



**MINISTERIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**IMUNOFENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA EM UMA  
POPULAÇÃO DE DOADORES DE SANGUE APLICADOS À  
MEDICINA TRANSFUSIONAL**

**LINDUARTE VARELA DE MORAIS**

**NATAL/RN  
2022**

**LINDUARTE VARELA DE MORAIS**

**IMUNOFENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA EM UMA  
POPULAÇÃO DE DOADORES DE SANGUE APLICADOS À  
MEDICINA TRANSFUSIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof /Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior

**NATAL/RN  
2022**

### Ficha Catalográfica

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN –

Morais, Linduarte Varela de.

Imunofenotipagem em uma população de doadores de sangue aplicados à medicina transfusional / Linduarte Varela de Moraes. - Natal, 2022.

73 f.: il.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcante Júnior.

1. Imunofenotipagem. 2. Doadores de Sangue. 3. Banco de Dados. I. Saúde, Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da II. Título.

RN/UF/

Não deixe que as pessoas te façam desistir daquilo que você mais quer na vida.

Acredite. Lute. Conquiste. E acima de tudo, seja feliz.

**MINISTERIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAUDE**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

**LINDUARTE VARELA DE MORAIS**

**IMPORTÂNCIA DA IMUNOFENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA NA  
POPULAÇÃO DE DOADORES DE SANGUE APLICADOS À  
MEDICINA TRANSFUSIONAL**

**Banca examinadora:**

Presidente: Professor Doutor Geraldo Barroso Cavalcante Júnior -  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas / Centro de Ciências da  
Saúde (CCS) /UFRN.

.....

Membro interno: Professor Doutor Aldo da Cunha Medeiros – Departamento de  
Cirurgia / Centro de Ciências da Saúde (CCS) / UFRN.

.....

Membro externo: Professora Doutora Amália Cintia Meneses do Rego – Escola  
de Saúde Universidade Potiguar (UNP).

.....

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao. Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior, meu orientador, por sua simplicidade no trato com seus alunos, acessibilidade nos momentos decisivos da elaboração deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Criador, que me deu a vida através dos meus pais, Otávio e Emília.

A Roseanny, minha esposa e companheira nos momentos decisivos da minha vida.

A Profa. Dra. Maria Zélia Fernandes, pelo incentivo em todos os momentos, acreditando sempre na minha capacidade.

A Dra. Linete Vasconcelos de Medeiros Rocha, Diretora do Hemocentro do Rio Grande do Norte – Hemonorte, abrindo as portas da Instituição para a realização deste trabalho.

Aos professores da banca de qualificação: Prof. Dr. Aldo da Cunha Medeiros, Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcante Júnior e Profa. Dra. Valéria Soraia de Farias Sales, que com suas críticas e sugestões contribuíram para o aprimoramento desta pesquisa.

Aos meus filhos Beatriz, Victor, Maria Clara e Vinícius, fonte de incentivo para ser um exemplo de ética, coerência e honestidade.

A Ana Cristina da Silva Lopes, coordenadora da biblioteca setorial do Centro de Ciências da Saúde, pela correção das referências bibliográficas.

Aos doadores de sangue que, com seu anonimato, contribuíram para a realização desta pesquisa.

A Danilo Magno de Oliveira Teixeira, pelo suporte na elaboração dos dados estatísticos.

A equipe do Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro Dalton Cunha - Hemonorte.

Ao Dr. José Guido de Azevedo, pelos seus ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação profissional (in memoriam).



## RESUMO

**Objetivo:** Demonstrar a importância da imunofenotipagem na população de doadores de sangue destinados a construir um banco de dados, aplicados à medicina transfusional. **Método:** Estudo transversal realizados em 11.664 doadores de sangue para a tipagem do sistema ABH e Rh. Destes, foram selecionados, aleatoriamente, 1255 doadores de sangue para a determinação dos antígenos de grupos sanguíneos do sistema Rh e antígeno Kell. Foram utilizados, para tipagem sanguínea, os métodos de gel centrifugação, teste em tubo de hemólise por centrifugação e teste de Coombs indireto. Os resultados obtidos foram comparados pelo Teste do Qui quadrado. Considerou-se um nível de significância estatística de  $p \leq 0,05$ . Resultados: Frequências antigênicas para o sistema ABH encontradas: O 48,8 %; A 35,4 %; B 10,6 % e AB 3,2%. No sistema Rh-Hr os antígenos mais frequentes encontrados foram: e 94,5%, D 88,9 %; d 11,1% ;c 80,6; C 56,4 %; E 26,3%. Para o antígeno Kell a frequência encontrada foi de 6,7 %. Os fenótipos pesquisados mais frequentes encontrados: DCcee 23,3%; ddccee 18,1 %, DCCee 16,7 %; Dccee 11,0 %; DCcEe 10,2% e DccEe 8,8%. De menor frequência foi encontrado: DCcEE 0,64% e ddCcEe 0,08 %. **Conclusão:** As frequências antigênicas e fenotípicas encontradas, mostra a grande importância e necessidade da Imunofenotipagem destes antígenos de grupos sanguíneos visando a transfundi-los, tornando-os o mais compatível possível, desta forma diminuindo o risco da aloimunização. Devido à grande miscigenação da nossa população, se encontram frequências distintas em cada região, fazendo com que iniciativas neste sentido adquira uma maior relevância.

**Palavras-chaves:** Doadores de sangue, Imunofenotipagem, Antígenos de grupos sanguíneos, Banco de dados, Prevalência.

## ABSTRACT

**Objective:** Demonstrate the importance of immunophenotyping in the population of blood donors to construct a database applied to transfusion medicine. **Method:** A cross-sectional study was carried out on 11,664 blood donors for the ABH and Rh system typing and of these, 1255 blood donors were selected randomly for the determination of blood group antigens of the Rh system and Kell antigen. Blood centrifugation methods, centrifuge hemolysis tube test and indirect Coombs test were used for blood typing. The results obtained were compared by the Chi-square test. A level of statistical significance of  $p \leq 0.05$  was considered. **Results:** Antigenic frequencies for the ABH system found: the frequency found for the blood group O 48.8%, the frequency found for the blood group A 35.4%; the frequency found for the blood group B 10.6% and the frequency found for the blood group AB 3.2%. In the Rh-Hr system the most frequent antigens found: e 94.5%, D 88.9%; c 80.6; C 56.4%; E 26.3%, d 11,1%. For the Kell antigen, the frequency found was 6.7%. The most frequent phenotypes found were DCcee 23.3%; ddccee 18.1%, DCCee 16.7%; Dccee 11.0%; DCcEe 10.2% and DccEe 8.8%. The lowest frequency was found: DCcEE 0.64% and ddCcEe 0.08%**Conclusion:** The antigenic and phenotypic frequencies found show the great importance and necessity of the immunophenotyping of these antigens of blood groups in order to transfuse them, making them as compatible as possible, thus reducing the risk of alloimmunization. Due to the great miscegenation of our population, we find different frequencies in each region, making initiatives in this regard more relevant.

**Key-words:** Blood donors, Immunophenotyping, Blood Group Antigens, Database, Prevalence

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AABB</b>	American Association of Blood Bank
<b>AHAI</b>	Anemia Hemolítica Autoimune
<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CF</b>	Constituição Federal
<b>DHFRN/DHPN</b>	Doença Hemolítica do Feto e do Recém-Nascido/ Doença Hemolítica Perinatal
<b>Da</b>	Dalton
<b>Ducado</b>	Feudo ou domínio governado por um Duque ou Duquesa
<b>Eritróide</b>	Relativo à hemácia
<b>Exons</b>	São partes dos genes que codificam para proteínas
<b>Epítopo</b>	Determinante antigênico
<b>Fenótipo</b>	Expressão do antígeno na hemácia
<b>Homozigose</b>	Alelo expresso em dose dupla
<b>Heterozigose</b>	Alelo expresso em dose simples
<b>Hematócrito</b>	Relação plasma/glóbulo vermelho
<b>Introns</b>	São partes dos genes que não codificam para proteínas
<b>ISBT</b>	International Society of Blood Transfusion
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>uL</b>	Microlitro
<b>n</b>	número amostral
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde

<b>Pb</b>	Pares de base
<b>RhAG/Rh50</b>	Glicoproteína associada ao Rh
<b>RPM</b>	Rotações por Minuto
<b>CPD/SAG-M</b>	Solução anticoagulante preservadora utilizada na coleta de sangue destinado a transfusão
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphisms
<b>TAD</b>	Teste da Antiglobulina Direto
<b>Transferases</b>	Enzimas

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese dos grupos sanguíneos do Sistema ABO/ABH.....	25
Figura 2. Herança dos grupos sanguíneos ABO/ABH.....	26
Figura 3. Modelo da membrana eritrocitária que carrega os grupos sanguíneos.....	27
Figura 4. Estrutura do gene RHD e RHCE e seus respectivos polipeptídios.....	40
Figura 5. Representação esquemática do complexo Rh na membrana da hemácia.....	42
Figura 6. Estrutura do RhD fraco, apresentando alterações nos epítomos transmembrana e intracelulares.....	43
Figura 7. Variação no gradiente de reação do D fraco.....	44
Figura 8. Estrutura do RhD parcial, apresentando alterações pontuais nos epítomos extracelulares.....	45
Figura9. Resultados obtidos com os diversos tipos de D parcial, usando anticorpos monoclonais.....	46
Figura 10. Organização do gene Kell. ....	47
Figura 11. Modelo tridimensional da proteína Kell mostrando as posições dos resíduos de aminoácidos, responsáveis pelos polimorfismos dos antígenos Kell.....	48

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Reações dos subgrupos A <sub>1</sub> , A <sub>int</sub> , A <sub>2</sub> e A <sub>3</sub> com os antissoros.....	32
Tabela 2. Expressão dos antígenos ABO nas hemácias.....	34
Tabela 3. Nomenclaturas do Sistema Rh.....	39
Tabela 4. Números de sítios antigênicos D em hemácias de diversos fenótipos.....	40
Tabela 5. Frequência fenotípica dos 5 principais antígenos do Sistema Rh.....	41
Tabela 6. Frequência fenotípica dos antígenos K/k.....	49
Tabela 7. Tamanho da Amostra.....	52
Tabela 8. Frequência dos grupos sanguíneos ABO e Fator Rh nos doadores de sangue.....	54
Tabela 9. Frequência encontrada do antígeno Kell 1.....	57
Tabela 10. Frequência fenotípica do sistema Rh em doadores de sangue Rh Positivos em Natal-RN.....	61
Tabela 11. Frequência do Fenótipo Rh Negativos em doadores de Sangue em Natal-RN.....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição dos grupos sanguíneos ABO na população de doadores de sangue.....	55
Gráfico 2. Distribuição dos grupos sanguíneos Rh negativos na população de doadores de sangue.....	55
Gráfico 3. Distribuição dos grupos sanguíneos Rh positivos na população de doadores de sangue.....	56
Gráfico 4. Frequência observada e esperada do antígeno Rh(C).....	58
Gráfico 5. Frequência observada e esperada do antígeno Rh(c).....	58
Gráfico 6. Frequência observada e esperada do antígeno Rh(E).....	59
Gráfico 7. Frequência observada e esperada do antígeno Rh(e).....	59
Gráfico 8. Frequência observada e esperada do antígeno Rh(D).....	60
Gráfico 9. Frequência observada e esperada do antígeno K1.....	60

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 <b>Histórico</b> .....	22
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
<b>2.1. Sistema sanguíneo ABO (ISBT 001)</b> .....	24
2.1.1. <i>Interação dos genes Hh e ABO</i> .....	28
2.1.2 <i>Fenótipo Parabombay</i> .....	28
2.1.3 <i>Subgrupos de A</i> .....	29
2.1.3.1 <u>Subgrupo A<sub>1</sub> (A101)</u> .....	29
2.1.3.2 <u>Subgrupo A<sub>int</sub> (intermediário)</u> .....	30
2.1.3.3 <u>Subgrupo A<sub>2</sub> (A201)</u> .....	30
2.1.3.4 <u>Subgrupo A<sub>3</sub> (A301)</u> .....	31
2.1.3.5 <u>Outros subgrupos de A</u> .....	32
2.1.4 <i>Subgrupos do grupo sanguíneo B</i> .....	34
2.1.4.1 <u>Subgrupo B<sub>3</sub></u> .....	35
2.1.4.2 <u>Subgrupo B<sub>el</sub></u> .....	35
2.1.4.3 <u>Subgrupo B<sub>m</sub></u> .....	35
2.1.4.4 <u>Subgrupo B<sub>x</sub></u> .....	35
2.1.4.5 <u>Fenômeno do B adquirido</u> .....	35
2.1.5 <i>Sistema ABO e doenças</i> .....	36
<b>2.2 Sistema de grupo sanguíneo Rh (ISBT 004)</b> .....	37
2.2.1 <i>Nomenclatura do Sistema Rh</i> .....	37
2.2.1.1 <u>Nomenclatura de Fischer &amp; Race</u> .....	38
2.2.1.2 <u>Nomenclatura de Wiener</u> .....	38
2.2.1.3 <u>Nomenclatura da ISBT</u> .....	39
2.2.2 <i>Variantes do antígeno D</i>	
2.2.2.1 <u>Variante D fraco</u> .....	42
2.2.2.2 <u>Variante D fraco devido ao efeito trans</u> .....	44
2.2.2.3 <u>Variante D parcial</u> .....	44
2.2.3 <i>Rh<sub>null</sub></i> .....	46
<b>2.3 Sistema de Grupo Sanguíneo Kell. (ISBT 006)</b> .....	47
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	50
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	51
4.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	51
4.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	51



<b>5 DESENHO DO ESTUDO.....</b>	<b>52</b>
<b>6 TAMANHO DA AMOSTRA.....</b>	<b>52</b>
<b>7 METODOLOGIA.....</b>	<b>53</b>
<b>8 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>9 DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>10 CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>11 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ETICA.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO 2 - PAINEL DE HEMÁCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO 3 - ARTIGO 1 .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO 4 – ARTIGO 2 .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 5 - ARTIGO 3 .....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na sua obra, *O Povo Brasileiro*, o antropólogo Darcy Ribeiro<sup>1</sup> apresenta um traço particular na formação da nossa população: a presença de cinco grandes culturas que, embora distintas, seriam complementares. São elas: o Brasil crioulo (que se estendia do litoral de São Luís ao Rio de Janeiro e era muito influenciado pela África), o Brasil caboclo (região Norte com a Amazônia e os índios), o Brasil sertanejo (Nordeste, seu sertão, caatinga), o Brasil caipira (centro-oeste, sudeste, influência da cidade de São Paulo na formação do país) e o Brasil sulino (mamelucos vivendo em uma área muito rica e fértil, os pampas gaúchos, e com forte interferência europeia).

A partir de 1500, com a descoberta do Brasil, tivemos expressiva migração de portugueses, espanhóis, negros e mais recentemente, no início do século XX, de italianos, alemães e japoneses<sup>2</sup>. Além da migração externa, existiu e existe significativa migração interna. Estas migrações ao longo do tempo contribuíram para um alto percentual de miscigenação, fazendo da população brasileira única do ponto de vista antropológico<sup>3</sup>.

Três grupos étnicos originaram a população Nordestina: os brancos, negros e indígenas. De acordo com o estudo autossômico de 2011, levado a cabo pelo geneticista brasileiro Sérgio Pena<sup>4</sup>, o componente europeu é o predominante na população do Nordeste, com contribuições africanas e indígenas. De acordo com o estudo realizado, a composição do Nordeste pode assim ser descrita: 60,10% de herança europeia, 29,30% de herança africana e 8,90% indígena<sup>4</sup>.

Devido a esta enorme miscigenação, representada pelas diversas matizes de cor da pele, cabelo e olhos, que também se reflete na constituição fenotípica da frequência dos diferentes sistemas de grupos sanguíneos da população brasileira, faz com que, cada região do nosso país, tenha patrimônio antigênico eritrocitário distinto, de acordo com as etnias que as colonizaram.

Em decorrência deste fato, merece uma atenção especial a imunofenotipagem da população de cada região ou estado brasileiro, despertando o interesse de pesquisar, na grande Natal, as frequências dos grupos sanguíneos de maior interesse na medicina transfusional. Iniciativas

como esta possibilitará o encontro de fenótipos de baixa frequência fazendo com que se tenha acesso a eles, em situações especiais como de pacientes politransfundidos que apresentem anticorpos eritrocitários, sejam póstransfusional ou pós-gravidez.

A necessidade de se captar doadores de sangue raro, para atender as demandas transfusionais, de pacientes com anticorpos contra antígenos de grupos sanguíneos de alta frequência fez com que, em 1959, a Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB) criasse um banco de dados para doadores raros, seguida pela França em 1965<sup>5</sup>. O conceito de doador de sangue raro varia de país para país pois não existe um parâmetro para se considerar um tipo de sangue raro, no que se refere às suas características imunohematológicas e sim na sua prevalência em uma determinada população.

Tomando como exemplo alguns tipos sanguíneos como o fenótipo Bombay, de baixíssima prevalência na população brasileira, mas é encontrado com maior prevalência na Índia, como na cidade de Bombaim. Entre os portugueses o grupo sanguíneo "A" apresenta uma maior frequência. Nos países asiáticos sangue com fenótipo Rh (D) negativo é considerado muito raro. Outro exemplo é o fenótipo Fy (a-b-) que é muito difícil de encontrar na França, mas é encontrado mais facilmente em doadores afro-americanos nos Estados Unidos da América, enquanto no Nordeste brasileiro o grupo sanguíneo "O" lidera a porcentagem, como também nos ameríndios.

No Brasil existem inúmeros dados relativos ao estudo dos fenótipos eritrocitários na população indígena, em especial quanto aos sistemas ABO e Rh<sup>6,7, 8,9</sup>. Como os antígenos de grupo sanguíneo ABO não estão presentes apenas nos eritrócitos, a sua identificação tem importância em várias áreas de conhecimento, como genética, hematologia, obstetrícia, antropologia, dentre outras. Esta necessidade de conhecimento dos grupos sanguíneos também se estende a área de transplantes, notadamente os transplantes cardíaco e renal. A histocompatibilidade entre o doador e o receptor é avaliada pela compatibilidade obrigatória entre os antígenos de grupos sanguíneos ABO.<sup>10,11</sup> O artigo 123 da Portaria nº 2712 de 12/11/2013 do M S, que regulamenta as atividades hemoterápicas no Brasil, recomenda a realização da fenotipagem de antígenos eritrocitários dos sistemas Rh (D, C, c, E, e) e Kell

(K1) nas amostras de sangue de doadores, conforme as demandas do serviço de hemoterapia.

No artigo 176 § 18 da mesma portaria recomenda a realização da fenotipagem para os antígenos eritrocitários no sangue do receptor dos sistemas Rh (D, E, e, C, c), Kell (K1), Duffy (Fya, Fyb), Kidd (Jka, Jkb) e MNS (S, s) para pacientes aloimunizados contra antígenos eritrocitários ou que estão ou poderão entrar em esquema de transfusão crônica, com o objetivo de auxiliar a identificação de possíveis anticorpos eritrocitários irregulares ou de evitar a formação de outros anticorpos.<sup>12</sup>

Na medicina transfusional, a compatibilidade para o sistema ABO e para o antígeno D do sistema Rh é fundamental na prevenção de reações hemolíticas, embora seja desejável que outros antígenos sejam compatíveis, especialmente C, c, E, e do sistema Rh, assim como os principais antígenos dos sistemas Kell, Kidd, Duffy e MNS<sup>13,14, 15</sup>.

O conhecimento da frequência fenotípica e/ou genotípica dos vários grupos sanguíneos na população brasileira é essencial para estimar a disponibilidade de sangue compatível para pacientes que apresentem anticorpos contra antígenos eritrocitários.

Apesar do comprovado benefício propiciado aos pacientes submetidos à transfusão de sangue e hemoderivados em situações de emergência ou mesmo na prática médica como na revascularização do miocárdio, cirurgias ortopédicas, pacientes hematológicos, dentre outros, há indivíduos que se abstém de se submeterem a este procedimento médico. A terapia transfusional, além de obedecer às normas técnicas dos órgãos reguladores (ANVISA) está sujeita ao esclarecimento ao paciente quanto aos riscos e benefícios como também ao consentimento ou não por parte do paciente.

“Neste momento, emerge um problema com relação ao consentimento para a realização da transfusão sanguínea. Algumas confissões religiosas, como as Testemunhas de Jeová, proíbem a prática transfusional. Estas confissões religiosas fundamentam juridicamente sua recusa na terapia transfusional com base no art. 5º., III, da CF, que dispõe sobre a liberdade religiosa do cidadão brasileiro”<sup>16</sup>. A seita cristã Testemunha de Jeová foi fundada em 1870, por Charles Russel, em Pittsburgh (Pensilvânia- EUA). Seus

seguidores não aceitam transfusão sanguínea baseados em trechos do Antigo Testamento, interpretando a transfusão como similar ao ato de comer sangue<sup>17</sup>, como também alegam que suja e contamina o sangue do paciente.

Além do impedimento religioso surgiu, dentre outros, na década de 80, o medo da contaminação com o vírus HIV por transfusão, fazendo com que muitos pacientes questionem a qualidade do componente hemoterápico a ser transfundido, devido aos altos índices de transmissão também de doença de Chagas e hepatite pós-transfusional.

O caso da França é exemplar. A excessiva centralização da rede oficial de transfusões, sob o comando do Centro Nacional de Transfusões Sanguíneas, tem sido apontada como responsável pelo fornecimento de sangue contaminado entre 1983 e 1986, que provocou a morte de 256 hemofílicos e a infecção pelo HIV de mais de 600 receptores de sangue.<sup>18</sup>

“A descoberta do vírus HIV, caiu na hemoterapia como uma bomba atômica” (Guido de Azevedo).\*

No Brasil não foi diferente. O crescente número de hepatite pós-transfusional, a transmissão da doença de Chagas, fez acender a luz vermelha no poder público que conhecedor do quadro trágico que se delineou no Rio de Janeiro, particularmente na Baixada Fluminense, onde a obtenção e a comercialização de sangue caíram nas mãos de pessoas sem nenhuma qualificação para o desempenho desta função, tomou para si a responsabilidade de fiscalizar e normatizar a qualidade do sangue transfundido, criando o Pró-Sangue. Antes existia a Comissão Nacional de Hemoterapia (CNH), subordinada ao Ministério da Saúde.

O governo brasileiro, vendo a enorme importância no trato com o sangue e hemoderivados, na Assembleia Nacional Constituinte de 1988, promulgou no seu artigo 199, parágrafo 4: “A assistência à saúde é livre à iniciativa privada. A lei disporá sobre as condições e os requisitos que facilitem a remoção de órgãos, tecidos e substâncias humanas para fins de transplante, pesquisa e tratamento, bem como a coleta, processamento e transfusão de sangue e seus derivados, sendo vedado todo tipo de comercialização”<sup>19</sup>.

---

\* José Guido de Azevedo. Médico Hemoterapeuta e ex-chefe dos Serviços de Hemoterapia do Instituto de Hematologia Artur de Siqueira Cavalcanti (HemoRio) e do Instituto Nacional de Câncer, ambos no Rio de Janeiro.

### 1.1. Histórico

O descobrimento de três dos principais grupos sanguíneos por Karl von Landsteiner em 1900, se tornou o grande divisor de águas entre a hemoterapia empírica e a hemoterapia com bases científicas. A sua pesquisa detectou a aglutinação de eritrócitos humanos por soros de outros indivíduos, tendo posteriormente descrito os padrões de reatividade dos três tipos, agora chamados A B e O. Um quarto grupo, AB, foi detectado em 1902 por von Decastello e Sturli, seus discípulos.<sup>20</sup> Por esta descoberta Landsteiner foi agraciado com o prêmio Nobel de medicina em 1930.

Na fase empírica da hemotransfusões os acidentes transfusionais era o resultado mais frequente, causando o óbito dos pacientes transfundidos. Um dos casos que passou para a história dos acidentes transfusionais foi o do papa Inocêncio VIII, descrito pelo escritor italiano Stefano Infessura. Em 1492 o Sumo Pontífice se encontrava bastante debilitado e foi sugerido por um médico a transfusão de sangue de jovens, com o intuito de restabelecer a sua saúde. Os rapazes tinham menos de 10 anos de idade, e receberam a promessa de ganhar um Ducado cada.

Entretanto, não somente o papa morreu, mas também as três crianças, das quais foi retirado todo o sangue.<sup>21</sup> Na época não se conhecia a circulação sanguínea, o que foi desvendado no século XVI pelo médico inglês William Harvey. A descoberta do antígeno D do sistema Rh, está ligado a reação hemolítica em uma paciente obstétrica que, após dar à luz a um natimorto, esta paciente precisou se submeter a uma transfusão sanguínea. A escolha do doador recaiu sobre seu marido, pois o mesmo era ABO compatível. Após a transfusão esta receptora demonstrou sinais e sintomas clássicos de uma reação transfusional hemolítica aguda. Este evento hemolítico não deveria acontecer, pois receptor e doador eram ABO compatíveis. Um ano mais tarde Landsteiner e Wiener descreveram um anticorpo produzido por cobaias e coelhos, quando estes eram transfundidos com hemácias do macaco Rhesus. Este anticorpo que aglutinou 85% das hemácias humanas foi chamado de

"Rh".<sup>22</sup> Este sistema de grupo sanguíneo atualmente é composto de 54 antígenos catalogados pela ISBT, sendo um dos mais polimórficos de todos os sistemas sanguíneos.

Anos mais tarde foi constatado que o anticorpo produzido pela parturiente, que reagia tanto a 37<sup>o</sup> C como a 20<sup>o</sup>C e os anticorpos formados pelas cobaias eram diferentes. Entretanto, o anticorpo produzido pela parturiente continuou sendo chamado de anti-Rh e o anticorpo produzido pelo coelho foi denominado de anti-LW em homenagem aos seus descobridores (Landsteiner e Wiener). A descoberta do antígeno Rh (D) do sistema Rh é apenas a ponta do iceberg que compõe um dos sistemas de grupo sanguíneo como um dos mais polimórficos e importantes na medicina transfusional, pelo seu grande poder imunogênico.

Outro antígeno de grupo sanguíneo que foi descoberto por um evento semelhante ao ocorrido com o descobrimento do antígeno D sistema Rh, foi o antígeno Kell. Descoberto após a introdução do teste da antiglobulina direta (TAD), por Coombs, Race e Mourant em 1946, após um teste de Coombs direto positivo realizado em uma amostra de sangue de um recém-nascido acometido de DHPN (Doença Hemolítica Perinatal). O soro da mãe reagia contra as hemácias do bebê recém-nascido, da sua filha mais velha, do seu marido e de 9% da população. O nome deste antígeno vem do nome desta paciente sra. Kellecher. O antígeno foi chamado de Kell. Em 1949, Levine et al<sup>23</sup> relataram o descobrimento do seu antitético de alta prevalência k (Cellano).

