeno de grupo sanguíneo Lan foi reconhecida e associada ao gene *ABCB6* e o gene responsável por controlar a expressão da proteína homônima (Figura 3) (Haer-Wigman et al., 2014; Helias et al., 2012; Koszarska et al., 2014; Reid et al., 2014; Tanaka et al., 2014).

Figura 3 - Desenho esquemático da proteína de multipassagem ABCB6 (antígeno Lan) na membrana plasmática.

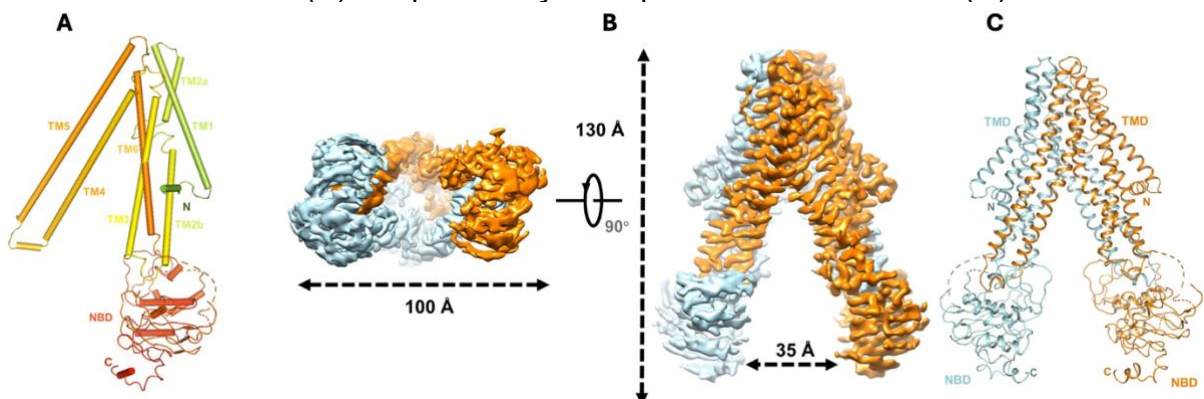


Fonte: Extraído e traduzido de Boswell-Casteel; Fukuda; Schuetz (2018).

3.5 BASE MOLECULAR DO SISTEMA LAN: O GENE *ABCB6*

Os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) são essenciais para diversos processos fisiológicos e são uma das maiores famílias de proteínas existentes desde bactérias até os humanos. As proteínas ABC são divididas em subfamílias e membros, sendo o antígeno Lan caracterizado pela proteína ABC, família B, membro 6 (Figura 4). Por muito tempo sua função foi atribuída à mitocôndria, mas alguns estudos sugerem a localização da proteína ABCB6 em outras organelas do sistema vesicular, como no complexo de Golgi, e principalmente na membrana plasmática devido a uma forte suspeita de desenvolver papel importante na multirresistência a fármacos (Helias et al., 2012; Paterson et al., 2007).

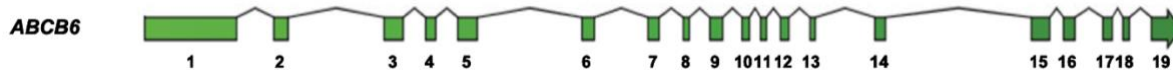
Figura 4 - Diagrama topológico do monômero hABCB6 com os domínios transmembranares (A), representação da superfície do hABCB6 em vistas inferior e lateral (B) e representação esquemática do hABCB6 (C).



Fonte: Extraído e modificado de Song et al. (2021).

O gene *ABCB6* possui 9,2kb, compreende 19 éxons, sendo localizado no cromossomo 2q36 e codifica a proteína ABCB6 composta por 842 aminoácidos N-glicosilados de multipassagem (Figura 5). Apesar do banco de dados de *SNP* do *NCBI* listar cerca de 417 variantes para a proteína ABCB6, apenas 34 até o momento estão envolvidas com o fenótipo Lan negativo (Bonifácio; Novaretti, 2009; Helias et al., 2012; Koszarska et al., 2014; Reid; Lomas-Francis; Olsson, 2012; Tanaka et al., 2014).

Figura 5 - Desenho esquemático do gene *ABCB6* diferenciando regiões de éxons (verde) e íntrons (linhas).



Fonte: Extraído e modificado de (Helias et al., 2012).

3.6 MUTAÇÕES DO GENE *ABCB6* E FENÓTIPOS LAN NEGATIVO E LAN FRACAMENTE POSITIVO

Alguns estudos com pesquisa em larga escala de doadores encontraram a presença de uma expressão fraca do antígeno Lan na superfície da hemácia, parecendo ser mais comum do que previamente se especulava, baseado na baixa frequência do tipo sanguíneo Lan negativo. A ausência desse antígeno na membrana da hemácia já foi descrita em indivíduos caucasianos, pretos e asiáticos, com grande número de mutações prevalente em caucasianos. Ainda assim, o antígeno Lan é um antígeno eritrocitário de alta prevalência, veiculado pela proteína *ABCB6* e expresso em praticamente todos os indivíduos; dessa forma, o fenótipo Lan negativo é extremamente raro em nível mundial, não estando restrito a grupos étnicos específicos e sendo clinicamente silencioso em indivíduos saudáveis (Haer-Wigman et al., 2014; Reid et al., 2014; Tanaka et al., 2014).

Helias e colaboradores (2012) demonstraram que apesar da proteína *ABCB6* desenvolver um papel importante na exportação de porfirina através da membrana plasmática da hemácia, a sua deficiência não está relacionada a casos de incompatibilidade com a vida, sendo não apenas viável como assintomático. O aumento discreto de porfirina nas hemácias de indivíduos Lan- correlaciona sua função de exportação do composto pela membrana plasmática, mas também sugere que outro transportador de porfirina através da membrana das células vermelhas possa compensar a ausência da *ABCB6* (possivelmente a *ABCG2* desenvolva esse papel similar) (Helias et al., 2012). Alguns estudos alertam que esses indivíduos podem estar envolvidos com processos de hepatotoxicidade pela alteração na farmacocinética de fármacos envolvidos com o transporte pela *ABCB6*. Também podem estar relacionados com casos de pseudo-hipercalcemia familiar autossômica dominante e com coloboma, um defeito no desenvolvimento ocular (Helias et al., 2012; Reid et al., 2014).

3.7 ANTICORPO ANTI-LAN E IMPLICAÇÕES TRANSFUSIONAIS

A maior dificuldade que pode ser enfrentada por indivíduos Lan negativo está associada ao desenvolvimento de anticorpos anti-Lan e a necessidade de receber uma transfusão sanguínea compatível. Esse processo pode ser bastante desafiador não apenas pela escassez de doadores Lan-, mas também pela dificuldade de identificação, seja pela ausência de hemácias testadas nos painéis de hemácias utilizados para resolução dos casos, mas principalmente pela ausência de reagentes confiáveis para diagnóstico de pacientes e busca de doadores (Helias et al., 2012). A presença de anti-Lan em receptores está associada a reações transfusionais hemolíticas (leves a severa) e à DHFRN (leves a média severidade) (Brooks; Squires, 2014; Haer-Wigman et al., 2014; Helias et al., 2012; Koszarska et al., 2014; Reid et al., 2014; Reid; Lomas-Francis; Olsson, 2012; Sharma et al., 2020; Smith et al., 1969).

3.8 ESTRATÉGIAS DE TRIAGEM E RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Em 2012, Helias e colaboradores foram os primeiros a conseguirem purificar um anticorpo monoclonal de especificidade anti-Lan (OSK43; IgG1κ) de linfócitos imortalizados de uma mulher japonesa saudável Lan- que desenvolveu anticorpos durante a gestação. O reagente foi utilizado no estudo pesquisando 713.384 doadores de sangue e encontrando 14 indivíduos Lan-, apresentando uma frequência de 0,002% e identificando 10 mutações associadas ao antígeno, presente em 8 éxons diferentes. Enquanto outro estudo encontrou uma prevalência de 0,003%, Okubo et al. (1984) não encontrou nenhum doador Lan- em 15.000 amostras testadas e Haer-Wigman et al. (2014) calcularam que aproximadamente 25 doadores Lan- possam ser encontrados ao serem triados sorologicamente 500.000 doadores (0,005%), enquanto a genotipagem aplicada no estudo seria capaz de detectar apenas um (sendo que em indivíduos pretos e chineses não foram encontradas mutações). Ademais, a heterogeneidade genética e a variabilidade nos níveis de expressão, associadas à inexistência rotineira de busca pelo fenótipo podem tornar a triagem genética e sorológica da população bastante desafiadora. Haer-Wigman et al. (2014) sugerem que a triagem para doadores Lan-

seja mais eficiente se realizada por sorologia em larga escala (preferencialmente com soro policlonal fortemente reativo ou monoclonal com especificidade anti-Lan) seguida de sequenciamento para confirmação molecular. Em situações específicas, abordagens complementares, como a citometria de fluxo, podem ser utilizadas para avaliar quantitativamente a expressão do antígeno Lan na superfície dos eritrócitos, auxiliando na diferenciação entre fenótipos Lan- e Lan positivo fraco, sobretudo diante da heterogeneidade genética do sistema. (Haer-Wigman et al., 2014; Koszarska et al., 2014; McBean et al., 2015). Entretanto, a frequência alélica das mutações capazes de levar ao fenótipo Lan- podem ser mais frequentes do que se imaginava e algumas delas, em heterozigose, parecem estar envolvidas com expressão reduzida na membrana do eritrócito, levando ao fenótipo positivo fraco (+^{wk}) (Koszarska et al., 2014; Saison et al., 2013).

Tendo em vista a possibilidade de reações transfusionais hemolíticas severas e até podendo acarretar em DHFRN, associado à conhecida falta de triagem para o fenótipo e ausência de doadores conhecidos no território nacional, atrelado à alta frequência do antígeno Lan e nenhum estudo da prevalência do antígeno e do alelo na população catarinense e brasileira, um estudo que pudesse realizar a triagem desses doadores e conhecer as possíveis mutações mais prevalentes associadas aos fenótipos Lan negativo e Lan positivo fraco seria de grande importância e relevância para a população brasileira.

Nesse contexto, a realização de uma triagem sorológica exploratória para o sistema Lan associada à análise das mutações mais prevalentes do gene *ABCB6* em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina mostra-se estratégica para ampliar o conhecimento sobre a frequência fenotípica e genotípica desse sistema no Brasil, bem como para contribuir com a segurança transfusional e a ampliação de bancos de doadores raros.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE PESQUISA

Essa pesquisa é um estudo quantitativo, exploratório e explicativo, experimental e transversal, que visou identificar o problema e explicar sua causalidade, explorando experimental e quantitativamente, em um período determinado, uma característica desconhecida de um recorte da população (Hochman et al., 2005).

4.2 PARTICIPANTES/POPULAÇÃO E AMOSTRA

Apesar do fenótipo Lan- ser bastante raro, algumas mutações não parecem ser tão raras e algumas, em heterozigose, culminam na expressão fraca do antígeno (+^{wk}), reduzindo a quantidade de amostras necessárias para testagem. Esse estudo possui caráter exploratório, pois não há uma frequência nacional estabelecida ou na população de Santa Catarina (Koszarska et al., 2014).

Considerando que são doadas, em média, 10.000 bolsas de sangue no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina por mês, foram triadas 8.600 amostras de doadores da rotina do laboratório de imuno-hematologia de doadores do Hemocentro Coordenador de Santa Catarina, localizado em Florianópolis. O número de amostras foi desenhado baseando-se na quantidade de reagente monoclonal disponível para testagem sorológica, sendo este o fator limitante amostral.

4.2.1 Seleção amostral

No processo do ciclo do sangue, os hemocentros regionais (HR) e unidades de coleta (UC) realizam a coleta das bolsas de sangue total e tubos de amostras para realização de testes de triagem desses doadores nos setores de Sorologia/NAT, Hematologia e Imuno-hematologia que são centralizados no Hemocentro Coordenador, em Florianópolis. Destarte, como a pesquisa foi desenvolvida no Hemocentro Coordenador, foi possível realizar a seleção das

amostras de doadores coletadas em tubo de EDTA 5 mL de toda a hemorrede destinadas e concentradas no setor de Imuno-hematologia.

O quantitativo de amostras coletadas entre os HR e UC é desigual com base na capacidade de atendimento, população atendida, realização de coletas externas e campanhas realizadas. Portanto, a fim de equalizar os quantitativos entre cada local, foi emitido um relatório através do sistema informatizado do HEMOSC (HemoSis) com intuito de averiguar a média de coleta em cada uma das unidades durante o período de um ano antes do início da realização da triagem sorológica desse estudo e realizada a proporcionalização das amostras para o total de 200 amostras triadas/dia. Como as UC de Tubarão e Jaraguá do Sul possuem sua operação vinculada aos HR de Criciúma e Joinville, respectivamente, a amostragem desses dois conjuntos de locais foi condensada como uma única população (Tabela 1). Ademais, com intuito de manter a aleatoriedade da seleção, iniciou-se a separação das amostras pela primeira amostra daquele local, pulando ao menos um tubo e separando o próximo até chegar ao número limite diário. Caso terminasse, já que a distribuição ao longo dos dias da semana não é igualitária, foi retornado ao início selecionando assim a segunda amostra e seguindo o mesmo esquema.

Foram separadas e testadas 200 amostras por dia em dois períodos distintos de testagem: 23/05/2024 a 05/07/2024 e 07/10/2024 a 26/11/2024.

Tabela 1 - Cálculo para separação proporcional das amostras da hemorrede com base no número médio de coleta de cada hemocentro.

Locais	Nº Doadores (1 ano)	%	Amostragem total	Amostragem diária
Hemocentro Coordenador	31282	0,23	1980	46
HR de Lages	9828	0,07	622	14
HR de Joaçaba	7464	0,05	473	11
HR de Blumenau	22074	0,16	1397	32
HR de Joinville + UC de Jaraguá do Sul	26249	0,19	1662	39
HR de Chapecó	17386	0,13	1101	26
HR de Criciúma + UC de Criciúma	21559	0,16	1365	32
TOTAL	135842	1,00	8600	200

Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

4.2.2 Estudo familiar

Após a triagem sorológica e identificação dos doadores com fenótipo Lan negativo e/ou positivo fraco ($+^{wk}$) foi conduzido o estudo familiar com anonimização de dados (Apêndice A) e aplicação de TCLE (Apêndice B).

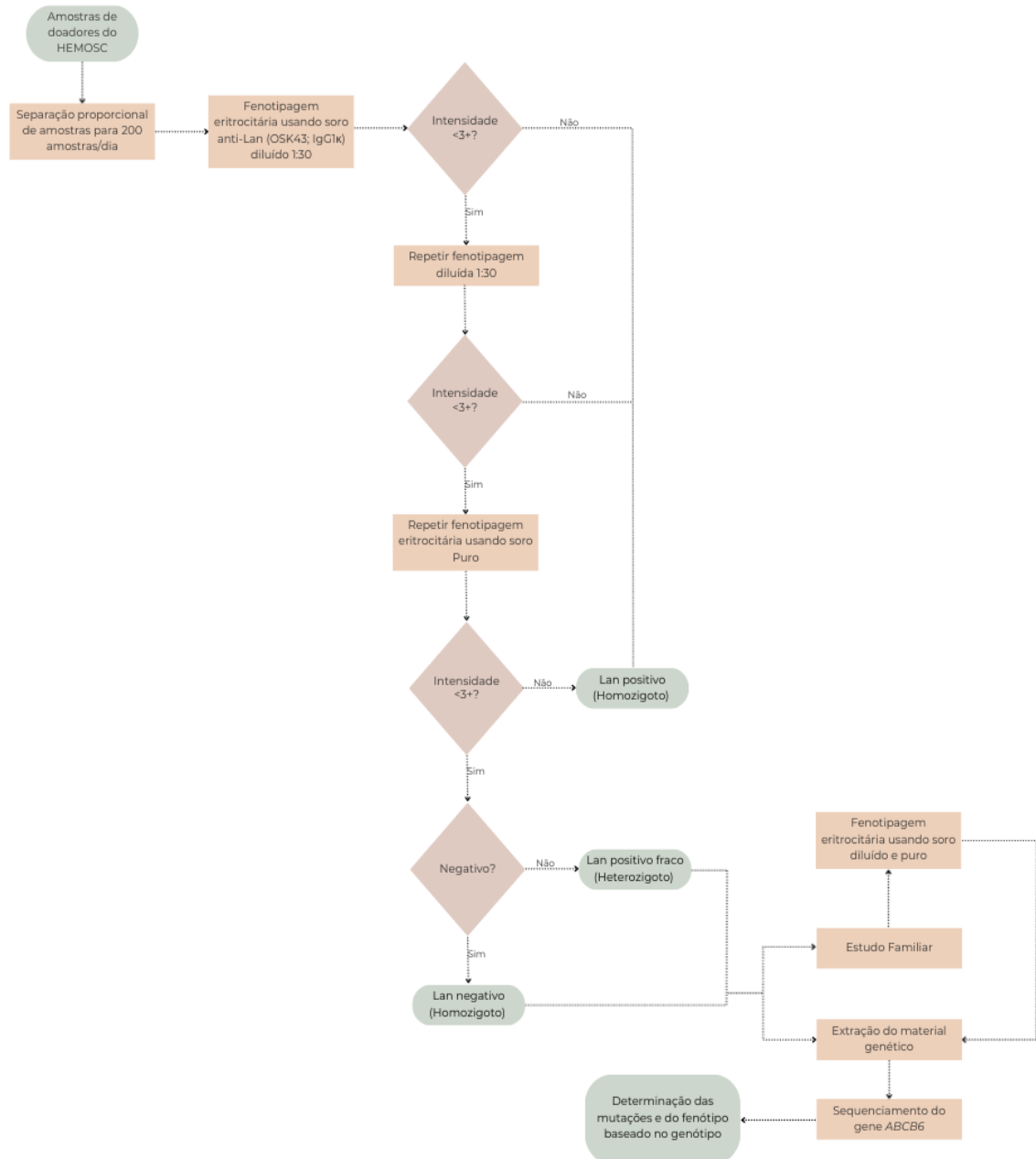
Dentre as diversas estratégias descritas para a busca de antígenos raros, o estudo familiar demonstra-se mais vantajosa em comparação à busca aleatória. Em casos de fenótipo de alta frequência na população, como o antígeno Lan, a chance de encontrar o fenótipo negativo em irmãos é de, no mínimo, 25% de probabilidade (Brasil, 2022).

Nessa etapa, a comunicação foi realizada ao doador com explicação detalhada da maior probabilidade de encontrar o fenótipo raro entre os familiares e informado os procedimentos necessários para coleta de sangue. Além disso, foi facultado o desejo dele em envolver os familiares na pesquisa. Havendo consentimento, foi realizado o agendamento dos familiares para inclusão no estudo, desde que concordassem com a participação, assinando o TCLE (Apêndice B). Todo o processo de contato foi realizado pelos anonimizadores (Apêndice A) autorizados neste estudo e aprovados pelos comitês de ética.

4.2.3 Estratégia de busca para identificação de indivíduos Lan- e Lan(+^{wk})

O fluxograma (Figura 6) apresenta a estratégia de busca para identificação de doadores raros com o fenótipo Lan- e Lan (+^{wk}).

