UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Mestrado em Hemoterapia e Biotecnologia

- MAYARA AOYAMA SOARES -

Estudo do perfil fenotípico e imunohematológico para o grupo sanguíneo Diego^{a} na população do Distrito Federal e sua importância na terapia transfusional.

RIBEIRÃO PRETO
2019

MAYARA AOYAMA SOARES

Estudo do perfil fenotípico e imunohematológico para o grupo sanguíneo Diego[a] na população do Distrito Federal e sua importância na terapia transfusional.

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Orientadora: Drª Lílian Maria de Castilho

RIBEIRÃO PRETO
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

SOARES, Mayara Aoyama
Estudo do perfil fenotípico e imunohematológico para o grupo sanguíneo Diego[a] na população do Distrito Federal e sua importância na terapia transfusional / Mayara Aoyama Soares; orientadora, Lílian Maria de Castilho - 2019. 47f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia.
Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Orientadora: Castilho, Lílian Maria de

1. Sistema sanguíneo 2. Sistema Diego 3. Imuno-hematologia 4. Genotipagem 5. Banco de Sangue

Nome: SOARES, Mayara Aoyama

Título: Estudo do perfil fenotípico e imunohematológico para o grupo sanguíneo Diego[a] na população do Distrito Federal e sua importância na terapia transfusional.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia, Área de Concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora
Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____
Assinatura: _____

Dedico este trabalho ao meu pai, Elber, que hoje não está mais ao meu lado, mas sei que vibra a cada conquista minha. Nunca foi por mim, sempre foi por você. Dedico também à minha filha, Lívia, que de dentro do meu ventre, acompanhou a conclusão do mesmo e foi minha força motriz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois colocou em meu caminho anjos que hoje chamo de AMIGOS. Estes nunca saíram do meu lado e me prestaram apoio incondicional. Ingênua eu de achar que aos 30 e poucos anos já sabia o real significado da palavra amizade. Com vocês, **Juliana Laterza Prazeres** e **Bruno Pereira Lustosa**, tenho aprendido muito. Jamais imaginaria que teria companheiros tão fiéis ao ponto de realizarem junto comigo esta pesquisa. Obrigada por discutir o assunto comigo, por perderem seus finais de semana e feriados para extrair DNA, por viajar até Campinas em busca de conhecimento, por serem pessoas tão incríveis e marcar minha vida de uma maneira tão especial. Não só no campo profissional, como também na vida pessoal. Ainda temos muito que conquistar juntos!

À amiga **Thaiana Cirqueira Gonçalves**, por ter vivido toda essa loucura junto comigo. Companheira de muitos anos, iniciamos juntas a nossa jornada na Hemoterapia, em 2009. Nada mais justo que, depois de 10anos, agradecer pelo crescimento, apoio e diversão, e comemorarmos mais uma conquista juntas.

À minha orientadora e fonte de inspiração, **Dra Lílian Maria de Castilho**, por dispensar a mim sua confiança e por várias vezes abdicar de seu precioso tempo. Obrigada pela forma na qual me conduziu durante a realização desta pesquisa, me dando total autonomia e por sua paciência, que em meio a tantos problemas pessoais que foram meus grandes obstáculos, não desistiu de mim e do meu trabalho. Foi difícil não desistir Dr^{a}, mas jamais a desapontaria. Minha eterna gratidão. Sou uma grande admiradora da profissional que és.

À **Tamires Delfino**, do Laboratório de Grupos Sanguíneos da UniCamp, por desmistificar a biologia molecular e se dedicar tanto à mim, Bruno e Juliana, sem nada em troca. Você foi muito importante pra nós e pra realização deste trabalho.

Aos amigos do hemocentro, **Daphne** e **equipe do Laboratório de Imunologia de Transplantes**, em especial **Pedro, Agenor e Kássia**, por todo auxílio, paciência e espaço que me deram. Obrigada por compartilharem comigo suas experiências e seus conhecimentos. Sem vocês nada disso sairia do papel.