O sistema Kell permaneceu com dois antígenos até que em 1957 Giblett, descreve o antígeno Js<sup>a</sup> e Walker *et al*, descreveram o Js<sup>b</sup> em 1963 que eram antitéticos e estavam relacionados ao Sistema Kell. Em 1958 Allen et al, descreveram os antígenos antitéticos Kp<sup>a</sup> e Kp<sup>b</sup> que estudos confirmaram sua relação com o sistema Kell. Nesse mesmo ano foi descrito o fenótipo nulo Ko que ajudou a associar outros antígenos ao sistema Kell. Atualmente a Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (ISBT) reconhece 35 antígenos<sup>24</sup> como pertencentes a este sistema de grupo sanguíneo, sendo o terceiro mais polimórfico, precedido pelos sistemas Rh e MNS.

Até junho de 2015 foram catalogados 308 antígenos distribuídos em 36 sistemas sanguíneos, 38 antígenos não catalogados em sistemas, 15 antígenos em seis coleções, 17 antígenos de baixa prevalência e 6 antígenos de alta prevalência<sup>25</sup>.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Sistema Sanguíneo ABO (ISBT 001)**

Considerado o mais importante sistema de grupo sanguíneo na medicina transfusional, o sistema ABO tem características únicas, dentre elas a presença de anticorpos naturais da classe IgM após seis meses a um ano de vida, sem ter sido imunizada previamente. Devido a isto, a primeira transfusão feita havendo incompatibilidade ABO, haverá uma reação transfusional hemolítica imediata.

Outra característica singular é a presença de um grande número de determinantes antigênicos (epítomos) nos grupos sanguíneos "A" e "B", fato não compartilhado por nenhum outro sistema sanguíneo, tornando-o o primeiro sistema de grupo sanguíneo a ser fenotipado quando se requer uma transfusão. Os antígenos ABO não estão restritos apenas à membrana dos eritrócitos, podendo ser encontrados também em uma grande variedade de células como linfócitos, plaquetas, endotélio capilar, venular e arterial, células sinusoidais do baço, medula óssea, mucosa gástrica, além de secreções e outros fluidos como saliva, urina e leite<sup>27</sup>; devido a esta característica também são chamados de sistema de grupo histo-sanguíneo, sendo detectados nos eritrócitos entre a quinta e a sexta semanas do embrião e só se desenvolvem totalmente depois do nascimento, estando completamente formados em torno dos 2 a 4 anos de idade e assim permanecendo durante toda a vida.

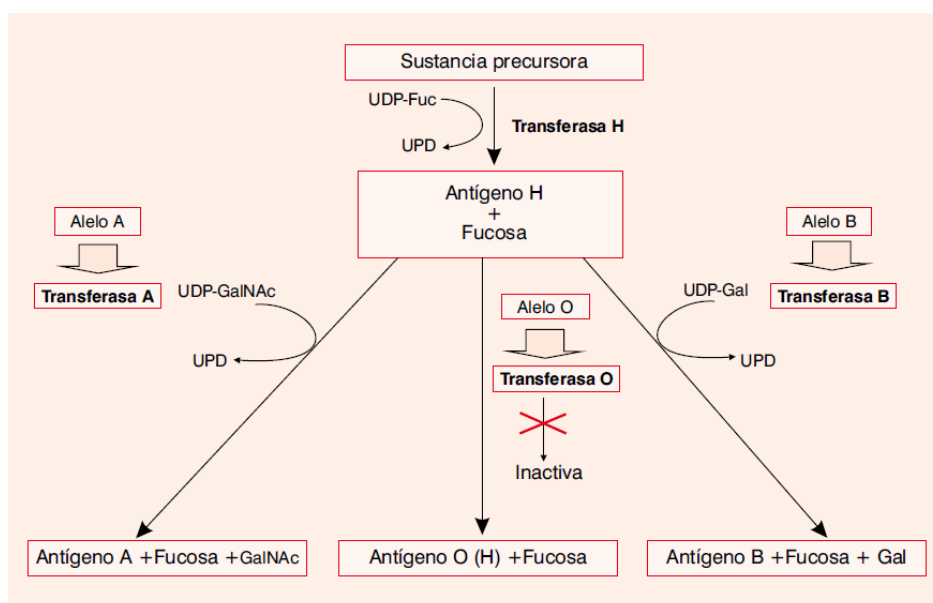
Isso poderia ser o motivo pelo qual a Doença Hemolítica do Feto e do Recém-Nascido (DHFRN), devido à incompatibilidade ABO, geralmente ser leve, em comparação com a DHFRN ocasionado por outros antígenos, como os antígenos do sistema Rh.

Localizado no braço longo do cromossomo 9, o locus ABO estende-se por uma região de 18-20 kilobases (kb), na posição 9q34.1-9q34.2, consistindo



de 6 introns e 7 exons (cujo tamanho varia entre 26-688 pares de base, sendo que grande parte da sequência codificadora se encontra nos exons 6 e 7)<sup>26</sup>. Os genes ABO não codificam a produção de antígenos nas hemácias e sim produzem glicosiltransferases que acrescentam açúcares específicos a uma substância precursora (sp) presente nos eritrócitos. É composto de carboidratos, onde o açúcar terminal confere a sua especificidade expressando nas hemácias os antígenos A, B, AB ou O. Para que ocorra a expressão dos antígenos ABO nas hemácias é necessário a presença de uma substância precursora (sp), ligada a um ceramida, formada por 4 açúcares, que são (N-acetilgalactosamina, D-galactose, N-acetilglicosamina e D-galactose) sobre a qual agirão as glicosiltransferases, dependendo da herança de cada indivíduo.

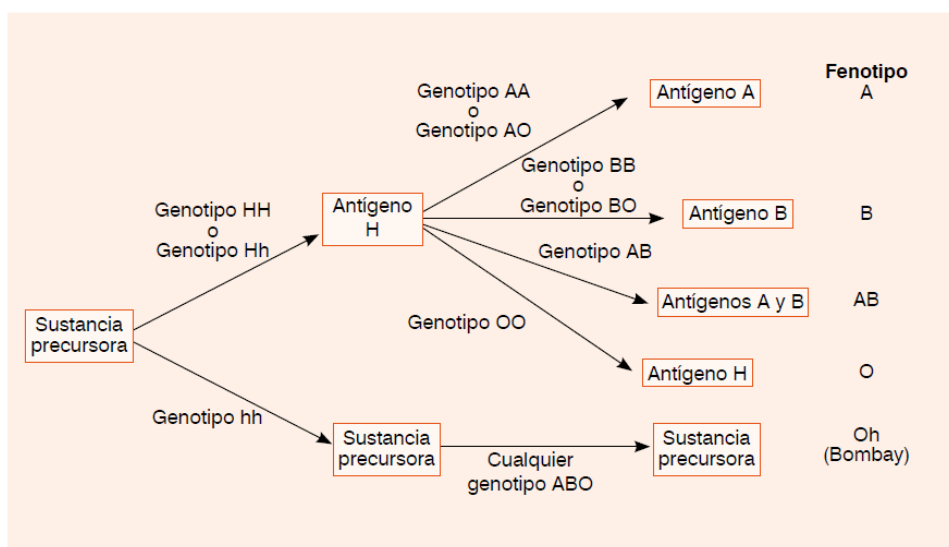
Além desta sp é necessário a herança do antígeno H em homo ou heterozigose para que haja a expressão dos antígenos do sistema ABO. Este antígeno H é um carboidrato produzido pela ação da enzima  $\alpha$ -2-L-fucosiltransferase codificada no locus FUT1 do cromossomo 19, na posição q13.3, sendo, portanto, geneticamente independente do locus ABO<sup>27</sup>. Herdado este antígeno irá agir ou não sobre ele as transferases  $\alpha$ 1-3-N-acetilgalactosamina transferase ou a  $\alpha$ -1-3-N-galactosil transferase ao substrato H, e os convertem ao antígeno A ou B, respectivamente (figura 1).



**Figura 1. Biossíntese dos grupos sanguíneos do Sistema ABO/ABH**

Fonte: Medicina e Laboratório, pág. 332, 2009- Carlos Alberto A. Garcia

Não havendo a herança de uma destas transferases não haverá a adição de açúcar na porção terminal do antígeno H e estas hemácias ficarão com um antígeno com cem por cento de substância H, tornando-se o grupo sanguíneo "O". A presença desta substância H pode ser detectada nas hemácias do indivíduo de grupo sanguíneo "O" do mesmo modo que os outros grupos sanguíneos, utilizando um antissoro extraído da planta *Ulex europaeus*, que tem especificidade anti-H com a mesma intensidade de aglutinação que os antissoros anti-A ou anti-B. Não havendo a herança da FUT1, não será acrescentado o açúcar L-fucose na porção terminal da sp, conseqüentemente não haverá a produção do antígeno H presente nas hemácias do grupo sanguíneo "O". Mesmo sendo herdado uma das duas transferases, não haverá a formação de nenhum antígeno do sistema ABO. Este fenótipo foi denominado de fenótipo Bombay por Bhende e colaboradores descoberto em 1952 em Bombaim(Índia), tendo como principal característica, além da presença no seu plasma dos anticorpos anti-A e anti-B, a presença do anti-H, capaz de aglutinar hemácias do grupo "O" com a mesma intensidade que indivíduos do grupo sanguíneo "O" aglutina hemácias "A" ou "B", o que faz do indivíduo que apresenta este fenótipo, só pode ser transfundido com sangue de outro indivíduo que apresente este mesmo tipo sanguíneo, como mostra a figura 2.



**Figura 2. Herança dos grupos sanguíneos ABO/ABH**

Fonte: Medicina e Laboratório, pág. 332, 2009- Carlos Alberto A. Garcia

O alelo A codifica a produção de um açúcar  $\alpha$ -1-3-N-acetilgalactosaminiltransferase (GalNac) a partir do nucleotídeo doador UDP-GalNac (Uridina-difosfato-N-acetil-D-Galactose) para a substância H. Este açúcar é responsável pela especificidade do antígeno A.

Outro gene, o Se, também localizado no cromossomo 9, codifica uma enzima (Fucosiltransferase), que se expressa no epitélio dos tecidos secretores e catalisa a produção do antígeno H nas secreções. Assim os indivíduos secretores, que são 80% da população, possuem pelos menos uma cópia do gene Se (Se/Se ou Se/se) que codifica uma enzima funcional produzindo o antígeno H nas secreções, que por sua vez é processado como antígeno "A" ou "B" dependendo do genótipo do ABO do indivíduo.

Por outro lado, indivíduos "não secretores" (20%) são homocigotos para o gene nulo (se / se) e, portanto, não podem produzir a forma solúvel do antígeno H, nem dos outros antígenos do sistema ABO.<sup>28</sup> A maioria dos antígenos eritrocitários corresponde a moléculas de carboidratos associadas a proteínas da membrana plasmática, formando as glicoproteínas, ou a moléculas de carboidratos associadas a fosfolipídios de membrana, que formam os glicolipídeos, como mostra a figura 3.

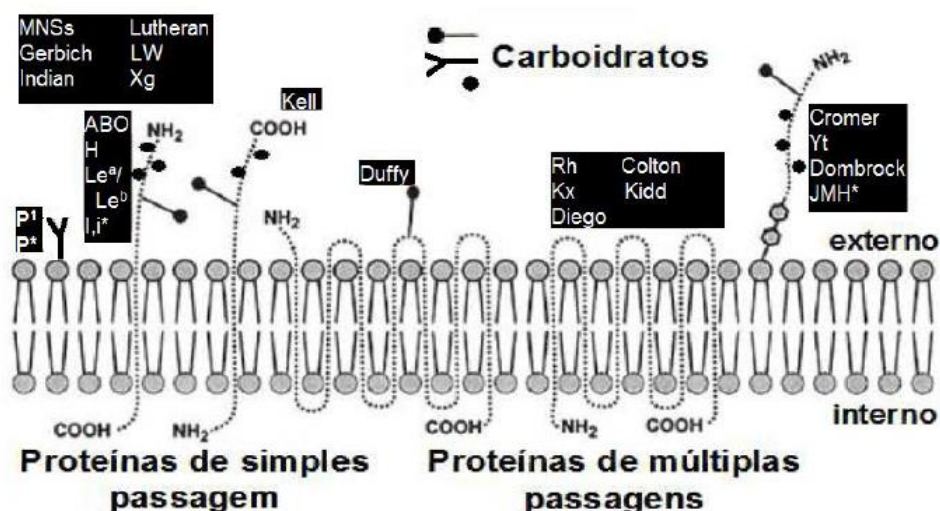


Figura 3. Modelo da membrana eritrocitária que carrega os grupos sanguíneos

Fonte: Reid, ME, Mohandas N. Seminars in Hematology, 01 Apr 2004, 41(2):93-117

### 2.1.1 Interação dos genes Hh e ABO

A teoria da herança dos grupos sanguíneos ABH foi descrita, em 1924, por Bernstein, demonstrando que cada indivíduo herda um gen ABO de cada um dos pais e que estes dois genes determinam que antígeno será expresso na superfície da membrana da hemácia. Os genes A e B diferem em sete substituições de nucleotídeos localizadas nas posições 297, 526, 657, 703, 796, 803 e 930<sup>29</sup>. A herança de pelo menos um gene H (genótipo HH ou Hh), leva à produção de uma enzima a  $\alpha$ -2-L-fucosiltransferase, que transfere o açúcar L-fucose do nucleotídeo doador GDP-Fucose (Guanosina-difosfato-L-fucose) para a galactose terminal da cadeia precursora, formando a substância H. O gene H está presente em mais de 99,99% da população, é bastante comum e os indivíduos possuem um genótipo HH ou Hh. O “h” e o genótipo “hh” são extremamente raros. Este alelo não produz a  $\alpha$ -2-L-fucosiltransferase necessária para a formação da estrutura H. Este genótipo “hh”, chamado de Fenótipo Bombay ( $O_h$ ), não retrata uma expressão normal dos antígenos ABH, porque não existe a produção da  $\alpha$ -2-L-fucosiltransferase.<sup>25</sup> Mesmo que indivíduos Bombay (hh) herdem genes ABO, a expressão normal, na formação dos antígenos A, B e H, não ocorre. A substância H deve ser formada para que outros açúcares como a N-Acetil-glicosamina e D-Galactose se fixem, portanto, o fenótipo Bombay ( $O_h$ ) com genótipo “hh”, é desprovido de antígenos do sistema ABO.

### 2.1.2 Fenótipo Parabombay

Outra variante deficiente do gene H, é caracterizado como Parabombay ( $A_h$ ,  $B_h$  e  $AB_h$ ). Portadores desse fenótipo são identificados por apresentarem quantidades mínimas dos antígenos A e B nos eritrócitos e pouco ou nenhum antígeno H. Nesse fenótipo, ao contrário do Bombay, a transferase H está presente com atividade muito fraca, sendo que as poucas quantidades de substância H produzidas são convertidas aos antígenos A e B pelas suas respectivas transferases.<sup>30</sup>

### 2.1.3. Subgrupos de A

Os subtipos do sistema de grupo sanguíneo ABO são chamados de subgrupos ou variantes e são diferenciados pela quantidade de antígenos nos eritrócitos, sendo o grupo A o que tem a maior variação de subgrupos. A quantidade de antígenos expressos neles diminui na seguinte ordem:  $A_1 > A_2 > A_3 > A_x > A_{end} > A_m > A_{el}$ . A heterogeneidade fenotípica do sistema sanguíneo ABO é devido à diferença estrutural dos genes das glicosiltransferases, que são responsáveis pela transferência dos resíduos específicos de açúcar,  $\alpha$ -1-3-N-acetilgalactosamina transferase ou a  $\alpha$ -1-3-N-galactosil transferase ao substrato H, e os convertem ao antígeno A ou B respectivamente.<sup>31,32</sup>

Estas diferenças genéticas se refletem quando se pesquisa os grupos sanguíneos em laboratório, fazendo com que reações com intensidades diferentes ocorram ou discrepâncias aconteçam durante a classificação do grupo sanguíneo A. Apresentando diversos subgrupos ( $A_1, A_2, A_3, A_x, A_{int}$ ) dentre outros, sendo o de maior prevalência o subgrupo  $A_1$ , em torno de 80% e 20% o subgrupo  $A_2$  e os demais. O subgrupo  $A_3$  aparece logo após o subgrupo  $A_2$  como o mais prevalente.

#### 2.1.3.1 Subgrupo $A_1$ ( $A_{101}$ )

Em 1911 von Dungerne Hirszfeld descreveram dois tipos de antígenos A, levando em consideração a reação das hemácias com dois antissoros: o anti-A e o anti- $A_1$ . Este último é uma lectina extraída da semente da planta *Dolichos biflorus*, por Bird<sup>33</sup> e colaboradores, em 1952. As hemácias que reagem com o anti-A e anti- $A_1$  foram classificadas como  $A_1$  e as hemácias que reagem apenas com o anti-A foram classificadas como  $A_2$ . A diferença entre estes dois subgrupos é qualitativa e quantitativa. A transferase  $A_1$  é mais eficiente na transformação da substância H em antígeno  $A_1$ , apresentando, portanto, a maior quantidade de antígenos por hemácias, variando entre 810.000 e 1.170.000, fazendo com que este subgrupo seja considerado o mais

imunogênico dentre eles. Estudos sobre as transferases de indivíduos  $A_1$  e  $A_2$ , demonstraram maior atividade no soro de indivíduos  $A_1$  do que no soro de indivíduos  $A_2$  evidenciada pela capacidade de converter mais células do grupo sanguíneo "O" em células do subgrupo  $A_1$ <sup>34</sup>, deste modo apresentando mais epítomos por hemácia do que o subgrupo  $A_2$ . Estudos comprovam que, por exemplo o antígeno A presente em  $A_2B$  é mais fraco que em  $A_2$  e que o antígeno  $A_1$  é mais fraco em portadores do subgrupo  $A_1B$  do que em indivíduos do subgrupo  $A_1$ . Talvez esta capacidade de conversão maior da transferase  $A_1$ , explique a produção de anticorpos anti- $A_1$ , em alguns indivíduos do subgrupo  $A_2$ .

O anticorpo anti- $A_1$  ocorre naturalmente, a temperatura ambiente, no soro de 1-2% das pessoas do subgrupo  $A_2$  e em cerca de 26% em portadores do subgrupo  $A_2B$ <sup>35</sup>. Na Polônia, no entanto, foi encontrada uma prevalência mais alta em teste a temperatura de 10°C em torno de 14% em pessoas do subgrupo  $A_2$  e de 51% em portadores do subgrupo  $A_2B$ <sup>36</sup>.

### **2.1.3.2 Subgrupo $A_{int}$ (intermediário)**

O subgrupo  $A_{int}$ , mais comum em indivíduos de etnia negra, como sua denominação indica, apresenta características intermediárias entre  $A_1$  e  $A_2$ . Os critérios para classificar o  $A_{int}$  são controversos. Alguns grupos classificam de  $A_{int}$  aquelas células com reações fracas com Dolichos biflorus (anti- $A_1$ ), porém com reatividade anti-H mais forte que as hemácias pertencentes ao subgrupo  $A_2$ , ao passo que outros pesquisadores os classificam por sua forte reatividade com anti- $A_1$  e anti-H.

### **2.1.3.3. Subgrupo $A_2$ (A201)**

Descoberto pelos mesmos pesquisadores que descreveram o subgrupo  $A_1$ , este outro subtipo do antígeno A comum em caucasianos, é facilmente detectado em laboratório, utilizando-se os antissoros anti-A e a lectina anti- $A_1$ , apresentando como resultado positivo a aglutinação somente com o antissoro anti-A. Apresenta uma quantidade de antígeno por hemácia em torno de

250.000, variando em número entre 240.000-290.000. Isto se deve a menor capacidade deste gene de transformar a substância H, através da sua transferase, em antígeno A. O gene  $A_2$  resulta da associação da mutação T467C/Pro156Leu com a deleção de um nucleotídeo na região 3', que gera desvio de leitura de transição ocorrendo como consequência, uma inserção de 21 aminoácidos na proteína e diminuição da atividade enzimática<sup>37</sup>. Outra mutação presente em indivíduos  $A_2$  e  $A_2B$  ocorre nas regiões 467C>T e 1060delC, mostrando a sua heterogeneidade fenotípica. Contrastando com a baixa prevalência do subgrupo  $A_2B$  encontrado na literatura, uma grande quantidade de amostras de  $A_2B$  comparado com  $A_2$  foi encontrado por pesquisadores japoneses (citado em Furuhashi 1974; Yamaguchi 1967), confirmado por uma tipagem sanguínea realizada em moradores de Hiroshima e Nagasaki (Hamilton 1982).

Neste estudo, foram examinadas as características do grupo sanguíneo A e enzimas B em amostras da população de Hiroshima e Nagasaki, na tentativa de explicar o excesso de  $A_2B$  encontrado no Japão<sup>38</sup>. Os portadores do subtipo  $A_2$  apresenta no seu plasma o anticorpo anti-A e de 1-2% o anticorpo anti- $A_1$ . Os indivíduos do subtipo  $A_2B$  apresentam no seu plasma anti-A e a frequência do anti- $A_1$  sobe para 25%. Pacientes portadores deste subgrupo, com anticorpo anti- $A_1$  no seu plasma que necessitem ser transfundidos com concentrados de hemácias é de fundamental importância a escolha do hemocomponente com o mesmo fenótipo a fim de evitar possível reação transfusional hemolítica intravascular.

#### **2.1.3.4. Subgrupo $A_3$ (A301)**

Terceiro subgrupo mais prevalente entre os subgrupos de A, foi descoberto por Friedenrich<sup>39</sup> em 1936, apresentando de 7.000 a 100.000 epítomos por hemácia, sendo aglutinado pelo soro Anti-A e pela maioria dos soros Anti-AB. Este subgrupo é pouco frequente e pode ser identificado em 0,001 a 0,01% dos indivíduos deste grupo sanguíneo<sup>37</sup>. Apresenta uma aglutinação em laboratório em campo misto, onde apresenta células aglutinadas e outras livres, demonstrando que este subgrupo possui um alto

grau de heterogeneidade, uma vez que diversas mutações já foram associadas a ele, de acordo com estudos feitos por Yamamoto et al<sup>40</sup>, no cDNA de indivíduos A<sub>3</sub>. As células que apresentam este subgrupo não aglutinam com a lectina Anti-A<sub>1</sub>, entretanto Dunsford<sup>41</sup> encontrou Anti-A<sub>1</sub> no soro de dois indivíduos entre onze amostras de portadores do subgrupo A<sub>3</sub>. Secretores do subgrupo A<sub>3</sub> apresentam o antígeno A na saliva. Estudos moleculares realizados em amostras classificadas como A<sub>3</sub> e A<sub>3</sub>B demonstraram que esse subgrupo possui um alto grau de heterogeneidade, uma vez que diversos eventos moleculares foram associados a ele, embora apenas um pequeno número de amostras tenha sido testado até hoje. A mutação 871G>A, presente em indivíduos A<sub>3</sub>B foi, pela primeira vez, observada em amostras A<sub>3</sub>, por Novaretti<sup>42</sup>.

Friedenrich e Gammelgaard consideram o locus A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>BO o responsável pela expressão deste subgrupo. Alguns soros Anti-A apresentam reações muito fracas com este subgrupo, sendo observadas apenas em microscópio.

**Tabela 1. Reações dos subgrupos A<sub>1</sub>, A<sub>int</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub> com os antissoros**

	Soro Anti-A	Soro Anti-AB	Lectina Anti-A <sub>1</sub>	Lectina Anti-H	Anticorpo no soro
A <sub>1</sub>	4+	4+	4+	0	Anti-B
A <sub>int</sub>	2+	3+	2+	4+	Anti-B
A <sub>2</sub>	4+	4+	0	3+	Anti-B e Anti-A <sub>1</sub>
A <sub>3</sub>	1+/(cm)	3+	0	3+	Anti-B

Legenda: cm- campo misto

Fonte: Medicina e Laboratório, pág. 335, 2009- Carlos Alberto A. Garcia/

### 2.1.3.5 Outros subgrupos de A

A distinção entre os subgrupos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> é bastante definida e laboratórios de maior acurácia conseguem, muitas vezes, identificar o subgrupo A<sub>3</sub>, apresentando na classificação reversa aglutinação com hemácias do grupo B o que auxilia na sua identificação. Porém outros dois subgrupos mais fracos são classificados com A<sub>x</sub> e A<sub>m</sub>. O subgrupo A<sub>x</sub> suas células não reagem com o Anti-A ou reagem fracamente com este antissoro, mas apresenta uma reação satisfatória com o soro Anti-AB; geralmente apresenta Anti-A<sub>1</sub> no seu plasma.



Os indivíduos secretores deste subgrupo apresentam na saliva a substância H, mas não o antígeno A. Sua prevalência é estimada em 0,003%<sup>37</sup>. O subtipo  $A_m$  apresenta reação negativa ou fraca com os antissoros Anti-A e Anti-AB. O seu plasma é desprovido dos anticorpos Anti-A e Anti- $A_1$ , os portadores do gene Se apresentam na saliva as substâncias A e H. Uma característica comum a estes dois subgrupos é que reagem fortemente com a lectina anti-H<sup>43</sup>, devido à alta concentração de substância H nas suas hemácias em decorrência da pouca transformação em antígeno A, pela suas transferases. Os subgrupos  $A_m$  e  $A_{el}$  são raros, suas frequências variam de acordo com a população analisada. Na França, em 150.000 doadores de sangue estudados nenhum caso de  $A_{el}$  e apenas um  $A_m$  foi encontrado; ao passo que na China cinco indivíduos  $A_{el}$  e um  $A_m$  foram identificados em 400.000 pessoas submetidas a testes para a identificação do grupo sanguíneo<sup>37</sup>. Outros subgrupos de menor reatividade com os antissoros podem ser identificados por técnicas de adsorção e eluição como o  $A_{bantu}$ ,  $A_{end}$ , entre outros. A classificação dos subgrupos fracos de A se baseia em: 1. Grau de aglutinação eritrocitária pelo anti-A e lectina anti- $A_1$ . 2. Grau de aglutinação eritrocitária com o antissoro anti-AB. 3. Grau de aglutinação pela lectina anti-H.