Figura 6 - Fluxograma demonstrativo da estratégia de busca por doadores Lan negativo e Lan positivo fraco.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2025.

4.3 FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA

Para a triagem da ausência do antígeno Lan na membrana eritrocitária foi utilizado reagente contendo anticorpo monoclonal com especificidade anti-Lan (OSK43; IgG1κ) cedido pelo Hemocentro de Kinki Block da Cruz Vermelha Japonesa (Helias et al., 2012). Foram triadas 8.600 amostras de doadores de sangue para a presença do antígeno Lan por meio da técnica de antiglobulina indireta em gel teste (LISS/Coombs). Após a etapa de triagem, foram realizadas também as fenotipagens eritrocitárias para o antígeno Lan dos irmãos dos doadores triados que apresentaram fenótipo Lan- ou Lan(+^{wk}) que consentiram em participar do estudo.

Na avaliação das reações de hemaglutinação realizadas pela técnica de gelcentrifugação, a intensidade da aglutinação foi interpretada de acordo com a escala semiquantitativa convencional utilizada em imuno-hematologia. Nessa metodologia, as hemácias são retidas na matriz de gel quando ocorre aglutinação, enquanto células não aglutinadas atravessam o gel durante a centrifugação. O resultado 0 (negativo) é caracterizado pela passagem completa das hemácias através da coluna de gel, formando um pellet compacto no fundo do microtubo. A reação (+), frequentemente descrita como “poeira”, corresponde à presença de pequenas partículas ou microaglutinados dispersos ao longo da coluna de gel, representando uma reação extremamente fraca. As reações subsequentes são graduadas como 1+, 2+, 3+ e 4+, refletindo aumento progressivo da retenção das hemácias na matriz de gel: 1+ apresenta a maioria das hemácias no fundo do microtubo, com alguns pequenos aglutinados distribuídos na porção inferior do gel; 2+ caracteriza-se pela distribuição de aglutinados ao longo da coluna de gel, com menor quantidade de hemácias sedimentadas no fundo; 3+ corresponde à retenção predominante dos aglutinados na metade superior da coluna; e 4+ indica aglutinação máxima, com as hemácias formando uma banda compacta no topo do gel, sem células livres no fundo do microtubo. Em algumas situações, podem ser utilizados qualificadores adicionais para refinar a interpretação da intensidade da reação, como ^s (*strong*/forte) para indicar uma reatividade mais intensa dentro de uma mesma graduação e ^w (*weak*/fraca) para indicar uma reação mais discreta (AABB, 2020).

Ressalta-se ainda que, no contexto do sistema de grupo sanguíneo Lan, a notação Lan (+^{wk}) é empregada para designar um fenótipo de expressão antigênica fraca (*weak*), constituindo uma classificação fenotípica específica do antígeno,

enquanto a designação (+^w) refere-se apenas à intensidade fraca da reação de hemaglutinação observada no ensaio, não implicando necessariamente na caracterização do fenótipo Lan fraco.

4.3.1 Inspeção e validação

A triagem sorológica proposta pelo estudo foi realizada através da técnica de fenotipagem eritrocitária, que se baseia em uma reação de hemaglutinação pela interação antígeno-anticorpo. A técnica é bem descrita na literatura e amplamente validada e utilizada na rotina dos laboratórios de imuno-hematologia. O antígeno buscado deveria estar presente na membrana das hemácias previamente diluídas em suspensão a 1% em potencializador LISS (*Low Ionic Strength Saline*) capaz de diminuir o potencial *zeta* e propiciar a formação do complexo antígeno-anticorpo na presença de soro específico para o alvo. Esse foi identificado como um reagente contendo anticorpo monoclonal com especificidade anti-Lan (OSK43; IgG1 κ) cedido pelo Hemocentro de Kinki Block da Cruz Vermelha Japonesa (Helias et al., 2012). Em conjunto com o reagente, foi enviado um relatório informativo sobre o material (Anexo A).

Para realização dos testes e padronização foram utilizados os insumos LISS comercial DG Gel Sol (Grifols, Espanha), DG Gel Coombs (Grifols, Espanha) e Hemácia I/II Serascan Diana 2 (Grifols, Espanha) já inspecionados e aprovados na rotina normal do serviço do setor de imuno-hematologia. O cartão-gel ID-Card LISS/Coombs (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) foi previamente inspecionado com amostras conhecidas e comparados seus resultados de reatividade com o cartão DG Gel Coombs sendo aprovado para utilização no estudo nas mesmas condições pré-estabelecidas para o cartão-gel da marca Grifols®. As centrífugas de gel, as incubadoras de gel 37 °C com monitoramento constante de temperatura e as micropipetas utilizadas são todas validadas para execução dos testes.

4.3.1.1 Especificidade

Para confirmar que a característica de especificidade do anticorpo monoclonal, mesmo após o transporte do Japão até o Brasil, tinha se mantido, foi realizado teste em colaboração com outro centro de hemoterapia de referência (Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein). Foram realizados os testes de antiglobulina indireto em tubo à temperatura ambiente e AGH à 37°C e em técnica de gel teste em LISS/Coombs e em Enzima (Papaína) utilizando uma célula conhecidamente Lan+ e uma Lan-. Os resultados obtidos nesta etapa estão descritos na Tabela 2 e apresentados na Figura 7. O reagente foi aprovado nessa etapa.

Tabela 2 - Resultados obtidos no teste de especificidade do anticorpo monoclonal anti-Lan (OSK43; IgG1κ).

Célula	Tubo			Gel	
	TA	AGH	LISS	Enzima (Papaína)	
Hemácia Lan+ (TI Grifols – lot.: 23055.01)	0	3+	4+	3+	
Hemácia Lan- (J0172059X – NBS Bristol UK)	0	0	0	0	

Legenda: TA – Temperatura ambiente; AGH – Fase de antiglobulina humana à 37°C.
Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Figura 7 - Representação dos resultados obtidos na reação de hemaglutinação por gelcentrifugação no teste de especificidade do anticorpo monoclonal anti-Lan (OSK43; IgG1κ).



Legenda: À esquerda - Primeiro poço reação negativa/ Segundo poço: reação positiva (3+^w); À direita: Primeiro poço reação negativa/ Segundo poço: reação positiva (4+).
Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

4.3.1.2 Sensibilidade

O teste de sensibilidade foi realizado diretamente no HEMOSC. Considerando que pela literatura ao menos 99,8% da população apresenta fenótipo positivo para o antígeno Lan, foi selecionada a hemácia I do kit de PAI hemácias I/II em suspensão 1% Serascan Diana 2 (Grifols, Espanha) com reatividade elevada (3+^s a 4+) para realização da titulação. Foram utilizados cartões DG Gel Coombs e suspensão de hemácia 1% em solução de NaCl 0,9% e em LISS. Adicionalmente, esse resultado foi reforçado pela utilização das quatro células do painel Identisera Diana Extend (Grifols, Espanha) em LISS com reatividade de 4+ e em Papaína 3+^s.

Em método gel teste LISS/Coombs o reagente apresentou título de 512 (última titulação com 1+ de reatividade – Tabela 3) pelo método de gelcentrifugação LISS/Coombs atingindo um escore¹ de 89.

Tabela 3 - Resultados por intensidade obtidos no teste de sensibilidade utilizando reagente contendo anticorpo monoclonal com especificidade anti-Lan (OSK43; IgG1κ).

Título	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Célula I – NaCl	3+ ^s	3+ ^s	3+	3+ ^w	3+ ^w	3+ ^w	2+ ^s	2+ ^w	(+)	0
Célula I - LISS	3+ ^s	3+ ^s	3+ ^s	3+	3+	3+ ^w	2+ ^s	2+ ^s	2+	1+ ^s

Legenda: NaCl – Solução salina isotônica (NaCl 0,9%); LISS – Solução de baixa força iônica.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

4.3.1.3 Padronização

Visando otimizar o volume total de 20 mL do reagente contendo anticorpo monoclonal com especificidade anti-Lan (OSK43; IgG1κ) disponibilizado pelo Hemocentro de Kinki Block da Cruz Vermelha Japonesa foram realizadas titulações utilizando amostras de doadores diluídas à 1% em LISS comercial DG Gel Sol e hemácias I/II em suspensão 1% Serascan Diana 2 (Grifols, Espanha). Com o objetivo de garantir que todos os insumos e reagentes estavam sendo reprodutíveis, essa etapa foi realizada duas vezes, dado que os testes foram executados em dois

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

períodos distintos em decorrência do aguardo da segunda remessa de gel-teste encaminhada para realização da pesquisa. Na primeira remessa o título encontrado foi de 256, já na segunda 128.

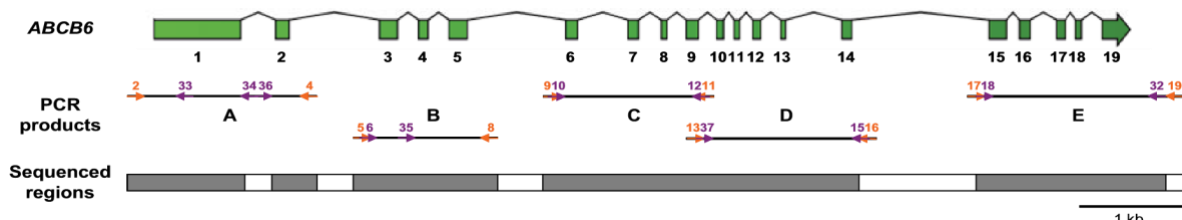
Com base nesses resultados foram estipuladas duas diluições possíveis para o anticorpo monoclonal: 1:30 e 1:50. Após realização dos testes não foi possível verificar diferença nas intensidades de reação entre as diluições propostas (3+^s em ambas as diluições), sendo padronizada a utilização da diluição 1:30 no estudo. Essa medida permitiu o aumento do número de testagens possíveis no estudo de menos de 400 amostras para 8600 amostras de doadores, um incremento de 8200 fenotipagens.

A fenotipagem eritrocitária foi padronizada seguindo os mesmos parâmetros utilizados na rotina do setor de imuno-hematologia e permitiu sua validação nos mesmos moldes por apresentar reatividade consistente (3+^s) para as amostras utilizadas na padronização. A reação foi realizada utilizando 50 µL de suspensão de hemácia em LISS comercial DG Gel Sol, acrescido de 25 µL de reagente contendo anticorpo monoclonal de especificidade anti-Lan (OSK43; IgG1κ) diluído 1:30 em poço de cartão DG Gel LISS/Coombs ou ID-Card LISS/Coombs incubado por 15 min à 37 °C e centrifugado por 9 min à 128,1 $g \pm 1.0\%$, respectivamente. A leitura das intensidades dos cartões gel DG Gel LISS/Coombs foram padronizadas utilizando leitora de cartão semiautomatizada DG Reader Net (Grifols, Espanha) (Anexo B) e a dos cartões ID-Card LISS/Coombs foram manuais. Para as amostras com resultado negativo ou com expressão fraca, a fenotipagem foi repetida utilizando-se o anticorpo monoclonal não diluído. Na persistência do fenótipo, foi realizado teste de antiglobulina direto (TAD).

4.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE *ABCB6* (2q36)

Foi realizado o sequenciamento total do éxons do gene *ABCB6* (éxons 1-19) (Figura 8) dos doadores que apresentaram resultado de fenotipagem negativo ou positivo fraco para o antígeno Lan, assim como de seus irmãos, com intuito de analisar as possíveis mutações associadas presentes na população de doadores de sangue do estado de Santa Catarina.

Figura 8 - Representação gráfica do gene *ABCB6* incluindo éxons e íntrons e do esquema da estratégia de sequenciamento.



Legenda: Esquema da estratégia de sequenciamento: cinco produtos de PCR (A-E) cobrindo os 19 éxons de *ABCB6* foram gerados com pares de iniciadores (laranja) e posteriormente sequenciados com iniciadores internos (roxo) após purificação em gel; as regiões sequenciadas do *ABCB6* são indicadas em cinza na barra. As caixas em verde representam os éxons, enquanto as linhas representam as regiões intrônicas. Em cinza, na barra inferior, representa as regiões abrangidas pelo sequenciamento.

Fonte: Extraída de HELIAS et al., 2012.

4.4.1 Extração, quantificação e avaliação da pureza do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de amostras de sangue total utilizando o kit comercial *ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System* (Promega Corporation, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O método baseia-se na lise celular, seguida da ligação do DNA a uma coluna de sílica, etapas de lavagem para remoção de contaminantes e posterior eluição do material genético purificado. Inicialmente, as amostras de sangue total em tubo de sangue a vácuo EDTA k3 foram centrifugadas a $1.500 \times g$ por 15 minutos e, em seguida, 200 μL da região do *buffy coat* de cada amostra foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL contendo proteinase K e tampão de lise celular, promovendo a digestão proteica e a liberação do DNA. Após incubação a 56°C por 10 minutos, foi adicionado tampão de ligação, e a mistura resultante foi transferida para a coluna de ligação do sistema.

O material foi centrifugado para permitir a adsorção do DNA à membrana da coluna. Posteriormente, a coluna foi submetida a três etapas de lavagem com solução específica, visando a remoção de impurezas e resíduos celulares. O DNA genômico foi eluído com água livre de nucleases, em volume de 50 μL , e armazenado a -20°C até sua utilização nas análises subsequentes.

As concentrações dos DNAs obtidos, bem como a avaliação do grau de pureza, foram determinadas por espectrofotometria, utilizando o

equipamento *Thermo Scientific Multiskan SkyHigh Microplate Reader* (Thermo Fisher Scientific, EUA). A pureza do DNA foi avaliada por meio das razões de absorbância A260/A280 e A260/A230, conforme recomendado para amostras de DNA genômico.

4.4.2 Amplificação do gene *ABCB6* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação das regiões de interesse do gene *ABCB6* foi realizada a partir de DNA genômico, previamente extraído e quantificado, com o objetivo de obter fragmentos adequados para posterior sequenciamento pelo método de Sanger (Sanger; Nicklen; Coulson, 1977). Considerando as diferentes abordagens presentes na literatura internacional, foi elencada a metodologia que melhor se aplicava ao desenho do estudo e amostragem. Assim, baseando-se no tamanho total do gene (~9,2 kb), foram realizadas cinco reações de PCR independentes, cada uma destinada à amplificação de um fragmento específico, de modo a abranger todos os éxons (1–19) e porções adjacentes dos íntrons, permitindo a análise das regiões codificantes (Figura 8) (Helias et al., 2012).

Cada reação de PCR foi conduzida utilizando um par específico de iniciadores (*senso* e *antisenso*) (Quadro 1), sintetizados comercialmente (Sigma-Aldrich, 10 µM), sendo realizada uma reação individual para cada par de iniciadores, a fim de evitar amplificações inespecíficas. A composição das reações, incluindo volumes e concentrações finais dos reagentes, encontra-se descrita na Tabela 4.

Quadro 1 -Iniciadores utilizados para amplificação por PCR das regiões do gene *ABCB6*.

Produto de PCR	Região	Iniciadores	Sequência	Orientação	Tamanho (pb)
A	éxons 1-2	ABCB6-2	GGCCTGGTCGTCAGATTTC	<i>senso</i>	1.636
		ABCB6-4	GTGTCATGCACCTGTAGTC	<i>antisenso</i>	
B	éxons 3-5	ABCB6-5	TCCCTGTCATCATTCTTCC	<i>senso</i>	1.217
		ABCB6-8	CTGCCCGCATTACCTAAGT	<i>antisenso</i>	
C	éxons 6-9	ABCB6-9	TTTAGCCACCCACCTCTTG	<i>senso</i>	1.561
		ABCB6-11	GGCAATCAAGGAAGCAGAG	<i>antisenso</i>	
D	éxons 9-14	ABCB6-13	TTTGGAGTGGAAGTCGAGC	<i>senso</i>	1.648
		ABCB6-16	ACATCTCCTCTCTCTGGAC	<i>antisenso</i>	
E	éxons 15-19	ABCB6-17	ACAGAGAGGAGTGATTTGCC	<i>senso</i>	1.680
		ABCB6-19	ATGTGGAGTGGGCAGGAAG	<i>antisenso</i>	

Fonte: Adaptado de Helias et al. (2012).

As reações foram preparadas contendo água ultrapura livre de nucleases, iniciadores específicos, mistura de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP), DNA genômico molde e a enzima Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Applied Biosystems, EUA), acompanhada de seu respectivo tampão 5X Phusion Plus Buffer (Applied Biosystems, EUA), conforme as recomendações do fabricante. A escolha de uma polimerase de alta fidelidade visou minimizar erros de incorporação de nucleotídeos durante a amplificação de fragmentos relativamente longos, assegurando maior precisão na análise das sequências amplificadas.

Tabela 4 -Protocolo de PCR para amplificação de fragmentos do gene ABCB6 (PCR 1-5).

Reagentes	Volume (µL)	Concentração
H ₂ O	11,64	-
5X Phusion Plus Buffer	4	1X
ABCB6-(<i>senso</i>) (10µM)	1	0,5 µM
ABCB6-(<i>antisense</i>) (10µM)	1	0,5 µM
dNTP	0,16	0,2 mM
Phusion	0,2	-
DNA	2	9,7 – 490,0 µg
TOTAL	20	-

Fonte: Elaborada pelo autor, 2025.

As condições de ciclagem empregadas no termociclador, incluindo as etapas de desnaturação inicial, desnaturação, pareamento, extensão e extensão final, estão detalhadas na Tabela 5, tendo sido ajustadas de acordo com o tamanho esperado de cada produto amplificado e com as especificações da enzima utilizada.

Tabela 5 - Protocolo de condições de ciclagem do termociclador para reação de PCR para amplificação dos fragmentos do gene ABCB6 (PCR 1-5).

Etapa	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	98°C	5 min
2	35	98°C	10 s
3		60°C	10 s
4		72°C	60 s
5	1	72°C	5 min

Legenda: 1 – desnaturação inicial; 2 – desnaturação; 3 – pareamento; 4 – extensão; 5 – extensão final.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2025.

Ao término das reações de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb, com o objetivo de confirmar a presença, integridade e tamanho esperado dos fragmentos amplificados. Os géis foram impregnados com brometo de etídio e os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz ultravioleta (UV), permitindo a avaliação da especificidade das amplificações. Apenas os produtos amplificados que apresentaram bandas únicas e com tamanho compatível com o esperado foram selecionados para as etapas subsequentes de purificação e sequenciamento.

4.4.3 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos à etapa de purificação com o objetivo de remover iniciadores residuais, nucleotídeos livres, enzimas e demais componentes da reação, tornando os fragmentos adequados para o sequenciamento. A purificação foi realizada utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Alemanha), conforme protocolo fornecido pelo fabricante, por meio de procedimento manual em colunas de sílica, com uso de microcentrífuga.

De forma resumida, os produtos de PCR foram inicialmente misturados ao tampão de ligação do kit, permitindo a adsorção do DNA à membrana de sílica da coluna de purificação. Em seguida, as colunas foram submetidas à centrifugação para retenção do DNA, seguida de etapas de lavagem com tampão específico, visando à remoção de contaminantes. Após a etapa de secagem da membrana, o DNA purificado foi eluído com tampão apropriado, em volume final de 50 µL, e armazenado a -20 °C até sua utilização.