Ao meu namorado **Henrique Braz,** que sempre me apoiou e nunca me deixou sozinha. Sua companhia nesses anos tem sido imprescindível, minhas conquistas também são suas. Obrigada por compreender meus momentos de ausência.

Por último, e não menos especial, à minha família, que é meu refúgio e minha segurança. **Mãe e irmãos**, vocês são TUDO pra mim. **Laura Shizuka**, você quem me ensinou a ir atrás de tudo que eu quero e sonho, me fez uma mulher batalhadora e forte.

"*Procurai suportar com ânimo tudo aquilo que precisa ser feito*."

Sócrates

RESUMO

SOARES, Mayara Aoyama. Estudo do perfil fenotípico e imunohematológico para o grupo sanguíneo Diego^a na população do Distrito Federal e sua importância na terapia transfusional. 2019. 47f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: O primeiro caso de antígeno associado ao sistema de grupo sanguíneo Diego foi relatado em 1953 através de um recém-nascido diagnosticado com doença hemolítica perinatal (DHPN) que evoluiu a óbito em apenas 3 dias. Anos após, foi descoberto um segundo antígeno e atualmente 21 antígenos são reconhecidos neste sistema pela ISBT – International Society of Blood Transfusion, sendo o antígeno Di^a o mais imunogênico e de maior importância clínica transfusional podendo causar reações transfusionais hemolíticas de moderadas à graves. Apesar de existirem no Brasil estudos populacionais da frequência do antígeno Di^a, não existe nenhum estudo da frequência deste antígeno na população do Distrito Federal (DF). Considerando que o antígeno Di^a é um marcador antropológico das raças asiática e indígena que fazem parte da constituição étnica da população do DF, é importante realizar um estudo fenotípico ou genotípico que possa determinar a frequência dos alelos *DI*A* e *DI*B* nos doadores do DF e o risco de aloimunização ao antígeno Di^a em pacientes para determinar seu impacto na segurança transfusional. **Materiais e Métodos:** *Trata-se de* estudo observacional descritivo transversal para determinação da frequência do antígeno Di^a na população doadora da FHB – Fundação Hemocentro de Brasília e seu impacto na rotina transfusional do DF devido a aloimunização dos pacientes receptores de transfusão. Amostras de sangue de doadores voluntários da região aptos à doação foram coletadas e, após extração do DNA, as mesmas foram genotipadas através d e uma técnica de PCR-RFLP. A aloimunização ao antígeno Di^a foi investigada pela análise retrospectiva dos registros de pacientes transfundidos com concentrado de hemácias. **Resultados**: Houve 100% de concordância entre os resultados da fenotipagem e genotipagem para o antígeno Di^a nas amostras de doadores estudadas. A frequência do alelo *DI*A* encontrada nesta população foi de 3.8% e nenhum genótipo *DI*A/DI*A* homozigoto foi encontrado. **Conclusão:** Nossos resultados demonstram que a frequência do alelo *DI*A* em doadores de sangue do DF é mais alta que a encontrada entre outras populações e portanto, pode ter grande impacto no índice

de aloimunização de pacientes que recebem transfusões de concentrados de hemácias e em gestantes.

Palavras chave: Sistema Diego. Antígeno Di$^{a.}$ Genotipagem. Imunohematologia.

ABSTRACT

SOARES, Mayara Aoyama. Study of the phenotypic and immunohematological profile for the Diego^a blood group in the population of the Federal District and its importance in transfusion therapy. 2019. 47f. Thesis (Master's Degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, 2019.