**Tabela 2. Expressão dos antígenos ABO nas hemácias.**

Grupo sanguíneo		Número de antígenos
A <sub>1</sub>	Adulto	810.000 - 1.170.000
A <sub>1</sub>	Recém-nascido	250.000 - 370.000
A <sub>2</sub>	Adulto	240.000 - 290.000
A <sub>2</sub>	Recém-nascido	140.000
A <sub>1</sub> B	Adulto	460.000 - 850.000
A <sub>1</sub> B	Recém-nascido	240.000 - 290.000
A <sub>2</sub> B	Adulto	120.000
A <sub>3</sub>		7.000 - 100.000
A <sub>x</sub>		1.400 - 10.000
A <sub>end</sub>		1.100 - 4.400
A <sub>m</sub>		200 - 1.900
A <sub>el</sub>		100 - 1.400
B	Adulto	610.000 - 830.000
B	Recém-nascido	200.000 - 320.000
A <sub>1</sub> B	Adulto	310.0 - 560.000 *

\*Valores referentes ao antígeno B

Fonte: Medicina e Laboratório, pág. 335,2009- Carlos Alberto A. Garcia

#### 2.1.4 Subgrupos do grupo sanguíneo B

Semelhante ao que ocorre com o grupo sanguíneo A, o grupo sanguíneo B, também apresenta subtipos que possui semelhanças nas suas características sorológicas e também de nomenclatura (B<sub>3</sub>, B<sub>x</sub>, B<sub>m</sub>, B). Antígeno resultante da adição do açúcar galactose na porção terminal do antígeno H, faz com que haja a transformação do antígeno H em antígeno B e este açúcar adicionado determina a sua especificidade B.

A pesquisa destes subgrupos apresenta maior interesse na área acadêmica, na medicina transfusional demonstra menor importância por serem bastante raros.

#### **2.1.4.1 Subgrupo B<sub>3</sub>**

Caracteriza-se em laboratório pela presença da reação em campo misto, com os antissoros anti-B e anti-AB e uma forte reação com antissoros anti-H; na classificação reversa aglutina fortemente com células dos subgrupos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>. Esta fraca reação com os antissoros anti-B e anti-AB em parte é devida a pequena quantidade de epítomos B por hemácia. Apresenta na saliva as substâncias B e H, para os indivíduos secretores. Dentre os subgrupos fracos é o de maior prevalência.

#### **2.1.4.2 Subgrupo B<sub>el</sub>**

Fenótipo extremamente raro, não apresenta reação com os antissoros anti-B ou Anti-AB, possui o anticorpo anti-A no seu plasma e apenas a substância H na saliva dos portadores do gene Se.

#### **2.1.4.3 Subgrupo B<sub>m</sub>**

Semelhante ao subgrupo anterior estas hemácias não são aglutinadas pelos antissoros anti-B e anti-AB, porém adsorvem e eluem facilmente o antissoros anti-B. Quantidades normais de substâncias H e B são encontradas no soro de indivíduos secretores. Este subtipo é encontrado com certa frequência no Japão.

#### **2.1.4.4 Subgrupo B<sub>x</sub>**

Diferentemente dos dois subgrupos supracitados apresenta uma fraca reação com o antissoros anti-B e uma reação mais forte com o anti-AB, poderá apresentar no seu plasma anti-B fraco e substância H nos indivíduos secretores. A única característica comum a todos os subtipos é a presença do anticorpo anti-A no plasma.

#### **2.1.4.5 Fenômeno do B adquirido**

Indivíduos que apresentam obstrução do trato intestinal como, carcinoma de cólon ou de reto, podem apresentar um aumento da permeabilidade da parede intestinal permitindo a passagem de polissacarídeos da Escherichia coli sorotipo O<sub>86</sub> para a circulação sanguínea do paciente. As

hemácias de indivíduos do grupo sanguíneo A absorvem o polissacarídeo tipo B, simulando uma falsa reação com o antissoro B, causando uma discrepância entre a classificação direta e reversa deste paciente.

### 2.1.5 Sistema ABO e doenças

Semelhante ao que ocorre com o sistema HLA, onde existe estreita ligação entre alguns dos seus antígenos com a pré-disposição (risco relativo) do indivíduo portador daquele fenótipo desenvolver determinada patologia, verifica-se este fenômeno também com o sistema sanguíneo ABO. A investigação das eventuais relações entre os grupos sanguíneos do sistema ABO e diversas doenças comuns, iniciou-se relativamente pouco tempo depois da descoberta destes grupos sanguíneos<sup>44</sup>. Estudos mostram uma forte associação entre o grupo sanguíneo O e a infecção pelo *H. pylori*<sup>45</sup> e úlcera péptica

Os prováveis receptores do *H. pylori* no epitélio gástrico são carboidratos das mucinas gástricas, que têm papel primordial na proteção da mucosa gástrica. Os antígenos de grupos sanguíneos ABH e Lewis fazem parte da composição das mucinas gástricas e têm sido implicados como receptores da bactéria na mucosa gástrica<sup>46</sup>. O grupo sanguíneo A está relacionado ao carcinoma gástrico e a anemia perniciosa. Beiguelman<sup>47</sup> em seu trabalho sobre grupos sanguíneos e Lepra verificou que o grupo sanguíneo O, percentualmente, é maior entre os que apresentam a forma tuberculóide que entre os portadores da forma lepromatosa. Teixeira<sup>48</sup> et al em sua pesquisa com 148 doentes chagásicos crônicos, assintomáticos e sintomáticos, com diferentes formas anatomoclínicas, sobre a relação entre os grupos sanguíneos ABO e doença de Chagas mostrou que, embora os indivíduos necropsiados do grupo sanguíneo O não sejam protegidos contra a infecção pelo *T. cruzi*, parecem relativamente protegidos quanto a sua ação patogênica, particularmente no que se refere formas “megas” (cardiomegalia, megacólon) da doença<sup>49</sup>.

## **2.2. Sistema de grupo sanguíneo Rh (ISBT 004)**

Considerado um dos mais polimórfico dos grupos sanguíneos e o segundo mais importante na medicina transfusional, sobreposto apenas pelo sistema ABO. É composto por 54 antígenos e tem relevante importância também na obstetrícia por ser responsável pela Doença Hemolítica Perinatal (DHPN). Dentre os antígenos deste sistema sanguíneo, cinco despertam maior interesse por serem os mais imunogênicos (D, C, c, E, e). Considerado o mais imunogênico dentre os cinco, sendo vinte vezes mais imunogênico que o antígeno c, o antígeno Rh (D) é o responsável pela maioria das reações transfusionais e que desperta maior interesse na terapia transfusional. A sua ausência ou presença nas hemácias é que determina a divisão em indivíduos Rh positivos ou Rh negativos. Indivíduos que apresentam o antígeno D é considerado Rh positivo, enquanto que a sua ausência determina o Rh negativo. A etnia a que pertence o indivíduo determina o mecanismo da ausência do antígeno Rh (D). Nos caucasianos o fenótipo Rh negativo é resultante da completa deleção do gene RHD, enquanto nos afrodescendentes é a presença do pseudogene RHD $\psi$  e do gene híbrido RHD-CE (4-7)-D<sup>50</sup>, causando a ausência de expressão do antígeno Rh (D) nas hemácias. As bases moleculares do sistema Rh são determinadas por rearranjos gênicos, mutações pontuais e deleções, as quais são responsáveis por numerosas variantes dos antígenos RhD e RhCE, segundo estudo de Castilho et al.

### **2.2.1 Nomenclatura do Sistema Rh**

Vários grupos de pesquisadores se reuniram para normatizar as nomenclaturas utilizadas para representar os antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos. Dentre eles os grupos de trabalho de Fischer-Race e do pesquisador A.S. Wiener. Estes dois grupos se detiveram especificamente nos antígenos do Sistema Rh. O grupo instituído pela ISBT (International Society for Blood Transfusion), foi mais abrangente catalogando todos os antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos.

### **2.2.1.1 Nomenclatura de Fischer & Race**

Fisher e Race concluíram que os antígenos do sistema Rh eram produzidos por três grupos de alelos que tinham estreita relação entre si e os denominou de D, d, C, c, E, e. O fenótipo de uma determinada hemácia é definido pela presença e expressão destes antígenos. O d representa a ausência do antígeno D, portanto não existindo este antígeno. Portadores do Rh negativo são expressos como d/d. Segundo Fischer-Race cada indivíduo herda um grupo de genes de cada genitor, podendo ser D ou d, C ou c, E ou e, que será expresso na hemácia dependendo da herança, uma vez que eles são codominantes. Isto significa que a pessoa pode apresentar, simultaneamente C, c, E, e nas suas hemácias. Cada antígeno e gene correspondentes receberam a mesma letra, entretanto para diferenciar o antígeno do gene este é escrito em itálico. Esta nomenclatura adotada por Fischer-Race é mais detalhada pois descreve todos os cinco antígenos presentes nas hemácias do indivíduo. O antígeno D, como seu alelo é amorfo, a sua ausência é representada por d. O portador do Rh negativo sempre será homozigoto. Pessoas portadoras do Rh positivo poderá ser homozigoto (D/D) ou heterozigoto (D/d). Isto explica porque duas pessoas Rh positivas têm 25% de probabilidade (D/d x D/d) de gerar um filho Rh negativo.

### **2.2.1.2 Nomenclatura de Wiener**

Este pesquisador em seus trabalhos defendia que um único gen produzia uma aglutinina que expressava vários fatores nas hemácias (Rho, Rh1, Rh2, Rhz, rh, rh', rh'', rhy) e usou a terminologia Rh-Hr. De acordo com sua nomenclatura ele representava os indivíduos Rh positivos com R e os indivíduos Rh negativos por r, independentemente da herança dos outros antígenos do sistema Rh. Existe uma equivalência entre as duas nomenclaturas, a de Fischer-Race usa os aglutinogênios para expressar o fenótipo, enquanto a nomenclatura de Wiener usa apenas um aglutinogênio para expressar o fenótipo (tabela 3).

**Tabela 3. Nomenclaturas do Sistema Rh**

Fischer-Race		Wiener		
Haplótipos	Antígenos	Gens	Aglutinogênios	
	Dce	D, c, e	R <sup>0</sup>	Rho
	DCe	D, C, e	R <sup>1</sup>	Rh1
Rh +	DcE	D, c, E	R <sup>2</sup>	Rh2
	DCE	D, C, E	R <sup>z</sup>	Rhz
	dce	d, c, e	r	rh
Rh -	dCe	d, C, e	r'	rh'
	dcE	d, c, E	r''	rh''
	dCE	d, C, E	rh	rhy

Fonte: Harmening D. Técnicas modernas de banco de sangue e transfusão, 4ª. Ed. Pág. 131, 2006

### 2.2.1.3 Nomenclatura da ISBT

Devido ao número de antígenos descoberto, dentre eles o Sistema Rh, tornou-se necessária uma normatização para identificar todos os antígenos deste e dos outros sistemas. Então a ISBT capitaneou a criação de uma linguagem universal para expressar os antígenos de todos os sistemas de grupo sanguíneo, através de seis dígitos onde os três primeiros indicam o sistema a que pertence o antígeno e os três últimos o antígeno específico. O sistema Rh foi catalogado como 004 e antígeno Rh (D) 004001. Seguindo este raciocínio os outros quatro principais antígenos ficaram assim denominados: 004002 o antígeno C, 004003 o antígeno E, 004004 o antígeno c e 004005 o antígeno e. Existe uma correlação entre estas três nomenclaturas. Tomando como exemplo o antígeno E (Fischer-Race), na nomenclatura Wiener seria expresso por rh'' e na ISBT 004003.

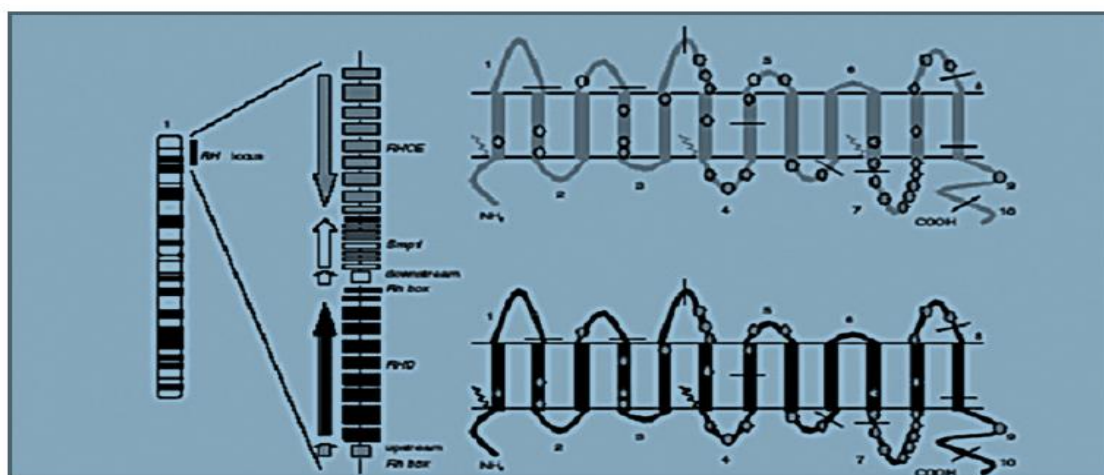
O número de determinantes antigênicos do antígeno Rh (D) por hemácia varia de acordo com o fenótipo apresentado pelo indivíduo, como mostra a tabela 4. Este número oscila entre 9.900 a 33.300 sítios antigênicos por hemácia, o que explica as diferentes intensidades de reação em laboratório apresentado pelo antígeno D, podendo apresentar reação de 1+ até a mais forte aglutinação classificada com 4+S (sólido). Apesar da baixa prevalência, já

foram descritos indivíduos que não apresentam os antígenos C/c e E/e nas suas hemácias. Pessoas portadoras deste fenótipo podem apresentar até 220.000 antígenos D por hemácia. A tabela 5 mostra a prevalência dos principais antígenos do sistema Rh em caucasianos

**Tabela 4. Números de sítios antigênicos D em hemácias de diversos fenótipos.**

Fenótipo Rh	Nos. de sítios antigênicos
DcE/dce	9.900 - 14.600
Dce/dce	12.000- 20.000
DcE/dce	14.000 -16.600
DcE/DcE	14.500 - 19.300
DCe/DcE	23.000 - 31.000
DcE/DcE	15.800 - 33.300
D-/-	110.000 - 202.000

Fonte: Hughes-Jones, N, C, Gardner, B and Lincoln, P.J. Observation of the number of available C, D and E antigens sites of the red cells. *vox. sang.*



Legenda: Adaptado de Martine GHM Tax. Rh variabiliteit vanuit multi-etnisch perspectief Consequenties voor RH genotypering. © 2005, Rotterdam, The Netherlands. ISBN 90-9020176-9

**Figura 4. Estrutura do gene RHD e RHCE e seus respectivos polipeptídeos**



**Tabela 5. Frequência fenotípica dos 5 principais antígenos do Sistema Rh**

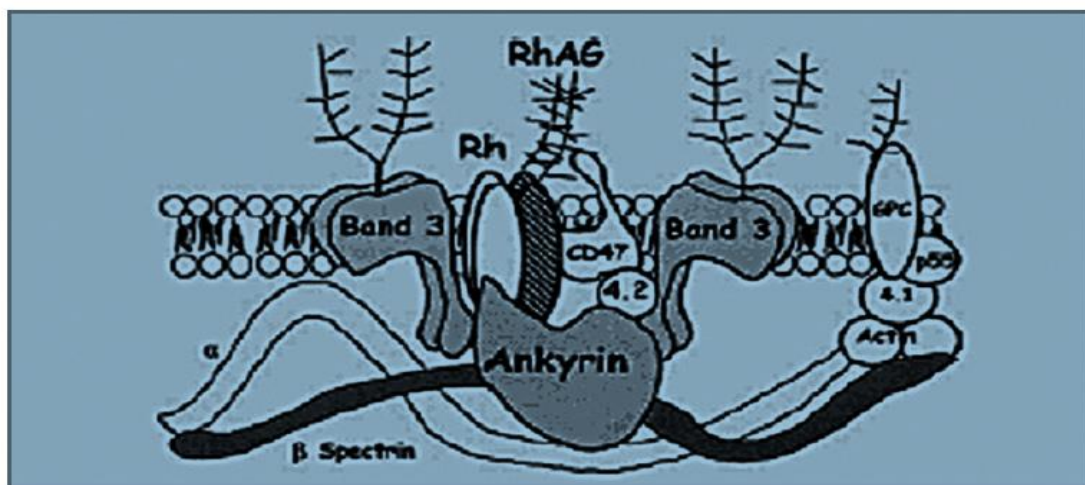
D	85%
d	15%
C	70%
c	80%
E	30%
e	98%

Fonte: Widman, F.K. Technical Manual of the American Association of Blood Banks - AABB, 1985

Em 1939 Levine et al observaram que após transfusão de sangue ABO compatível do seu marido em uma puérpera, esta apresentou quadro de reação transfusional hemolítica, após dar à luz a um natimorto, com quadro de eritroblastose fetal. O soro desta paciente aglutinava as hemácias do seu marido e cerca de 80% dos doadores caucasianos, mesmo sendo ABO compatível. Posteriormente, pesquisas de Landsteiner imunizando coelhos com hemácias de macacos da espécie Rhesus, obteve um antissoro que aglutinava 85% das hemácias humanas. Pensando tratar-se do mesmo anticorpo deu-lhe o nome de antígeno Rh. Em 1942 Fisk et al, constatou que o anticorpo produzido pela puérpera e o anticorpo produzido pelo coelho eram diferentes, mesmo assim foi mantido o nome Rh para o antígeno humano e LW para o antígeno do macaco Rhesus, em homenagem a Landsteiner e Wiener. O anticorpo humano foi denominado anti-D. Em contraponto ao que ocorre com o sistema ABO, a transfusão de hemácias Rh positivas em um indivíduo destituído do antígeno D, tem 80% de probabilidade de este produzir anti-Rh em um primeiro contato com este antígeno.

Indivíduos Rh negativos, diferentemente do sistema ABO, não apresentam naturalmente anticorpos anti-Rh no seu plasma, possibilitando no momento da primeira transfusão o receptor apresentar uma melhora do seu hematócrito e posteriormente formará anticorpos anti-Rh que poderão ser detectados pelo teste da antiglobulina indireta (TAI). Em se tratando de mulheres, em período fértil, tem desdobramento mais grave. Caso ela tenha uma gravidez com feto Rh positivo terá grande chance desta criança apresentar doença hemolítica do recém-nascido mesmo sendo a primeira gestação, o que é incomum acontecer em primigesta. Anticorpos contra o

antígeno RhD é a principal causa de Doença Hemolítica do feto e do Recém-nascido (DHFRN).<sup>49</sup>Atualmente o anti-D tem uma prevalência de aproximadamente 0,27 a 0,56% nos receptores de transfusão, 0,16 a 0,25% nos doadores de sangue e de 0,1 a 0,2 % nas gestantes<sup>4</sup>



Legenda: Adaptado de Kim CLV, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Reviews* 2006;20:93-110

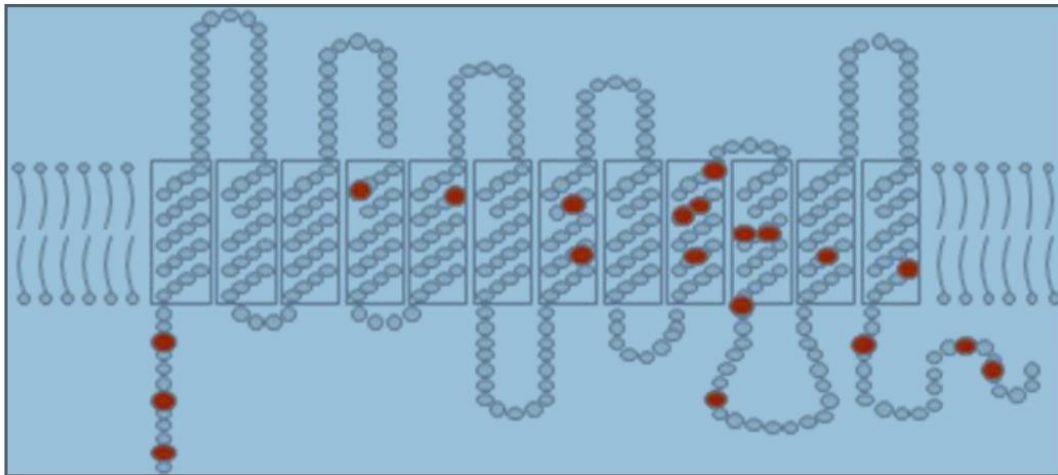
**Figura 5. Representação esquemática do complexo Rh na membrana da hemácia**

## 2.2.2. Variantes do antígeno D

### 2.2.2.1. Variante D fraco

Essa variante foi descrita pela primeira vez por Stratton et al em 1946, caracterizada por uma alteração quantitativa que leva a uma baixa expressão do antígeno RhD. Este fenômeno ocorre em consequência de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) em diferentes exons do gene *RHD*<sup>50</sup>, como mostra a figura 6. Conhecido anteriormente com D<sup>u</sup>, tem como característica uma reação negativa com o antissoro anti-D, podendo também apresentar reação apenas microscópica. Hemácias com este fenótipo expressam um antígeno RhD intacto ocorrendo em 0,2% a 1% dos caucasianos. Atualmente 22 tipos de D fracos já foram identificados, sendo os mais comuns os tipos 1, 2 e 3. O mecanismo relacionado com a expressão reduzida do antígeno RhD fraco não está totalmente esclarecido, e sua expressão difere dependendo do tipo presente na membrana da hemácia. A sua detecção em laboratório é feita pelo

teste da antiglobulina humana ou teste de Coombs, que consiste em incubar as hemácias do paciente ou doador, a temperatura de 37° C de 15 a 45 minutos, com a finalidade de intensificar uma possível reação com o soro anti-D. Após esta fase adiciona-se o soro de Coombs(reagente com especificidade contra a fração gamaglobulina humana) ou o soro anti-humano (reagente com especificidade contra a fração gama e não gamaglobulina humana) ao teste, para facilitar a reação entre as hemácias. Havendo aglutinação nesta fase a mostra será classificada como Rh D fraco positivo.



Fonte: Tezza, L. C. Estudo das variantes *RHD* em pacientes portadores da doença falciforme. 2014

Figura 6. Estrutura do RhD Fraco, apresentando alterações nos epítomos transmembrana e intracelulares

Outra técnica para a pesquisa do D fraco é a do teste em gel onde verificamos os diferentes gradientes de aglutinação apresentado por esta variante do antígeno D, como mostra a figura 7.



Figura 7. Variação no gradiente de reação do D fraco.

Fonte: Arquivo pessoal

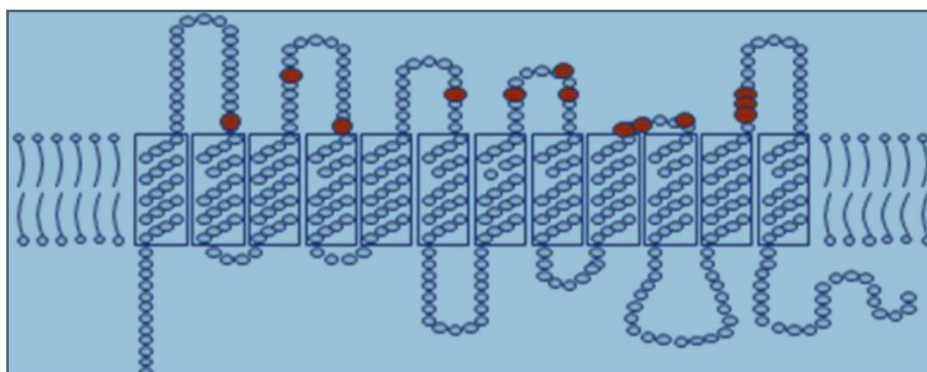
### 2.2.2.2. Variante D fraco devido ao efeito trans

Fenótipos que apresentam o antígeno C na posição trans enfraquece a expressão do antígeno D. Conhecido como efeito de interação gênica o fenótipo Rho/rh'(Dce/dCe) se encaixa nesta situação. Apesar de apresentarem um número expressivo de antígenos D nas hemácias, o antígeno C na posição oposta enfraquece a reação em laboratório, não se conseguindo diferenciar estas duas variantes por técnicas sorológicas, apenas com estudos familiares.

### 2.2.2.3. Variante D parcial

O antígeno RhD é considerado um mosaico composto de 37 epítomos, onde pelo menos nove deles (epD1-epD9) já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais. Hemácias D parciais são definidas pela ausência de um ou mais epítomos causados pelos rearranjos dos genes RHD e RHCE. Essa configuração genética propicia micro conversões e trocas unidirecionais de fragmentos de gene RHD e RHCE, ou parte deles, levando a formação de alelos RHD-CE-D ou RHCE-D-CE respectivamente<sup>51</sup>. Alguns indivíduos RhD positivos podem desenvolver aloanticorpos anti-D dirigidos contra um ou mais dos epítomos ausentes, definindo-se, assim, as categorias do antígeno RhD parcial (DII, DIII, DIV, DV, DVI, DVII, DFR, DBT, R<sub>o</sub><sup>Har</sup>) que são diferenciadas umas das outras de acordo com a presença ou ausência de um ou mais epítomos<sup>52</sup>.

Diferentemente das variantes supracitadas, esta se caracteriza por uma fraca reação em laboratório, não por apresentar um menor número de antígenos, mas por faltar partes do antígeno D. Wiener e Unger <sup>53</sup> postularam que o antígeno D é composto por subpartes antigênicas, herdadas geneticamente, mas que em condições especiais frações destas podem estar ausentes. Esta hipótese justifica porque pessoas Rh D positivas poderão desenvolver anticorpo anti-D em seu plasma contra as frações ausentes nas suas hemácias. (Figura 7). Estudo molecular das variantes de D, mostrou que a perda de expressão de certos epítomos está associada a mutações de ponto no gene RHD ou a rearranjos gênicos entre os genes RHD e RHCE.



Fonte: Credidio DC. Variantes do antígeno RhD: estudo sorológico e molecular. 2010

**Figura 8. Estrutura do RhD parcial, apresentando alterações pontuais nos epítomos extracelulares**

Estas diferentes expressões dos epítomos do antígeno D, podem ser pesquisadas com anticorpos monoclonais, como mostra a figura 9.

Anti-D	D II	D III	D IV <sup>a</sup>	D IV <sup>b</sup>	D V	D VI	D VII	DFR	DBT	R <sub>0</sub> <sup>Har</sup>
1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
2	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
3	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
4	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
5	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
6	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+/-

Figura 9. Resultados obtidos com os diversos tipos de D parcial, usando anticorpos monoclonais.

Fonte: DiaMed, Technicals manual, arquivo particular

### 2.2.3 *Rh<sub>null</sub>*

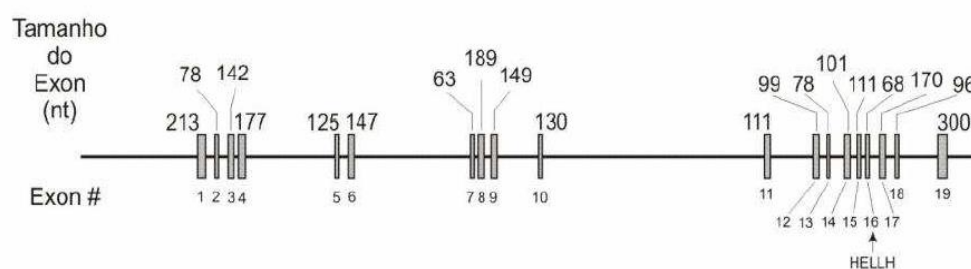
Descrito pela primeira vez a partir de 1998, graças ao aprimoramento das técnicas de diagnóstico molecular, condição que afeta uma em cada 6 milhões de pessoas, tem como característica a ausência total dos cinco principais antígenos do sistema Rh. Descrito apenas 4 casos até 2006 no mundo, indivíduos portadores desta síndrome não são classificados como Rh negativos, significando que só devem ser transfundidos, caso necessitem, com sangue *Rh<sub>null</sub>*.