Após a purificação, os fragmentos de DNA obtidos foram avaliados quanto à integridade e ao tamanho esperado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, impregnado com brometo de etídio, utilizando marcador de peso molecular de 100 pb. A visualização dos fragmentos foi realizada sob luz ultravioleta (UV), permitindo a confirmação da presença e qualidade do material purificado antes de sua aplicação no sequenciamento.

4.4.4 Sequenciamento do gene *ABCB6* pelo método de Sanger

O sequenciamento dos fragmentos amplificados do gene *ABCB6* foi realizado pela metodologia de Sanger, utilizando os produtos de PCR previamente purificados. As reações de sequenciamento foram conduzidas na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS), empregando o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA), equipado com capilares de 50 cm e polímero POP-7.

Para cada corrida de sequenciamento, foram utilizados os produtos purificados dos fragmentos de DNA amplificados nas PCRs correspondentes, juntamente com iniciadores específicos de sequenciamento, desenhados de modo a garantir a cobertura completa de todas as regiões codificantes do gene *ABCB6*. As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se descritas no Quadro 2. Para os fragmentos provenientes da PCR 1, foram empregados três iniciadores de sequenciamento, sendo um iniciador *senso* e dois iniciadores *antisenso*, com o objetivo de abranger integralmente os éxons 1 e 2. Para os fragmentos amplificados nas demais PCRs, foi utilizado um par de iniciadores (*senso* e *antisenso*) para cada fragmento, na tentativa de assegurar a leitura bidirecional das sequências, caso necessária (Figura 8).

Quadro 2 - Iniciadores utilizados para sequenciamento dos fragmentos de PCR das regiões do gene *ABCB6*.

Produto de PCR	Região	Iniciadores	Sequência	Orientação
A	éxons 1-2	ABCB6-33	CCAAGACAGCGAATCAGC	<i>antisenso</i>
		ABCB6-34	GCAGTGCTTTCTCCCAAG	<i>antisenso</i>
		ABCB6-36	TCCCCGGCCCTATTATAAGTAG	<i>senso</i>
B	éxons 3-5	ABCB6-6	AGTTTTTCTGACCCCATCAAGG	<i>senso</i>
		ABCB6-35	TGCCTGAAGAGAGTCCTG	<i>senso</i>
C	éxons 6-9	ABCB6-10	CCTAGAGGCAGGGTTGCT	<i>senso</i>
		ABCB6-12	AGGCCGCTCTTCTTGTC	<i>antisenso</i>
D	éxons 9-14	ABCB6-37	GGATCTTGGATGAGAGAGTGG	<i>senso</i>
		ABCB6-15	CAGCCAGCCCTTATCATTCC	<i>antisenso</i>
E	éxons 15-19	ABCB6-18	ACACGGCTAGGATATGGGG	<i>senso</i>
		ABCB6-32	GTTTCTCTCTCCTCTAACCT	<i>antisenso</i>

Fonte: Adaptado de Helias et al. (2012).

As reações de marcação foram realizadas em volume final de 10 µL, contendo 2,5 pmol do iniciador específico, 30 a 60 ng de cada produto purificado e 0,5 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, EUA). As reações foram submetidas a um ciclo inicial de desnaturação a 96 °C por 3 minutos, seguido de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 55 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos, em termociclador *LGC XP Cycler*.

Após a etapa de marcação, os produtos de sequenciamento foram purificados por precipitação com isopropanol a 75%, seguida de lavagem com etanol a 60%, visando à remoção de terminadores não incorporados e sais residuais. Os produtos precipitados foram ressuspensos em 10 µL de formamida *Hi-Di™* (Applied Biosystems, EUA), desnaturados a 95 °C por 5 minutos, resfriados em gelo por igual período e, posteriormente, eletroinjetados no sequenciador automático.

Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando o *software Data Collection 3* (Applied Biosystems, EUA), configurado com os parâmetros: *Dye Set "Z"*; *Mobility File "KB_3500_POP7_BDTv3.mob"*; *BioLIMS Project "3500_Project1"*; *Run Module "FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module "BC-3500SR_Seq_FASTA.saz"*. Os arquivos gerados (.ab1), correspondentes aos eletroferogramas, foram convertidos em arquivos no formato de texto FASTA (.seq) por meio do *Sequence Analysis Software v. 6* (Applied Biosystems, EUA), utilizando parâmetros padrão, para posterior análise das sequências obtidas.

4.4.5 Análise das sequências e caracterização das variantes genéticas dos éxons do gene *ABCB6*

Os arquivos gerados a partir do sequenciamento pelo método de Sanger, no formato .ab1, foram inicialmente submetidos à análise visual dos eletroferogramas e à avaliação da qualidade geral do sequenciamento, utilizando os programas Chromas (Technelysium Pty Ltd., Austrália) e UGENE (Unipro, Rússia). A qualidade das leituras foi avaliada com base nos valores de qualidade mensuradas pelos *softwares*, sendo consideradas adequadas para análise as sequências que apresentaram qualidade superior a 20 ($Q > 20$) ao longo do fragmento sequenciado, ou seja, probabilidade de uma base ser incorreta de 1:100 (acurácia de 99%).

As regiões iniciais e finais das leituras que apresentaram qualidade inferior a Q20 foram removidas manualmente, a fim de garantir maior confiabilidade na análise

subsequente. Após essa etapa de retirada de regiões de baixa qualidade, as sequências foram exportadas no formato FASTA.

Os arquivos FASTA obtidos foram então alinhados individualmente às sequências de referência correspondentes a cada éxon do gene *ABCB6*, extraídas do genoma de referência NT_005403.17 (Helias et al., 2012; Koszarska et al., 2014), utilizando o programa MEGA 12.1 (Pennsylvania State University, EUA) (Stecher et al., 2025). A identificação de variantes nucleotídicas foi realizada inicialmente de forma unidirecional, sendo posteriormente confirmada por leitura bidirecional, sempre que disponível, a fim de assegurar a confiabilidade das mutações detectadas.

Após a identificação preliminar das variantes, as regiões contendo alterações nucleotídicas foram novamente inspecionadas nos programas Chromas e UGENE, por meio da análise detalhada dos eletroferogramas, para determinação do estado de homozigose ou heterozigose das mutações identificadas, com base no padrão dos picos de fluorescência observados, além da identificação da qualidade da base sequenciada, no caso de mutação em homozigose.

Posteriormente, as sequências foram alinhadas ao gene *ABCB6* completo, utilizando o software MEGA, permitindo a caracterização das variantes quanto ao seu tipo de mutação e a avaliação da ocorrência de alterações na sequência de aminoácidos codificada. Essa etapa possibilitou a classificação das variantes quanto ao seu impacto potencial na proteína.

Todas as mutações identificadas foram sistematicamente catalogadas e organizadas para posterior apresentação em forma de tabela nos capítulos de Resultados e Discussão. Todos os programas utilizados nas análises foram empregados nas seguintes versões: Chromas 2.6.6, MEGA 12.1 e UGENE 53.0.

4.5 ADSORÇÃO E ELUIÇÃO

A técnica de adsorção e eluição foi realizada na amostra que apresentou resultado Lan negativo na triagem sorológica com o anticorpo monoclonal anti-Lan (OSK43), com o objetivo de remover e concentrar anticorpos anti-eritrocitários potencialmente presentes.

4.5.1 Adsorção do anticorpo anti-Lan (OSK43)

Inicialmente, os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina isotônica (NaCl 0,9%). Para cada lavagem, foram adicionados 2 mL de solução salina ao concentrado de hemácias, seguido de centrifugação a $800 \times g$ por 1 min com descarte completo do sobrenadante após cada etapa. Após a última lavagem, as hemácias foram centrifugadas a $800 \times g$ por 5 minutos, e o sobrenadante residual foi cuidadosamente removido.

Em seguida, foram combinados na proporção 1:1 o concentrado de eritrócitos e o reagente contendo anticorpos anti-Lan, em tubo apropriado. A mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura de 37°C em banho-maria, com homogeneização periódica (nos tempos 0, 15 e 30 min) durante a incubação para favorecer a interação antígeno-anticorpo.

Ao final do período de incubação, a suspensão foi centrifugada a $800 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante, correspondente ao reagente adsorvido, foi transferido para um tubo limpo e identificado. As hemácias adsorvidas foram preservadas para a etapa de eluição.

4.5.2 Eluição do anticorpo anti-Lan (OSK43)

A eluição dos anticorpos ligados à superfície eritrocitária foi realizada por método de eluição ácida, utilizando como base o protocolo descrito na bula do kit DiaCidel (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos).

O concentrado de eritrócitos previamente adsorvido foi lavado inicialmente uma vez com solução salina isotônica (NaCl 0,9%), utilizando 3 mL por lavagem, com centrifugação a $2000 \times g$ por 2 minutos. Posteriormente, foram realizadas quatro lavagens adicionais com solução de lavagem específica do kit, conforme instruções do fabricante, garantindo a completa remoção de anticorpos não especificamente ligados.

Após a etapa de lavagem, 1 mL do concentrado de eritrócitos foi transferido para um tubo limpo, ao qual foram adicionados 1 mL da solução de eluição ácida. A suspensão foi imediatamente homogeneizada por inversão suave do tubo e centrifugada a $900 \times g$ por 1 minuto.

O sobrenadante contendo o eluato foi transferido para um tubo limpo e neutralizado com cinco gotas da solução tampão fornecida pelo kit, até atingir pH neutro, confirmado por mudança de coloração do indicador.

O eluato neutralizado foi centrifugado a $900 \times g$ por 1 minuto para remoção de possíveis resíduos celulares. O sobrenadante final foi transferido para um novo tubo e utilizado nos testes de detecção e identificação de anticorpos. Para essa etapa foi utilizada uma amostra Lan positiva testada previamente, para a reação foi utilizado 50 μL de suspensão de hemácia em LISS comercial DG Gel Sol, acrescido de 25 μL do soro eluído em poço de cartão DG Gel LISS/Coombs incubado por 15 min à 37 °C e centrifugado por 9 min à $128,1 g \pm 1.0\%$. Como controle negativo do método foi realizada mesma reação substituindo o soro eluído pelo sobrenadante reservado previamente na última lavagem.

4.6 CITOMETRIA DE FLUXO

4.6.1 Validação e padronização do protocolo de sensibilização eritrocitária

Com o objetivo de validar e padronizar o protocolo de sensibilização eritrocitária para detecção indireta de IgG por citometria de fluxo, foram realizados experimentos preliminares de otimização, avaliando diferentes condições de incubação e marcação.

Inicialmente, foram testadas variações na proporção entre hemácias e anticorpo monoclonal OSK43, bem como na composição do meio de incubação, incluindo diferentes volumes de solução de baixa força iônica (LISS) e albumina de soro bovino (BSA). Além disso, foram avaliadas condições distintas de incubação quanto à temperatura (temperatura ambiente (TA) e 37 °C) em tempo de 30 minutos, bem como etapas de lavagem e ressuspensão celular. As diferentes sensibilizações foram testadas primeiramente por fenotipagem eritrocitárias, em formato de Coombs direto - para avaliar a efetividade da sensibilização - depois seguindo o processo de sensibilizações secundárias, incubações, lavagens e aquisição.

A partir dessas avaliações preliminares, foi definida como condição ideal a sensibilização na proporção 1:1 entre hemácias lavadas (100 μL) e anticorpo monoclonal OSK43 (100 μL), em presença de 20 μL de albumina sérica bovina

(BSA) a 6% e 2 mL de LISS, seguida de incubação por 30 min a 37°C. Essa condição apresentou maior reprodutibilidade e melhor desempenho na detecção da marcação indireta por citometria de fluxo.

A validação do protocolo incluiu a repetição do ensaio em experimentos independentes, utilizando amostras controle positivas e negativas (branco – apenas hemácias sensibilizadas, para determinar a fluorescência intrínseca), permitindo confirmar a consistência do padrão de fluorescência obtido e a adequada discriminação da população eritrocitária. A inclusão de marcadores de exclusão (CD71, CD61 e CD45) possibilitou a confirmação da identidade celular e a exclusão de populações não eritrocitárias, assegurando a especificidade da análise.

Após a etapa de validação, o protocolo descrito foi adotado como metodologia padrão para os experimentos subsequentes.

4.6.2 Citometria de fluxo para detecção indireta de IgG anti-Lan em hemácias

As hemácias foram obtidas a partir de amostras de sangue periférico e previamente lavadas três vezes com solução salina isotônica (NaCl 0,9%), por centrifugação 3.400 rpm, durante 1 min, com descarte do sobrenadante a cada etapa. Após a última lavagem, o pellet eritrocitário foi utilizado para o procedimento de sensibilização.

4.6.2.1 Sensibilização eritrocitária

Para a sensibilização, 100 µL de hemácias lavadas foram incubadas com 100 µL do anticorpo monoclonal com especificidade anti-Lan (OSK43; IgG1κ) (Helias et al., 2012), utilizado em sua forma não diluída, em presença de 20 µL de BSA a 6%, e 2 mL de solução de baixa força iônica (LISS). A mistura foi homogeneizada suavemente e incubada por 30 min (homogeneizada nos tempos 0, 15 e 30 min), a 37 °C, protegida da luz.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 3.400 rpm por 1 min, sendo o sobrenadante parcialmente removido até um volume residual aproximado de 500 µL. As hemácias foram então cuidadosamente ressuspendidas.

4.6.2.2 Marcação com anticorpos fluorescentes

A partir da suspensão sensibilizada, foram retirados 3 μL , os quais foram incubados com 2 μL do anticorpo secundário ZyMax™ F(ab')₂ de cabra anti-IgG(H+L) humana (Cat. #81-7111, Invitrogen, EUA), conjugado ao fluorocromo FITC, em conjunto com anticorpos monoclonais para exclusão de populações não eritrocitárias:

- 7 μL de Anti-CD71 (Cat. A89313, APC-A750, Beckman Coulter, EUA);
- 3 μL de Anti-CD61 (Cat. 564173, PERCP, BD Bioscience, EUA);
- 1 μL de Anti-CD45 (Cat. 560777, V500, BD Bioscience, EUA).

A incubação foi realizada por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

4.6.2.3 Lavagens e aquisição

Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com 1.000 μL de PBS por lavagem, com centrifugação a 2.000 rpm por 5 minutos a cada etapa. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* final ressuspendido em 1.000 μL de PBS para aquisição.

A aquisição foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCanto II utilizando software FACSDiva (BD Bioscience, EUA), sendo as hemácias inicialmente selecionadas por parâmetros de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC). Os marcadores CD71⁻/CD61⁻/CD45⁻ foram utilizados para excluir leucócitos, plaquetas e precursores eritroides, permitindo a análise específica da população eritrocitária madura. Para cada amostra, foram adquiridos 10.000 eventos totais, e os dados foram analisados no software Infinicyt™ (BD Bioscience, EUA).

A análise da fluorescência foi realizada por meio da sobreposição de histogramas de intensidade de fluorescência, incluindo controles positivos, controle branco (utilizado para determinação da fluorescência intrínseca das hemácias sensibilizadas com OSK43) e amostras em teste. A interpretação da expressão antigênica foi baseada no deslocamento do histograma da amostra em relação ao controle branco e na sua posição relativa em comparação aos controles positivos.

Como medida quantitativa, foi utilizada a mediana da intensidade de fluorescência (MFI), extraída do canal correspondente ao fluorocromo do anticorpo secundário (FITC), permitindo comparação objetiva entre os grupos analisados. Para fins de normalização da fluorescência basal e redução do impacto de variações técnicas interexperimentais, foi calculada a razão entre a MFI da amostra e a MFI do controle branco (razão MFI). A interpretação dos resultados foi realizada de forma comparativa, considerando conjuntamente: a magnitude do deslocamento da curva da amostra em relação ao controle branco; a intensidade relativa da fluorescência em comparação aos controles positivos; e os valores de razão MFI obtidos.

A caracterização fenotípica baseou-se na análise integrada dos dados quantitativos (MFI e razão MFI) e da distribuição gráfica dos histogramas, permitindo a identificação de ausência de expressão, expressão reduzida ou expressão plena do antígeno Lan de maneira contextual e comparativa.

4.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi conduzido após apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) e Comitê de Ética em Pesquisa do CEPON e aprovação conforme parecer consubstanciado sob número CAAE 79024724.7.0000.0121. Foi solicitada às respectivas instâncias éticas a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), uma vez que se trata de uma pesquisa na qual os dados foram coletados de maneira anônima. Não houve intervenções clínicas nem alterações na rotina ou tratamento dos participantes, resultando na ausência de riscos ou prejuízos ao bem-estar deles.

As amostras são regularmente processadas no HEMOSC exclusivamente por meio de códigos de barras, impedindo a identificação direta dos doadores. Em situações que demandem acesso ao sistema, a equipe do HEMOSC realizou a anonimização dos dados. Dois colaboradores foram responsáveis por criar um banco de dados que não revelasse a identidade dos doadores (Apêndice A). Os benefícios para os participantes serão indiretos, contribuindo para a formação do banco nacional de doadores raros. Todos os procedimentos seguiram os padrões operacionais estabelecidos pela instituição, além de estarem em conformidade com a legislação em vigor.

4.7.1 Riscos

Os riscos são considerados mínimos. Os riscos relacionados ao compartilhamento de dados são mitigados por meio do controle de acesso restrito ao pesquisador responsável e ao seu orientando, não sendo permitido o compartilhamento com terceiros, de modo a não comprometer a utilidade científica dos dados disponibilizados pelo HEMOSC.

4.7.2 Benefícios

Os participantes do estudo não apresentam benefícios diretos. Os benefícios do projeto incluem:

1. Impacto social: A estimativa da frequência do antígeno Lan em doadores de Santa Catarina, de forma regionalizada, e a possibilidade de identificação de doadores de sangue Lan negativos para composição do Cadastro Nacional de Sangue Raro podem permitir transfusões mais ágeis e seguras para receptores aloimunizados;
2. Contribuição para bancos de dados públicos: Caso sejam identificados portadores do fenótipo Lan negativo, o Cadastro Nacional de Sangue Raro poderá ser ampliado com dados referentes ao estado de Santa Catarina, contribuindo para a localização mais ágil de doadores compatíveis com o fenótipo Lan negativo associado aos sistemas ABO e Rh;
3. Contribuição para políticas públicas: Os resultados obtidos neste estudo podem contribuir para o fortalecimento das políticas públicas de fornecimento de sangue raro entre os hemocentros nacionais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO AMOSTRAL E TRIAGEM SOROLÓGICA

5.1.1 Seleção amostral

O Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) é responsável por toda a captação de doação voluntária de sangue e medula óssea, entre outras funções distribuindo hemocomponentes de qualidade para os serviços públicos e privados e gerindo o estoque de sangue do estado de Santa Catarina. Atende a maioria dos serviços do estado, sendo responsável pela cobertura de 99% do estado em hemoterapia. O Hemocentro funciona em rede estrategicamente instalados nas principais cidades das macrorregiões do estado (hemorrede estadual) compartilhando o estoque através de seus sete hemocentros, duas unidades de coleta e agências transfusionais (Figura 9) (HEMOSC, 2025).

Figura 9 - Mapa de abrangência da Hemorrede do HEMOSC, sinalizando o Hemocentro Coordenador, os HR e as UC.