Dois tipos de *Rh<sub>null</sub>* são encontrados em portadores desta síndrome: o tipo amorfo, que ocorre pela presença de mutações nonsense no gene RHCE em indivíduos que apresentam a deleção do gene RHD, ou seja, pessoas que são Rh negativas. O outro tipo de *Rh<sub>null</sub>* do tipo regulador é resultante da mutação no gene RHAG.

### 2.3. Sistema de Grupo Sanguíneo Kell. (ISBT 006)

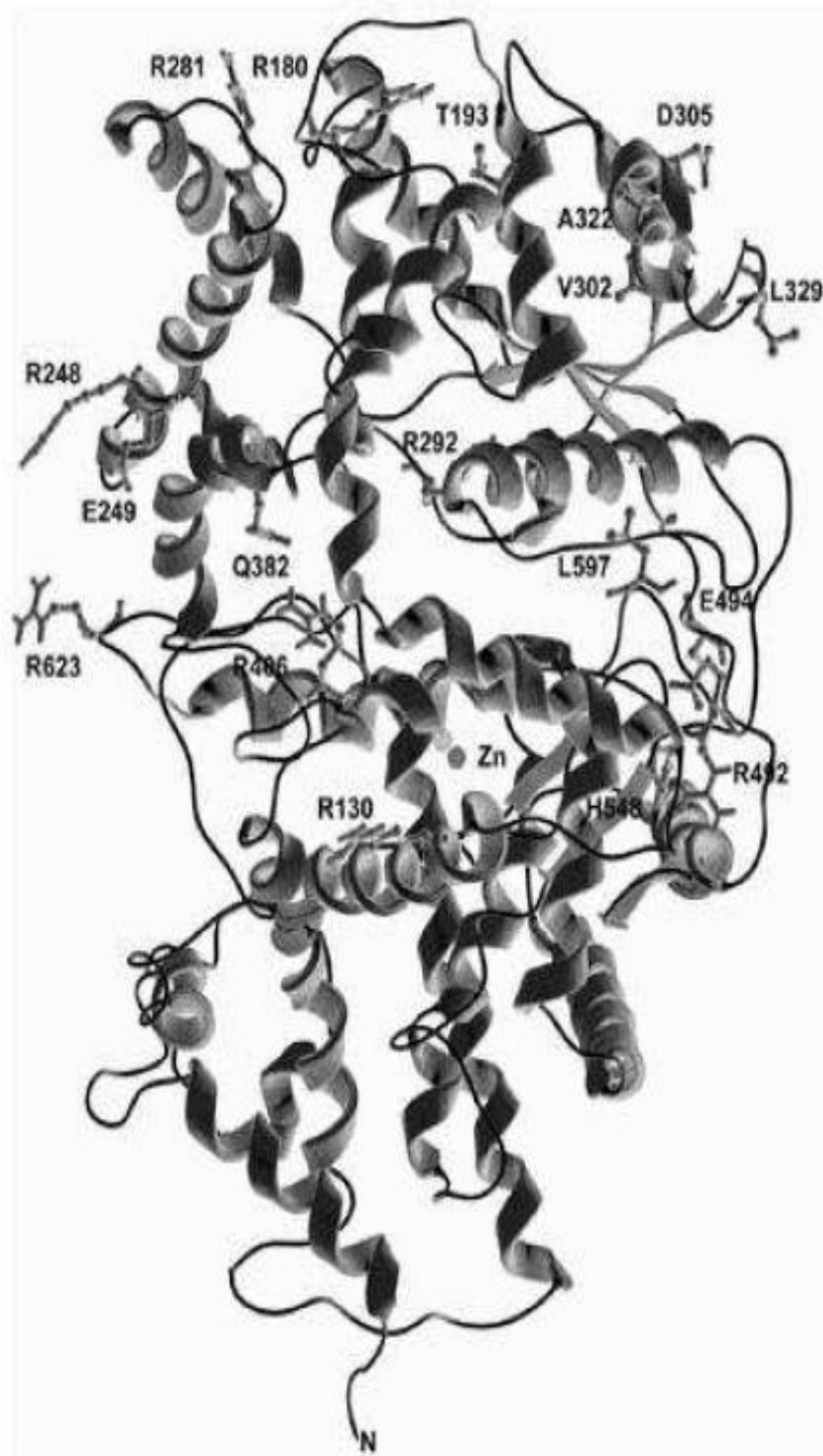
Depois de descoberto em 1946, passou-se quase meio século para que as bases moleculares destes antígenos fossem elucidadas. Graças aos trabalhos de Lee et al, pode-se entender a estrutura do gene Kell e suas variações. Atualmente quase todos os polimorfismos responsáveis pela expressão do antígeno Kell já foram desvendados, exceto para os antígenos Kell<sub>5</sub>, Kell<sub>16</sub> e Kell<sub>20</sub>.

Estes antígenos são expressos principalmente na superfície da membrana das hemácias, mas também estão presentes em órgãos não eritróide, como os órgãos linfóides (baço, tonsilas), cérebro, músculos e células progenitoras mielóides. Atualmente a Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (ISBT) reconhece 28 antígenos pertencentes a este sistema, sendo considerado um dos mais polimórficos, atrás apenas dos sistemas Rh e MNS. O gene Kell está localizado no cromossomo 7q33, contém 19 exons e 21.5kb, enquanto a proteína Kell (CD 238) é uma glicoproteína de membrana tipo II de 93 KDa, composta por 732 aminoácidos. Apresenta um pequeno segmento N-terminal intracitoplasmático de 47 aminoácidos, um domínio transmembrana único e um longo segmento C-terminal extracelular constituído por 665 aminoácidos. Os antígenos do sistema Kell são codificados por alelos gênicos antagônicos ou independentes. As bases moleculares deste sistema foram descritas em 1955 por Lee et al (Lee et al 1995c). Os 28 antígenos estão localizados ao longo do segmento extracelular. A figura 9 mostra a organização do gene Kell



**Figura 10. Organização do gene Kell. As barras numeradas indicam os 19 exons**

Fonte: adaptado de A. H. Lee, 2006



lo tridimensional da proteína Kell mostrando as posições dos resíduos de aminoácidos, responsáveis pelos polimorfismos dos antígenos Kell.



Os antígenos do sistema Kell, também são classificados em antígenos de alta e baixa prevalências populacionais. Os antígenos de alta incidência ocorrem em mais de 90% da população, como por exemplo o Cellano, que varia entre 91% entre indivíduos caucasoides e 98% em afrodescendentes. Ver tabela 6.

**Tabela 6. Frequência fenotípica dos antígenos K/k**

Fenótipos	Caucasoides	Afrodescendentes
K -/k+	91%	98%
K +/ k+	8,8%	2%
K +/k-	0,2%	Raro

Fonte: Covas, D. T. Hemoterapia. Fundamentos e Prática, 2007

Dentre os antígenos de baixa prevalência destacam-se os fenótipos Kell<sub>3</sub>(KP<sup>a</sup>), fenótipo Kell mod, fenótipo Kell null (K0) e fenótipo Macleod. Devido ao seu grande poder imunogênico os antígenos deste sistema, destacando-se neste quesito o antígeno Kell 1, desempenham grande importância clínica por estarem envolvidos em reações pós transfusionais, na DHRN e AHAI. Em indivíduos portadores de Talassemia o índice de aloimunização, por este antígeno, pode alcançar índices de 22,6%. Em pacientes portadores de anemia falciforme, a prevalência pode chegar a 40% dos pacientes politransfundidos.

### 3. JUSTIFICATIVA

1. Fenotipar os antígenos dos Sistemas ABO & Rh e antígeno Kell para fins transfusionais
2. Verificar a prevalência dos antígenos dos Sistemas ABO & Rh e antígeno Kell nesta população de doadores
3. Pesquisar a prevalência dos fenótipos cde/cde e Dce/dce nesta população de doadores de sangue
4. Mostrar a importância da imunofenotipagem eritrocitária, devido à grande miscigenação da nossa população e a constante migração que ocorre em nosso país.
5. A fenotipagem destes doadores possibilitará o fácil acesso a doadores raros nesta população e a seleção de hemoderivados mais semelhantes contribuindo para diminuir o risco de aloimunização.

## **4.OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Fazer o mapeamento dos antígenos dos grupos sanguíneos ABO, Rh e antígeno Kell1 em doadores de sangue para verificar a prevalência dos antígenos A B, AB, O, C, c, D, E, e, Kell1 com a finalidade de selecionar doadores de sangue.

### **4.2. Objetivos Específicos**

1. Comparar com a casuística nacional e verificar quais grupos sanguíneos têm maior prevalência entre os doadores, levando-se em conta a nossa miscigenação populacional.
2. Verificar a prevalência dos fenótipos do sistema Rh nesta população de doadores de sangue.
3. Construir um panorama geral da distribuição dos grupos sanguíneos dos doadores de sangue.
4. Disponibilizar aos pacientes portadores de doenças crônicas dependentes sistematicamente de transfusões sanguíneas, unidades hemoterápicas o mais compatível possível nos sistemas ABH, Rh (D, C, c, E, e) e antígeno Kell 1.

## 5. DESENHO DO ESTUDO

1. Esta pesquisa foi feita em doadores de sangue do Hemocentro Dalton Cunha.
2. A coleta das amostras de sangue foi realizada por punção venosa, sem anticoagulante, com agulha calibre 40 x 16.
3. Foram realizadas classificação sanguínea direta e reversa no Sistema ABO e classificação direta no Sistema Rh e antígeno Kell 1
4. Técnicas utilizadas: Hemaglutinação em tubo por centrifugação a 3.400 rpm x 15 segundos e técnica em Gel (DiaMed)
5. As discrepâncias que ocorreram foram resolvidas utilizando as lectinas anti-A1 e anti-H.
6. Para o cálculo das frequências foi usado o teste do Qui quadrado.

## 6. TAMANHO DA AMOSTRA

**Tabela 7. Tamanho da população**

<b>Tamanho da população (para o fator de correlação de uma população infinita)</b>	
Frequência (%) hipotética do fator de resultado da população p	40% +/- 3
Limite de confiança com o % de 100 (absoluto +/- %) (d)	3%
Efeito de desenho (para inquérito em grupo EDFF)	1
<b>Tamanho da amostra (n) para vários níveis de confiança</b>	
<b>INTERVALO DE CONFIANÇA</b>	<b>TAMANHO DA AMOSTRA</b>
99%	1767
<b>97%</b>	<b>1255</b>
95%	1024
90%	721

Fonte: Open Epi: Estatísticas Epidemiológicas de código aberto para Saúde Pública v.3

## 7.METODOLOGIA

No período compreendido entre janeiro e dezembro de 2014, foram colhidos sangue de 11.664 doadores considerados aptos para doação no Hemonorte - Hemocentro do Rio Grande do Norte Dalton Cunha, obedecendo as Normas Técnicas do Ministério da Saúde para Coleta, Processamento e Transfusão de Sangue, Componentes e Derivados em Hemoterapia<sup>54</sup>. A coleta foi realizada em bolsa plástica com CPD/SAG-M. Adicionalmente foram colhidos dois frascos com, aproximadamente 10 ml, sem anticoagulante, para a realização dos testes Imunohematológicos. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Imunohematologia do Hemonorte. Para a determinação dos grupos sanguíneos as amostras foram testadas para a Imunofenotipagem dos principais antígenos eritrocitários dos sistemas Rh (D, C, c, E, e) e Kell (K1), através da metodologia de aglutinação em coluna gel teste (DiaMed Ag, Morat, Switzerland)<sup>55</sup> utilizando cartões com anticorpos policlonais. Para o teste foi preparada uma suspensão de hemácias a 5% em bromelina. Incubada por dez minutos à temperatura ambiente. Foi pipetado 10 µl da suspensão nos microtubos. A seguir, os cartões foram centrifugados a 1030 rpm por dez minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação em gel teste. Também foi utilizado a técnica em tubo,<sup>56</sup> empregando os antissoros anti-A, anti-B, Anti-AB e anti-Rh para a classificação direta nas hemácias com reagentes Biotest/SA e hemácias A1 e B (Revercel Biotest). Para os antígenos de grupo sanguíneo Kell, D, C, c, E, e, realizado apenas a classificação direta, uma vez que estes não apresentam anticorpos naturais para a determinação da classificação reversa, característica esta apresentada apenas pelo sistema de grupo sanguíneo ABH tornando-o único neste quesito. A análise estatística dos resultados obtidos foi feita utilizando o teste do Qui-quadrado.<sup>57</sup>

A pesquisa foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa - CEP - do Hospital Universitário Onofre Lopes - HUOL - da UFRN (Universidade Federal do Rio Grande do Norte) CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) sob no.43687315.0.0000.5292 e parecer favorável de no. 1.051.865.

## 8. RESULTADOS

Do total de doadores examinados, 10.370 (88,91%) foram classificados como Rh positivos e 1.294 (11,09%), foram classificados como Rh negativos. Para o sistema ABH; resultados encontrados: O grupo sanguíneo "O" contemplou 5.790 (49,63 %) dos doadores; o grupo "A" 4.230 (36,27 %), seguido do grupo sanguíneo "B" com 1.258 (10,79 %) e por último o grupo sanguíneo AB com 386 doadores com um percentual de 3,31 %. (Tabela 8). As prevalências encontradas para os antígenos do sistema ABH, relata o que outros trabalhos com este mesmo foco já encontraram. O grupo sanguíneo "O" com maior prevalência, seguido do grupo sanguíneo A, grupo sanguíneo B e por último o grupo sanguíneo AB, diferindo apenas nas suas incidências na população estudada. Relacionando os resultados encontrados neste trabalho, com a etnia europeia de maior influência na colonização do estado do Rio Grande do Norte, a população portuguesa, há uma predominância do grupo sanguíneo A em relação ao grupo O, no que se refere a prevalência, seguido do grupo sanguíneo B e do grupo sanguíneo AB de acordo com o estudo realizado por Duran<sup>58</sup> em 230.233 doadores de sangue em Portugal, encontrando os resultados: 46,6%; 42,2%; 7,6% e 3,4%, respectivamente.

**Tabela 8. Frequência dos grupos sanguíneos ABO e Fator Rh nos doadores de sangue.**

Grupo Sanguíneo	fator Rh positivo		fator Rh negativo	
	n	%	n	%
O	5.790	49,64	5.142	44,08
A	4.230	36,27	3771	32,33
B	1.258	10,79	1.122	9,62
AB	386	3,30	335	2,87
Total	11.664	100,00		

Fonte. Hemonorte - Hemocentro do Rio Grande do Norte Dalton Cunha.

As Frequências dos grupos sanguíneos ABO também estão representadas nos gráficos 1, 2 e 3 como mostra abaixo.

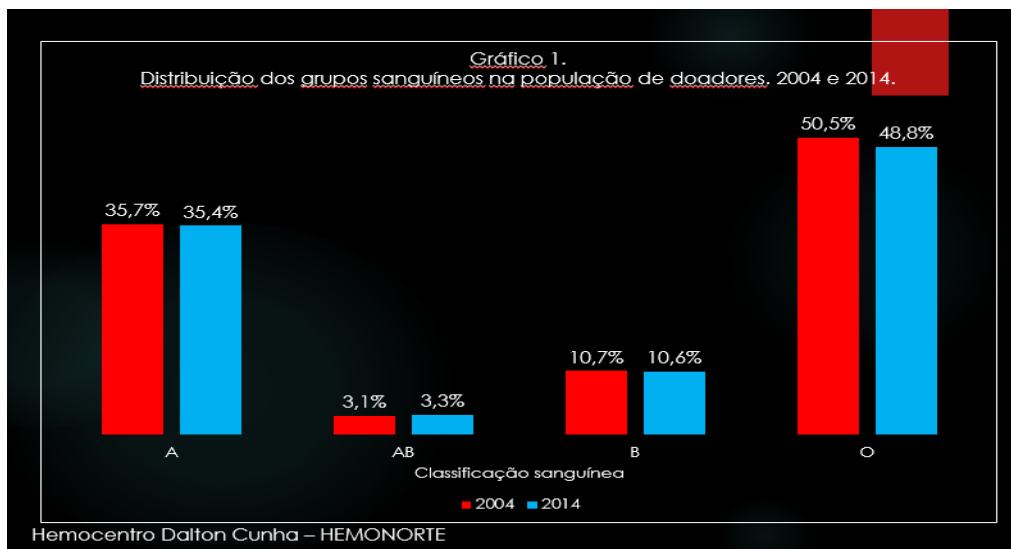


Gráfico 1. Distribuição dos grupos sanguíneos ABO na população de doadores de sangue

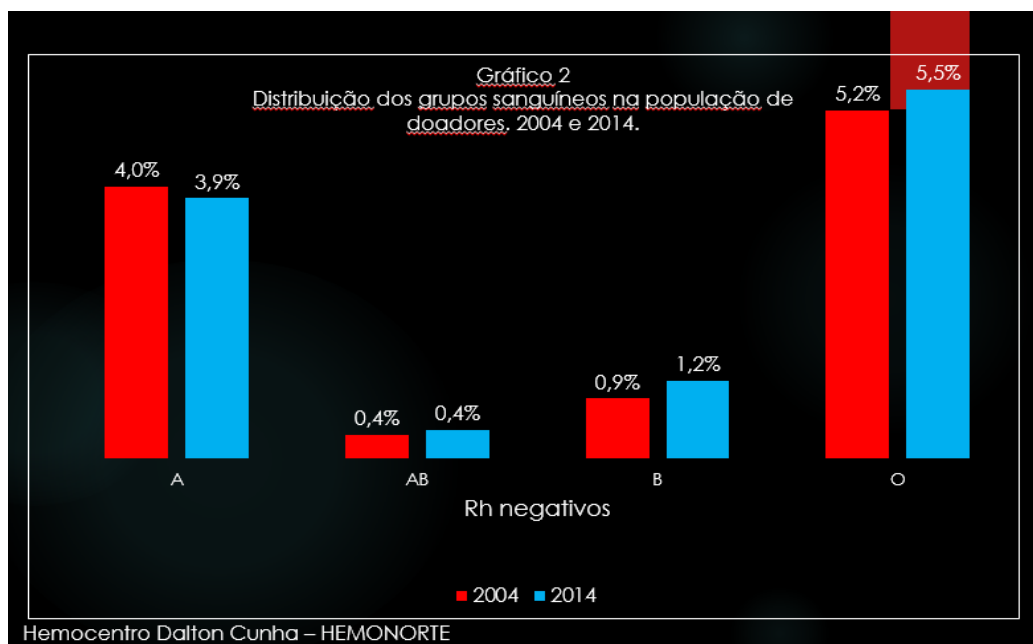
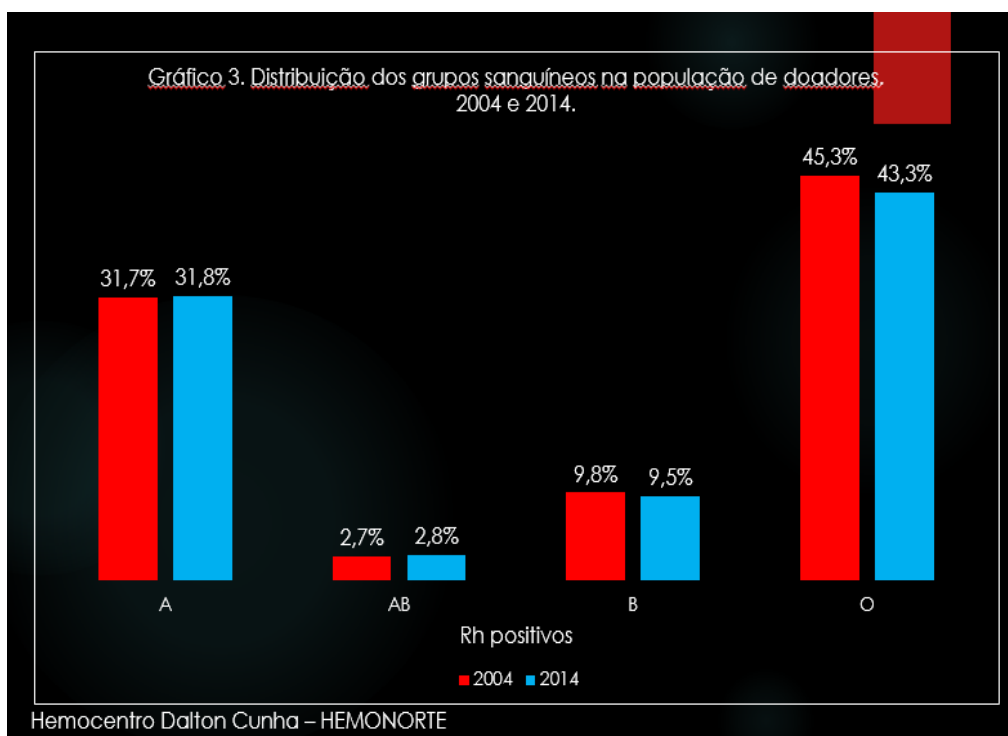


Gráfico 2. Distribuição dos grupos sanguíneos Rh negativos na população de doadores de sangue



**Gráfico 3. Distribuição dos grupos sanguíneos Rh positivos na população de doadores de sangue**

Das amostras colhidas para a pesquisa foram selecionados 1.255 doadores para verificar a frequência de antígenos e fenótipos para o sistema Rh e antígeno Kell. Os resultados encontrados constam nas tabelas 9 e 10. A frequência do antígeno Kell encontrada, refere-se a sua presença em homozigose e/ou heterozigose (K/K, K/k)

São escassos os trabalhos quanto a frequência dos antígenos do sistema Kell na população brasileira. Estes poucos estudos não demonstram a sua alta importância na medicina transfusional e seu poder imunogênico. A tabela 9 mostra a frequência encontrada neste trabalho, de 6,7%, em doadores de sangue. Costa <sup>59</sup> em sua tese encontrou uma frequência de 6% em doadores de sangue; Boturão Neto <sup>60</sup> relata uma frequência de 6,3% também em doadores de sangue em sua pesquisa. Em termos de imunogenicidade, o antígeno Kell perde apenas para o antígeno Rh (D). Quando pacientes K- recebem transfusão de uma unidade de sangue K+, a probabilidade de formarem anticorpos anti-K pode chegar a 10% <sup>25</sup>. O sistema Kell compreende



34 antígenos dos quais três conjuntos antitéticos de antígenos, são os mais importantes (K, k, Kp<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup>, Jsa e Jsb). Anticorpos contra antígenos do sistema de grupo sanguíneo Kell, além de provocar a destruição imune de hemácias na DHFRN (Doença Hemolítica do Feto e do Recém-Nascido), também causam uma imunossupressão da eritropoiese, que pode resultar em anemia grave, prolongada e sem sinais evidentes de hemólise.<sup>25</sup> Em pacientes hematológicos, portadores de Anemia Aplástica (AA), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) a prevalência de anticorpos irregulares se situa entre 11 e 16%. Os principais sistemas eritrocitários submetidos à fenotipagem, destinados a transfusão em portadores de anemia falciforme são o Rh (antígenos D, C, c, E, e) e o Kell (antígeno K), por serem estes os que apresentam as maiores frequências de aloimunização em pacientes acometidos por esta anemia<sup>61</sup>

Os anticorpos mais envolvidos em reação transfusional hemolítica tardia são dirigidos contra antígenos dos sistemas Rh (34%), Kidd (30%), Duffy (14%) e Kell (13%)

**Tabela 9. Frequência encontrada do antígeno Kell 1**

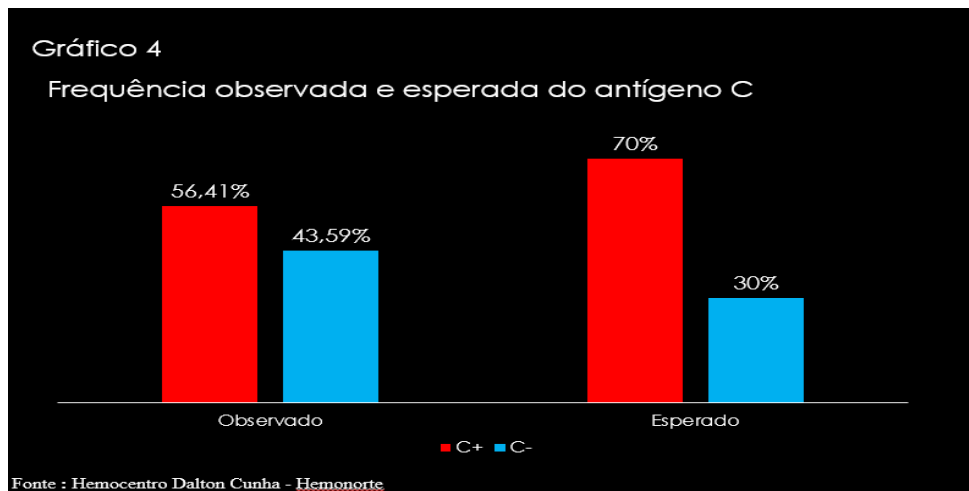
Antígeno	n	%	p < 0,05
K 1	84	6,7	

Fonte: Hemonorte – Hemocentro do Rio Grande do Norte      Total de amostras 1.255

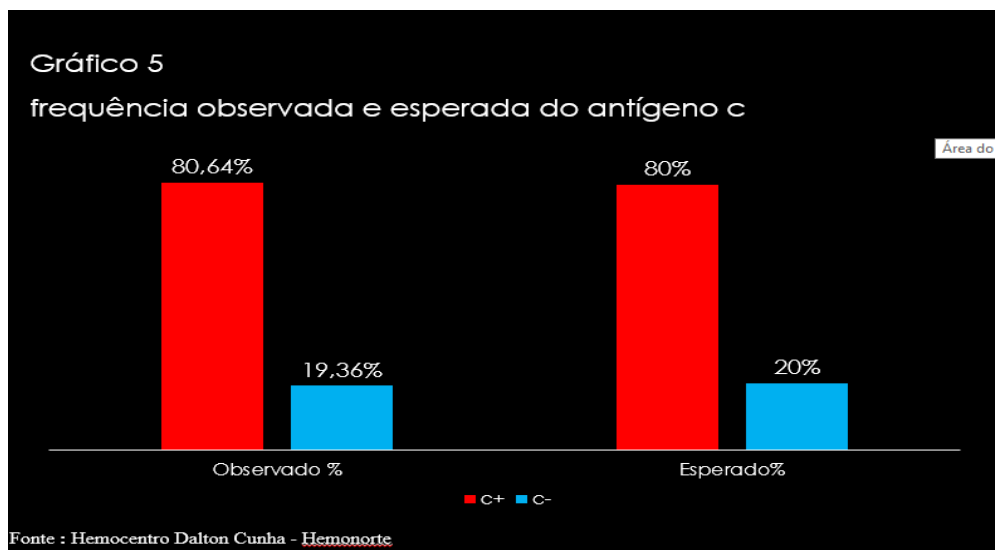
Nas frequências encontradas, para os antígenos de grupo sanguíneo Rh, dentre as amostras Rh positivas, o fenótipo **DCcee** apresentou a maior prevalência (23,3%), seguido pelo fenótipo Dccee, "que é considerado um dos marcadores da etnia negra" <sup>62</sup>, com uma prevalência de 11,0 % (Tabela 10). Em estudo feito por Silva <sup>63</sup>, em doadores de sangue dos Hemocentros regionais de Crato-Ce e Picos-Pi, encontrou uma prevalência deste fenótipo de 15,6 %

Dados da AABB (American Association of Blood Banks), encontrou uma prevalência do fenótipo **Dccee** de 22,9% entre os afrodescendentes norte americanos e de 3,0% entre caucasianos. Nas amostras Rh negativas analisadas neste estudo, o fenótipo **ddccee** apresentou a maior prevalência

(18,17%). (Tabela 11). Os resultados esperados e obtidos dos antígenos do Sistema Rh e antígeno Kell, estão expressos nos gráficos 4, 5, 6,7,8 e 9.



**Gráfico 4. Frequência observada e esperada do antígeno Rh(C)**



**Gráfico 5. Frequência observada e esperada do antígeno Rh(c)**

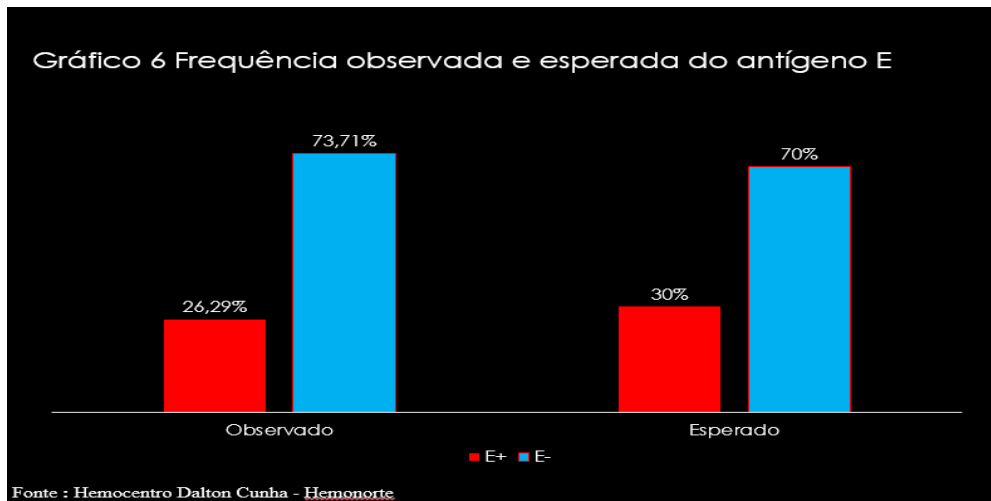


Gráfico 6. Frequência observada e esperada do antígeno Rh(E)

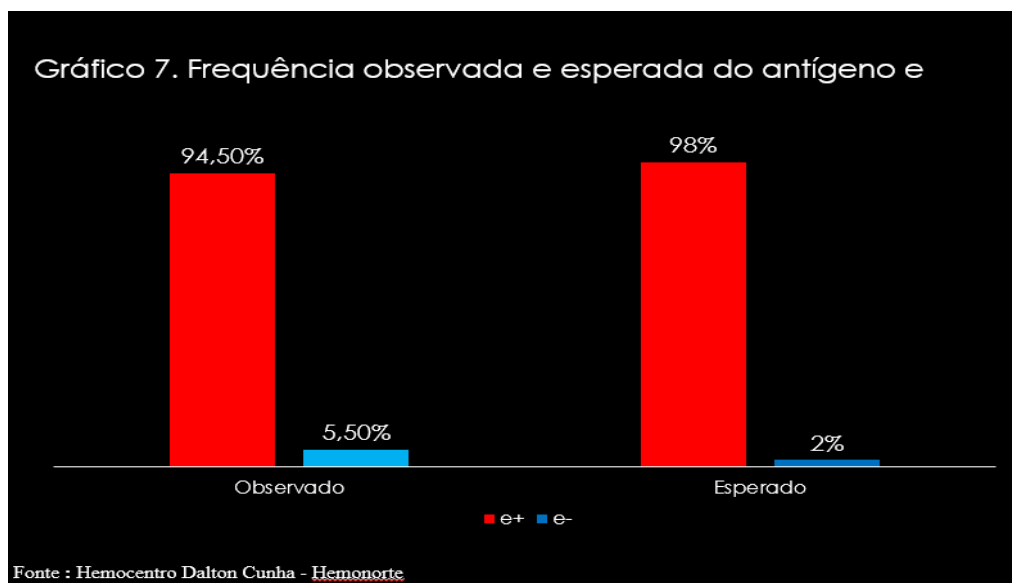


Gráfico 7. Frequência observada e esperada do antígeno Rh(e)

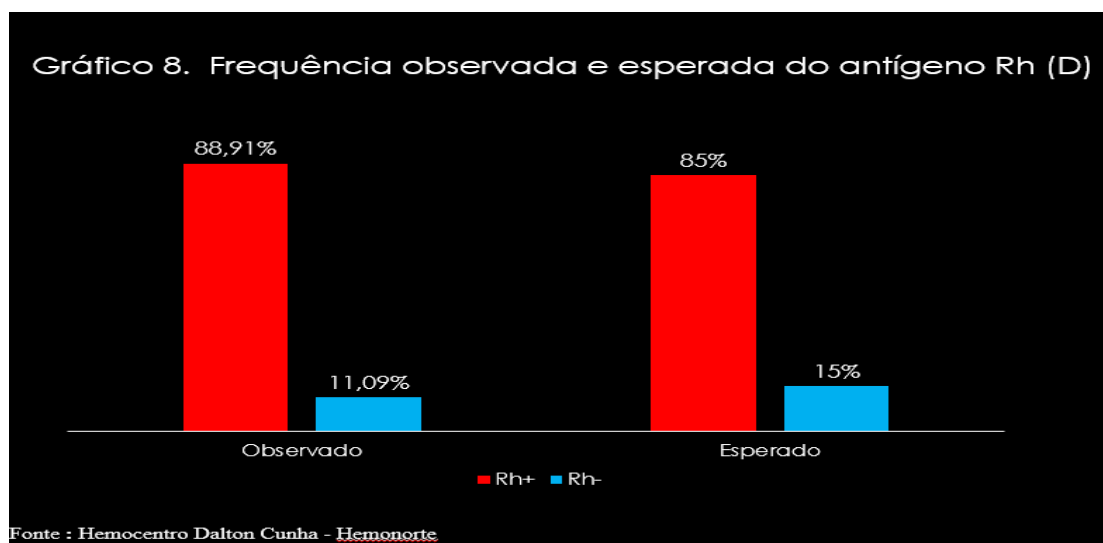


Gráfico 8. Frequência observada e esperada do antígeno Rh(D)

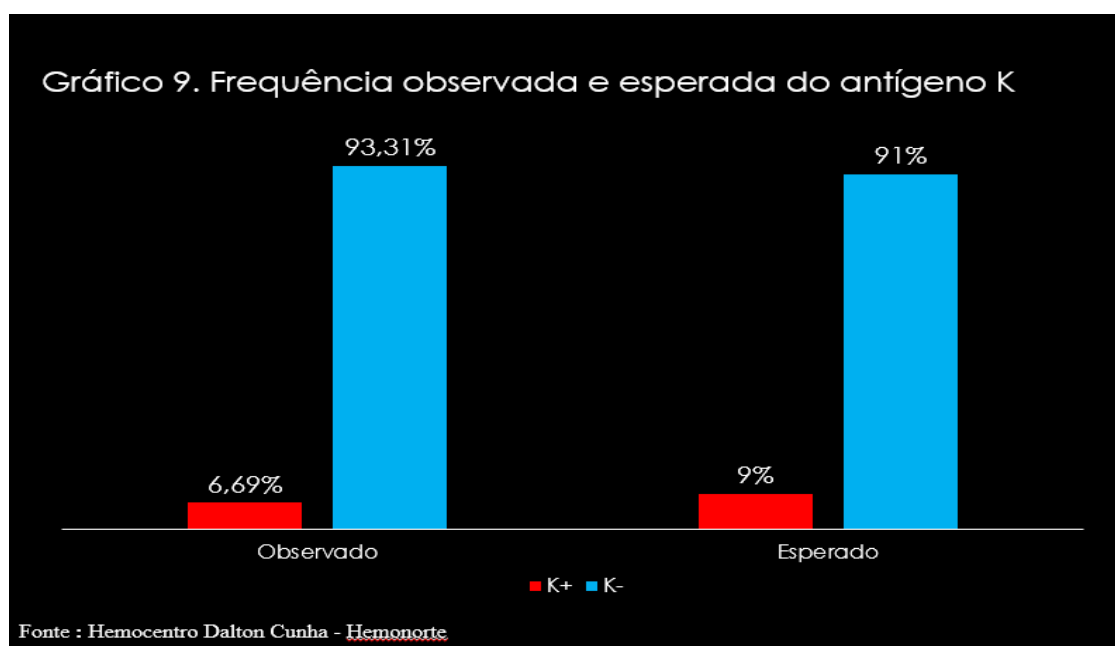


Gráfico 9. Frequência observada e esperada do antígeno K1

**Tabela 10. Frequência fenotípica do sistema Rh em doadores de sangue Rh Positivos em Natal-RN**

<b>Fenótipo</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p valor</b>
DCcee	293	23,35	p < 0,05
Dccee	138	11,00	p < 0,05
DccEe	111	8,84	p > 0,05
DCcEe	128	10,28	p > 0,05
DCCee	210	16,73	p <0,05
DccEE	40	3,19	p<0,05
DCCEe	12	0,96	p<0,05
DCcEE	8	0,64	p<0,05
Total	940	74,90	p<0,05

Fonte: Hemonorte - Hemocentro do Rio Grande do Norte.

**Tabela11. Frequência do Fenótipo Rh Negativos em doadores de Sangue em Natal-RN**

<b>Fenótipo</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p&lt;0,05</b>
ddccee	228	18,17	p<0,05
ddCcee	35	2,79	p<0,05
ddccEe	18	1,43	p<0,05
ddCcEe	1	0,08	p<0,05
Outros	33	2,63	p<0,05
Total	315	25,10	p<0,05

Fonte: Hemonorte - Hemocentro do Rio Grande do Norte

## 9. DISCUSSÃO

Os resultados nos mostram a importância da imunofenotipagem dos doadores e receptores de sangue com a finalidade de minimizar o risco da aloimunização. Em pacientes submetidos rotineiramente a transfusão de concentrado de hemácias como os portadores de aplasia medular, anemia falciforme, leucemias, pacientes renais crônicos, este procedimento se torna muito mais relevante, devido à exposição rotineira a derivados de sangue que contêm antígenos diferentes dos seus. Pode-se afirmar que, teoricamente toda transfusão oferece o risco da aloimunização, exceto nas autotransfusões ou quando se seleciona gêmeos idênticos e num futuro incerto através da clonagem humana. A organização de programas de fenotipagem a nível nacional e a disponibilização destes dados poderão trazer avanços significativos, tanto para a rápida seleção de uma unidade hemoterápica, como para seleção de concentrado de hemácias a serem congeladas no país.

Merece especial atenção indivíduos portadores de variantes do antígeno Rh D, seja os portadores do D parcial ou portadores do D fraco. Estas pessoas se comportam de maneiras diferentes quando são doadores ou receptores de sangue. Estes indivíduos quando são doadores de sangue eles são considerados Rh positivo. O motivo desta condição se ampara no princípio que mesmo não possuindo o antígeno D na sua forma plena, apresenta frações ou concentrações que poderão imunizar pessoas Rh D negativas, como os indivíduos que são Rh negativos por deleção total do antígeno Rh D.

No momento em que necessitam uma hemotransfusão, devem ser considerados Rh negativos, mesmo apresentando frações ou pequena quantidade do antígeno Rh D poderão se imunizar contra a fração que não possuem, como constatou Stratton et al, em suas observações.

Outro ponto a destacar é a relação custo/benefício de uma transfusão, pois tal procedimento envolve riscos, mesmo se tomando todas as medidas e condutas existentes hoje. Além da aloimunização, as reações alérgicas e a transmissão de doenças infectocontagiosas, fazem parte dos efeitos colaterais que podem advir de uma hemotransfusão. Apesar de todos os protocolos

usados na hemoterapia, desde o descobrimento dos grupos sanguíneos até os dias de hoje, precisa ser bastante criteriosa a prescrição de uma transfusão sanguínea.

Mesmo com todo o avanço brasileiro na área da medicina transfusional, nosso país ainda não possui um programa de sangue raro a nível nacional, abrangendo todas as unidades da federação.

A possibilidade de acesso rápido a um cadastro nacional com informações referentes aos doadores de sangue com fenótipo raro poderá proporcionar vários benefícios, como uma maior rapidez na localização de concentrados de hemácias compatíveis para pacientes. Aliado a isto no nosso país ainda não existe a conscientização da população em doar sangue rotineiramente diminuindo as chances, deste modo, de ser descoberto mais doadores de sangue raro. No País, 3,5 milhões de pessoas realizam transfusões sanguíneas por ano e 1,6 a 1,8% das pessoas doam sangue. Se tivéssemos um plantel de doadores mais satisfatório poderíamos contar com uma maior probabilidade de descobrirmos mais pessoas portadoras de sangue raros e estes registros poderiam compor o cadastro nacional de doadores de sangue com fenótipos raros, aumentando as chances de se localizar fenótipos compatíveis para os pacientes aloimunizados nas várias regiões do país.

## 10. CONCLUSÕES

Com a expectativa de vida dos brasileiros aumentando, aumenta também o aparecimento de doenças ou condições que necessitem de transfusão de sangue e hemoderivados, e este estudo mostra a importância da imunofenotipagem dos doadores e receptores de sangue para uma transfusão mais segura. O transplante de medula óssea fez surgir outro tipo de paciente que não existia há algumas décadas e pelas suas condições clínicas torna-se necessário uma seleção do hemocomponentes o mais compatível possível, fazendo com que a imunofenotipagem seja, na rotina transfusional, de vital importância para o receptor de medula óssea. Estes pacientes chegam a receber de uma a dez unidades de concentrado de hemácias.

Independente da condição clínica do paciente se faz necessário a imunofenotipagem para se evitar o máximo possível a aloimunização. Antes de se fazer esta técnica, tínhamos um olhar curativo após o paciente ser submetido à uma hemotransfusão. Isto significa dizer, que na unidade de sangue a ser transfundida, realizava-se o teste de compatibilidade, se compatível, a transfusão era realizada. Caso este mesmo paciente necessitasse de uma segunda transfusão e, esta fosse incompatível com o seu sangue, o soro deste paciente era submetido a um painel de hemácias, para se detectar que anticorpo ele produziu. Este procedimento identificava a que antígeno ele se imunizou, mas a sensibilização já tinha ocorrido, então selecionava uma unidade hemoterápica que fosse negativa para o antígeno identificado.

Com a imunofenotipagem, se realiza um processo preventivo, pois através dela se seleciona, uma unidade de sangue para evitar a aloimunização contra a maioria dos antígenos envolvidos em reações transfusionais.



## 11. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo um olhar retrospectivo desde a descoberta dos grupos sanguíneos, até os dias de hoje, vemos que houve um avanço científico exponencial no que se refere as tecnologias utilizadas na coleta, preservação e indicação de sangue. No início tínhamos apenas o sangue total para uso terapêutico que tinha como efeito colateral importante a sobrecarga circulatória, pois em diversas situações o paciente necessitava única e exclusivamente do concentrado de hemácias. O surgimento da centrifuga refrigerada foi outro avanço importante pois antes dela a separação das hemácias e plasma podia chegar a 72 horas. Com o advento da centrífugas refrigeradas este tempo caiu para 15 minutos, uma diferença substancial. Na sorologia passamos do uso da técnica do VDRL e da reação de Machado Guerreiro para uma gama maior de teste com o intuito de minimizar o risco de transmissão de doenças infecto contagiosas. Outro avanço importante foi a técnica de congelamento de sangue raro por dez anos, possibilitando pessoas que têm sangues de baixa frequência poderem optar por esta tecnologia e usá-lo quando necessário. Outro passo importante é o uso da biologia molecular para resolver discrepâncias em amostras de sangue com resultados inconclusivos. Depois destes avanços veio o uso rotineiro da imunofenotipagem na seleção de sangue o mais compatível também. Como em alguns procedimentos e técnicas, o custo financeiro mais acessível da técnica de biologia molecular, pacientes portadores de sangue de baixa prevalência poderão se beneficiar desta ferramenta nas suas transfusões e em um futuro próximo esta ser utilizada de modo rotineiro, como o realizado com o imunofenotipagem, trazendo ainda mais segurança nas hemotransfusões.

## 12. REFERÊNCIAS

1. Ribeiro D. O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil. 2. ed. São Paulo: Companhia das Letras; 1995.
2. Salzano FM. Genetic polymorphisms in Brazilian populations. In: Salzano F.M, editor. The ongoing evolution of Latin American Populations. Springfield: Charles C. Thomas; 1971. p. 631-655.
3. Salaru NN, Otto P. Blood groups in a large sample from the city of São Paulo (Brazil): allele and haplotype frequencies for MNSs, Kell-Cellano, Rh and ABO systems. Rev. Bras. Genet. 1989;12:625-643.
4. Pena SDJ, Pietro GD, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FSG et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. PLoS ONE [Internet]. 2011 [cited 2018 jan 23];6(2):1-9. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017063>.
5. Mourant AE. Establishment of an International Panel of Blood Donors of Rare Types. Vox Sanguinis [Internet]. 1965 [cited 2018 jan 23];10:129–132. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1423-0410.1965.tb04330.x/full>.
6. Conceição MM, Salzano FM, Franco MHP. Demography genetics and race admixture in Aracaju, Brazil. Rev. Bras. Genet. 1987; 10: 313-331.
7. Montenegro L. Blood group in tucanoindians. Hum Biol. 1967;9:89-92.
8. Long JC, Smouse PE. Tribal gene flow between the Yeçuana and Referencias Refe Yanomana: Genetic Analysis of an admixed village. Am J Phys Anthropol. 1983;61:411-422.
9. Rosa VL, Salzano FM, Franco MHL. Blood genetic studies in five Amazonian populations. Rev. Bras. Genet. 1984;7:569-582.
10. Fiorelli AI, Oliveira JJJ, Stolf NAG. Transplante cardíaco. Rev. Med. [Internet]. 2009 [citado 2018 jan. 23]; 88(3):123-137. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/42199/45872>.
11. Pestana. Transplante renal. JOM [internet]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão (UNA-SUS); 2014. [citado 2018 jan. 23] Disponível em: [file:///C:/Users/manuelatiburcio.huol/Downloads/livro\\_unidade\\_4\\_mod6.pdf](file:///C:/Users/manuelatiburcio.huol/Downloads/livro_unidade_4_mod6.pdf).

12. Schörner, EJ. Guia Nacional para Implantação de Banco de Sangue com Fenótipos Raros: uma proposta para a Hemorrede Pública Brasileira. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2015.
13. Castro O, Sandler SG, Houston-Yu P, Rana S. Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. *Transfusion*. 2002;42:684-690.
14. Osby M, Shulman IA. Phenotype matching of donor red blood cell units for nonalloimmunized sickle cell disease patients: a survey of 1182 North American laboratories. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2005;129(2):190-193.
15. Schonewille H, van de Watering LM, Loomans DS, Brand A. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. *Transfusion*. 2006;46(2):250-256.
16. Nunes HF. Responsabilidade civil e a transfusão de sangue [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Programa de Ciências Médicas; 2010.
17. Vale NB, Delfino J. As nove premissas anestesiológicas da Bíblia. *Rev. Bras. de Anest.* 2003;53(1):130.
18. Santos LAC, Moraes C, Coelho VSP. A politização do sangue no primeiro mundo. *Physis*. [internet] 1993 [citado 2018 nov 10]; 3(2): 165-192. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/physis/a/DRH3pGK7pmQSpC8NrR7Yxdz/?lang=pt>.
19. Brasil. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília: Senado Federal; 1988.
20. Watkins WM. The ABO blood group system: Historical background. *Transf. Med.* 2001;11:243-265.
21. História da transfusão. Puro Sangue: Grupo de Doadores de Sangue Benévolos do Concelho de Alpiarca [Internet]. 2019 [citado 2019 fev 13]. Disponível em: <https://purosangue.wordpress.com/historia-da-transfusao-de-sangue/>.
22. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. (NY)*. 1940;43:223.
23. Levine P. et al. A new human hereditary blood property (Cellano) present in 99,8 percent of all bloods. *Science*. 1949;109:464.

24. Denomme G. Kell e Kx blood group systems: a review. *Imunohematology*. 2015;31(1):14-19.
25. Castilho L, Pellegrino Júnior J, Reid ME. Fundamentos de imunohematologia. São Paulo: Atheneu; 2015.
26. Olsson ML, Chester MA. Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Trans. Med*. 2001;11(4):295-313.
27. Schenbel-Brunner H. Human Blood Groups: Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity. 2nd ed. New York: Springer Wien; 2000.
28. Dean L. The ABO blood group. In: Dean L editor. Blood groups and red cell antigens. Bethesda: NCBI; 2005.
29. Mattos LC et al. Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2001;23(1):15-22.
30. Schenbel-Brunner H. Human Blood Groups: Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity. 2nd ed. New York: Springer Wien; 2000.
31. Yoshida A, Yamaguchi YD, Dave V. Immunologic homology of human blood group glycosyltransferases and genetic background of blood group (ABO) determination. *Blood*. 1979;59:344-350.
32. Yamamoto F, Hakomori S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferase is based on amino acid substitutions. *J. Biol. Chem*. 1990;265:19257-19262.
33. Bird GWG. Relationship of the blood subgroups A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>1</sub>B, A<sub>2</sub>B to hemagglutinins present in the seeds of *Dolichos biflorus*. *Nat. Lond*. 1952;170:674.
34. Schachter H, Michaels MA, Tilley CA, Crookston M C, Crookston JH. Qualitative differences in the alpha-N-acetylgalactosaminyltransferases produced by human A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1973;70(1):220-224.
35. Taylor GL, Race RR, Prior AM, Ikin EW. Frequency of the iso-agglutinin A<sub>1</sub> in the sérum of the subgroup A<sub>2</sub> and A<sub>2</sub>B. *J. Path. Bact*. 1942;54:514-516.
36. Lenkiewicz B, Sakul B. Anti-A<sub>1</sub> antibodies in blood donors in the Warsaw region. *Arch. Immunol. and Ther. Exp*. 1971;19:643-647.

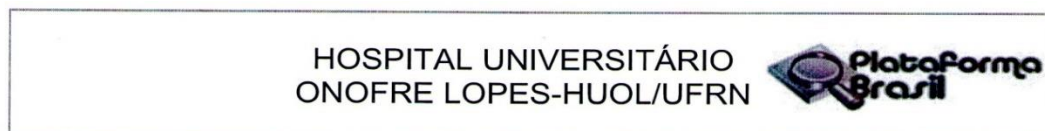
37. Castro, MLRB. Estudo molecular do gene ABO do subgrupo sanguíneo A3 edo grupo O de ameríndios da tribo Parakanã [Tese]. São Paulo: Unicamp-Campinas; 1999.
38. Yoshida A, Dave V, Howard B, Hamilton T. Imbalance of Blood Group A Subtypes and the Existence of Superactive B\* Gene in Japanese in Hiroshima and Nagasaki. *Am. J. Hum. Genet.* 1988;43:422-428.
39. Race, Sanger. *Blood Groups in man.* 6th ed. London: Blackwell Scientific Publications; 1975. p. 14.
40. Yamamoto F, McNeil PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T, Judd WJ et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood system: 1. Weak subgroups: A3 and B3 alleles. *Vox Sang.* 1993;64:116-117.
41. Dunsford I. A critical review of the ABO sub-groups. In *Proc. 7th Congr. Int. Soc. Blood Transf.* Rome. 1959. p. 685-691.
42. Novaretti. MCZ. Estudo das alterações moleculares do gene ABO em doadores de sangue fenotipados como A<sub>3</sub> e A<sub>3</sub>B. *Rev. Bras. Hemat. e Hemot.* 2008;30(1):83-84.
43. Race RR, Sanger R. *Blood Groups in man.* 6th ed. London: Blackwell Scientific Publications; 1976. p. 15.
44. Buchanan JA, Higley ET. The relationship of blood groups to disease. *Brit. J. Exp. Path.* 1921;2:247-255.
45. Mattos LC, Cintra J R, Sanches FE, Silva RCA, Ruiz MA, Moreira HW. ABO, Lewis, secretor and non-secretor phenotypes in patients infected or uninfected by the *Helicobacter pylori* bacillus. *Med. J/Ver. Paul. Med.* 2002;120(2):55-58.
46. Aguiar DCF. Expressão dos antígenos ABH e Lewis na gastrite crônica e alterações pré-neoplásica da mucosa gástrica. *Arq. Gastroenterol.* 2002;39(4):222-232.
47. Beiguelman B. Grupos sanguíneos e lepra. *Rev. Bras. Leprol.* 1963;31:34-44.
48. Teixeira VPA, Martins E, Almeida HO, Soares S, Souza HM, Morais CA. Sistema ABO e formas anatomoclínicas da doença de Chagas crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1987;20:163-168.
49. Nardozza LMM, Szulman A, Barreto JA, Araujo Junior E, Moron AF. Bases moleculares do sistema Rh e suas aplicações em obstetrícia e medicina transfusional. *Ver. Assoc. Med. Bras.* 2010;56(6):724-728.