Fonte: Extraído de HEMOSC, 2025.

De acordo com informações disponibilizadas no site do HEMOSC, são realizadas, em média, cerca de 10 mil doações de sangue mensalmente em todo o estado. Entre os diversos critérios de elegibilidade para doação, destacam-se aqueles relacionados ao intervalo e à frequência das doações.

A frequência máxima permitida é de até quatro doações de sangue total por ano para homens e três para mulheres, exceto em situações especiais, que devem ser avaliadas e aprovadas pelo responsável técnico. O intervalo mínimo entre duas doações de sangue total é de dois meses para homens e três meses para mulheres, respeitando-se os limites anuais estabelecidos.

No caso da doação por aférese (plaquetaférese), o intervalo mínimo entre duas coletas é de 15 dias, sendo permitido ao doador realizá-la no máximo duas vezes ao mês. Além disso, entre uma doação de sangue total e uma doação por plaquetaférese deve ser respeitado um intervalo mínimo de oito semanas.

5.1.2 Triagem sorológica: Fenotipagem eritrocitária

Foram triadas sorologicamente por metodologia de hemaglutinação associada a antiglobulina humana (teste de antiglobulina indireta) 8600 amostras de doadores de sangue da hemorrede do HEMOSC utilizando metodologia padronizada com reagente contendo anticorpo monoclonal com especificidade anti-Lan (OSK43; IgG1κ). Como o padrão de reatividade padronizado foi de 3+, qualquer leitura com intensidade menor foi retestada primeiramente com o anticorpo monoclonal diluído 1:50 e, em caso de repetição de intensidade menor que 3+, foi testada com reagente puro e realizado TAD, não sendo encontrado nenhum TAD positivo nas amostras selecionadas. Nos casos em que a reatividade foi reduzida ou negativa em reagente puro, a amostra foi segregada para extração de material genético seguida do congelamento do eluato para realização da etapa de sequenciamento do gene *ABCB6*.

A fenotipagem eritrocitária foi realizada utilizando 8600 amostras de doadores de sangue da hemorrede do HEMOSC respeitando a proporção entre o número de doações de cada Hemocentro/UC para um total de 200 amostras/dia de testagem, totalizando 43 dias de triagem em dois períodos distintos: 23/05/2024 a 05/07/2024 e 07/10/2024 a 26/11/2024. Dessas, 31 amostras apresentaram reatividade reduzida em anticorpo monoclonal diluído, entretanto, apenas cinco

reproduziram o resultado, sendo que uma foi confirmada com intensidade negativa e quatro reduzida em reagente puro. Dos quatro primeiros, um é doador do Hemocentro Coordenador, dois do HR de Criciúma e um do HR de Joinville, juntamente com a única doadora Lan- (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados obtidos durante etapa de fenotipagem eritrocitária.

Doador	Data de testagem	Hemocentro de Origem	Fenotipagem Diluída	Fenotipagem Pura	Fenótipo
1	18/06/2024	HR Joinville	(+)	2+	Lan(+ ^{wk})
2	19/06/2024	Hemocentro Coordenador	0	1+	Lan(+ ^{wk})
3	30/10/2024	HR Criciúma	0	1+	Lan(+ ^{wk})
4	19/11/2024	HR Joinville	0	0	Lan-
5	26/11/2024	HR Criciúma	1+	3+ ^w	Lan(+ ^{wk})

Legenda: A fenotipagem diluída foi realizada utilizando anticorpo monoclonal OSK43 diluído 1:30, enquanto na fenotipagem pura foi utilizado o anticorpo na sua forma não diluída.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Cada doador pôde participar do estudo apenas uma única vez. Entretanto, como os dados laboratoriais eram anonimizados por meio do uso de amostras identificadas exclusivamente por códigos de barras, e as testagens foram realizadas em dois períodos distintos (23/05/2024 a 05/07/2024 e 07/10/2024 a 26/11/2024), houve a ocorrência de doadores repetidos entre os períodos.

A identificação dessas duplicidades foi realizada posteriormente por meio de planilhamento anonimizado em software Microsoft Excel, utilizando o número único de identificação do doador — denominado número de Pessoa Física (PF) — obtido a partir de dados extraídos do HemoSis.

Ao todo, 314 números de PF apresentaram duplicidade, sendo excluído um dos registros correspondentes a cada par, o que resultou na exclusão de 157 amostras. Os resultados fenotípicos encontrados entre as duplicatas foram iguais entre si. Adicionalmente, dois códigos de barras foram desconsiderados devido a erro de leitura pelo leitor óptico.

Após a exclusão das amostras duplicadas e dos registros inválidos, 8.441 amostras foram consideradas elegíveis para análise final. Na triagem sorológica realizada com o anticorpo monoclonal anti-Lan OSK43, foi identificada uma amostra inicialmente classificada como Lan negativa e quatro amostras com reatividade

reduzida, caracterizadas como Lan positivo fraco Lan(+^{wk}), correspondendo às frequências de 1:8.441 (0,012%) e 4:8.441 (0,047%), respectivamente.

O antígeno Lan é classicamente descrito como de alta incidência, com positividade superior a 99,9% na maioria das populações estudadas (Abdelmonem et al., 2024; Koszarska et al., 2014; Tanaka et al., 2014). Trabalhos prévios evidenciam a raridade extrema do fenótipo Lan-: Okubo et al. (1984) não identificaram nenhum indivíduo Lan- após a triagem de aproximadamente 15.000 doadores japoneses, enquanto Helias et al. (2012), em um estudo envolvendo 713.384 doadores, relataram apenas 14 indivíduos Lan-, correspondendo a uma frequência aproximada de 0,002% (1:51.000). Nesse contexto, a frequência observada neste estudo, embora numericamente superior à descrita em grandes coortes asiáticas, permanece compatível com a classificação do fenótipo Lan- como extremamente raro e pode refletir variações amostrais decorrentes do menor tamanho da coorte, bem como diferenças populacionais na distribuição de alelos do gene *ABCB6*.

A identificação de quatro doadores com fenótipo Lan(+^{wk}) reforça evidências crescentes de que a expressão do antígeno Lan não é binária, mas apresenta um espectro quantitativo. Estudos demonstraram que fenótipos Lan fracos estão frequentemente associados à heterozigose para alelos nulos ou hipomórficos do *ABCB6*, resultando em expressão reduzida do antígeno na membrana eritrocitária (McBean et al., 2015). Avaliações quantitativas por citometria de fluxo indicam que hemácias Lan(+^{wk}) podem expressar cerca de 50% da quantidade de antígeno observada em indivíduos Lan positivos, e que fenótipos intermediários, como Lan(+^{wk}/-), podem apresentar tipagens variáveis, inclusive resultados negativos, dependendo do reagente anti-Lan utilizado (McBean et al., 2015; Reid et al., 2014). Além disso, a triagem da expressão da proteína ABCB6 em indivíduos saudáveis revelou uma frequência inesperadamente elevada de variantes associadas à redução ou ausência de expressão dessa proteína, sugerindo que fenótipos de expressão diminuída do antígeno Lan podem ser mais comuns do que o verdadeiro fenótipo Lan- (Koszarska et al., 2014).

No presente estudo, os doadores com fenótipos Lan- e Lan(+^{wk}) foram identificados em diferentes regiões do estado de Santa Catarina, sem evidência de agrupamento geográfico. A análise de possível correlação étnica é limitada devido a autodeclaração de raça/cor não constituir um campo obrigatório no sistema HemoSis

e o procedimento para sua avaliação não estar bem estabelecido na triagem clínica dos candidatos a doação de sangue, o que restringe inferências diretas nesse sentido e pelo limitado número amostral. Ainda assim, considerando a distribuição geográfica dos casos identificados e a composição populacional do estado segundo dados censitários do IBGE, não se observou padrão sugestivo de associação étnica específica. Esses achados estão em consonância com a literatura, que descreve a ocorrência de indivíduos Lan⁻ e Lan fracos em diferentes grupos étnicos, incluindo populações caucasianas, negras e asiáticas, sem restrição geográfica evidente (Abdelmonem et al., 2024; Okubo et al., 1984; Tanaka et al., 2014; Xu et al., 2025).

Do ponto de vista clínico e transfusional, a identificação de indivíduos Lan⁻ ou com expressão reduzida do antígeno é relevante, uma vez que indivíduos verdadeiramente Lan⁻ podem desenvolver aloanticorpos anti-Lan associados a reações transfusionais hemolíticas e, mais raramente, à DHFRN (Abdelmonem et al., 2024; Brooks; Squires, 2014; Helias et al., 2012; Koszarska et al., 2014; McBean et al., 2015; Reid; Lomas-Francis; Olsson, 2012; Sharma et al., 2020; Smith et al., 1969). Considerando a elevada prevalência do antígeno Lan na população geral, a identificação e o eventual cadastramento desses doadores negativos em registros de doadores raros podem contribuir para o manejo transfusional de pacientes com anti-Lan. Nesse cenário, a utilização do anticorpo monoclonal OSK43 mostrou-se adequada para a triagem em larga escala e para a detecção de fenótipos de expressão reduzida, fundamentando a continuidade do estudo por meio de fenotipagem dirigida, estudo familiar e análise molecular do gene *ABCB6*, etapas abordadas a seguir (Abdelmonem et al., 2024; Basavarajegowda et al., 2023; Koszarska et al., 2014; McBean et al., 2015; Okubo et al., 1984; Reid et al., 2014; Tanaka et al., 2014; Xu et al., 2025).

5.1.2.1 Estudo familiar

Após a etapa de triagem sorológica, os anonimizadores foram acionados para realizarem o primeiro contato de orientação com os cinco doadores envolvidos (1 Lan- e 4 Lan (+^{wk})) e responderem o questionário de dados de contato dos irmãos (Apêndice C). Em seguida, ocorreu contato com os irmãos para convite de participação no estudo, marcação de data presencial para aplicação do TCLE e coleta de amostra.

A inclusão dos familiares esteve condicionada tanto ao consentimento dos doadores em envolver seus irmãos quanto à disponibilidade e concordância destes em participar do estudo, o que resultou na inclusão parcial dos familiares elegíveis. Todos os participantes residiam em localidades próximas a algum HR ou UC que realiza diariamente o transporte de amostras para o Hemocentro Coordenador, facilitando a logística de coleta e transportes dessas amostras até as suas testagens e extrações (Quadro 3).

Quadro 3 - Quantitativo de irmãos incluídos, local de coleta das amostras e seus números de identificação no estudo.

Doador (fenótipo)	Hemocentro de Origem	Nº total de irmãos (Nº de irmãos incluídos no estudo)	Local de coleta dos irmãos	Número de identificação do indivíduo no estudo
1 (Lan + ^w)	HR de Joinville	0 (0)	-	-
2 (Lan + ^w)	Hemocentro Coordenador	2 (2)	Guarapuava (PR)	10
			Santiago (RS)	7
3 (Lan + ^w)	HR de Criciúma	>14 (2)	Tubarão (SC)	9
			Tubarão (SC)	11
4 (Lan -)	HR de Joinville	0 (0)	-	-
5 (Lan + ^w)	HR de Criciúma	2 (2)	Criciúma (SC)	6
			Criciúma (SC)	8

Fonte: Elaborada pelo autor, 2025.

Ao total foram incluídos seis irmãos consanguíneos dos doadores Lan- e Lan(+^{wk}) no estudo, sendo que os resultados da fenotipagem eritrocitária estão descritos na Tabela 7. Observou-se que nenhum dos irmãos avaliados apresentou fenótipo Lan-, enquanto três foram classificados como Lan(+^{wk}) e três como Lan positivos.

Tabela 7 - Resultado da fenotipagem eritrocitária dos irmãos incluídos na etapa de estudo familiar.

Indivíduo	Fenotipagem diluída	Fenotipagem pura	Fenótipo
6	2+	3+ ^w	Lan(+ ^{wk})
7	0	1+	Lan(+ ^{wk})
8	1+	2+	Lan(+ ^{wk})
9	3+	3+	Lan +
10	3+	3+	Lan +
11	2+	3+	Lan +

Legenda: A fenotipagem diluída foi realizada utilizando anticorpo monoclonal OSK43 diluído 1:30, enquanto na fenotipagem pura foi utilizado o anticorpo na sua forma não diluída.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2025.

A análise dos resultados familiares evidenciou variabilidade intrafamiliar na expressão do antígeno Lan entre os irmãos consanguíneos avaliados, com coexistência de fenótipos Lan positivos e Lan positivos fracos. Esse padrão de segregação não é compatível com um modelo recessivo simples associado exclusivamente à ausência completa do antígeno, mas sugere a presença de variantes genéticas associadas à expressão reduzida do antígeno Lan. Estudos prévios demonstraram que fenótipos Lan(+^{wk}) podem ocorrer em indivíduos heterozigotos para variantes nulas ou hipomórficas do gene *ABCB6*, resultando em diminuição quantitativa da expressão do antígeno na superfície eritrocitária, com reatividade variável conforme o reagente anti-Lan utilizado (Koszarska et al., 2014; McBean et al., 2015; Tanaka et al., 2014).

No caso do doador inicialmente classificado como Lan negativo na triagem sorológica, não foi possível realizar avaliação de segregação familiar devido à ausência de irmãos incluídos no estudo. Dessa forma, a interpretação desse achado baseia-se exclusivamente nos resultados sorológicos iniciais e nas análises complementares realizadas posteriormente, reforçando a necessidade de investigação molecular e funcional para o correto esclarecimento do fenótipo observado.

De acordo com o Guia do Cadastro Nacional de Sangue Raro do Ministério da Saúde (Brasil, 2022), a investigação familiar de indivíduos com fenótipos eritrocitários raros constitui uma estratégia recomendada para aumentar a probabilidade de identificação de novos indivíduos com fenótipos semelhantes, sendo frequentemente estimado um incremento aproximado de 25% em relação à triagem populacional ao acaso. No presente estudo, embora essa abordagem não

tenha resultado na identificação de indivíduos com fenótipo Lan negativo, observou-se um enriquecimento expressivo de fenótipos Lan(+^{wk}) entre os familiares avaliados. Considerando a frequência de Lan(+^{wk}) observada na triagem populacional (0,047%) e aquela identificada no estudo familiar (50%), verificou-se um enriquecimento aproximado de 1.060 vezes na detecção de fenótipos de expressão reduzida do antígeno Lan no contexto familiar. Embora esse valor deva ser interpretado com cautela em razão do número limitado de indivíduos avaliados, ele ilustra de forma objetiva a relevância da investigação familiar como estratégia para a identificação de fenótipos parciais associados ao sistema Lan, particularmente aqueles relacionados à variabilidade de expressão do gene *ABCB6*.

Esses achados fundamentaram a continuidade do estudo por meio da análise molecular do gene *ABCB6* e da aplicação de metodologias complementares, com o objetivo de esclarecer os mecanismos genéticos envolvidos e relacionados à variabilidade fenotípica observada.

5.2 SEQUENCIAMENTO DO GENE *ABCB6* E TRIAGEM DAS MUTAÇÕES

Com base na metodologia previamente descrita, procedeu-se à análise genômica do gene *ABCB6* com o objetivo de investigar variantes associadas aos fenótipos sorológicos observados no sistema Lan. A estratégia adotada contemplou o sequenciamento de cinco fragmentos gênicos, abrangendo a totalidade dos 19 éxons do gene, incluindo regiões flangeadoras intrônicas.

Inicialmente, o material genético foi obtido a partir de amostras de sangue periférico dos doadores incluídos no estudo, bem como de seus respectivos irmãos. A extração de DNA genômico foi realizada conforme protocolo descrito na metodologia, resultando em amostras adequadas para as etapas subsequentes de amplificação e sequenciamento.

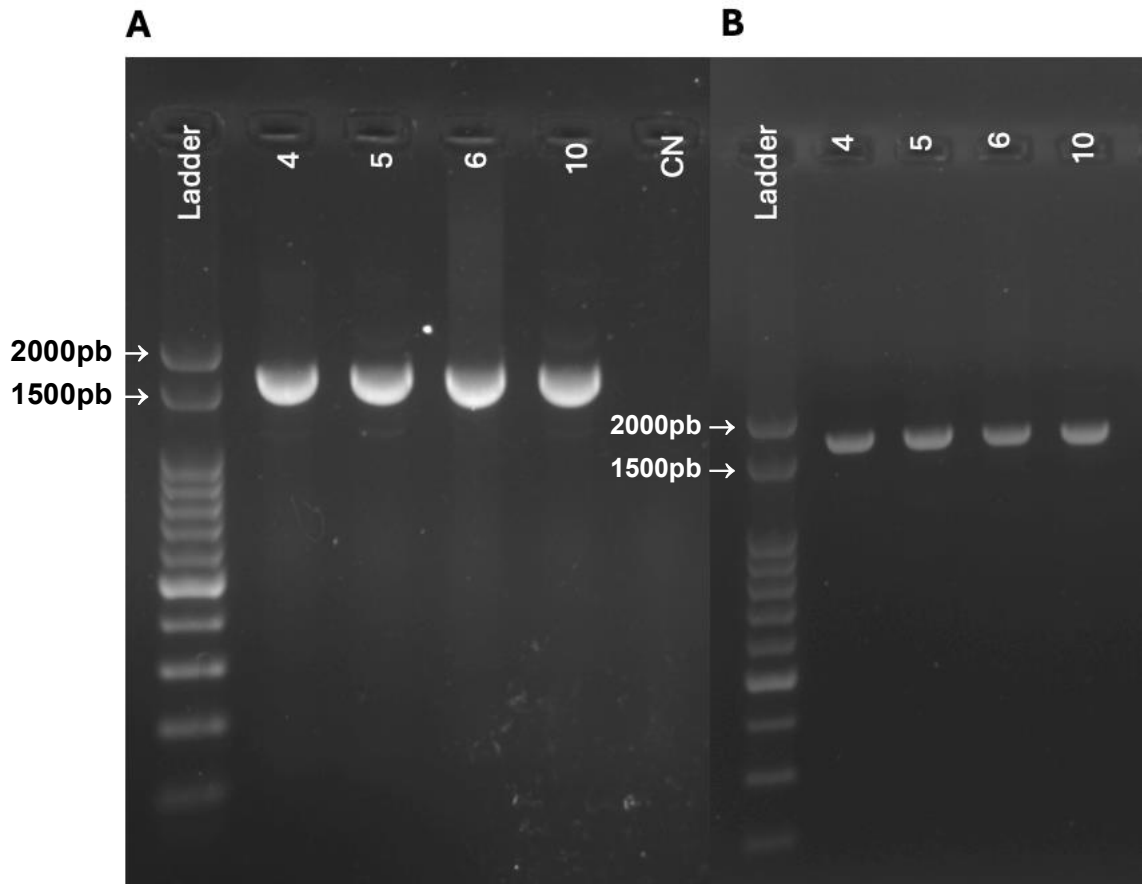
Após a extração, as amostras de DNA foram submetidas à quantificação e avaliação de pureza, permitindo a padronização das concentrações utilizadas nas reações de PCR. Em seguida, foram realizadas reações de amplificação para cada um dos cinco fragmentos do gene *ABCB6*. A eficiência da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, sendo observada a presença de bandas com tamanhos compatíveis com os fragmentos esperados. A Figura 10 ilustra um

exemplo representativo do perfil de amplificação obtido para uma das reações de PCR realizadas.