50. Stratton F. A new Rh allelomorph. *Nature*.1946;158:25.
51. Flegel WA, Wagner FF. Molecular Biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin. Lab.*2002;48:53-59.
52. Barros C, Otta M, Wakim VL, Zaqueroni M, Baleotti Júnior W, Castilho L. Evaluation of anti-D reagents in the detection of weak D and partial D antigens. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2006;28(4):269-274.
53. Harmening DM. Técnicas modernas de banco de sangue e transfusão 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 136.
54. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria no.1.376, 19 de novembro de 1993. Normas técnicas para Coleta, Processamento e Transfusão de Sangue, Componentes e Hemoderivados. Diário Oficial [República Federativa do Brasil] 1993 dez;131(229):18405-18415.
55. DIAMED [Internet]. 2019 [citado 2019 fev 13]. Disponível em: <http://www.diamed.com.br/Cmi/Pagina.aspx?379>.
56. Walker RH. Technical Manual. 11th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks; 1993.
57. Oliveira AG. Bioestatística descodificada: bioestatística, epidemiologia e investigação. 2. ed. Lisboa: Lidel; 2014.
58. Duran JÁ, Chanbert T, Rodrigues F, Pestana D. Distribuição dos grupos sanguíneos na população portuguesa. *Rev. ABO* [Internet]. 2007 [citado 2018 jan 23];29:5-17. Disponível em: [http://ipst.pt/files/IPST/INFORMACAO\\_DOCUMENTACAO/ABO\\_29\\_2007\\_p\\_ag\\_5a17.pdf](http://ipst.pt/files/IPST/INFORMACAO_DOCUMENTACAO/ABO_29_2007_p_ag_5a17.pdf).
59. Costa, DC. Investigação do Polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no estado de Santa Catarina [Tese]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Farmácia; 2016.
60. Boturão Neto, E. Estudo Imunohematológico molecular do Sistema de Grupo Sanguíneo Kell em indivíduos brasileiros [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Programa de Pós-graduação em Hematologia; 2008.
61. Pinto PCA, Braga JAP, Santos AMN. Fatores de risco para aloimunização em pacientes com anemia falciforme. *Rev. Assoc. Med. Bras.* [Internet]. 2011 [citado 2018 jan. 23]; 57(6):668-673. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302011000600014&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302011000600014&lng=en). <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302011000600014>.

62. Novaretti MCZ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone, DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasoides e negroides na cidade de São Paulo. Rev. Bras.hematol.hemoter. 2000;22(1):23-32.
63. Silva JM. Fenotipagem eritrocitária em doadores de sangue no HEMOPI (Teresina – Picos) – PI e no HEMOCE (Crato) – CE [Dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina; 2016.

## 13. ANEXOS

### ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética.



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** MAPEAMENTO DO SISTEMA ABO & RH (D) DOS DOADORES DE SANGUE DAS MESORREGIÕES DO RIO GRANDE DO NORTE:  
Um estudo retrospectivo

**Pesquisador:** Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 43687315.0.0000.5292

**Instituição Proponente:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.051.865

**Data da Relatoria:** 24/04/2015

#### **Apresentação do Projeto:**

O projeto está de acordo com o padrão vigente

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Frequências dos grupos sanguíneos dos doadores de sangue dos doadores das mesorregiões do Rio Grande do Norte.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: mínimos, já que trata-se de um trabalho retrospectivo, contudo o pesquisador referenda que poderá haver exposição dos dados, sendo necessário manter sigilo.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trabalho tem relevância e segue os padrões esperados. O cronograma está coerente com a data de início

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

todos foram contemplados

#### **Recomendações:**

Aprovado pelo colegiado sem recomendações

<b>Endereço:</b> Avenida Nilo Peçanha, 620 - 3º subsolo			
<b>Bairro:</b> Petrópolis	<b>Município:</b> NATAL	<b>CEP:</b> 59.012-300	
<b>UF:</b> RN			
<b>Telefone:</b> (84)3342-5003	<b>Fax:</b> (84)3202-3941	<b>E-mail:</b> cep_huol@yahoo.com.br	



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
ONOFRE LOPES-HUOL/UFRN



Continuação do Parecer: 1.051.865

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

O projeto e os demais documentos apreciados estão bem instruídos, portanto sou de parecer favorável

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

NATAL, 06 de Maio de 2015

---

**Assinado por:**  
**HELIO ROBERTO HEKIS**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida Nilo Peçanha, 620 - 3º subsolo

**Bairro:** Petrópolis

**CEP:** 59.012-300

**UF:** RN

**Município:** NATAL

**Telefone:** (84)3342-5003

**Fax:** (84)3202-3941

**E-mail:** cep\_huol@yahoo.com.br

**ANEXO 2. PAINEL DE HEMÁCIAS**

	Rh-ir	Doador Donor	Donante	Rh-ir					Kell					Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS			Luth.		D <sup>i</sup>	Antígenos especiais Special types Tipos especiais				
				D	C	E	c	e	C <sup>+</sup>	k	Kp <sup>+</sup>	Kp <sup>-</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	M	N	S	s			Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>		
1	C <sup>+</sup> CD.ee	R <sup>+</sup> R <sub>1</sub>	147212	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0		1
2	CCD.ee	R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	170270	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0		2
3	ccD.EE	R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	059-1906	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	nt	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0		3	
4	Ccddee	r <sub>1</sub> r <sub>1</sub>	7429	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0		4	
5	ccddEe	r <sub>2</sub> r <sub>2</sub>	098-2905	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0		5	
6	ccddee	rr	053-1906	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0		6	
7	ccddee	rr	285877	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0		7	
8	ccD.ee	Ror	74300	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0		8	
9	ccddee	rr	006-1206	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0		9
10	CCD.Ee	R <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	073-0406	+	+	+	0	+	0	+	0	+	nt	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0		10	
11	CcD.ee	R <sub>1</sub> r	034-0406	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+		11

## ANEXO 3: ARTIGOS E PUBLICAÇÕES

Artigo1 Este artigo foi publicado no periódico Blood, que tem como fator de impacto 25,48 , correspondente ao Qualis CAPES A1



MENU

401.BASIC SCIENCE AND CLINICAL PRACTICE IN BLOOD TRANSFUSION | NOVEMBER  
13, 2019

### Genotypic and Alelicas Frequencies of the ABO and Rh Systems in the State of Rio Grande Do Norte, Northeast of Brazil

Linduarte Varela Morais, Aldair Sousa Paiva, PhDMD, Valéria SF Sales, PhD,  
Geraldo Barroso Cavalcanti, Jr., PhD



Blood (2019) 134 (Supplement\_1): 4990.

<https://doi.org/10.1182/blood-2019-123802>

Split-Screen Share Tools

**Objective:** To determine the immunophenotyping of a population of blood donors, intended to build a database for transfusion medicine. 2) To make available to patients with chronic diseases that are systematically dependent on blood transfusions as compatible as possible in ABH, Rh (DCcEe) and Kell 1 antigen systems. **Method:** A cross-sectional study was carried out on 11,664 blood donors for the ABH system typing and of these, 1255 blood donors were selected randomly for the determination of blood group antigens of the Rh system and Kell antigen. Blood centrifugation methods, centrifuge hemolysis tube test and indirect Coombs test were used for blood typing. The results obtained were compared by the Chi-square test. A level of statistical significance of  $p \leq 0.05$  was considered. **Results:** Antigenic frequencies for the ABH system found:

[https://ashpublications.org/blood/article/134/Supplement\\_1/4990/424761/Genotypic-a...](https://ashpublications.org/blood/article/134/Supplement_1/4990/424761/Genotypic-a...) 11/02/2020

Genotypic and Alelicas Frequencies of the ABO and Rh Systems in the State of Rio... Página 2 de 4

the frequency found for the blood group O 48.8%, the frequency found for the blood group A 35.4%; the frequency found for the blood group B 10.6% and the frequency found for the blood group AB 3.2%. In the Rh-Hr system the most frequent antigens found: e 94.5%, D 88.9%; c 80.6%; C 56.4%; E 26.3%. For the Kell antigen, the frequency found was 6.7%. The most frequent phenotypes found were DCcee 23.3%; ddccee 18.1%, DCCee 16.7%; Dccee 11.0%; DCcEe 10.2% and DccEe 8.8%. The lowest frequency was found: DCcEE 0.64% and ddCcEe 0.08% **Conclusion:** The antigenic and phenotypic frequencies found show the great importance and necessity of the immunophenotyping of these antigens of blood groups in order to transfuse them, making them as compatible as possible, thus reducing the risk of alloimmunization. Due to the great miscegenation of our population, we find different frequencies in each region, making initiatives in this regard more relevant.

#### Disclosures

No relevant conflicts of interest to declare.

**Topics:** alloimmunization, antigens, blood donors, blood group antigens, blood groups, blood transfusion, blood type, blood type a, blood type ab, blood type b

## Artigo 2: Este artigo foi publicado no periódico International Journal of Development Research, que tem o fator de impacto 7.012, correspondente ao Qualis CAPES A2



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

# IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 10, Issue, 10, pp. 41228-41231, October, 2020

<https://doi.org/10.37118/ijdr.20026.10.2020>

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

### IMMUNOPHENOTYPING IN A POPULATION OF BLOOD DONORS APPLIED TO TRANSFUSION MEDICINE

Linduarte Varela de Moraes<sup>1\*</sup>, Maria Zélia Fernandes<sup>2</sup>, Geraldo Barroso Cavalcante Jr.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Adjunct Professor of the discipline Diseases of Lymphohematopoietic System of UFRN Medicine course, MD

<sup>2</sup>Associate Professor of the discipline Diseases of Lymphohematopoietic System of UFRN Medicine course, PhD

<sup>3</sup>Associate Professor of UFRN Postgraduation Program in Health Sciences, PhD

#### ARTICLE INFO

##### Article History:

Received 27<sup>th</sup> July, 2020

Received in revised form

29<sup>th</sup> August, 2020Accepted 06<sup>th</sup> September, 2020Published online 30<sup>th</sup> October, 2020

##### Key Words:

Blood donors, Immunophenotyping, Blood Group Antigens

##### \*Corresponding author:

Linduarte Varela de Moraes

#### ABSTRACT

**Objective:** To determine the immunophenotyping of a population of blood donors, intended to build a database for transfusion medicine. Show the importance of erythrocyte immunophenotyping as prevention of alloimmunization. **Method:** A cross-sectional study was carried out on 11,664 blood donors for the ABH system typing and of these, 1255 blood donors were selected randomly for the determination of blood group antigens of the Rh system and Kell antigen. Blood centrifugation methods, centrifuge hemolysis tube test and indirect Coombs test were used for blood typing. The results obtained were compared by the Chi-square test. A level of statistical significance of  $p \leq 0.05$  was considered. **Results:** Antigenic frequencies for the ABH system found: the frequency found for the blood group O 48.8%, the frequency found for the blood group A 35.4%, the frequency found for the blood group B 10.6% and the frequency found for the blood group AB 3.2%. In the Rh-IRsystem the most frequent antigens found: e 94.5%, D 88.9%, c 80.6, C 56.4%, E 26.3%. For the Kell antigen, the frequency found was 6.7%. The most frequent phenotypes found were DCcEe 23.3%, ddccEe 18.1%, DCCe 16.7%, DccEe 11.0%, DCcEe 10.2% and DccEe 8.8%. The lowest frequency was found: DCcEE 0.64% and dJcEe 0.08%. **Conclusion:** The antigenic and phenotypic frequencies found, shows the importance of immunophenotyping these blood group antigens in order to transfuse them, making them as compatible as possible, decreasing the risk of alloimmunization.

Copyright © 2020, Linduarte Varela de Moraes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Linduarte Varela de Moraes, Maria Zélia Fernandes, Geraldo Barroso Cavalcante Jr. 2020. "Immunophenotyping in a population of blood donors applied to transfusion medicine". *International Journal of Development Research*, 10, (10), 41228-41231.

#### INTRODUCTION

In this paper, the Brazilian people, the anthropologist Darcy Ribeiro presents another specific feature in the formation of our population: the existence of five great cultures that, although different from each other, would be complementary. Here they are: the creole Brazil (which extended from the coast of the cities of São Luis to Rio de Janeiro and was very influenced by Africa), the caboclo Brazil (Northeast, its hinterland, caatinga), the countryside Brazil (midwest, southeast, influence of the city of São Paulo in the country formation) and the southern Brazil (mamluks living in a very rich and fertile area, the pampas of the state of Rio Grande do Sul, with a strong European interference)<sup>1</sup>. Three ethnic types generated the Northeast population: white, black and indigenous. According to the autosomal study of 2011, conducted by the Brazilian geneticist Sérgio Pena, the European component is prevalent in the Northeast population, with African and indigenous contributions.

According to the study performed, the Northeast composition can be described as follows: 60.10% of European inheritance, 29.30% of African inheritance and 8.90% indigenous inheritance.<sup>2</sup> Due to such a big miscegenation represented by the several matrices of skin, hair and eyes colors, which also reflect in the phenotypic constitution of the frequency of different systems of blood groups of the Brazilian population, causes each region of our country to have a different erythrocyte antigenic heritage, according to the ethnicities that have colonized it. For this reason, special attention should be paid to the Immunophenotyping of the population of each region or state of Brazil. And that has generated interest of researching, in the great Natal, the frequencies of the most interesting blood groups in transfusion medicine. This research will enable the finding of phenotypes of low frequency, making them accessible in special situations such as of politransfused patients having erythrocyte antibodies, whether post-transfusion or post-pregnancy. The need of capturing rare blood donors to meet the transfusion demands of patients with antibodies against blood group antigens of high frequency

caused that in 1959 the American Association of Blood Banks (AABB) created a database of rare donors, followed by France in 1965<sup>3</sup>. This need of compatibility extends to the transplantation area, notably the heart and kidney transplantation. Such histocompatibility between the donor and the receptor is at first assessed by the mandatory compatibility between the ABO blood group antigens.<sup>4,5</sup> The transfusion therapy, in addition to comply with the technical standards of the regulatory agencies (ANVISA), is subject to the clarifications on the risks and consent of the patient. "At this moment, there is a problem in relation to the consent for performing the blood transfusion. Some religious confessions, such as the Jehovah's Witnesses, prohibit the transfusion practice. Such religious confessions have legal basis to their refuse to transfusion therapy on art 5, III, of the Federal Constitution (CF), which provides for the religious freedom of the Brazilian citizen"<sup>6</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

In the period from January to December 2014, blood was collected from 11,664 donors considered able to donation in Hemonorte - Dalton Cunha Blood Center of Rio Grande do Norte State, complying with the Technical Standards of the Ministry of Health for Blood Collection, Processing and Transfusion, Components and Derivatives in Hemotherapy<sup>7</sup>. The collection was performed in a CPD plastic bag. Additionally, two bottles with approximately 10 ml, without anticoagulant, were collected for conducting the Immunohematological tests. The research was performed in the Hemonorte's Immunohematology Laboratory. To determine the blood groups the samples were tested for the Immunotyping of the main erythrocyte antigens of the Rh (D,C,c,E,e) and Kell (K1) systems through the agglutination methodology in gel test column (Diamed Ag, Morat, Switzerland)<sup>8</sup> using cards with polyclonal antibodies A 5% red blood cell suspension in bromelain was prepared and incubated for 10 minutes at room temperature. 10 µl of the suspension was pipetted in the microtubes. Next, the cards were centrifugated at 1030 rpm for 10 minutes. The reaction reading was performed due to the agglutination standards in gel test. The tube technique,<sup>9</sup> was also used employing anti-A, anti-B, Anti-AB and anti-Rh antisera for direct classification in the red blood cells with Biotest/SA reagents and e A1 and B red blood cells (RevercelBiotest) For the antigens of Kell, D, C, c, E, e blood group, having performed the direct classification only, once they do not have natural antibodies to determine the reverse classification, which is a characteristic showed by the ABH blood group system only, making it unique in this aspect. The statistical analysis of the results obtained was conducted by the Chi-square test.<sup>10</sup> The research was submitted and approved by the Research Ethics Committee - REC - of the Onofre Lopes University Hospital - HUOL - of UFRN (Federal University of Rio Grande do Norte) CAAE (Certificate of Presentation for Ethics Assessment) under no. 43687315.0.0000.5292 and favorable opinion no. 1,051,865.

## RESULTS

Of the total donors examined, 10,370 (88.91%) were classified as Rh positive and 1,294 (11.09%), were classified as Rh negative. For the ABH system, the results found were the following: The "O" blood group contemplated 5,790 (49.63 %)

of donors; the "A" group 4,230 (36.27 %), followed by the "B" group with 1,258 (10.79 %) and lastly the AB group with 386 donors with a percentage of 3.30 %. (Table 1).

Table 1. Frequency of ABO blood groups and Rh Factor in blood donors

Blood Group	n	%	Rh positive factor		Rh negative factor	
			n	%	n	%
O	5,790	49.64	5,142	44.08	648	5.55
A	4,230	36.27	3,771	32.33	459	3.94
B	1,258	10.79	1,122	9.62	136	1.17
AB	386	3.30	335	2.87	51	0.43

Source: Hemonorte - Blood Center of Rio Grande do Norte State.

The prevalences found for ABH system antigens report what the other papers with this same focus already found. The "O" blood group with greatest prevalence, followed by the A blood group, the B blood group and lastly the AB blood group, differing only in its incidences in the population studied. Relating the results found in this work, with the European ethnicity of greatest influence in the colonization of the state of Rio Grande do Norte, the Portuguese population, there is a predominance of the A blood type in relation to the O group regarding the prevalence, followed by the B blood group and the AB blood group according to the study performed by Duran<sup>11</sup>, in 230,233 blood donors in Portugal, finding the results: 46.6% ; 42.2% ; 7.6% and 3.4% , respectively. Of the samples collected for the research, 1,255 donors were selected to verify the frequency of antigens and phenotypes for the Rh system and Kell antigen. The results found can be seen in tables 2 and 3. The frequency of Kell antigen found refers to its presence in homozygosis and/or heterozygosis (K/K , K/k )

There are very few papers on the frequency of Kell system antigen in the Brazilian population. Such few papers do not show its high importance in transfusion medicine or its immunogenic power.

Table 2. Frequency found in Kell antigens

Antigen	n	%
K	84	6.7
p ≤ 0.05		
Source: Hemonorte		
Total samples 1,255		

Table 2 shows the frequency found in this work, of 6.7%, in blood donors. Costa<sup>12</sup> found in his thesis a frequency of 6% in blood donors; Boturão Neto<sup>13</sup> reports a frequency of 6.3% also in blood donors in his research. In terms of immunogenicity, Kell only loses for the D blood type antigen. When K- patients receive transfusion of a unit of K+ blood, the probability of forming anti-K antibodies may reach 10%<sup>14</sup>. The Kell system includes 34 antigens of which three antithetical antigen sets are the most important ones (K, k, Kp<sup>1</sup>, Kp<sup>2</sup>, Jsa and Jsb ). Antibodies against antigens of the Kell system blood type, in addition to provoke the immune destruction of red blood cells in the HDFN (Hemolytic disease of the fetus and newborn), also caused immunosuppression of erythropoiesis, which can result in anemia that is severe, prolonged and without any apparent signs of hemolysis.<sup>15</sup> In hematological patients, those having aplastic anemia (AA), acute myeloid leukemia (AML), the prevalence of irregular antibodies is between 11 and 16%. The main erythrocyte systems submitted to phenotyping, intended to transfusion in patients having sickle cell anemia are the Rh (D, C, c, E, e antigens) and Kell (K antigen), due to be those having the

greatest frequencies of alloimmunization in patients having this type of anemia<sup>16,17</sup>. The antibodies most involved in late hemolytic transfusion reaction are directed against antigens of the Rh (34%), Kidd (30%), Duffy (14%) and Kell (13%) systems<sup>18</sup>.

**Table 3. Phenotype frequency of the RH system in blood donors of the city of Natal**

Phenotype	n	%	p value
DCcee	293	23.35	p < 0.01
Dceee	138	23.35	p < 0.01
DceEe	111	11.00	p > 0.05
DCeEe	128	8.84	p > 0.05
DCCEe	210	10.28	p < 0.01
DceEE	40	3.19	p > 0.05
DCCeE	12	0.96	p > 0.05
DcEEe	8	0.64	p > 0.05
ddeee	228	18.17	p < 0.01
ddCee	35	2.79	p > 0.05
ddeEe	18	1.43	p > 0.05
ddCcEe	1	0.08	p > 0.05
Others	33	2.63	p > 0.05
Total	1255	100.00	

Source: Hemonorte - Blood Center of Rio Grande do Norte State

In the frequencies found, for the Rh blood group antigens, among the Rh-positive samples, the DCcee phenotype showed greater prevalence (23.3%), followed by the Dceee phenotype, "which is considered one of the black ethnicity phenotype"<sup>19</sup>, with a prevalence of 11.0%. Between the blacks, the ddeee phenotype the percentage is 39.0%<sup>20</sup>. In a study made by Silva<sup>21</sup>, in blood donors of the regional Blood Centers of Crato, state of Ceará, and Picos, state of Piauí, a prevalence of this phenotype of 15.6% was found. Data of the AABB (American Association of Blood Banks), found a prevalence of the Dceee phenotype of 22.9% between the North American afro-descendants and 3.0% between Caucasians. In the Rh-negative samples analyzed in this study, the ddeee phenotype showed the greatest prevalence (18.17%).

## DISCUSSION

In this paper, the phenotypic frequency for the blood group systems ABO and Rh, among blood donors, is in accordance with the values already found in other papers published in Brazil. In spite of the Portuguese colonists have a greater prevalence of the blood group "A", according to the papers published by Duran et al, a greater prevalence of the blood group "O" was found. A hypothesis for such result may be due to the crossover of Europeans with Brazilian Indians, who are predominantly of the blood group "O", as well as the Amerindians. Among the phenotypes found in the Rh system, the frequency of the phenotype Dceee called attention. According to Novaretti, this phenotype is considered one of the markers of individuals with black ethnicity, although mulattos predominantly form the Brazilian population.

The results found in this paper are highly relevant to employ planning policies for capitation of donors and thus have an appropriate supply of the transfusion therapy demands in Greater Natal. Knowing the phenotypic frequencies of the main blood group systems in blood donors may help to calculate the probability of capitation of negative units for a given phenotype, which is intended to blood receptors having antibodies resulted from alloimmunization and phenotypes of low frequency among blood donors.

## Conclusions

The results obtained in this assay allowed to know the prevalence of extremely important blood group antigens, as well as verifying that due to our big miscegenation, each Brazilian region or state have characteristics that are specific for the study in question, enabling the creation of a database with the genotyping of the donors in order to meet the demands of patients needing transfusion, notably those who have chronic diseases. Such experiments will initiate the building of a database with phenotyped donors representing the prevalence in each state or region, facilitating the search for donors with rare blood phenotypes. The objective of this study is to show the importance of the Immunophenotyping in the transfusion therapy, especially in patients having chronic diseases depending systematically of blood transfusions. With such initiatives, the tendency is to reduce the transfusion reactions, improve the quality of life of such patients, in addition to prove, not only by the color of the skin, hair or eyes, but also of the blood groups, that we are a unique people in terms of miscegenation.

**Acknowledgments:** Thanks to the team of the immunohematology laboratory of Hemonorte - Blood Center of Rio Grande do Norte State.

## Authorship contributions

ABO bloodgroup - Maria Zélia Fernandes research  
ABO and Rh bloodgroup - Linduarte Varela de Moraes research  
Statistical - Geraldo Barroso Cavalcante Jr research.

**Disclosure of conflicts of interest:** None

## REFERENCES

- Blumberg N, Peck K, Ross K, Avila E. Immune response to chronic red blood cell transfusion. *Vox Sang*[Internet]. 1983 [cited 2018 Jan 23];44(4):212-17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6601881>
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria no.1.376, 19 de novembro de 1993. Normas técnicas para Coleta, Processamento e Transfusão de Sangue, Componentes e Hemoderivados. *Diário Oficial [República Federativa do Brasil] dez 1993; 131(229):18405-15.*
- Castilho L. *Fundamentos de Imuno-hematologia*. Rio de Janeiro: Atheneu; 2015.
- Costa, DC. *Investigação do Polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no estado de Santa Catarina [Tese de doutorado]*. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Farmácia; 2016.
- DIAMED. Available from: <http://www.diamed.com.br/Cmi/Pagina.aspx?379>.
- Duran JÁ, Chanbert T, Rodrigues F, Pestana D. Distribuição dos grupos sanguíneos na população portuguesa. *Revista ABO* [Internet]. 2007 [cited 2018 Jan 23];29:5-17. Available from: [http://ipst.pt/files/IPST/INFORMACAO\\_DOCUMENTACAO/ABO\\_29\\_2007\\_pa\\_g\\_5a17.pdf](http://ipst.pt/files/IPST/INFORMACAO_DOCUMENTACAO/ABO_29_2007_pa_g_5a17.pdf).
- Fiorelli AI, Oliveira JLL, Stolf NAG. Transplante cardíaco. *Rev Med*[Internet]. 2009 [cited 2018 Jan 23];88(3):123-37.

- Godfrey GJ, Lockwood W, Kong M, Bertolone S, Ray A. Antibody development in pediatric cell patients undergoing erythrocytapheresis. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2010 [cited 2018 Jan 23]; 55(6):1134-37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.22647>
- Harmening DM. *Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão*. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006.
- Mourant AE. Establishment of an International Panel of Blood Donors of Rare Types. *VoxSanguinis*[Internet]. 1965[cited 2018 Jan 23]; 10: 129–132. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1423-0410.1965.tb04330.x/full>
- Neto, EB. *Estudo Imunohematológico molecular do Sistema de Grupo Sanguíneo Kell em indivíduos brasileiros* [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Programa de Pós-graduação em Hematologia; 2008.
- Nunes, HF. *Responsabilidade civil e a transfusão de sangue* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Programa de Ciências Médicas; 2010.
- Oliveira AG. *Bioestatística decodificada: bioestatística, epidemiologia e investigação*. 2. ed. Lisboa: Lidel; 2014.
- Pena SDJ, Pietro GD, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FSG et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 [cited 2018 Jan 23]; 6(2):1-9. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017063>.
- Pestana JOMA. *Transplante renal* [Tipo de mídia]. São Luis: Universidade Federal do Maranhão (UNA-SUS), 2014. Available from: [file:///C:/Users/manuelatiburcio.huol/Downloads/livro\\_unidade\\_4\\_mod6.pdf](file:///C:/Users/manuelatiburcio.huol/Downloads/livro_unidade_4_mod6.pdf).
- Pinto PCA, Braga JAP, Santos AMN. Fatores de risco para aloimunização em pacientes com anemia falciforme. *Rev. Assoc. Med. Bras.* [Internet]. 2011 [cited 2018 Jan 23]; 57(6):668-73. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302011000600014&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302011000600014&lng=en). <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302011000600014>.
- Ribeiro D. *O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil*. 2. ed. São Paulo: Companhia das Letras; 1995.
- Sanchez-Mazas AS, Langsganey A. Common genetic pools between human populations. *Hum Genet* [Internet]. 1988 [cited 2018 Jan 23]; 78(2):161-6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3422217>.
- Silva JM. *Fenotipagem eritrocitária em doadores de sangue no HEMOPI (Teresina – Picos) – PI e no HEMOCE (Crato) - CE* [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina; 2016.
- Walker RH. *Technical Manual*. 11. ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks; 1993.
- Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Tratado de Hematologia*. 1th ed. São Paulo: Atheneu; 2013.

\*\*\*\*\*

## ARTIGO3: Este artigo foi publicado no periódico Annals of Clinical and Laboratory Research, cujo fator de impacto é 2.64, correspondente ao Qualis CAPES A2

Research Article

Annals of Clinical and Laboratory Research  
ISSN 2386-5180

2022

Vol.10 No.6:417

### Clinical Significance of Flow Cytometry Findings in Brazilian Patients with De Novo Acute Myeloid Leukemia

Received: 06-May-2022, Manuscript No. IPACLR-22-12774; Editor assigned: 09-May-2022, PreQC No. IPACLR-22-12774(PQ); Reviewed: 23-May-2022, QC No. IPACLR-22-12774; Revised: 17-Jun-2022, Manuscript No. IPACLR-22-12774(R); Published: 24-Jun-2022, DOI: 10.36648/2386-5180.22.10.417

Linduarte Varela de Morais<sup>1\*</sup>, Rafael Duarte Lima<sup>2,4\*</sup>, Erica Aires Gil<sup>2\*</sup>, Aldair de Souza Paiva<sup>1</sup>, Lenilton Silva da Silveira Junior<sup>2</sup>, Victor de Lima Soares<sup>2</sup>, Ciro Alexandre Mercês Gonçalves<sup>2</sup>, Taissa Maria Moura de Oliveira<sup>2</sup>, Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva<sup>3</sup>, Gustavo Henrique de Medeiros Oliveira<sup>4</sup>, and Geraldo Barroso Cavalcanti Junior<sup>2,4\*</sup>

#### Abstract

**Introduction:** Immunophenotyping by Flow Cytometry (FC) is an essential method for diagnosis and classification of Acute Myeloid Leukemias (AML), and its extensive use could identify blast cell subpopulations with phenotypes rarely seen in normal myelopoiesis, correlating with clinical, morphological and prognostic characteristics.

**Methods:** In this study we analyzed 143 cases of AML, examining them for Leukemia-Associated Immunophenotype (LAIP) by FC immunophenotyping in leukemic cells using a panel of monoclonal antibodies (MoAb) for diagnosis and classification of Acute Leukemia (AL). At the same time, clinical, demographic and hematological data of these patients were also investigated. Most patients were male adults and splenomegaly and hepatomegaly were present in most cases.

**Results:** Immunophenotyping showed a characteristic profile of AML with expression of pan-myeloid antigens CD13, CD33 and Myeloperoxidase (MPO), combined with CD34 and CD117 in most cases. Expression of CD14 and CD64 were observed in AML with monocytic component (AML-M4/M5), CD235a, CD36 and CD71 in cases of erythroleukemia (AML-M6) and platelet glycoproteins CD41, CD42b and CD61 in acute megakaryocytic leukemia (AML-M7). Regarding the aberrant phenotype, higher levels of expression of CD4, CD7 and CD56 were observed, corresponding to 24.5%, 22.4%, and 16.1% of the cases, respectively.

**Conclusion:** We conclude that LAIP, as they are described here, were present in the vast majority of cases of investigated AML, with a relevant association with prognostic factors, clinical data, cytomorphological classification.

**Keywords:** Immunophenotyping, Flow cytometry, Monoclonal antibodies, Acute myeloid leukemia, Leukemia-associated immunophenotype

- <sup>1</sup> Department of Clinical Medicine/ Federal University of Rio Grande do Norte (DMC/UFRN), Brazil
- <sup>2</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis / Federal University of Rio Grande do Norte (DACT/UFRN), Brazil
- <sup>3</sup> Department of Textile Engineering / Federal University of Rio Grande do Norte (DET/UFRN), Brazil
- <sup>4</sup> Flow Cytometry Laboratory, Dalton Cunha Blood Center, Natal- Rio Grande do Norte, Brazil

\*Corresponding author:  
Geraldo Barroso Cavalcanti Junior

✉ gbcjunior@hotmail.com

Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Norte (DACT/UFRN), Brazil

Fax: +55(84)32154226

**Citation:** Morais LV, Lima RD, Gil EA, Paiva AS, Junior LSS, et al. (2022) Clinical Significance of Flow Cytometry Findings in Brazilian Patients with De Novo Acute Myeloid Leukemia. Ann Clin Lab Res. Vol.10 No.6:417

#### Introduction

The characterization of Acute Leukemias (AL) is based on multiparametric analysis which includes clinical features, cell morphology, genetics and immunological markers [1,2]. These parameters have been shown to be important for the diagnosis and prognosis [1]. The first systems of classification of AL were based on cytomorphological investigations enabling the differentiation between Acute Myeloid Leukemia (AML) and Acute Lymphoid Leukemia (ALL) [1-4].

The system established by the French-American British group (FAB), established a morphological classification as AML



according to the characteristics of the cells obtained from the Bone Marrow (BM) aspirate in: AML-M0 (Undifferentiated AML); AML-M1 (AML with minimal differentiation); AML-M2 (Maturing AML); AML-M3 (Acute promyelocytic leukemia or APL); AML-M4 (Acute myelomonocytic leukemia), including the eosinophilic form (AML-M4eos); AML-M5 (Acute monocytic leukemia), subdivided into AML-M5a with predominance of monoblasts and AML-M5b with predominance of promonocytes; AML-M6 (Erythroleukemia); AML-M7 (Acute megakaryoblastic leukemia) [3,4].

Currently, cytomorphology remains a central tool in the diagnostic and classification of hematological disorders [2]. It should be integrated with other methods such as flow cytometry, cytogenetics/molecular genetics and clinical data [1,2].

Flow Cytometry (FC) is widely used for diagnosis and monitoring of hematological neoplasm, being a quicker and simpler technique than other methods. Its high sensitivity and antigenic quantification enables the identification of cells with Leukemia-Associated Immunophenotype (LAIP) in the diagnosis and detection of Minimal Residual Disease (MRD) through a panel of Monoclonal Antibodies (MoAb) conjugated with fluorochromes that recognize specific cell antigen epitopes, allowing a more accurate delineation of the LAIP, enabling the differentiation between AML and ALL [5-11].

Thus, the systematic use of MoAbs, such as CD13, CD33, CD65, c-Kit receptor (CD117), antigen associated with hematopoietic precursors (CD34), HLADR and anti-myeloperoxidase (MPO), allow the definition of AML, being essential for the definition of subtypes M0, M7, M5a and variant hypogranular form of APL (AML-M3v) [10-15].

In addition, to contributing to the diagnosis, FC immunophenotyping can also evidence blast cell heterogeneity as reflected by the existence of a high variety of phenotypes as well as detect antigen associations rarely seen in normal BM cells, such as aberrant expression of lymphoid antigens and asynchronous phenotypes [13].

To characterize the other FAB subtypes of AML, FC is less important, but corroborates with the cytomorphological findings in diagnosis and differentiation between the M1 and M2 subtypes [10-13]. The expression of CD14 and CD64, are present in the monocyte population, characterizing AML-M4/M5 and erythroleukemia by the expression of glycoprotein alpha (CD235a) [6-8,13-15].

In order to assess the occurrence of LAIPs and correlate their presence with the various morphological subtypes, we analyzed 143 de novo AML cases. Correlations between clinical data, aberrant phenotypes, patient age and hematologic changes were also examined.

## Methods

### Study Population

A total of 143 newly diagnosed AML cases at the Blood Center Dalton Cunha (HEMONORTE), Natal City, located in Northeastern Brazil in the period 2016-2018 were included in the study. Ethical

approval for this study was granted by the Ethics and Research Committees of the Onofre Lopes University Hospital of the Federal University of Rio Grande do Norte (CAAE: 51300215.6.0000.5292). All patients or their legal representatives signed the informed consent form.

Demographic and clinical data for each case were obtained at the time of diagnosis, including age, sex, fever, splenomegaly, hepatomegaly, adenopathy, hemorrhagic phenomena and presence of tumor masses. Hematologic information collected, such as White Cell Count (WCC), platelets, hemoglobin and B12 vitamin measurement. In Peripheral Blood (PB). And BM smears examination supplemented by cytochemical of Sudan Black B (SBB) and MPO stained and FC immunophenotyping were performed to confirm AML [16-20].

### Hematological analysis from peripheral blood and bone marrow

Hematologic information was performed in a hematological analyzer (BC-3000 Plus, Myndray, China). Differential blood cell counts were performed in PB smears stained with May-Grünwald-Giemsa (MGG-Laboclin, Brazil), in which a minimum 100 mononuclear cells were counted in an optical microscope using 20x and 100x objective lenses (Zeiss Microscope, Götting, Germany) and the result of the cell count scored in percentage. MGG-staining smears of BM were evaluated according to the FAB criteria [3,4].

Serum dosage of vitamin B12 was performed by chemiluminescence immunoassay (ARCHITECT i1000SR immunoassay analyzer, Abbott, USA) with the aim of excluding Megaloblastic Anemia (MA) in patients with suspected AML-M6.

### Immunophenotyping studies

Erythrocyte-lysed whole BM samples were analyzed by FC using a large panel of MoAbs in four combinations (Table 1) [17-20]. Detection of surface, cytoplasmic (cyt) such as MPO, cytCD13, cytCD79a, cytCD22, cytCD3, anti-IgM and nuclear (nu) Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) antigens were performed following a previously established protocol [19-23].

Data acquisition and analysis were performed on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA) using Cell-Quest software. Calibration and fluorescence compensation were carried out using Calibrite beads (Becton Dickinson, San José, CA, USA) and immunoglobulin isotype-matched negative controls. Identification of blast cells was performed using Forward Scatter (FSC) versus Side Scatter (SSC) parameters and/or CD45 intensity versus SSC dot plots. Antigen expression was considered to be positive when the percentage of positive blast cells was equal or greater than 20% [19,20].

## Results

Out of the 143 cases, 85 males and 58 females were studied. Patients were aged between 02 and 92 years. The age group most affected by the disease was 20 to 59 years (65 cases), followed by individuals over the age of 60 with 52 patients. All cases were classified according to FAB criteria and FC immunophenotyping

Table 1: Monoclonal antibodies used in this study.

MoAb/Fluorochromes	Clone	Reactivity	Source
CD45 <sub>APC</sub>	HI3	Common leukocyte antigen	BD
HLADR <sub>APC</sub>	L243	MHC class II cell surface receptor	BD
CD34 <sub>PerCP</sub>	8G12	Immature hematopoietic precursors	BD
CD117 <sub>APC</sub>	CE/VD	c-kit receptor / Myeloid precursor	BD
anti-MPO <sub>PerCP</sub>	CLB	Myeloperoxidase / Myeloid antigen	BD
CD13 <sub>FITC</sub>	L13	Aminopeptidase N / Myeloid antigen	BD
CD33 <sub>PE</sub>	P67.6	Myelomonocytic antigen / Myeloid precursors	BD
CD36 <sub>PE</sub>	NLO7	Scavange receptor	BD
CD14 <sub>PerCP</sub>	M5E2	Lipopolysaccharide receptor / monocytes antigen	BD
CD64 <sub>APC</sub>	MB22	Precursor monocytes antigen	BD
CD65 <sub>FITC</sub>	88H	Myeloid antigen / Myeloid precursors	BD
CD66b <sub>APC</sub>	G10F5	Carcinoembryonic antigen / myeloid antigen	BD
CD71 <sub>FITC</sub>	L01.1	Transferrin receptor	BD
CD235a <sub>FITC</sub>	GA-R2	Glycophorin A / eritroid antigen	BD
CD41 <sub>FITC</sub>	HIP8	Glicoprotein IIb/ Platelet and platelet precursors	BD
CD42b <sub>FITC</sub>	HIP1	Glicoprotein IX / Platelet and platelet precursors	BD
CD61 <sub>PerCP</sub>	RUU-PLF12	Glicoprotein IIIa / Platelet and platelet precursors	BD
CD1a <sub>PerCP</sub>	HI-149	Thymocytes antigens / T-lymphocytes precursors	BD
CD2 <sub>FITC</sub>	55.2	T-lymphocytes mature and precursors	BD
CD3 <sub>APC</sub>	UCHT1	Best marker for cells of T lineage	BD
CD7 <sub>APC</sub>	M-T701	T-cell lineage-associated antigen	BD
CD56 <sub>PE</sub>	B159	Natural Killer Cells	BD
CD10 <sub>FITC</sub>	HI10	CALLA antigen / B-lymphocytes precursors	BD
CD19 <sub>PerCP</sub>	898	Pan-B lineage lymphocytes	BD
CD20 <sub>FITC</sub>	2H7	Pan-B lineage lymphocytes	BD
CD22 <sub>FITC</sub>	HIB22	Pan-B lineage lymphocytes	BD
CD79a <sub>PE</sub>	HMA7	Early B-lymphocytes precursors	BD
IgM <sub>APC</sub>	G20-123	IgM immunoglobulin heavy chain	BD
TdT <sub>APC</sub>	HT9	Terminal-deoxynucleotidyl Transferase	BD
<b>Multitest conjugated MoAb</b>			
BD/Simultest Leucogate: CD14FICT/CD45PE: CD14 mature monocytes and CD45 common leukocyte antigen;			
BD/Oncomark CD14FICT/CD64PE: Monocytic development;			
BD/Oncomark CD7FICT/CD33PE: CD7 T-lymphocytes and CD33 myelomonocytic antigen; BD/Oncomark /CD15FICT/CD34PE: CD15 mature granulocytes and CD34 Immature precursors; BD/Multitest 4-Color: CD3FICT/CD8PE/CD45PerCP/CD4AP: T-subsets lymphocytes;			
BD/Multitest 4-Color: CD3FICT/CD16-56PE/CD45PerCP/CD19AP: T, NK and B lymphocytes			
IgG1FITC/IgG1PE/IgG1PerCP/IgG1APC: BD Isotypic matched antibodies			
Note: Monoclonal antibodies (MoAb); Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-chlorophyll protein (PerCP), Allophycocyanin (APC), Becton & Dickinson (BD).			

distributed into: 03 AML-M0, 53 AML-M1, 22 AML-M2, 09 AML-M3, 27 AML-M4, 14, AML-M5a, 08 AML-M5b, 04 AML-M6 and 3 AML-M7 (Table 2).

Clinical data associated with the AML were present in most cases. Of these, splenomegaly was predominant with 118 cases, followed by hepatomegaly and bone pain with 99 and 40 cases respectively. Hemorrhagic phenomena were predominantly in APL and directly associated with low platelet count in PB. Presence of gingival hypertrophy and tumor mass were predominant in AML-M5a (Table 2).

A WBC variation was observed, which ranged from 700 to 299.000/ $\mu$ L. There was a predominance of patients with WBC more than 50.000/ $\mu$ L with 82 cases, followed by 40 cases with WBC between more than 10.000 and 50.000/ $\mu$ L. Patients with

WBC between 5.000 and 10.000/ $\mu$ L and less than 5.000/ $\mu$ L were observed in 11 and 10 cases, respectively. Hemoglobin levels less than 12.0g/dL and thrombocytopenia were observed in most cases, with more pronounced results in cases of APL. Cytochemical stain of SBB and MPO were positive in most cases, notably in subgroups M1, M2 and M3, and negative in AML-M0, M6 and M7 (Table 3).

In FC analysis, leukemic cells were initially identified by FSC/SSC ratio and expression of pan-myeloid antigens: CD13, CD33, CD65, CD117 and MPO in most cases. CD34 was expressed in most cases, characterizing the presence of blast cells with little differentiation (Table 4 and Figure 1).

Leukemic cells from APL showed a characteristic pattern of positivity to CD13, CD33, MPO and CD117 and negativity for CD34

**Table 2:** Correlation between demographic and clinical date and FAB subgroups M0 into M7 of patients with acute myeloid leukemia.

Date	Patients n=143	AML-M0 n= 03 n+ (%)	AML-M1 n= 53 n+ (%)	AML-M2 n= 22 n+ (%)	AML-M3 n= 09 n+ (%)	AML-M4 n= 27 n+ (%)	AML-MSa n= 14 n+ (%)	AML-MSb n= 08 n+ (%)	AML-M6 n= 04 n+ (%)	AML-M7 n= 03 n+ (%)
<b>Gender</b>										
Male	85	02 (66.7)	31 (58.5)	13 (59.1)	07 (77.8)	17 (63.0)	07 (50.0)	06 (75.0)	01 (25.0)	01 (33.3)
Female	58	01 (33.3)	22 (41.5)	09 (40.9)	02 (22.2)	10 (37.0)	07 (50.0)	02 (25.0)	03 (75.0)	02 (66.7)
<b>Age (Years)</b>										
≤ 10	14	00 (-)	08(15.1)	02 (09.1)	00 (-)	00 (-)	01 (07.1)	02 (25.0)	00 (-)	01 (33.3)
>10- 19	12	00 (-)	04 (07.5)	04 (18.2)	02 (22.2)	02 (07.4)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
>20- 59	65	03 (100)	17 (32.1)	12 (54.5)	06 (66.7)	14 (51.9)	06 (42.9)	03 (37.5)	03 (75.0)	01 (33.3)
≥ 60	52	00 (-)	24 (45.3)	04 (18.2)	01 (11.1)	11 (40.7)	07 (50.0)	03 (37.5)	01 (25.0)	01 (33.3)
<b>Clinical date</b>										
Splenomegaly	118	03 (100)	45 (84.9)	19 (86.4)	00 (-)	26 (96.3)	14 (100)	07 (87.5)	02 (50.0)	02 (66.7)
Hepatomegaly	99	03 (100)	39 (73.6)	16 (72.7)	02 (22.2)	17 (63.0)	13 (92.9)	05 (62.5)	03 (75.0)	01 (33.3)
Bone pain	40	03 (100)	13 (24.5)	07 (31.8)	00 (-)	05 (18.5)	05 (35.7)	04 (50.0)	02 (50.0)	01 (33.3)
Fever	25	03 (100)	15 (28.3)	02 (09.1)	00 (-)	01 (03.7)	01 (07.1)	02 (25.0)	00 (-)	01 (33.3)
Bleeding	21	01 (33.3)	05 (09.4)	00 (-)	09 (100)	02 (07.4)	04 (28.6)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
Gingival hypertrophy	19	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	04 (14.8)	10 (71.4)	05 (62.5)	00 (-)	00 (-)
Tumor mass	15	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	03 (11.1)	11 (78.6)	01 (12.5)	00 (-)	00 (-)
Chloroma	09	00 (-)	03 (05.7)	04 (18.2)	00 (-)	02 (07.4)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
Lymphadenopathy	08	00 (-)	05 (09.4)	01 (04.5)	00 (-)	01 (03.7)	01 (07.1)	00 (-)	00 (-)	00 (-)

Note: (FAB) French American [3-5]

**Table 3:** Correlation between hematological date and FAB subgroups M0 to M7 of patients with acute myeloid leukemia.

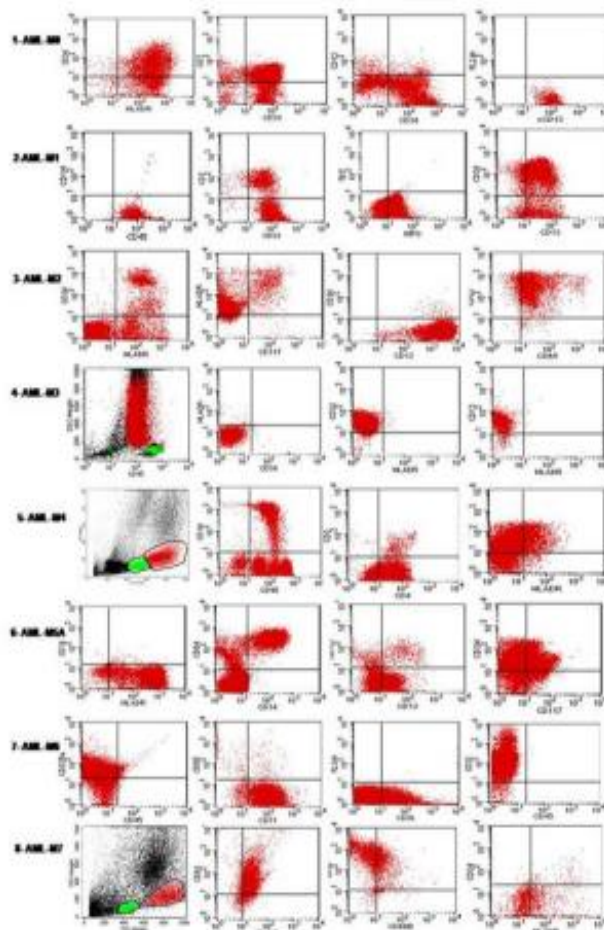
Date	Patients n=143	AML-M0 n= 03 n+ (%)	AML-M1 n= 53 n+ (%)	AML-M2 n= 22 n+ (%)	AML-M3 n= 09 n+ (%)	AML-M4 n= 27 n+ (%)	AML-MSa n= 14 n+ (%)	AML-MSb n= 08 n+ (%)	AML-M6 n= 04 n+ (%)	AML-M7 n= 03 n+ (%)
<b>B12 vitamin (pg/mL)</b>										
≤ 200	Ur	Ur	Ur	Ur	Ur	Ur	Ur	Ur	00 (-)	Ur
> 200	Ur	Ur	Ur	Ur	Ur	Ur	Ur	Ur	04 (100)	Ur
<b>+ Cytochemistry (SBB/MPO)</b>	132	00 (-)	53 (100)	22 (100)	09 (100)	27 (100)	13 (92.9)	08 (100)	* 00 (-)	*00 (-)
<b>WBC /PB(x 10<sup>9</sup>/L)</b>										
≤ 5.0	10	00 (-)	01 (01.9)	00 (-)	08 (88.9)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (25.0)	00 (-)
>5.0-10	11	00 (-)	01 (01.9)	05 (22.7)	00 (-)	02 (07.4)	01 (07.1)	00 (-)	01 (25.0)	01 (33.3)
> 10 - 50	40	00 (-)	16 (30.2)	06 (27.2)	00 (-)	11 (40.7)	03 (21.4)	01 (12.5)	00 (-)	02 (66.7)
> 50	82	03 (100)	36 (67.9)	11 (50.0)	01 (11.1)	14 (51.9)	10 (71.4)	06 (75.0)	02 (50.0)	01 (33.3)
<b>% Blastic cells (PB)</b>										
≤ 50	26	00 (-)	12 (22.6)	04 (18.2)	01 (11.1)	04 (14.8)	01 (07.1)	02 (25.0)	01 (25.0)	01 (33.3)
>50	117	03 (100)	41 (77.4)	18 (81.8)	08 (88.9)	23 (85.2)	13 (92.9)	06 (75.0)	03 (75.0)	02 (66.7)
<b>Platelet count/ PB (x 10<sup>9</sup>/L)</b>										
≤ 20	17	00 (-)	04 (07.5)	00 (-)	08 (88.9)	02 (07.4)	02 (14.3)	01 (12.5)	00 (-)	00 (-)
>20- 50	63	02 (66.7)	31 (58.5)	11 (50.0)	01 (11.1)	08 (29.6)	06 (42.8)	01 (12.5)	03 (75.0)	00 (-)
50 - 100	53	01 (33.3)	15 (28.3)	10 (45.5)	00 (-)	15 (55.6)	05 (37.1)	04 (50.0)	01 (25.0)	02 (66.7)
> 100	10	00 (-)	03 (05.7)	01 (04.5)	00 (-)	02 (07.4)	01 (07.1)	02 (25.0)	00 (-)	01 (33.3)
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>										
< 10.0	107	02 (66.7)	45 (84.9)	13 (59.1)	08 (88.9)	16 (59.3)	11 (78.6)	06 (75.0)	03 (75.0)	03 (100)
10.0 - 12.0	33	01 (33.3)	08 (15.1)	08 (36.4)	01 (11.1)	09(33.3)	03 (21.4)	02 (25.0)	01 (25.4)	00 (-)
> 12.0	03	00 (-)	00 (-)	01 (04.5)	00 (-)	02 (07.4)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)

Note: (FAB) French American British classification 3-5; (+) Positive Reaction; (n) number of patients tested; (n+) number of positive cases; (%) percentage of positive cases; (PB) peripheral blood; (WBC) white cell count; (SBB) Sudan Black B; (MPO) Myeloperoxidase; (\*) SBB/MPO staining negative in erythroid and megakaryocyte population; (Ur)unrealized.

Table 4: Diagnosis and classification of AML based on reactivity with various monoclonal antibodies.

AcMo	Patients n=143 n+ (%)	AML-M0 n= 03 n+ (%)	AML-M1 n= 53 n+ (%)	AML-M2 n= 22 n+ (%)	AML-M3 n= 09 n+ (%)	AML-M4 n= 27 n+ (%)	AML-M5a n= 14 n+ (%)	AML-M5b n= 08 n+ (%)	AML-M6 n= 04 n+ (%)	AML-M7 n= 03 n+ (%)
CD45	138 (96.5)	03 (100)	53 (100)	22 (100)	09 (100)	27 (100)	14 (100)	08 (100)	00 (-)	01 (33.3)
HLADR	120 (83.9)	03 (100)	53 (100)	22 (100)	00 (-)	27 (100)	14 (100)	08 (100)	02 (50.0)	01 (33.3)
CD34	106 (74.1)	03 (100)	53 (100)	12 (54.5)	00 (-)	18 (66.7)	14 (100)	01 (12.5)	04 (100)	01 (33.3)
CD117	131 (91.6)	02 (66.7)	53 (100)	20 (90.1)	09 (100)	27 (100)	13 (92.9)	05 (62.5)	02 (50.0)	01 (33.3)
anti-MPO	124 (86.7)	03 (100)	53 (100)	10 (100)	09 (100)	27 (100)	05 (35.7)	08 (100)	00 (-)	00 (-)
CD13	130 (90.1)	03 (100)*	53 (100)	22 (100)	09 (100)	27 (100)	14 (100)	07 (87.5)	00 (-)	00 (-)
CD33	139 (97.2)	01 (33.3)	53 (100)	22 (100)	09 (100)	26 (96.3)	14 (100)	08 (100)	04 (100)	03 (100)
CD36	44 (30.8)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	25 (92.6)	09 (64.3)	06 (37.5)	04 (100)	03 (100)
CD14	38 (26.6)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	22 (81.5)	10 (71.4)	06 (75.0)	00 (-)	00 (-)
CD64	46 (32.2)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	26 (96.3)	14 (100)	06 (75.0)	00 (-)	00 (-)
CD65	118 (82.5)	00 (-)	53 (100)	22 (100)	09 (100)	27 (100)	07 (50.0)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
CD66b	49 (34.3)	00 (-)	00 (-)	22 (100)	00 (-)	27 (100)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
CD71	42 (29.4)	03 (100)	20 (37.7)	05 (22.7)	00 (-)	00 (-)	05 (35.7)	00 (-)	04 (100)	00 (-)
CD235a	04 (02.8)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	04 (100)	00 (-)
CD41	03 (02.1)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	03 (100)
CD42b	03 (02.1)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	03 (100)
CD61	03 (02.1)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	03 (100)
CD1a	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
CD2	10 (06.7)	00 (-)	04 (02.0)	04 (02.0)	00 (-)	02 (07.4)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
CD3	08 (05.6)	00 (-)	02 (03.8)	03 (13.6)	00 (-)	02 (07.4)	01 (07.1)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
CD3+/CD4+	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
CD3+/CD8+	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
CD4	35 (24.5)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	20 (70.1)	11 (78.6)	04 (50.0)	00 (-)	00 (-)
CD7	32 (22.4)	02 (66.7)	20 (37.7)	05 (22.7)	00 (-)	03 (11.1)	01 (07.1)	00 (-)	00 (-)	01 (33.3)
CD56	23 (16.1)	00 (-)	03 (05.7)	11 (50.0)	02 (22.2)	00 (-)	05 (35.7)	02 (25.0)	00 (-)	00 (-)
CD10	01 (0.70)	00 (-)	01 (01.9)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
CD19	12 (08.4)	00 (-)	02 (03.8)	09 (40.9)	00 (-)	01 (03.7)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
CD20	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
CD22	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
cytCD79a	04 (02.8)	00 (-)	02 (03.8)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	02 (-)	02 (25.0)	00 (-)	00 (-)
IgM	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
nuTdT	04 (02.8)	00 (-)	04 (07.5)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)

Note: (FAB) French American British classification 3-5; (n) number of patients tested; (n+) number of positive cases; (%) percentage of positive cases; (HLADR) Type II major histocompatibility complex; (anti-MPO) AcMo against myeloperoxidase; (CD13\* or cytCD13) Intracytoplasmic CD13; (CD3+/CD4+) T-helper lymphocytes; (CD3+/CD8+) T-cytotoxic lymphocytes; (cytCD79a) Intracytoplasmic CD79a; (nuTdT) nuclear Terminal deoxynucleotidyl Transferase.