As amostras que apresentaram amplificação adequada foram então submetidas ao processo de purificação dos produtos de PCR, com o objetivo de remover iniciadores residuais, nucleotídeos livres e outras impurezas que poderiam interferir na reação de sequenciamento. Após a purificação, os produtos foram novamente avaliados por eletroforese em gel de agarose, confirmando a integridade e especificidade dos fragmentos purificados (Figura 10).

Os produtos de PCR purificados foram então submetidos ao sequenciamento pelo método de Sanger. Após o recebimento dos arquivos de sequenciamento, foi realizada a análise da qualidade das leituras obtidas. As sequências foram inicialmente avaliadas quanto aos parâmetros de qualidade, seguida da remoção das regiões de baixa confiabilidade nas extremidades das leituras (*trimming*). Nessa etapa foi evidenciado um problema no sequenciamento da região correspondente ao éxon 2, associada aos iniciadores utilizados, impedindo a obtenção de cobertura adequada do segmento. As demais sequências tratadas foram então alinhadas individualmente às sequências de referência correspondentes a cada um dos éxons do gene *ABCB6*, possibilitando o rastreamento (*screening*) de variantes nucleotídicas ao longo das regiões codificantes. Essa abordagem permitiu a obtenção de dados confiáveis para a identificação e caracterização das variantes genéticas presentes nos indivíduos analisados.

Figura 10 - Géis de agarose impregnados com brometo de etídio contendo produtos amplificados da PCR A (A) e após purificação do produto de PCR A (B).



Legenda: *Ladder* – padrão de tamanho molecular de 100 pb; 4, 5, 6 e 10 – amostra dos indivíduos 4, 5, 6 e 10 do estudo, respectivamente; CN – controle negativo.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2025.

A análise do sequenciamento dos cinco fragmentos do gene ABCB6, abrangendo os 19 éxons, permitiu a identificação de múltiplas variantes genéticas distribuídas principalmente nos éxons 1, 3, 12 e 16 (Quadro 4). Os resultados foram organizados considerando tanto a ocorrência individual das variantes quanto o agrupamento familiar dos doadores analisados. Foram encontradas ao todo cinco mutações envolvidas com o fenótipo Lan (+^{wk}): c.826C>T (Reid et al., 2014; Saison et al., 2013); c.1762G>A (Reid et al., 2014; Saison et al., 2013); c.2148C>M (*novel*); c.2215C>T (*novel*); c.2216G>A (Reid et al., 2014); e uma mutação sinônima c.117G>A (*novel*). Em um estudo similar, realizado em 2014, por Koszarska et al. observou-se 34 variações associadas a esse fenótipo em indivíduos saudáveis de três diferentes coortes, uma incluindo 184 doadores de sangue húngaros, outra com 1089 indivíduos poloneses e a terceira com 47 indivíduos saudáveis húngaros classificados como “coorte de descoberta”.

Quadro 4 - Determinação e classificação das mutações do gene *ABCB6* encontradas nos indivíduos do estudo.

Grupo Familiar	Indivíduo	Éxon	Mudança do nucleotídeo	Mudança do aminoácido	Nome do alelo (ISBT)	Fenótipo (ISBT)
A	1	1	c.117G>A (homo)	Sem mudança	-	-
		12	c.1762G>A (homo)	p.Gly588Ser	<i>ABCB6*01W.03</i>	Lan fraco ^{1,2}
B	2	1	c.117G>A (homo)	Sem mudança	-	-
		3	c.826C>T (homo)	p.Arg276Trp	<i>ABCB6*01W.01</i>	Lan fraco ^{1,2}
	7	1	c.117G>A (homo)	Sem mudança	-	-
		3	c.826C>T (homo)	p.Arg276Trp	<i>ABCB6*01W.01</i>	Lan fraco ^{1,2}
	10	3	c.826C>Y (hetero)	p.Arg276Trp	<i>ABCB6*01W.01</i>	Lan fraco ^{1,2}
C	3	1	c.117G>A (homo)	Sem mudança	-	-
		12	c.1762G>R (hetero)	p.Gly588Ser	<i>ABCB6*01W.03</i>	Lan fraco ^{1,2}
		16	c.2215C>Y (hetero)	p.739R>C	<i>novel</i>	-
	9	1	c.117G>A (homo)	Sem mudança	-	-
		16	c.2215C>Y (hetero)	p.739R>C	<i>novel</i>	-
	11	1	c.117G>A (homo)	Sem mudança	-	-
D	4	1	c.117G>A (homo)	Sem mudança	-	-
		12	c.1762G>R (hetero)	p.Gly588Ser	<i>ABCB6*01W.03</i>	Lan fraco ^{1,2}
		16	c.2216G>R (hetero)	p.Arg739His	<i>ABCB6*01W.04</i>	Lan fraco ¹
E	5	1	c.117G>A (homo)	Sem mudança	-	-
		3	c.826C>Y (hetero)	p.Arg276Trp	<i>ABCB6*01W.01</i>	Lan fraco ^{1,2}
		16	c.2148C>M (hetero)	p.716Y>* (<i>stop códon</i>)	<i>novel</i>	-
		16	c.2215C>Y (hetero)	p.739R>C	<i>novel</i>	-
	6	1	c.117G>R (hetero)	Sem mudança	-	-
		3	c.826C>Y (hetero)	p.Arg276Trp	<i>ABCB6*01W.01</i>	Lan fraco ^{1,2}
	8	1	c.117G>A (homo)	Sem mudança	-	-
		3	c.826C>Y (hetero)	p.Arg276Trp	<i>ABCB6*01W.01</i>	Lan fraco ^{1,2}
		16	c.2215C>Y (hetero)	p.739R>C	<i>novel</i>	-

Legenda: ¹(Reid et al., 2014), ²(Saison et al., 2013).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2025.

Todos os indivíduos incluídos no estudo apresentaram a variante sinônima c.117G>A, localizada no éxon 1, observada predominantemente em estado homozigoto. Essa variante não resultou em alteração da sequência de aminoácidos da proteína ABCB6 e esteve presente de forma recorrente entre os diferentes grupos familiares e indivíduos não aparentados.

Entre as variantes não sinônimas previamente descritas na literatura, destacaram-se mutações associadas a alelos conhecidos de *ABCB6* relacionados ao fenótipo Lan positivo fraco. A variante c.826C>T (p.Arg276Trp), correspondente ao alelo *ABCB6*01W.01*, foi identificada em diferentes indivíduos, tanto em homozigose quanto em heterozigose, principalmente no éxon 3. De forma semelhante, a variante c.1762G>A (p.Gly588Ser), associada ao alelo *ABCB6*01W.03*, foi detectada no éxon 12, em estados homozigoto e heterozigoto. A variante c.2216G>A (p.Arg739His), correspondente ao alelo *ABCB6*01W.04*, também foi identificada em heterozigose em um dos indivíduos analisados.

Os doadores 1 e 4 não possuíam irmãos incluídos no estudo. O doador 1 apresentou, além da variante sinônima c.117G>A em homozigose, a variante c.1762G>A (p.Gly588Ser) no éxon 12, também em homozigose, previamente descrita como associada ao alelo *ABCB6*01W.03*, relacionado ao fenótipo Lan positivo fraco. O doador 4, identificado sorologicamente como Lan negativo, apresentou um perfil genético composto pela variante c.117G>A em homozigose, associada às variantes c.1762G>R (p.Gly588Ser) no éxon 12 e c.2216G>R (p.Arg739His) no éxon 16, ambas em heterozigose. Essas variantes correspondem aos alelos *ABCB6*01W.03* e *ABCB6*01W.04*, respectivamente, previamente associados ao fenótipo Lan positivo fraco.

O grupo familiar composto pelos indivíduos 2, 7 e 10 apresentou variantes recorrentes no éxon 3. Os indivíduos 2 e 7 exibiram a variante c.826C>T (p.Arg276Trp) em homozigose, correspondente ao alelo *ABCB6*01W.01*, enquanto o indivíduo 10 apresentou a mesma variante em heterozigose (c.826C>Y). Apesar do compartilhamento genético, os fenótipos sorológicos não foram homogêneos dentro do grupo, com variação entre Lan positivo fraco e Lan positivo.

No grupo formado pelos indivíduos 3, 9 e 11, observou-se maior heterogeneidade genética. O indivíduo 3 apresentou, além da variante c.117G>A em homozigose, a variante c.1762G>R (p.Gly588Ser) no éxon 12 e a variante c.2215C>Y (p.Arg739Cys) no éxon 16, ambas em heterozigose, sendo esta

última considerada uma variante *novel*. O indivíduo 9 compartilhou a variante *novel* c.2215C>Y em heterozigose, enquanto o indivíduo 11 apresentou apenas a variante sinônima c.117G>A.

O grupo familiar composto pelos indivíduos 5, 6 e 8 apresentou o maior número de variantes por indivíduo. O indivíduo 5 exibiu, além da variante c.117G>A em homozigose, a variante c.826C>Y (p.Arg276Trp) no éxon 3, bem como duas variantes no éxon 16: c.2148C>M (p.Tyr716), que introduz um códon de parada prematuro, e c.2215C>Y (p.Arg739Cys), ambas classificadas como variantes *novel* e em heterozigose. Os indivíduos 6 e 8 compartilharam a variante c.826C>Y (p.Arg276Trp) em heterozigose, sendo que o indivíduo 8 também apresentou a variante *novel* c.2215C>Y no éxon 16.

O sequenciamento do gene *ABCB6* foi realizado com o objetivo de elucidar a base molecular dos fenótipos sorológicos identificados na triagem inicial e aprofundados no estudo familiar. A abordagem adotada, abrangendo todos os éxons codificantes, permitiu a identificação de variantes previamente descritas na literatura, associadas a fenótipos Lan positivo fraco, bem como de variantes *novel* com potencial impacto funcional.

A qualidade das leituras obtidas assegurou a confiabilidade da análise genotípica, conforme ilustrado pela visualização dos fragmentos amplificados e pela consistência das sequências obtidas (Figura 10). Para as variantes identificadas em homozigose, foi avaliada a qualidade da chamada de base na posição mutada, observando-se picos únicos, bem definidos e com valores de qualidade elevados nos eletroferogramas. Nos casos de heterozigose, a interpretação baseou-se na análise conjunta da posição da mutação e das regiões adjacentes, verificando-se a presença de dois picos sobrepostos, bem formados e de intensidades compatíveis, além de boa qualidade das bases adjacentes. Ressalta-se que, nessas situações, a qualidade da base na posição específica da mutação tende a ser reduzida em decorrência da leitura simultânea de dois nucleotídeos distintos no mesmo ponto, característica esperada em variantes heterozigóticas. Esses critérios de avaliação são exemplificados nos eletroferogramas e alinhamentos apresentados nas figuras subsequentes, referentes às principais variantes identificadas neste estudo (Figuras 10–14).

Estudos prévios demonstram que essas variantes estão associadas à redução quantitativa da expressão do antígeno Lan, com reatividade sorológica variável conforme o reagente empregado, refletindo diferenças na densidade antigênica da membrana eritrocitária (Koszarska et al., 2014; McBean et al., 2015; Reid et al., 2014; Xiao; Zhou; Lauschke, 2020). Devido ao grande tamanho da coorte polonesa do estudo de Koszarska et al. 2014), com cerca de 1089 indivíduos, permitiu-lhes confirmar com relativa certeza as altas frequências alélicas das variantes ligadas à expressão fraca ou ausente de ABCB6 nos eritrócitos, assim como em nosso estudo. Porém, em discordância com os resultados obtidos por eles, não encontramos relação causal dentro dos grupos familiares entre o polimorfismo p.Arg276Trp e p.Gly588Ser. O artigo cita uma provável relação entre a população estudada e a ligação entre as duas mutações devido a um efeito fundador, o que não foi evidenciado em nossa população e que pode ser a mesma explicação da presença expressiva da mutação sinônima c.117G>A.

A ISBT mantém uma página web para cada sistema contendo informações sobre os sistemas de grupos sanguíneos e seus antígenos, incluindo todas as mutações já descritas com suas comprovações fundamentadas periodicamente atualizadas. Todas as mutações foram comparadas com as já reconhecidas por esta organização, com base em literatura atualizada e referenciada (ISBT, 2026c). Devido à limitação da técnica empregada, não foi possível determinar se as diferentes mutações encontradas em um mesmo indivíduo estavam em alelos diferentes e assim levando a um sinergismo em sua expressão fenotípica, ou se estavam em um mesmo alelo, o que poderia não diminuir ainda mais a expressão da proteína na membrana dos eritrócitos. Esse entendimento seria importante especialmente em alguns casos de mesmas mutações em indivíduos diferentes, porém com expressão fenotípica diferente, e para uma melhor caracterização da mutação *nonsense* encontrada.

5.2.1 Correlação intrafamiliar genótipo–fenótipo

5.2.1.1 Grupo Familiar B – variante c.826C>T (p.Arg276Trp)

Na família B, a variante c.826C>T foi identificada em diferentes estados de zigosidade. Os indivíduos homozigotos para essa mutação apresentaram reatividade sorológica mais fraca quando comparados ao indivíduo heterozigoto e a outros membros da família que também carregavam a variante. Esse resultado é biologicamente plausível no contexto de variantes hipomórficas do ABCB6, já que a mutação p.Arg276Trp não é classificada como alelo nulo, mas como variante associada à redução da expressão da proteína. Em homozigose, a presença exclusiva da proteína estruturalmente alterada pode resultar em maior instabilidade, retenção intracelular ou degradação, reduzindo ainda mais a fração de ABCB6 que atinge a membrana eritrocitária. Em contraste, no estado heterozigoto, a expressão residual do alelo funcional pode ser suficiente para gerar maior reatividade sorológica. Em um estudo de 2020, Xiao, Zhou e Lauschke, observaram que 138.632 indivíduos, em sete populações diferentes, apresentaram 62.793 variantes exômicas (sendo 98,5% raras) pelo método de técnica de sequenciamento de nova geração (NGS) dentro da superfamília de transportadores humanos ABC. Esse achado permitiu inferir que essa família apresenta uma elevada variabilidade etnogeográfica e interindividual. A proteína ABCB6, sendo da mesma família de transportadores ABC, apresentou padrão compatível com a ampla variabilidade quantitativa da expressão de ABCB6 descrita mesmo entre indivíduos com genótipos semelhantes, do mesmo ou de diferentes grupos familiares. Essas informações também podem ser corroboradas por McBean et al. (2015) que em um estudo incluindo indivíduos Lan+, Lan (+^{wk}) e Lan-, demonstrou não apenas variabilidade quantitativa nos níveis de sítios de ABCB6 na membrana eritrocitária entre fenótipos distintos, mas também dentro do mesmo fenótipo, especialmente do fenótipo Lan (+^{wk}).

5.2.1.2 Grupo Familiar C – variante *novel* c.2215C>T (p.Arg739Cys)

A família C apresentou um padrão particularmente informativo para a interpretação de variantes *novel*. Dois irmãos compartilharam a mutação c.2215C>T (p.Arg739Cys), localizada no éxon 16, enquanto o terceiro não apresentou essa variante. O eletroferograma e o alinhamento dessa mutação *novel* são apresentados na Figura 14. A segregação familiar da variante, associada a fenótipos de expressão reduzida do antígeno Lan, sugere um efeito hipomórfico plausível, ainda que não determinístico.

O éxon 16 codifica uma região estruturalmente relevante da proteína ABCB6, próxima ao domínio ABC, envolvido na ligação e hidrólise de ATP. Evidências funcionais demonstram que ABCB6 atua como um transportador dependente de ATP, cuja integridade estrutural é essencial para seu dobramento, estabilidade e tráfego intracelular (Paterson et al., 2007; Koszarska et al., 2014; Xu et al., 2025). Alterações em regiões conservadas podem comprometer a expressão funcional da proteína, mesmo na ausência de perda completa do alelo (Roesler; Rao, 2000; Xue; Crum; Thibodeau, 2014). A substituição Arg→Cys implica perda de carga positiva essencial e introdução de um grupo tiol reativo capaz de formar ligações dissulfeto desestabilizantes, fenômeno amplamente descrito em outras proteínas, o que pode impactar de forma mais pronunciada a estabilidade ou o processamento da proteína, conferindo plausibilidade biológica ao papel da variante p.Arg739Cys na modulação da expressão do antígeno Lan (Guo et al., 2023; Liu et al., 2019; Pantoliano et al., 1987; Roesler; Rao, 2000).

No contexto da segregação observada nesta família, a análise individual dos membros evidencia nuances importantes na correlação genótipo–fenótipo. Observa-se que a variante c.1762G>A (p.Gly588Ser), localizada no éxon 12, está presente exclusivamente no indivíduo 3, que corresponde ao único membro com fenótipo sorológico claramente classificado como Lan positivo fraco. Esse achado sugere que essa variante pode exercer um efeito modulador relevante sobre a expressão do antígeno, potencialmente atuando de forma aditiva em conjunto com outras alterações no gene *ABCB6*. Por outro lado, o indivíduo 9, embora portador da variante c.2215C>T (p.Arg739Cys), não apresentou fenótipo sorológico enfraquecido, indicando que essa alteração isoladamente pode não ser suficiente para determinar redução detectável da expressão do antígeno Lan. Esse padrão

Os irmãos desse indivíduo compartilharam parcialmente as variantes identificadas, porém não apresentaram um padrão linear de redução da reatividade sorológica, sendo observada variabilidade mesmo entre indivíduos com perfis genéticos semelhantes. Esse gradiente intrafamiliar sugere um efeito cumulativo das mutações sobre a expressão do antígeno Lan, no qual a combinação de uma mutação *nonsense* com variantes *missense* resulta em expressão extremamente reduzida, enquanto variantes isoladas produzem fenótipos mais brandos. Evidências funcionais independentes sustentam esse modelo, demonstrando que alterações estruturais na ABCB6, particularmente em regiões próximas ao domínio ABC, podem comprometer a estabilidade e o tráfego da proteína, reduzindo sua expressão funcional (Boswell-Casteel; Fukuda; Schuetz, 2018; Helias et al., 2012; Koszarska et al., 2014; McBean et al., 2015; Paterson et al., 2007; Song et al., 2021). A grande prevalência de mutações *missense* e *nonsense* são evidenciadas em outras pesquisas de cunho imuno-hematológico; outrossim, o estudo de Xiao; Zhou; Lauschke (2020) reforça que dentro dos diversos transportadores ABC humanos, há predominância de variabilidade *missense*, seguida de *nonsense* permeando a subfamília ABCB6 de proteínas (Helias et al., 2012; Koszarska et al., 2014; Okubo et al., 1984; Reid et al., 2014; Saison et al., 2013; Tanaka et al., 2014; Xu et al., 2025). A confirmação desse genótipo é de suma importância para compreendermos o papel de uma nova mutação *null* para antígeno Lan, o que corrobora fortemente para a ideia de uma chance da existência dessa mutação em homozigose acarretando em um fenótipo Lan negativo na população do estado ou do país. Esse resultado reacende o alerta da possibilidade de indivíduos Lan negativo e reforça a importância do estabelecimento de uma estratégia de busca ativa por doadores Lan negativo no intuito de assegurar um cadastro para formação de estoque seguro para futuros possíveis pacientes com o mesmo fenótipo.

Adicionalmente, observa-se que os indivíduos 5 e 8 compartilham a variante c.2215C>T (p.Arg739Cys), previamente identificada em outra família deste estudo, e apresentam fenótipos sorológicos reduzidos em relação ao padrão Lan positivo. Notavelmente, o indivíduo 5, portador adicional da mutação *nonsense* c.2148C>A (p.Trp716*), não apresentou reatividade inferior à de seu irmão (indivíduo 8), evidenciando que a presença de uma variante truncante não se traduziu, neste caso, em redução proporcional da expressão do antígeno. Esse achado reforça a ausência de uma relação estritamente linear entre genótipo e fenótipo, mesmo em um

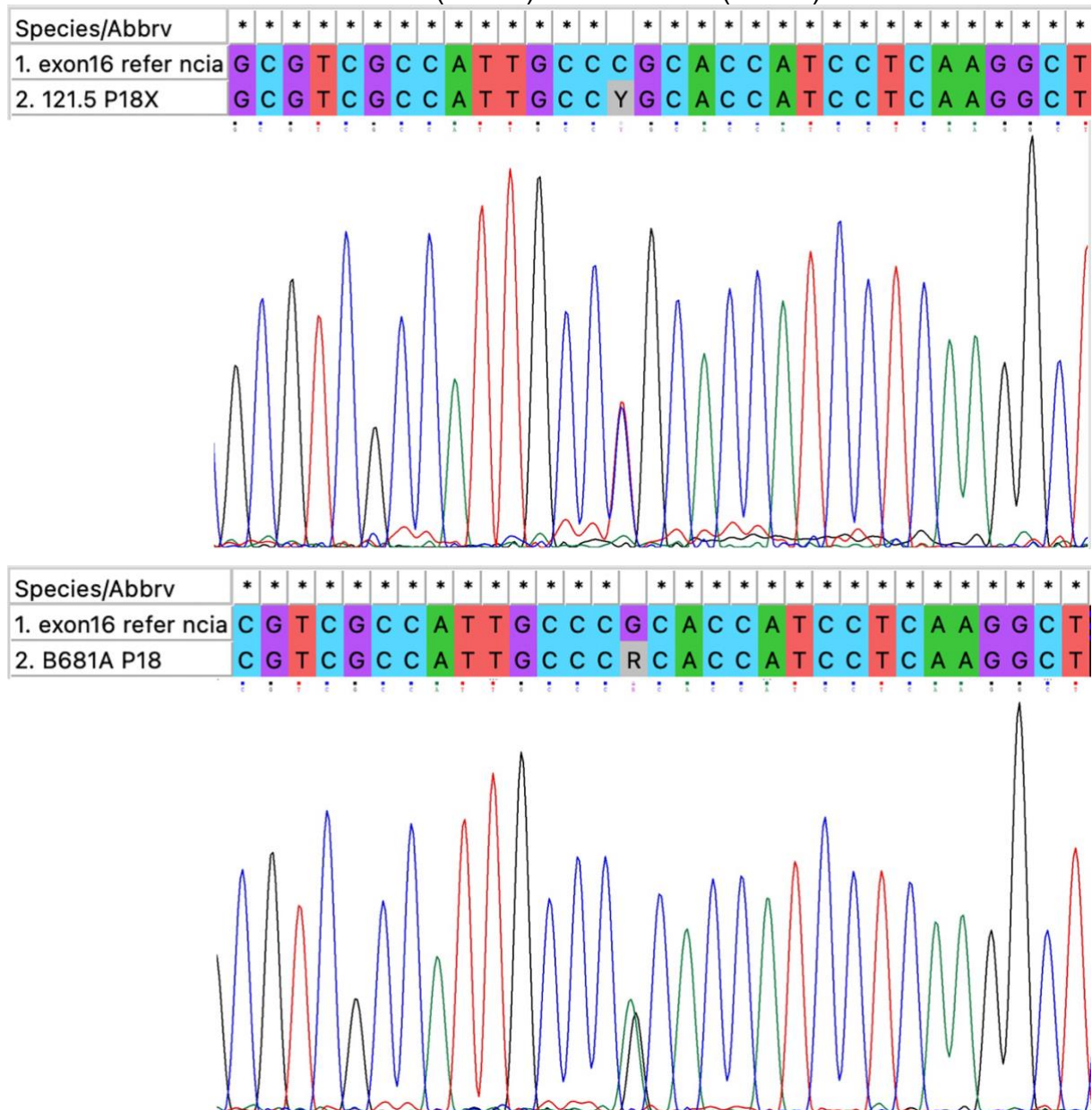
contexto intrafamiliar controlado. Em conjunto, esses dados sustentam a hipótese de que a expressão do antígeno Lan resulta de uma interação complexa entre variantes genéticas e possíveis fatores regulatórios adicionais, nos quais mutações *missense*, como c.2215C>T, podem exercer papel modulador relevante, mas não determinístico, sobre o fenótipo final (Koszarska et al., 2014; McBean et al., 2015).

5.2.1.4 Comparação entre indivíduos 3 e 4 – nucleotídeos 2215 versus 2216

Um achado de particular relevância emergiu da comparação direta entre os indivíduos 3 e 4, que compartilham o mesmo conjunto de variantes adicionais no gene *ABCB6*, diferindo exclusivamente na substituição nucleotídica que afeta o resíduo Arg739. O indivíduo 3 apresenta a variante novel c.2215C>T (p.Arg739Cys) e exibiu reatividade sorológica residual (1+ em reagente puro), compatível com um fenótipo Lan positivo fraco ou até Lan^{w/-}. Em contraste, o indivíduo 4 apresenta a variante previamente descrita c.2216G>A (p.Arg739His) e foi classificado como Lan negativo na tipagem sorológica. A comparação direta entre os eletroferogramas e alinhamentos dessas duas variantes é ilustrada na Figura 14.

Embora ambas as variantes afetem a mesma trinca de aminoácidos, a natureza bioquímica das substituições é distinta. A troca Arg→His pode ser considerada relativamente mais conservadora, enquanto a substituição Arg→Cys pode implicar perda de carga positiva e introdução de uma modificação de maior importância. A discrepância sorológica observada entre esses indivíduos, em um contexto genético praticamente idêntico, sugere que alterações sutis na natureza da substituição podem influenciar de maneira crítica a expressão residual do *ABCB6* na membrana eritrocitária, posicionando esses fenótipos próximos ao limite de detecção sorológica (Guo et al., 2023; McBean et al., 2015; Paterson et al., 2007; Song et al., 2021; Xue; Crum; Thibodeau, 2014). Ainda assim, nesse primeiro contexto, ela parece não realizar uma reatividade sorológica menos pronunciada se comparada com a mutação c.2216G>A já descrita.

Figura 14 - Comparação entre os eletroferogramas e alinhamentos das variantes c.2215C>Y (hetero) e c.2216G>R (hetero).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2026.

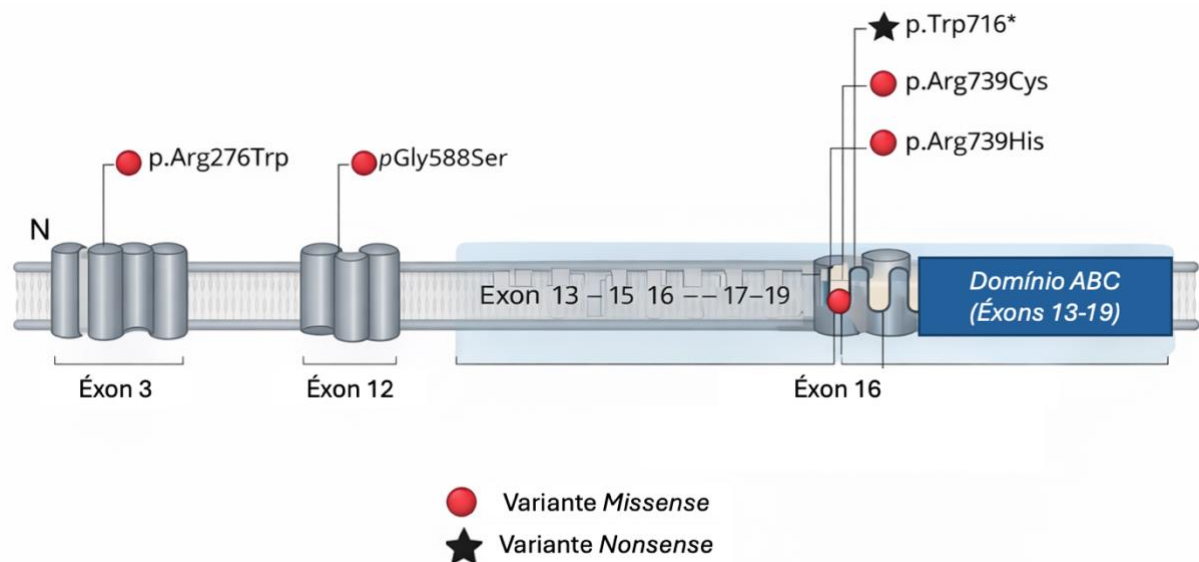
5.2.1.5 Doador inicialmente classificado como Lan negativo

O doador inicialmente classificado como Lan negativo (indivíduo 4) representa um exemplo paradigmático da necessidade de integração entre dados sorológicos, familiares e moleculares. A análise genotípica revelou a presença de variantes hipomórficas em heterozigose, sem evidência de alelos nulos em homozigose. Quando considerados em conjunto com os resultados obtidos por

metodologias complementares, esses achados sustentam a reclassificação desse indivíduo como portador de um fenótipo de expressão residual do antígeno Lan, compatível com a classificação Lan^{+/w/-}, reforçando as limitações da classificação baseada exclusivamente na sorologia (Abdelmonem et al., 2024; McBean et al., 2015; Reid et al., 2014).

A distribuição das variantes identificadas ao longo da proteína ABCB6, com destaque para o acúmulo no éxon 16, é apresentada de forma esquemática na Figura 15, integrando os achados sorológicos, familiares e moleculares observados neste estudo.

Figura 15 - Desenho esquemático da proteína ABCB6 mapeando as mutações encontradas nos indivíduos do estudo.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2026.

5.3 ELUCIDAÇÃO DO ESTUDO SOBRE O INDIVÍDUO QUATRO

5.3.1 Adsorção e eluição do indivíduo quatro

A técnica de adsorção e eluição foi empregada como teste complementar na amostra que apresentou resultado inicialmente Lan negativo na triagem sorológica com o anticorpo monoclonal anti-Lan (OSK43), com o objetivo de investigar a presença de anticorpos ligados à superfície eritrocitária e avaliar a possibilidade de expressão antigênica residual não detectada nos testes de rotina.

Após o processo de adsorção, o reagente adsorvido não apresentou reatividade quando testado contra os eritrócitos utilizados na própria etapa de adsorção, confirmando a remoção efetiva dos anticorpos presentes no reagente. Em seguida, o eluato obtido por eluição ácida foi testado contra hemácias previamente caracterizadas como Lan positivas, utilizando o sistema de gel LISS/Coombs.

O eluato apresentou reatividade consistente de intensidade (2+) frente às amostras Lan positivas testadas, enquanto o controle negativo do método, realizado com o sobrenadante reservado previamente, permaneceu não reagente (Figura 16). Esses achados confirmam a presença de imunoglobulinas com especificidade anti-Lan adsorvidas à superfície das hemácias da amostra em estudo, as quais foram efetivamente recuperadas pelo processo de eluição.

Figura 16 - Imagem do cartão gel das intensidades de reação do sobrenadante e eluato após adsorção/eluição da amostra previamente classificada como Lan-.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2026.

A detecção de reatividade moderada (2+) no eluato, associada à ausência de reatividade na triagem sorológica inicial, sugere que a amostra previamente classificada como Lan negativa apresenta, na realidade, expressão antigênica quantitativamente reduzida, compatível com um fenótipo Lan positivo fraco. Nesses casos, a baixa densidade do antígeno Lan na membrana eritrocitária pode limitar a detecção por anticorpos monoclonais em testes diretos, enquanto métodos mais sensíveis, como a adsorção e eluição, permitem evidenciar a interação antígeno-anticorpo de forma indireta.

5.3.2 Citometria de fluxo do indivíduo quatro

A expressão do antígeno Lan foi avaliada por citometria de fluxo utilizando sensibilização indireta com o anticorpo monoclonal anti-Lan (OSK43), seguida de revelação com anticorpo secundário conjugado a fluorocromo, conforme descrito na metodologia. Foram adquiridos 10.000 eventos eritrocitários por amostra, e a análise foi realizada com base na mediana da intensidade de fluorescência (MFI), utilizando o controle branco para determinação da fluorescência intrínseca das hemácias.

Os valores obtidos demonstraram MFI de 20,72 para o controle branco, 196,05 e 227,22 para os controles positivos (média de 211,63) e 58,57 para a amostra previamente classificada como Lan negativa por metodologia sorológica convencional. A razão entre a MFI da amostra e a MFI do controle branco foi de 2,83, enquanto a razão média dos controles positivos foi de 10,21 (Tabela 8). Quando comparada à média dos controles positivos, a amostra apresentou intensidade correspondente a aproximadamente 27,7% da fluorescência observada em indivíduos Lan positivos.

Tabela 8 - Resultados de MFI e razão MFI da citometria para os controles e amostra previamente classificada como Lan-.

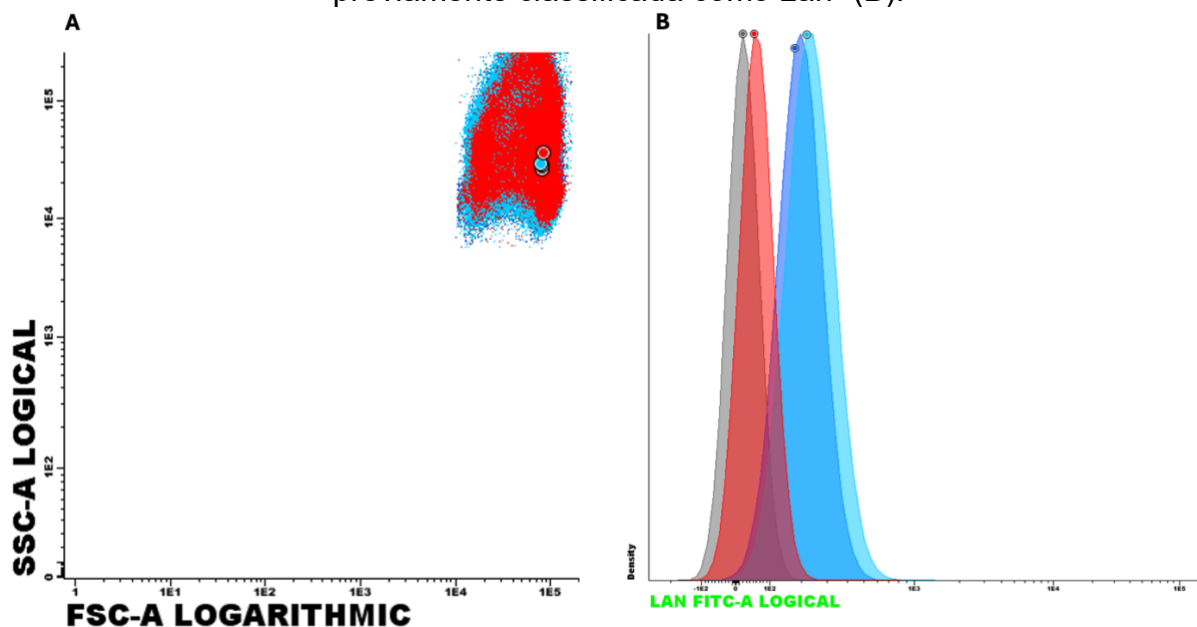
Grupo	MFI	Razão vs Branco
Controle Branco	20,72	1,00 (referência)
Controle Positivo 1	196,05	9,46
Controle Positivo 2	227,22	10,97
Controle Positivo (Média)	211,63	10,21
Indivíduo 4 (Lan-?)	58,57	2,83

Fonte: Elaborada pelo autor, 2026.

A análise gráfica por sobreposição dos histogramas de fluorescência (Figura 17) reforçou esses achados. O controle branco (cinza) apresentou distribuição concentrada em baixa intensidade fluorescente, representando o *background* do sistema. Os controles positivos (azul/roxo) exibiram deslocamento evidente da curva para a direita, com pico definido em região de alta fluorescência, compatível com expressão plena do antígeno Lan. A amostra teste (vermelho), por sua vez, apresentou deslocamento consistente em relação ao branco, evidenciando presença

de marcação específica acima do *background*. Contudo, o pico de fluorescência da amostra manteve-se nitidamente à esquerda dos controles positivos, posicionando-se mais próximo do branco do que das amostras Lan positivas.

Figura 17 - Sobreposição dos gráficos de dispersão bidimensional SSC x FSC (A) e histogramas de fluorescência dos controles (positivos e branco) e da amostra previamente classificada como Lan- (B).



Legenda: (A) Gráfico *dot plot* SSCxFSC sobreposto dos controles positivo, branco e amostra indivíduo 4 (B) Branco (cinza), controles positivos (azul e roxo), amostra indivíduo 4 previamente classificada como Lan- (vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2026.

Esse padrão gráfico demonstra que a amostra não apresenta ausência completa de expressão antigênica, mas sim redução significativa da intensidade de marcação quando comparada aos controles positivos. O deslocamento intermediário da curva, aliado ao valor de MFI aproximadamente três vezes superior ao background e substancialmente inferior aos controles positivos, indica presença de expressão residual do antígeno Lan.

A análise integrada dos dados numéricos e da distribuição gráfica sustenta que a amostra previamente classificada como Lan negativa não corresponde a um fenótipo verdadeiramente negativo, mas sim a um perfil de baixa expressão antigênica. A redução de aproximadamente 73% da intensidade fluorescente em relação aos controles positivos sugere diminuição quantitativa relevante da densidade do antígeno na membrana eritrocitária.

Esse comportamento é compatível com fenótipos Lan de expressão reduzida, descritos na literatura como decorrentes de alterações no gene *ABCB6* associadas à diminuição da densidade da proteína transportadora na membrana das hemácias. No estudo, em 2015, de (McBean et al., 2015) que utilizou amostras conhecidamente Lan+, Lan(+^{wk}) e Lan- observou-se que ao empregarem citometria quantitativa com *beads* calibradoras ficou demonstrado que indivíduos Lan(+^{wk}) apresentam número significativamente reduzido de sítios antigênicos quando comparados a Lan+, mantendo, contudo, expressão superior ao *background* observado em Lan-. Embora o presente estudo não tenha realizado quantificação absoluta do número de antígenos por célula, o padrão relativo de fluorescência observado reproduz o comportamento descrito para fenótipos de baixa expressão.

A utilização da razão MFI permitiu a normalização da fluorescência intrínseca das hemácias e reduziu o impacto de variações técnicas interexperimentais, conferindo maior robustez à interpretação. A classificação fenotípica foi baseada na análise comparativa entre controle branco, controles positivos e amostra teste, associando dados quantitativos à avaliação qualitativa dos histogramas de fluorescência.