**Figure 1** Identification leukemia-associated immunophenotype patterns (LAIP) of in subgroup of AML.  
Note: 1-AML-M0; 2-AML-M1; 3-AML-M2; 4-AML-M3; 5-AML-M4; 6-AML-MSA; 7-AML-M6; 8-AML-M7.

and HLADR (Figure 1). Monocytic AML (M4/M5), expression of CD14 and CD64, associated with CD13, CD33 and HLADR (Figures 1).

AML-M6 was identified by strong expression of CD235a and CD71, associated with CD33, CD36 and CD34 (Figure 1). In these AML, serum levels of vitamin B12 were normal, ruling out the diagnosis of MA.

AML-M7 was confirmed by the expression of platelet glycoproteins CD41, CD42b and CD61 (Figure 1).

Aberrant expression of lymphoid antigens has been observed in some cases, especially CD4, CD7 and CD56. The CD4 was observed in 24.5% of cases, more present in cases of AML-M4/MS. CD7 was positive in 22.4% of cases, with more expressive values in AML-M0/M1 and CD56 was expressed in 16.1% of cases, notably in the subtypes AML-M2, M5a/b and M3. Other

lymphoid antigens such as TdT, CD3, CD10, CD19, CD2 and CD79a were observed in less frequently.

## Discussion

For the diagnosis and classification of AML, the World Health Organization (WHO) recommends careful integration of clinical history, morphology analysis of BM and PB smears, cytogenetic/molecular genetic analysis and immunophenotyping [24]. However, cytogenetic/molecular analyzes may not be available in many services, and cytomorphological analysis complemented by immunophenotyping is satisfactory for rapid diagnosis and classification of this leukemias [25].

It is important to identify the subtype of AML, as this influences the choice of treatment type and the patient's prognosis [26]. For example, in the case of APL, in which the diagnosis is clinically

urgent, the combination of these two modalities permits a diagnosis with high precision [1,16,26]. In some other types of AML, immunophenotypic features may provide an indication as to the cytogenetic anomaly likely to be present [1, 6,17,18,26].

Highlighting the AML with t(8;21) observed in immunophenotype cases with strong CD34+, HLADR+, weak CD33+, MPO+, CD65+ or CD15+ and IL-2 receptor (CD25+) can observe aberrant expression for lymphoid antigens CD19, CD79a, TdT and CD56. In AML, chromosome 16 inversion correlates with expression of CD34, CD117 and myeloid subpopulations with MPO+, CD13+, CD33+, CD15+, CD65+; AML with a monocytic component with expression of CD11b, CD11c, CD64, CD36 and CD14 and aberrant expression of CD4 AND CD2. AML with t(9;11) 11q23 correlates with aberrant expression of the lymphoid antigens CD19 and CD2 [1,6,-18,26].

Detection of MPO is probably the most specific technique for differentiating between myeloid and lymphoid lineages, which can be done by cytochemical methods or immunophenotyping [16,25]. It is a lysosomal enzyme found in the primary granules of cells in the myeloid series [26]. Its expression occurs at the beginning of myeloid differentiation and appears to be specific for cells of that lineage. MPO has never been reported in ALL [2,7,27,28].

Most studies have found a higher incidence of AML in males, although this predominance is not as distinct as in ALL [1]. In our series, a male prevalence was present, with a male to female ratio of 1.4 to 1 (Table 2).

Most patients had pallor and fatigue, possibly due to anemia [1]. In present study, splenomegaly and hepatomegaly were the most common clinical findings. Bleeding was more present in patients with APL (Table 2).

In the immunophenotypic evaluation of AL, the expression of one or more pan-myeloid antigens such as CD13, CD33, CD65, CD117 and MPO are sufficient for the diagnosis of AML [1,13,17-19,26].

Furthermore, the immunophenotypic classification has diagnostic and prognostic importance in some subtypes of AML. Thus, it is essential for the diagnosis of AML-M0 and M7, being helpful in the diagnosis of the variant hypogranular form of APL (AML-M3v), in the differentiation between subgroups AML-M1 and M2, in subtypes AML-M5a and M5b, and in the differential diagnosis between AML-M6 and MA [6,13-15,18,19,25].

The AML-M0 is characterized by the infiltration of BM by blast cells with negative cytochemical reaction for MPO and SBB. Blast cells are small, with loose chromatin and evident nucleoli, presenting agranular cytoplasm, without Auer bodies [2-4].

Immunophenotyping shows a blast population with a low FSC/SSC ratio, with positivity for at least one of the myeloid antigens such as CD33, cytCD13, CD117 and CD34 24-25. Lymphoid lineage antigens are generally negative, although CD7 and CD56 are observed in some cases [1,25]. As the therapeutic approach to AML differs from ALL, it is important to perform immunophenotyping in the differentiation between AML-M0 from ALL and the consequent correct treatment guidance [1,25].

The AML-M1 is associated with the expression of CD13, CD33, CD34, CD65, CD117 and HLADR in variable combinations [25]. In this AML group, the co-expression of CD34 and HLADR is significantly greater than that observed in the AML groups with maturation as M2/M3 [1,6,13,17,18,25].

AML-M2 is characterized by the presence of >30% of myeloblasts associated with 10% of mature granulocytes in BM. Blast cells of a large size, with abundant and basophilic cytoplasm, often containing azurophilic granules. Auer bodies are frequent [3-4]. Immunophenotyping leukemic cells exhibit CD65, CD66, HLADR, CD13 and CD33, but CD34 expression is very weak or sometimes may be absent [1,6,13,18,19,25]. Aberrant expression of lymphoid antigens CD19, CD2, CD7 and natural killer cells (CD56) can also be observed, as these are associated with t(8:21) and are related to good prognosis and higher rates of complete prolonged remission in adult patients [25].

APL is defined by the proliferation of leukemic promyelocytes in BM, which have a large nucleus, and a cytoplasm with many coarse granulations. In some cases, the presence of numerous Auer bodies "faggot cell" is observed [3-4,16]. In AML-M3v, promyelocytes have a large and convoluted nucleus. The cytoplasm is basophilic with little or no granulation [3,4]. Cytochemical stains for MPO and SBB are strongly positive in both types of APL [16].

The immunophenotypic reveals high auto fluorescence and higher FSC/SSC ratio [24] and positivity to MPO, CD13, CD33 and CD117, but there is a lack of CD34 and HLADR [15,17,18,25]. These immunophenotypic, clinical and hematological characteristics of APL were also found in the present study (Tables 2-4 and Figure 1).

In acute myelomonocytic leukemia (AML-M4), leukemic cells exhibit monocytic and granulocyte precursors [3-4]. Monocytic precursors constitute >20% of the nucleated cells in the BM, representing about 12% of AML [3-4]. The variant eosinophilic form (AML-M4eo) can be found, with an increase in the number of eosinophils related with chromosome 16 abnormalities, either inv(16)(p13q22) or chromosome 16 inversion, being associated with a better prognosis and response to treatment [14,17,18,25].

In FC immunophenotyping, two distinct populations of leukemic cells are typically observed based on the FSC/SSC pattern, one of a large size (high FSC) and a smaller one (low FSC), corresponding to blastic cells from monocyte and granulocyte lineage, respectively [24]. Monocyte antigens CD14 and CD64 are positive along with HLADR, CD11b, CD11c and CD36. Myeloid antigens CD13 and CD33 are generally positive [14,17,18,25]. The AML-M4eo, exhibits aberrant expression of the CD2 lymphoid line antigen may occur and weak expression of the CD4 antigen can be observed in the monocyte population [14,7-18,25].

Monocytic Leukemias (AML-M5) are defined when 80% or more of non-erythroid cells in the BM are composed of monoblasts, promonocytes or monocytes. The AML-M5a subtype has >80% of monoblasts, while the LMA-M5b subtype has a predominance of promonocytes [2-4].

The immunophenotypic profile characteristic of AML-M5 is the presence of a leukemic population with a higher FSC/SSC ratio than in AML subgroups M0, M1 and M2 [24]. Monocytes antigens

CD14 and CD64 are positive along with HLADR, CD11b, CD11c [14,25]. Elevated levels of CD14 expression is a specific feature of mature monocytes, being often absent or underexpressed in immature monocytic cells [14]. In addition, other antigens that are generally considered to be associated with monocytes may be expressed in other types of AML, such as CD33 and CD13 [14,25]. The CD34 is generally negative, being more present in the most immature subgroup (AML-M5a) [1,14,17,18,25].

The CD36 is not specific and can also be seen in the erythroid, megakaryocytic and monocytic series [25]. The weak expression of the CD4 antigen can be observed [14,25]. AML-M5 with CD33 and CD4 expression associated with negativity to CD13 and CD34 is frequently correlated with t(9;11) [1,14,25].

Patients with monocytic leukemia have a high incidence of extramedullary disease, with infiltration in the gums, skin, digestive tract and CNS. The presence of hepato-splenomegaly and leukocytosis is more frequent compared to other FAB subtypes [14]. These characteristics are consistent with the clinical, hematological and immunophenotyping data of AML-M5a/M5b observed in the present study (Tables 2-4).

Erythroleukemia (AML-M6) is a rare type of AL, corresponding to 2 to 3% of AML, defined by  $\geq 50\%$  of the nucleated cells in the BM being of erythroid origin [3-4]. Two subtypes herein described AML-M6a (erythroid/myeloid AML) with the presence of leukemic components of erythroid and myeloid origin, and AML-M6b (pure erythroid AML), characterized by the presence of 80% or more of erythroid precursors in BM, and are rarely seen and clinically more severe than AML-M6a [26]. Cytochemical reactions of MPO and SBB are negative in leukemic erythroid cells [16].

AML-M6 can be differentiated from AM by immunophenotyping, being made by the expression of CD235a, CD36 and strong expression of CD71 in erythroid lineage cells [25]. Investigation of CD33, CD117 and CD34 may also be useful, as they are negative in MA and generally positive in erythroid cells of AML-M6. The phenotype of the myeloid population is similar to that observed in AML-M0/M1 [13,18,19,28,29]. Additionally, vitamin B12 dosage may be useful in diagnostic complementation, with low or absent serum levels in MA. These characteristics of these AML were also observed in the present study (Tables 2-4).

Transferrin receptor (CD71) is an integral membrane protein encoded by a gene localized in chromosome 3 that mediates cellular iron uptake by the erythroid lineage for hemoglobin synthesis and may actively proliferate cell population, since iron is required for cell division. It is expressed by a wide variety of cells as erythrocyte precursors [30].

In AML, CD71 expression correlates with proliferative activity of leukemic cells, with consensus on the co-expression of CD71 and CD34 used to stratify AML patients as a poor prognostic factor [30]. In present investigation, CD71 expression was found in 29.4% of all cases, being significantly higher in more immature AML and all cases of AML-M6.

Acute Megakaryoblastic Leukemia (AML-M7) is defined by the presence of more than 30% of megakaryoblasts among nucleated cells [3-4]. This leukemia is rare, but relatively frequent in children with Down syndrome [28-29].

AML-M7 can be confused with ALL or AML-M0 by morphological criteria. Blast cells from BM are small, pleomorphic, basophilic cytoplasm without granules, with projections (blebs) and negative for cytochemical stains such as MPO and SBB [3-4].

The main immunophenotypic characteristic of blastic cells from AML-M7 is the expression of platelet antigens CD41 (glycoprotein complex IIb/IIIa), CD42 (glycoprotein Ib) and CD61 (glycoprotein IIIa). The expression of pan-myeloid antigens CD13 and CD33 is described, as has positive cases of CD36. Some cases can be HLADR and CD34 negative [13,8-19,26]. These immunophenotyping of AML-M7 characteristics were also observed in the present study (Table 4).

In addition to the distinction between AML and ALL and AL classification, immunophenotyping allowed the identification of additional prognostic factors, allowing a better stratification into risk groups, enabling a differentiated therapeutic approach. Positivity to CD34, CD71, aberrant expression of lymphoid antigens and Multidrug Resistance (MDR) phenotype are highlighted as factors of poor prognosis of AML [1,8,19,25,27,30-32].

CD34 is a 105-120 KD glycoprotein expressed on many different cell types, more specifically in immature hematopoietic stem cells mediating the binding of hematopoietic stem cells to extracellular matrix proteins or stromal cells in the precursors B and T lymphocytes and even more immature Colony-Forming Cells (CFUs) and myeloblastic [31].

In AML, CD34 has in 45-68% of cases with a higher incidence in more immature subtypes as M0, M1 and M5a, and this expression of has adverse prognostic factors, such as a higher recurrence rate and refractory disease [6,31].

Some authors have reported that the prognostic significance of CD34 expression increases if co-expression occurs with other antigens such as HLADR [6], CD71 [30] and aberrant expression of CD7 [31-36]. A high intensity of co-expression of CD34 together with CD19 and CD56 is characteristic of AML-M2 with t(8;21) translocation [17,18].

It has also been reported that among AML patients co-expressing CD34 together with MDR proteins such as P-glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) they was a statistically significant lower rate of complete remission or shorter overall survival [19].

In present study, we found CD34 positivity in 106 cases of AML, with more expressive levels in AML with very immature blasts (M0, M1 and M5a), in contrast to groups M2, M5b, which showed lower levels of positivity and negativity in all cases of AML-M3 (Table 4).

Aberrant phenotypes are associated with AL, identified by the co-expression of cell markers that are rarely or never found simultaneously in normal hematopoietic differentiation, overexpression of a specific cell line marker or absence of a marker, which configures the maturation asynchronism of a cell line [1,18,19,25,36-38].

Some immunological and molecular studies have reported that many AL may present antigenic characteristics of more than one

cell line, characterizing two groups of leukemias that presented "lineage infidelity", that is, ALL expressing antigens associated with the myeloid lineage and AML expressing antigens of lymphoid lineage [1,8,13,36-38].

However, it is important to make a distinction between biphenotypic leukemia with ALL or AML with aberrant expression of markers from other strains, due to differences in therapeutic approaches, therefore it is recommended to investigate the scoring system suggested by the EGIL group [13], as well as the use of a panel made up of multiple MoAb combined with different fluorochromes, which makes it possible to investigate the expression of different antigens in the same cell by means of FC [17,18].

The mechanisms by which the expression of aberrant phenotypes occurs in the development of LAs remain unclear, however, it is possible to establish associations between these unusual expressions and other biological characteristics of the disease, such as associations with chromosomal translocations and adverse prognostic factors [17,18,25,30,32-36].

According to the WHO, several lymphoid immunophenotypic cell markers may be aberrantly expressed in AML [25,26]. TdT may be expressed in greater than one-third of cases, CD7, CD2, CD19 and CD56 may be expressed frequently; however, the T-cell antigen CD3 is usually absent [1,18,19,25].

TdT is a nuclear polymerase normally expressed during the early stages of B and T cell differentiation [37]. In initial reports, TdT expression was believed to be limited to ALL and can account in 18-24% of AML, more frequently in subtype M0 and M1. No specific chromosomal abnormalities were associated with AML TdT+ [37].

CD7 is a 40kDa glycoprotein encoded by a gene situated on chromosome 17 [33]. In T-cells CD7 play an important role in the cellular activation. Some authors, however, believe that the expression of this antigen in T progenitor cells could be related to mediating the migration of these cells from the MB to the thymus. It is identified in hematopoietic progenitor cells that can give rise to other cell lines and can thus be observed in AML more frequently in subtypes M0 and M1 [33].

According to some authors, the co-expression of CD7 with other cellular markers related to poor prognosis in AMLs such as CD34, Pgp and MRP1 [19]. In our investigation, CD7 expression was observed in 32/143 patients, most of whom had CD34 co-expression, characterized AML very immature (Table 4).

CD2 is a 45-58kD glycoprotein present on the surface of T lymphocytes and natural-killer cells (NK) and is not normally expressed in human myeloid cells, but is found in a significant minority of AML cases, M2, M3v, M4 and M5 groups [17,18,25,36]. Expression of CD2 and other T-lymphoid antigens such as CD4, CD7 and CD56 in myeloid blast cells are correlated with extramedullary disease [17,18,25,36].

CD19 is a 95kD glycoprotein, which appears very early during the maturation of B-lymphocyte precursors and is constitutively expressed in mature normal B-lymphocytes and related neoplasm but not in plasma cells [32,35]. CD19 expression has

been observed in 2-22% of AML cases commonly associated with AML-M2 with translocation t(8;21) and t(8;19) and also in AML subgroups M3v, M4 and M5 [17,18,25]. In the present study, CD19 and CD2 expression were observed in 8.4% and 6.7% of cases respectively, with a predominance of CD19 in M2 and CD2 in M3 subgroup of AML (Table 3).

Neural cell adhesion molecule (NCAM or CD56) is a 180 kD glycoprotein, encoded by a gene located in chromosome 11, and it is expressed on most normal NK cells [38]. In addition, CD56 expression was found in rare subsets of T-lymphocytes (NKT cell), dendritic cells, and neural and mesenchymal stem cells [8]. Aberrant expression of CD56 in AML is present in 13-29% of cases with high frequency in AML M2, M3 and M5. It identifies a subset of patients with a bad prognosis as extramedullary involvement and high leukocyte count in the AML-M2 with t(8;21) and t(15;17) [38-40]. In our samples, CD56 expression was observed in 23 cases with predominance in AML-M2 cases (Table 4).

## Conclusion

We conclude that the immunophenotypic patterns observed in patients with AML allowed the accurate identification of different groups of this leukemia. Additionally, through CF we also identify varied patterns of aberrant phenotypes that also contribute to the diagnosis and identification of prognostic factors.

## Author Contributions

Linduarte V. Morais, Taissa Maria M. Oliveira, Erica A. Gil, Lenilton S. Silveira Jr, Victor L. Soares and Rafael L. Duarte, collected the data and contributed to the writing of the manuscript. Dany Kramer, Aldair S. Paiva and Gustavo Oliveira contributed to the clinical interpretation of laboratory analysis. Geraldo B. Cavalcanti Jr conceived and conducted the study, contributed clinical and flow cytometry data, and reviewed the manuscript.

## Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest of any kind.

## References

- Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. (2010) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults. On behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115: 453-474.
- Zini G (2021) How I Investigate difficult cells at the optical microscope. *Int J Lab Hematol* 43: 346-353.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, et al. (1976) Proposal for the Classification of the acute leukemias. *Brit J Haematol* 33: 451-488.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG et al. (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Int Med* 103: 620-625.
- Casasnovas RO, Slimane FK, Garand R, Faure GC, Campos L, et al. (2003) Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia* 17: 515-517.



6. Tong H, Lu C, Zhang J, Liu Z, Ma Y, et al. (2009) Immunophenotypic, cytogenetic and clinical features of 192 AML patients in China. *Clin Exp Med* 9: 149-155.
7. Gajendra S (2016) Flow cytometry in acute leukemia. *Clin Oncol* 1: 1-4.
8. Haycocks NG, Lawrence L, Cain JW, Zhao F (2011) Optimizing antibody panels for efficient and cost-effective flow cytometric diagnosis of acute leukemia. *Cytometry B (Clin Cyt)* 80: 221-229.
9. Weir EG, Borowitz MJ (2001) Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Sem Hematol* 38: 124-138.
10. Campana D, Behm FG (2000) Immunophenotyping of leukemia. *J Immunol Meth* 243: 59-75.
11. Bain BJ, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly JT, et al. (2002) Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haematol* 24: 1-13.
12. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Matutes E, Orfao A, et al. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9: 1783-1786.
13. Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, Jasper L, Covinsky MA, et al. (2003) Flow cytometric analysis of acute leukemias: diagnostic utility and critical analysis of data. *Arch Pathol Lab Med* 127: 42-48.
14. Xu Y, McKenna R, Wilson K, Karandikar NJ, Schultz RA, et al. (2006) Immunophenotypic identification of acute myeloid leukemia with monocytic differentiation. *Leukemia* 20: 1321-1324.
15. Douer D (2003) The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 16: 357-367.
16. Bain BJ, Swirsky (2012) Erythrocyte and leucocyte cytochemistry in Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Chapter 15, (11th Edition) Elsevier Churchill Livingstone, London. 333-352.
17. Ikoma MR, Sandes AF, Thiago LS, Cavalcanti GB, Lorand-Metze IGH, et al. (2015) First Proposed panels on acute leukemia for four-color immunophenotyping by flow cytometry from the Brazilian Group of Flow Cytometry-GBCFLUX. *Cytometry B (Clin Cyt)* 88: 194-203.
18. Beltrame MP, Xisto ES, Yamamoto M, Furtado FM, da Costa ES, et al. (2021) Updating recommendations of the Brazilian Group of Flow Cytometry (GBCFLUX) for diagnosis of acute leukemias using four-color flow cytometry panels. *Hematol Transfus Cell Ther* 43: 1-8.
19. Silveira Junior LS, Lima Soares V, Jardim da Silva AS, Aires Gil E, Pereira de Araujo MG, et al. (2020) P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-1 expression in acute myeloid leukemia: Biological and prognosis implications. *Int J Lab Hematol* 42: 493-668.
20. Alves GV, Fernandes AL, Freire JM, Paiva AS, Vasconcelos RC, et al. (2012) Flow cytometry immunophenotyping evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Correlation to factors affecting clinic outcome. *J Clin Lab Anal* 26: 431-440.
21. Cavalcanti Junior GB, Vasconcelos FC, Faria GP, Scheiner MAM, Dobbin JA, et al. (2004) Coexpression of p53 protein and MDR functional phenotype in leukemias: The predominant association in chronic myeloid leukemia. *Cytometry B (Clin Cyt)* 61: 1-8.
22. Cavalcanti Junior GB, Scheiner MAM, Magluta EPS, Vasconcelos FC, Klumb CE, et al. (2010) P53 flow cytometry evaluation in leukemias: correlation to factors affecting clinic outcome. *Cytometry B (Clin Cyt)* 78: 253-259.
23. Vidrales MB, Orfao A, Lopes-Berges MC, González M, López-Macedo, et al. (1995) Light scatter characteristics of blasts cells in acute myeloid leukaemia: association with morphology and immunophenotype. *J Clin Pathol* 48: 456-462.
24. BJ Bain, MC Bene (2019) Morphological and immunophenotypic clues to the WHO categories of acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol* 141: 232-244.
25. Szczepanski T, van Velden HHJ, van Dongen JIM (2003) Classification systems for acute and chronic leukemias. *Best Pract Res Clin Haematol* 16: 561-582.
26. Ortoloni C (2011) Flow cytometry of hematological malignancies. Chapter 1- Antigens: Myeloperoxidase. Page 100. Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons Ltd.
27. Pande A, Dorwal P, Jain D, Tyagi N, Mehra S, et al. (2016) Expression of CD71 by flow cytometry in acute leukemias: More often seen in acute myeloid leukemia. *Ind J Pathol Microbiol* 59: 310-313.
28. Athale UH, Razzouk BI, Raimondi SC, Tong X, Behm FG, et al. (2001) Biology and outcome of childhood acute megakaryoblastic leukemia: a single institution's experience. *Blood* 97: 3727-3732.
29. Pagano L, Pulsoni A, Vignetti M, Mele L, Fianchi L, et al. (2002) Acute megakaryoblastic leukemia: experience of GIMEMA trials. *Leukemia* 16: 1622-1628.
30. Li X, Li J, Du W, Zhang J, Liu W, et al. (2010) Relevance of immunophenotypes to prognostic subgroups of age, WBC, platelet count, and cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia. *APMIS* 119: 76-84.
31. Ortoloni C (2011) in Flow cytometry of hematological malignancies. Chapter 1- Antigens: CD34 antigen. Page 66-68.
32. Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Schuurhuis GJ (2011) Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. *Brit J Haematol* 153: 421-436.
33. Chang H, Yeung J, Brandwein J, QJ-long Y (2007) CD7 expression predicts poor disease-free survival and post-remission survival in patients with acute myeloid leukemia and normal karyotype. *Leuk Res* 31: 157-162.
34. Tiftik N, Bolaman Z, Batun S, Ayyildiz O, Isikdogan A, et al. (2004) The importance of CD7 and CD56 antigens in acute leukemias. *Int J Clin Pract* 58: 149-152.
35. Mushsin S, Al-Mudallal S (2014) Expression of aberrant antigens CD7 and CD19 in adult acute myeloid leukaemia by flow cytometry. *Iraq J Hematol* 3: 1-13.
36. Shahni A, Saud A, Siddiqui S, Murky SN (2018) Expression of aberrant antigens in hematological malignancies: A single center experience. *Pak J Med Sci* 34: 457-462.
37. Ortoloni C (2011) Flow cytometry of hematological malignancies. Chapter 1- Antigens: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons Ltd.
38. Sasca D, Sybink J, Schuler A, Shah V, Heidelberger J, et al. (2019) NCAM1 (CD56) promotes leukemogenesis and confers drug resistance in AML. *Blood* 133: 2305-2319.
39. Raspandori D, Damiani D, Lenoci, Rondelli D, Testoni N, et al. (2001) CD56 expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. *Leukemia* 15: 1161-1164.
40. Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Byrd JC, et al. (1997) Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8; 21)(q22; q22). *Blood* 90: 1643-1648.