5.3.3 O indivíduo quatro e sua correlação fenótipo-genótipo após análises complementares combinadas

A investigação do fenótipo Lan na amostra analisada evidenciou, desde as etapas iniciais, um comportamento sorológico atípico que motivou a realização de testes complementares. Na fenotipagem direta inicial, a amostra foi classificada como Lan negativa, sugerindo ausência do antígeno na superfície eritrocitária. Entretanto, considerando a alta prevalência do antígeno Lan e a raridade do fenótipo Lan negativo verdadeiro, tal resultado exigiu investigação adicional para exclusão de expressão residual não detectada por métodos convencionais.

A caracterização molecular por sequenciamento do gene *ABCB6* constitui etapa essencial para compreender que talvez não se tratava de um fenótipo verdadeiramente negativo. Variantes no *ABCB6*, particularmente aquelas associadas à redução da estabilidade proteica, alteração conformacional ou diminuição da expressão na membrana eritrocitária, têm sido descritas como responsáveis por fenótipos Lan de baixa expressão e foram encontradas nos

resultados do sequenciamento da amostra do indivíduo quatro. A presença de mutações *missense* em possível combinação alélica pode ter resultado em redução significativa da densidade antigênica sem ausência completa da proteína, justificando o padrão intermediário observado na citometria.

A etapa subsequente de adsorção e eluição mostrou-se fundamental nesse contexto investigativo primário. A reatividade observada no eluato indicou a presença de anticorpo previamente ligado à superfície eritrocitária, evidenciando que o antígeno estava presente, ainda que possivelmente em baixa densidade. Esse achado já sugeria que a classificação inicial como Lan negativa poderia não refletir ausência completa do antígeno, mas sim limitação metodológica da fenotipagem direta frente a uma expressão quantitativamente reduzida.

A citometria de fluxo confirmou essa hipótese. A análise demonstrou deslocamento consistente da fluorescência da amostra em relação ao controle branco, indicando presença de ligação específica do anticorpo anti-Lan. Contudo, a intensidade fluorescente foi substancialmente inferior à observada nos controles positivos, correspondendo a aproximadamente 27% da intensidade média destes. A sobreposição dos histogramas evidenciou curva intermediária, mais próxima do branco do que dos controles positivos, caracterizando padrão de expressão reduzida e afastando a hipótese de fenótipo Lan negativo verdadeiro.

Essa sequência de achados demonstra que a amostra apresenta expressão detectável, porém quantitativamente diminuída do antígeno Lan, compatível com fenótipo fracamente positivo. A integração entre adsorção/eluição e citometria foi determinante para essa redefinição fenotípica, evidenciando a importância de abordagens complementares na investigação de variantes de antígenos de alta prevalência. Em 2014, Reid et al. incluíram 14 indivíduos com diferentes mutações para gene *ABCB6* e testaram as amostras frente a diferentes soros policlonais dos próprios indivíduos e ao anticorpo monoclonal OSK43 demonstrando a variabilidade de resultados de intensidade em cada um dos casos. Essa variabilidade pode ser observada em outros estudos e justificada pelo estudo de Wu et al. (2013) que demonstra que os níveis de proteína são fenótipos moleculares hereditários que exibem considerável variação entre indivíduos, populações e sexos (Koszarska et al., 2014). McBean et al., em 2015, também observaram essa variabilidade ao utilizarem o anticorpo monoclonal OSK43 para citometria de fluxo quantitativa e afirmam que apesar de ser o único anticorpo monoclonal existente até o momento, a

citometria pode ser padronizada e empregada para a determinação sensível dos fenótipos Lan. Nosso estudo, assim como outros dois estudos deixam explícitos que existem dificuldades com os métodos sorológicos e genéticos tradicionais, dada a raridade e variabilidade da força dos antissoros e a complexa base genética dos fenótipos Lan, sendo a citometria de fluxo um possível método para a determinação da presença do antígeno Lan na membrana dos eritrócitos (Koszarska et al., 2014; McBean et al., 2015).

A correlação entre os achados fenotípicos e o perfil genético permite estabelecer relação causal entre a alteração molecular identificada e a redução quantitativa do antígeno na superfície eritrocitária. Essa integração genótipo–fenótipo fortalece a interpretação diagnóstica e amplia a compreensão do impacto funcional das variantes do *ABCB6*. Além disso, contribui para a caracterização mais precisa de variantes raras ou pouco descritas, agregando valor científico ao estudo.

Do ponto de vista clínico, a distinção entre fenótipo Lan negativo verdadeiro e fenótipo Lan positivo fraco possui relevância significativa. Indivíduos com expressão residual podem apresentar comportamento sorológico variável, com potencial implicação na seleção de hemocomponentes, no risco de aloimunização e de reações transfusionais hemolíticas. Assim, a adoção de estratégia investigativa escalonada — iniciando pela fenotipagem convencional e avançando para testes complementares e análise molecular — mostra-se fundamental para classificação adequada.

Em síntese, os resultados obtidos demonstram que a amostra inicialmente classificada como Lan negativa apresenta, na realidade, expressão reduzida do antígeno Lan, evidenciada por testes complementares e citometria de fluxo, e potencialmente explicada por variante no gene *ABCB6*. A abordagem integrada adotada neste estudo permitiu redefinição fenotípica fundamentada, reforçando a importância da correlação entre métodos sorológicos, citométricos e moleculares na investigação de sistemas sanguíneos de alta relevância transfusional.

À luz dos achados obtidos por meio das análises moleculares e das metodologias complementares, torna-se necessário reinterpretar a frequência dos fenótipos identificados na triagem inicial. O indivíduo previamente classificado como Lan negativo foi posteriormente caracterizado como portador de um fenótipo Lan positivo fraco, evidenciando limitação da abordagem sorológica isolada na distinção entre ausência e expressão residual do antígeno. Dessa forma, a frequência de

indivíduos verdadeiramente Lan negativos na coorte estudada foi de 0/8.441, enquanto os fenótipos Lan positivo fraco totalizaram 5/8.441 (0,059%). Esses resultados reforçam que a expressão do antígeno Lan apresenta caráter quantitativo e que fenótipos limítrofes podem ser subestimados ou incorretamente classificados em estratégias baseadas exclusivamente na triagem sorológica, em consonância com dados da literatura que descrevem variabilidade na expressão do *ABCB6* e limitações metodológicas na detecção de fenótipos fracos.

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar da robustez metodológica empregada e da integração entre abordagens sorológicas, citométricas e moleculares, algumas limitações devem ser consideradas na interpretação dos resultados.

Uma das principais limitações refere-se à cobertura incompleta do gene *ABCB6* durante o sequenciamento. Problemas técnicos relacionados aos iniciadores utilizados para o sequenciamento da região correspondente ao éxon 2 impediram a obtenção de cobertura adequada desse segmento. Dessa forma, não foi possível excluir formalmente a presença de variantes nesse éxon específico. Embora o restante da região codificante tenha sido devidamente analisado e comparado a sequências de referência consolidadas, a ausência de dados do éxon 2 representa uma lacuna na caracterização molecular completa.

Adicionalmente, a metodologia de sequenciamento empregada não permitiu a determinação da fase alélica das variantes identificadas. Embora tenha sido possível classificar os indivíduos quanto à presença de mutações em estado heterozigoto ou homozigoto, na ocorrência de múltiplas variantes não foi possível estabelecer se estas se encontram no mesmo alelo (em cis) ou distribuídas em alelos distintos (em trans). Essa limitação impede a interpretação do impacto funcional combinado das mutações sobre a expressão do antígeno Lan. A distinção entre variantes localizadas em um único alelo, com manutenção de um alelo plenamente funcional, e variantes distribuídas em ambos os alelos, potencialmente configurando efeito somatório ou sinérgico sobre a densidade antigênica, poderia contribuir para melhor compreensão da correlação entre genótipo e fenótipo observada no estudo.

No âmbito da análise por citometria de fluxo, não foi realizada análise quantitativa com *beads* calibradoras para determinação do número absoluto de sítios antigênicos por hemácia. A análise foi baseada em medidas relativas de intensidade de fluorescência (MFI e razão MFI), o que impede conversão direta para densidade antigênica absoluta. Além disso, a citometria de fluxo foi aplicada apenas à amostra inicialmente classificada como Lan negativa, não sendo possível realizar comparação sistemática do MFI entre todas as amostras analisadas no estudo. Tal limitação decorreu da impossibilidade de obtenção de novas amostras frescas em

tempo hábil para padronização do ensaio em lote único, o que teria permitido comparação direta entre indivíduos dentro das mesmas condições instrumentais.

Outra consideração relevante diz respeito à atualização recente da sequência de referência do gene *ABCB6*. Em 8 de fevereiro de 2026 foi depositada no site da ISBT (2026c) uma nova sequência de referência sob o número NG_032110.1. O alinhamento e análise das variantes descritas neste estudo foram realizados previamente a essa atualização, utilizando sequência de referência amplamente consolidada na literatura e comparada ao genoma de referência GRCh38. Embora os resultados obtidos tenham sido consistentes e biologicamente plausíveis, será necessário realizar novo alinhamento com base na sequência mais recente para confirmar a inexistência das variantes identificadas ou surgimento de novas.

Adicionalmente, o baixo volume disponível do anticorpo monoclonal anti-Lan (OSK43) limitou o número de doadores que puderam ser triados sorologicamente. O tamanho amostral reduzido pode ter impactado a capacidade de identificação de indivíduos Lan negativos verdadeiros, dada a raridade do fenótipo na população. Consequentemente, não foi possível estimar frequência alélica local nem desenvolver um esquema de triagem molecular direcionada baseado em variantes mais prevalentes. Essa limitação assume relevância prática, uma vez que a instituição dispõe de material genético previamente extraído em pool pelo teste NAT, o que poderia permitir implementação de triagem molecular de baixo custo voltada à identificação estratégica de doadores Lan negativos.

Além dessas limitações específicas, deve-se considerar que a classificação fenotípica foi baseada em ensaios realizados em momentos distintos e sob disponibilidade limitada de reagentes, o que pode introduzir variabilidade técnica inerente a estudos com sistemas antigênicos raros.

Por fim, o caráter observacional e o número reduzido de amostras analisadas impedem generalizações populacionais mais amplas, sendo necessários estudos adicionais com maior casuística para consolidação dos achados e melhor definição do espectro fenotípico associado às variantes do gene *ABCB6*.

7 PERSPECTIVAS

Os achados deste estudo abrem caminhos relevantes para aprofundamento da investigação do sistema Lan e da variabilidade associada ao gene *ABCB6*. A integração entre fenotipagem sorológica, citometria de fluxo e análise molecular demonstrou-se eficaz na identificação de expressão antigênica reduzida, entretanto, novas abordagens poderão ampliar a precisão diagnóstica, a compreensão do mecanismo e o impacto clínico dos resultados.

No âmbito molecular, a reestruturação dos iniciadores que abrangem o éxon 2 do gene *ABCB6* constitui etapa prioritária, permitindo cobertura completa da região codificante e exclusão definitiva de variantes nesse segmento. Adicionalmente, o realinhamento das sequências obtidas à nova referência NG_032110.1 depositada pela ISBT (2026c) deverá ser realizado para garantir atualização da nomenclatura e validação formal das variantes identificadas, assegurando conformidade com os padrões internacionais mais recentes.

Um aspecto particularmente relevante para elucidação futura refere-se à determinação da fase alélica das mutações identificadas. Estudos adicionais, incluindo sequenciamento com definição de haplótipos ou análise familiar expandida, são necessários para estabelecer se as variantes detectadas se encontram em alelos distintos (em trans), configurando possível efeito somatório/sinérgico sobre a densidade antigênica, ou se estão localizadas no mesmo alelo (em cis), com manutenção de um alelo funcional íntegro. Essa distinção é fundamental para compreender os fenótipos observados, especialmente nos casos em que indivíduos com mutações potencialmente associadas ao fenótipo Lan positivo fraco apresentaram fenótipo sorológico compatível com Lan positivo. A determinação da organização alélica poderá esclarecer se a redução de expressão decorre de interação entre dois alelos parcialmente comprometidos ou de efeito isolado de uma variante, considerando que a literatura aborda efeito bialélico do gene.

Da mesma forma, a mutação identificada que resulta em códon de parada prematuro deverá ser investigada funcionalmente para confirmar se se trata de uma variante verdadeiramente do tipo *null*. Estudos adicionais poderão avaliar a ocorrência de mecanismos que possam levar a uma ausência total da proteína ou ainda parcialmente funcional. A caracterização funcional permitirá determinar se tal variante possui potencial para impedir completamente a expressão do antígeno na

membrana eritrocitária ou se pode estar associada a expressão residual detectável por métodos sensíveis como a citometria de fluxo.

No âmbito fenotípico, a incorporação de citometria de fluxo quantitativa com *beads* calibradoras permitirá conversão da intensidade de fluorescência em número absoluto de sítios antigênicos por hemácia, possibilitando correlação direta entre densidade antigênica e dados genotípicos. Essa abordagem poderá contribuir para definição mais objetiva dos limites entre Lan positivo, Lan positivo fraco e ausência completa de expressão.

Do ponto de vista populacional, a ampliação do número amostral por meio de novas triagens é fundamental para estimativa mais precisa da frequência alélica local. Considerando a disponibilidade institucional de material genético previamente extraído em pool pelo teste NAT, torna-se viável o desenvolvimento de um esquema de triagem molecular direcionado para variantes específicas do *ABCB6* associadas à redução de expressão. Essa estratégia pode aumentar a probabilidade de identificação de doadores Lan negativos ou variantes raras com custo reduzido e maior eficiência operacional.

Adicionalmente, estudos clínicos complementares poderão investigar possíveis repercussões bioquímicas ou patológicas associadas às variantes identificadas. Embora o fenótipo Lan negativo seja descrito como clinicamente silencioso sob o ponto de vista hematológico, mutações no gene *ABCB6* têm sido associadas na literatura a outras condições não relacionadas diretamente ao sistema eritrocitário. A avaliação de marcadores laboratoriais, histórico clínico ou eventuais alterações metabólicas nos participantes poderá contribuir para compreensão mais ampla do espectro funcional da proteína e de sua relevância biológica sistêmica.

Por fim, a consolidação de banco de dados regional integrando informações fenotípicas e genotípicas permitirá futura colaboração com redes nacionais e internacionais de doadores raros, fortalecendo estratégias de segurança transfusional e ampliando o conhecimento sobre variantes do sistema Lan em diferentes populações.

Em conjunto, essas perspectivas indicam que a continuidade da investigação — com refinamento técnico, definição de fase alélica, caracterização funcional das variantes e ampliação populacional — poderá aprofundar

substancialmente o entendimento da relação entre genótipo e expressão antigênica no sistema Lan, além de gerar impacto direto na prática transfusional.

8 CONCLUSÃO

Este estudo representa a primeira triagem sorológica exploratória em larga escala para o sistema sanguíneo Lan realizada na população de doadores do estado de Santa Catarina e do Brasil. A utilização do anticorpo monoclonal anti-Lan (OSK43; IgG1κ), associada à validação criteriosa de especificidade, sensibilidade e padronização da técnica em gel teste (LISS/Coombs), demonstrou viabilidade técnica e reprodutibilidade para aplicação em rotina laboratorial.

A estratégia adotada, combinando triagem sorológica e sequenciamento completo do gene *ABCB6*, permitiu a identificação e caracterização molecular de indivíduos com fenótipo Lan positivo fraco, evidenciando a heterogeneidade genética do sistema Lan na população estudada. A detecção de variantes associadas à redução da expressão antigênica reforça a importância, não apenas da abordagem molecular complementar à fenotipagem, mas também de outros testes fenotípicos e citométricos complementares, especialmente frente a fenótipos variantes.

Os dados obtidos ampliam o conhecimento sobre a variabilidade fenotípica e alélica do sistema Lan no contexto brasileiro, contribuindo para o mapeamento de antígenos de alta prevalência e seus fenótipos raros. Do ponto de vista transfusional, a determinação de uma possível estratégia de busca de doadores de sangue raro Lan negativo possui impacto direto na segurança do paciente, ao possibilitar a identificação precoce de potenciais doadores Lan- e sua inclusão em bancos de sangue raro, fortalecendo o Cadastro Nacional de Sangue Raro e reduzindo riscos associados à aloimunização anti-Lan. Apesar de não encontrado nenhum doador com fenótipo Lan negativo, foi possível perceber a variabilidade genética da população, mesmo com número amostral reduzido, e determinar um indivíduo portando mutação *nonsense* que denota uma chance real da existência de indivíduos Lan negativo na população do estado.

Além disso, o estudo estabelece base metodológica aplicável à investigação de outros sistemas sanguíneos de alta prevalência, demonstrando que a triagem sorológica direcionada, quando associada à confirmação molecular, constitui estratégia eficiente para ampliação do conhecimento epidemiológico e aprimoramento da prática transfusional no Brasil.

REFERÊNCIAS

AABB. **Technical Manual 20th ed.** [S.l.: S.n.].

ABDELMONEM, Mohamed *et al.* Anti-LAN Antibodies: Clinical Implications and Case Presentation. **American Journal of Clinical Pathology**, 2024.

ALVES, Vitor Mendonça *et al.* Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 3, p. 206–211, 2012.

BASAVARAJEGOWDA, A. *et al.* Extended Phenotyping to Identify Blood Donors for an Institutional Rare Donor Registry. **International Journal of Advanced Medical and Health Research**, 2023.

BONIFÁCIO, Silvia L.; NOVARETTI, Marcia C. Z. Biological functions of blood group antigens. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 104–111, 2009.

BOSWELL-CASTEEL, Rebba C.; FUKUDA, Yu; SCHUETZ, John D. **ABCB6, an ABC Transporter Impacting Drug Response and Disease**. **AAPS Journal** Springer New York LLC, , 1 jan. 2018.

BRASIL. **Guia do Cadastro Nacional de Sangue Raro**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

BROOKS, Sarah; SQUIRES, Jerry E. Hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-Lan. **Transfusion**, v. 54, n. 5, p. 1317–1320, 2014.

CHANG, Yao Fu; IMAM, J. Saadi; WILKINSON, Miles F. **The Nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway**. **Annual Review of Biochemistry**, 2007.

DANIELS, Geoff. **Human Blood Groups**. 3. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2013.

GARRAUD, Olivier; CHIARONI, Jacques. An overview of red blood cell and platelet alloimmunisation in transfusion. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 29, n. 4, p. 297–306, 1 nov. 2022.

GUO, Yong *et al.* The effects of free Cys residues on the structure, activity, and tetrameric stability of mammalian uricase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 14, p. 4533–4542, 1 jul. 2023.

HAER-WIGMAN, Lonneke *et al.* Molecular analysis of immunized <sc>J</sc> r(a–) or <sc>L</sc> an– patients and validation of a high-throughput genotyping assay to screen blood donors for <sc>J</sc> r(a–) and <sc>L</sc> an– phenotypes. **Transfusion**, v. 54, n. 7, p. 1836–1846, 24 jul. 2014.

HELIAS, Virginie *et al.* ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies the new blood group system Langereis. **Nature Genetics**, v. 44, n. 2, p. 170–173, fev. 2012.

HEMOSC. **HEMOSC - Instituição**. Disponível em: <<https://www.hemosc.org.br/instituicao.html>>. Acesso em: 9 mar. 2025.

HOCHMAN, Bernardo *et al.* Desenhos de pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 2–9, 2005.

ISBT. **Rare donors**. Disponível em: <<https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rare-donors.html>>. Acesso em: 19 jan. 2026a.

ISBT. **Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology**. Disponível em: <<https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>>. Acesso em: 19 jan. 2026b.

ISBT. **Lan Blood Group**. Disponível em: <<https://blooddatabase.isbtweb.org/system/LAN>>. Acesso em: 19 jan. 2026c.

KAROUSIS, Evangelos D.; NASIF, Sofia; MÜHLEMANN, Oliver. Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 7, n. 5, p. 661–682, 1 set. 2016.

KOSZARSKA, Magdalena *et al.* Screening the expression of ABCB6 in erythrocytes reveals an unexpectedly high frequency of Lan mutations in healthy Individuals. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 31 out. 2014.

KUROSAKI, Tatsuaki; POPP, Maximilian W.; MAQUAT, Lynne E. **Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay**. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** Nature Publishing Group, , 1 jul. 2019.

LIU, Hai Xiao *et al.* Enhancement of protein stability by an additional disulfide bond designed in human neuroglobin. **RSC Advances**, v. 9, n. 8, p. 4172–4179, 2019.

MCBEAN, Rhiannon S. *et al.* Quantitation of Lan antigen in Lan+, Lan+w and Lan- phenotypes. **Blood Transfusion**, v. 13, n. 4, p. 662–665, 1 out. 2015.

MOISE, Kenneth J. Red blood cell alloimmunization in pregnancy. **Seminars in Hematology**, v. 42, n. 3, p. 169–178, jul. 2005.

MORAIS, Pedro; ADACHI, Hironori; YU, Yi Tao. **Suppression of nonsense mutations by new emerging technologies**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 jun. 2020.

NANCE, S. *et al.* International rare donor panels: A review. **Vox Sanguinis**, v. 110, n. 3, p. 209–218, 1 abr. 2016.

OKUBO, Y. *et al.* The rare red cell phenotype Lan negative in Japanese. **Transfusion**, v. 24, n. 6, p. 534–535, 1984.

PANTOLIANO, Michael W. *et al.* **Accelerated Publications Protein Engineering of Subtilisin BPN': Enhanced Stabilization through the Introduction of Two Cysteines To Form a Disulfide Bond** *Biochemistry*. [S.l.: S.n.].

PATERSON, Jill K. *et al.* Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. **Biochemistry**, v. 46, n. 33, p. 9443–9452, 21 ago. 2007.

REDMAN, Martin; REGAN, Fiona; CONTRERAS, Marcela. A Prospective Study of the Incidence of Red Cell Allo-Immunisation following Transfusion. **VoxSanguinis**, v. 71, p. 216–220, 1996.

REID, Marion E. *et al.* Alleles of the LAN blood group system: Molecular and serologic investigations. **Transfusion**, v. 54, n. 2, p. 398–404, fev. 2014.

REID, Marion E.; LOMAS-FRANCIS, Christine; OLSSON, Martin L. **The Blood Group Antigen FactsBook**. 3. ed. Oxford: Elsevier, 2012.

ROESLER, Keith R.; RAO, A. Gururaj. A single disulfide bond restores thermodynamic and proteolytic stability to an extensively mutated protein. **Protein Science**, 2000.

ROSA, Luiza Simon. **Teste de Antiglobulina Humana Indireto em Gestantes Aloimunizadas: Uma Revisão Sistemática**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

SAISON, C. *et al.* The ABCB6 mutation p.Arg192Trp is a recessive mutation causing the Lan- blood type. **Vox Sanguinis**, v. 104, n. 2, p. 159–165, fev. 2013.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)**. [S.l.: S.n.].

SCHÖRNER, Everaldo José. **Guia Nacional para Implantação de Banco de Sangue com Fenótipos Raros: Uma Proposta para a Hemorrede Pública Brasileira**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2015.

SHARMA, Purva *et al.* Anti-Lan Antibodies: A Rare Etiology of Severe Blood Transfusion Reaction. **Cureus**, 7 out. 2020.

SMART, Elizabeth; ARMSTRONG, Beryl. Blood group systems. **ISBT Science Series**, v. 15, n. S1, p. 123–150, 11 dez. 2020.

SMITH, D. S. *et al.* Haemolytic Disease of the Newborn Caused by Anti-Lan Antibody. **British Medical Journal**, v. 3, p. 90–92, 1969.

SONG, Guangyuan *et al.* Molecular insights into the human ABCB6 transporter. **Cell Discovery**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2021.

STECHER, Glen *et al.* **MEGA 12.1: Cross-Platform Release for macOS and Linux Operating Systems.** *Journal of Molecular Evolution* Springer, , 2025.

TANAKA, Mitsunobu *et al.* Novel alleles of Lan- in Japanese populations. **Transfusion**, v. 54, n. 5, p. 1438–1439, 2014.

TORMEY, Christopher A.; HENDRICKSON, Jeanne E. Transfusion-related red blood cell alloantibodies: induction and consequences. **Blood**, v. 133, 2019.

WESTHOFF, Connie M. Blood group genotyping. **Blood**, v. 133, 2019.

WU, Linfeng *et al.* Variation and genetic control of protein abundance in humans. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 79–82, 2013.

XIAO, Qingyang; ZHOU, Yitian; LAUSCHKE, Volker M. Ethnogeographic and inter-individual variability of human ABC transporters. **Human Genetics**, v. 139, n. 5, p. 623–646, 1 maio 2020.

XU, Xianguo *et al.* [Clinical and genetic analysis of an individual with Lan-negative rare blood group due to variant of ABCB6 gene]. **Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics**, v. 42 3, p. 286–291, 2025.

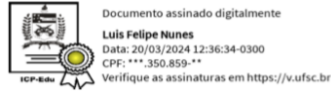
XUE, Peng; CRUM, Chelsea M.; THIBODEAU, Patrick H. Regulation of ABCC6 trafficking and stability by a conserved C-terminal PDZ-like sequence. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 19 maio 2014.

APÊNDICE A - 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 sorológica exploratória para o sistema Lan e análise das mutações mais prevalentes do gene *ABCB6* nos 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) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde (CEPSES/SC). 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 e CEPSES/SC. 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.

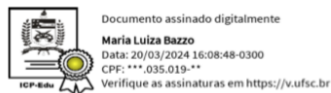
Pesquisadores:

Nome: Luis Felipe Nunes



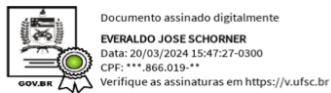
Assinatura: _____

Nome: Maria Luiza Bazzo



Assinatura: _____

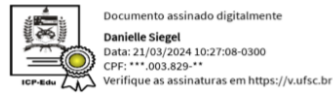
Nome: Everaldo José Schörner



Assinatura: _____

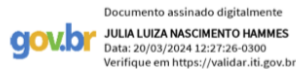
Controladores do banco de dados (Anonimização):

Nome: Danielle Siegel



Assinatura: _____

Nome: Julia Luiza Nascimento Hammes



Assinatura: _____

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ESTUDO FAMILIAR

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Triagem sorológica exploratória para o sistema Lan e análise das mutações mais prevalentes do gene *ABCB6* nos doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina”. 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 (fenótipo Lan negativo ou expressão fraca). 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 Lan 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 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, os(as) pesquisadores(as) 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 pelos telefones (48) 99972-8718 ou (48) 99914-1140. Informe 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, n° 222, sala 701, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88.040-400; e o telefone (48) 3331-1502 e e-mail (cep@cepon.org.br), do Comitê de Ética em Pesquisa do CEPON, localizado na Rodovia Admar Gonzaga, 655 – SC 404, Itacorubi, Florianópolis/SC, CEP 88.034-000. 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 por um dos pesquisadores. 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 n° 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 (Maria Luiza Bazzo – Rua Professora Maria Flora Pausewang, S/N - Campus Universitário - Trindade, Florianópolis/SC - 88036-800 - Telefone (48) 3721-4562 ou (48) 3721-8148 - Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia - LBMMS).
 Demais pesquisadores (Luis Felipe Nunes - Telefone (48) 3251-9719 - Laboratório de Sorologia do HEMOSC e Everaldo José Schörner - Telefone (48) 3251-9717 - Laboratório de Imuno-hematologia do HEMOSC
 Av. Prof. Othon Gama D'Eça, 756 - Centro, Florianópolis/SC, 88015-240).

APÊNDICE C - FORMULÁRIO DE CONTATO COM DOADORES PARA INCLUSÃO DE IRMÃOS NO ESTUDO FAMILIAR

Estudo familiar - Pesquisa Sangue Raro (Lan)

02/03/2026, 19:49

Estudo familiar - Pesquisa Sangue Raro (Lan)

Dados do Doador

* Indica uma pergunta obrigatória

1. Nome do doador *

2. Município de Residência *

Pular para a pergunta 3

Estudo familiar

3. Possui irmãos? *

Marcar apenas uma oval.

☐ Sim *Pular para a pergunta 4*

☐ Não

Dados dos parentes

Irmã(o) 1

4. Nome completo *

5. Idade *

6. Município/Estado de residência *

7. Telefone para contato *

8. E-mail para contato

9. Alguma outra informação de contato importante

10. Possui irmãos? *

Marcar apenas uma oval.

☐ Sim

☐ Não

Dados dos parentes**Irmã(o) 2**

11. Nome completo *

12. Idade *

13. Município/Estado de residência *

14. Telefone para contato *

15. E-mail para contato

16. Alguma outra informação de contato importante

ANEXO A – RELATÓRIO INFORMATIVO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-LAN (OSK43; IgG1 κ)

November 6, 2023

Mr. Luis Felipe Nunes
Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
Av. Prof. Othon Gama D'Eça, 756-Centro, Florianópolis-SC,
88015-240 Brazil

Dear Mr. Luis Felipe Nunes

The characteristics of the monoclonal antibodies (anti-Lan) you requested are as follows.

Monoclonal antibody

Specificity	Clone Name	Species	Immunoglobulin Class	Volume	Method	Preservative
anti-Lan	OSK43	human	IgG ₁	20mL	IAT	sodium azide

Sincerely yours,

Kanae Nishizawa, MT

Kanae Nishizawa

Sub-section chief of 1st Laboratory
Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center
7-5-17 Saitoasagi, Ibaraki-shi,
Osaka-fu, 567-0085
JAPAN
Tel: +81-72-643-1726
Fax: +81-72-643-1848

E-mail: ka-nishizawa@kk.bbc.jrc.or.jp

Hiroyuki Ishii, MT

Hiroyuki Ishii

Deputy Senior Director of Laboratory
Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center
7-5-17 Saitoasagi, Ibaraki-shi,
Osaka-fu, 567-0085
JAPAN
Tel: +81-72-643-1692
Fax: +81-72-643-1825

E-mail: h-ishii@kk.bbc.jrc.or.jp



November 6, 2023

○ Antibody titers of monoclonal anti-Lan (OSK43)

Cell phenotype	Incubation time			
	4°C	20°C	37°C	60min
				IAT
Lan+				1:256
Lan+				1:256
Lan+				1:256
Lan-				0

ANEXO B – EXEMPLO DE RELATÓRIO DE RASTREABILIDADE DA LEITORA SEMIAUTOMATIZADA DG READER NET (GRIFOLS®)

Relatório de Rastreabilidade

Receptor : LAN

Nome: -

Sobrenome: -

Gênero: -

Data de nascimento: -

ID Hospitalar: -

Teste : PC

Executado por: lfnfln

Instrumento 512-0000753

Instrumento 512-0000753

Xmatch (AHG) 7130

Micropoço	ID Doador	Interpretação	Estado	Data	Revisado por
1	=B33892411693121	Incom	Validado	29/05/2024 18:08:17	lfnfln
2	=B33892411561521	Incom	Validado	29/05/2024 18:08:17	lfnfln
3	=B33892411697021	Incom	Validado	29/05/2024 18:08:18	lfnfln
4	=B33892411697621	Incom	Validado	29/05/2024 18:08:18	lfnfln
5	=B33892411697221	Incom	Validado	29/05/2024 18:08:18	lfnfln
6	=B33892411684021	Incom	Validado	29/05/2024 18:08:18	lfnfln
7	=B33892411682321	Incom	Validado	29/05/2024 18:08:18	lfnfln
8	=B33892411549321	Incom	Validado	29/05/2024 18:08:18	lfnfln

DG Gel Coombs

713012240010127518

LOT*001.01

2024-12

1

2

3

4

5

6

7

8

3+

3+

3+

3+

3+

3+

3+

3+

X₍₁₎

X₍₂₎

X₍₃₎

X₍₄₎

X₍₅₎

X₍₆₎

X₍₇₎

X₍₈₎

Incidências

Rastreabilidade

A interpretação não foi modificada.

Reagentes			
Nome	ID	Lote	Validade
DG Gel Sol	031550900212	*021	31/03/2025

ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TRIAGEM SOROLÓGICA EXPLORATÓRIA PARA O SISTEMA LAN E ANÁLISE DAS MUTAÇÕES MAIS PREVALENTES DO GENE ABCB6 NOS DOADORES DE SANGUE DO CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE SANTA CATARINA.

Pesquisador: Maria Luiza Bazzo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 79024724.7.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.794.324

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2296353.pdf, de 15/04/2024) e/ou do Projeto Detalhado/ Brochura do Investigador.

Segundo pesquisadora: "Estudo exploratório prospectivo.

PARTICIPANTES/POPULAÇÃO E AMOSTRA

...Considerando que são doadas, em média, 10.000 bolsas de sangue no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina por mês, serão triadas 5.000 amostras de doadores da rotina do laboratório de imuno-hematologia de doadores do Hemocentro Coordenador de Santa Catarina, localizado em Florianópolis. Apenas após esse processo será possível um desenho estatístico de cálculo amostral com base na população de doadores de Santa Catarina.

INSTRUMENTOS

Fenotipagem eritrocitária

Para a triagem da ausência do antígeno Lan na membrana eritrocitária será utilizado soro de anticorpo monoclonal com especificidade anti-Lan (OSK43; IgG1 λ) cedido pelo Hemocentro de

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 701
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 6.794.324

Kinki Block da Cruz Vermelha Japonesa (HELIAS et al., 2012). Serão triados 5000 doadores de sangue para a presença do antígeno Lan por meio da técnica de antiglobulina indireta em gel teste (LISS/Coombs).

Sequenciamento gene ABCB6 (2q36)

Será realizado o sequenciamento parcial ou total do gene ABCB6 de doadores que apresentaram resultado de fenotipagem negativo ou positivo fraco para o antígeno Lan com intuito de analisar as possíveis mutações associadas circulantes na população de doadores de sangue do estado de Santa Catarina. Desfecho Primário: Encontrar doadores com o fenótipo Lan negativo e Lan fraco

Objetivo da Pesquisa:

Segundo pesquisadora:

Objetivo Primário: "Identificar os doadores de sangue com fenótipo Lan negativos (-) ou positivos fraco (+w) do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC)."

Objetivo Secundário: "Determinar a frequência do antígeno Lan nos doadores de sangue do Hemocentro de Santa Catarina, subdividido por macrorregiões; Determinar a prevalência das mutações presentes na população de doadores do HEMOSC que levam ao fenótipo Lan negativo ou positivo fraco."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo pesquisadora:

Riscos: "Os riscos são mínimos esperados. Os riscos do compartilhamento de dados serão mitigados pelo controle de acesso apenas ao pesquisador responsável e seu orientando, não podendo ser compartilhados com mais ninguém, sem comprometer a utilidade científica dos dados disponibilizados pelo HEMOSC."

Benefícios: "Os participantes do estudo não terão benefícios diretos."

Os benefícios do projeto são:

Impacto social: Ao estimar a frequência do antígeno Lan nos doadores de Santa Catarina de forma regionalizada e a possibilidade de encontrar doadores de sangue Lan negativos para compor o Cadastro Nacional de Sangue Raro irá permitir uma transfusão mais ágil e segura para receptores aloimunizados.

Contribuição para bancos de dados públicos: Se forem encontrados portadores do fenótipo Lan negativos o Cadastro Nacional de Sangue Raro será acrescido dos dados catarinense e poderá contribuir para localizar com mais agilidade doadores compatíveis com o fenótipo Lan negativo associado aos tipos sanguíneos ABO Rh.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 701
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 6.794.324

Contribuição para Políticas Públicas: Os resultados obtidos neste estudo podem contribuir para a intensificar as políticas públicas de fornecimento de sangue raro entre todos os hemocentros nacionais"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Solicita dispensa de TCLE, com base na seguinte justificativa:

"A grande quantidade de amostras que serão triadas no estudo impossibilita colher TCLE, além disso as amostras são regularmente processadas no HEMOSC exclusivamente por meio de códigos de barras, impedindo a identificação direta dos doadores. Em situações que demandem acesso ao sistema, a equipe do HEMOSC realizará a anonimização dos dados."

Cronograma:

Início: 05/2024

Término: 12/2025

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto assinada pela Profa. Dra. Thais C. Marques Sincero, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia/CCS/UFSC;
- Apresenta Carta de anuência institucional, emitida por representante legal do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina- HEMOSC, Patrícia Carsten, diretora geral do HEMOSC, em 12/04/2024;
- Apresenta Termo de Compromisso para Uso de Dados, assinado por todos integrantes da pesquisa;
- Apresenta Declaração de Anonimização, emitida por Danielle Siegel, Bioquímica do Setor de Imuno-hematologia do HEMOSC e controladora do banco de dados do setor de imuno-hematologia do HEMOSC, emitida em 29/02/2024;
- Apresenta Declaração de Anonimização, emitida por Julia Luiza Nascimento Hammes, Biomédica do Setor de Imuno-hematologia do HEMOSC e controladora do banco de dados do setor de imuno-hematologia do HEMOSC, emitida em 20/03/2024.

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa não apresenta pendências e/ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto 15/04/2024) refere-se apenas aos

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 701
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 6.794.324

aspectos éticos do projeto. Qualquer alteração nestes documentos deve ser encaminhada para avaliação do CEP SH. Informamos que a dispensa de TCLE somente será utilizada 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 CEP SH-UFSC.

Lembramos aos senhores pesquisadores que o CEP SH/UFSC deverá receber, por meio de notificação, os relatórios parciais sobre o andamento da pesquisa e o relatório completo ao final do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2296353.pdf	15/04/2024 23:12:29		Aceito
Outros	Anonimizacao2.pdf	15/04/2024 23:11:37	Maria Luiza Bazzo	Aceito
Outros	Anonimizacao_1.pdf	15/04/2024 23:10:41	Maria Luiza Bazzo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado.pdf	15/04/2024 23:08:03	Maria Luiza Bazzo	Aceito
Declaração de concordância	Concordancia.pdf	15/04/2024 23:05:51	Maria Luiza Bazzo	Aceito
Outros	TCUDnovo_assinado_assinado.pdf	15/04/2024 23:02:50	Maria Luiza Bazzo	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_NunesLF_BazzoML_assinado.pdf	15/04/2024 23:01:48	Maria Luiza Bazzo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 29 de Abril de 2024

**Assinado por:
Danielle O Mamed
(Coordenador(a))**

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 701
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br