Introduction: The first case of antigen associated with the Diego blood group system was reported in 1953 through a neonate diagnosed with perinatal hemolytic disease (DHPN) who died within 3 days. Years later, a second antigen was discovered and 21 antigens are known recognized in this system by the International Society of Blood Transfusion (ISBT), the Di^a is the most immunogenic antigen and it has the major clinical importance transfusion in this system causing moderate to severe hemolytic transfusion reactions. Even though population-based studies of the frequency of antigen Di^a in Brazil reported, there is no study of the frequency of this antigen in the population of the Distrito Federal (DF). Considering that Di^a antigen is an anthropological marker of the Asian and Indian races and also are part of the ethnic constitution of the DF population, it is important to execute a phenotypic or genotypic study that can determine the frequency of *DI*A* and *DI*B* alleles in donors DF and the risk of alloimmunization to Di^a antigen in patients to determine its impact on transfusion safety. **Materials and methods:** This is a cross-sectional descriptive observational study to determine the frequency of Di^a antigen in the donor population of FHB – Fundação Hemocentro de Brasília and its impact on the transfusion routine of the DF due to the alloimmunization of patients receiving transfusion. Blood samples from volunteer donors from the region, suitable for donation, were collected and, after DNA extraction, they were genotyped through a PCR-RFLP technique. Alloimmunization to Di^a antigen was investigated by retrospective analysis of the records of patients transfused with concentrate red blood cells. **Results:** There was a 100% agreement between the results of phenotyping and genotyping for Di^a antigen in the donor samples studied. The frequency of the *DI*A* allele found in this population was 3.8% and no homozygous genotype *DI*A/DI*A* were found. **Conclusion**: Our results demonstrate that the frequency of the *DI*A* allele in DF blood donors is higher than that found among other populations and therefore, may

have a great impact on the alloimmunization index of patients receiving red blood cell transfusions and in pregnants.

Keywords: Diego Blood Group System. Di^{a} antigen. Genotyping. Immuhematology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da Proteína Banda 3 e a localização dos antígenos do sistema Diego com destaque para os antígenos estudados nesta pesquisa - Di^a/Di^b. **20**

Figura 2 - Localização citogenética do gene SLC4A1 no cromossomo 17, braço longo (17q12-21) **21**

Figura 3 - Fórmula para cálculo de amostragem de população finita e legenda **30**

Figura 4 - Corrida em Gel de agarose. Padrão para amplificação e Digestão dos fragmentos para idenficação doa lelos *DI*A/DI*B* com ladder de 100pb..... Erro! Indicador não definido.

Figura 5 - Representação da técnica de gel com suas diferentes intensidades de aglutinação **34**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomes para os alelos do grupo sanguíneo DI (ISBT 010).....**18**

Tabela 2 - Primers SENSE e AntiSENSE **27**

Tabela 3 - Protocolo de PCR para *DI*A/DI*B* **31**

Tabela 4 - Sequência de oligonucleotídeos dos Primers utilizados. **32**

Tabela 5 - Protocolo de digestão da enzima Mspl para identificação dos alelos *DI*A/DI*B*.....**33**

Tabela 6 - Frequência genotípica e alélica em doadores para o Sistema Diego.....**34**

Tabela 1 - População residente no DF por Cor ou Raça e segundo a situação de domicílio.....**35**

Tabela 8 - *Comparação das frequências genotípicas e alélicas entre estados brasileiros*.....***38***

Tabela 9 - Frequências genotípicas de Diego[a] em descendentes de japoneses em comparação com japoneses e população brasileira mistas. **39**

Tabela 10 - Comparativos de Aloimunização de Pacientes Politransfundidos. **41**

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

µL – microlitro

ABO – Sistema de grupo sanguíneo ABO

AE1 – *Anion Exchanger 1*

DF – Distrito Federal

DHPN – Doença Hemolítica Perinatal

DI – Sistema de grupo sanguíneo Diego

*DI*A* – Alelo codificante para antígeno Di^a

*DI*B* – Alelo codificante para antígeno Di^b

Di^a – antígeno Di^a

Di^b – antígeno Di^b

DISK – antigen DISK

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – etilenodiaminotetracético

FHB – Fundação Hemocentro de Brasília

g/mol – massa molar

HBDF – Hospital de Base do Distrito Federal

HEMOSC – Hemocentro de Santa Catarina

LIT – Laboratório de Imunologia de Transplantes

nmole – unidade de medida namole

ISBT – International Society of Blood Transfusion

PAI – Pesquisa de anticorpos irregulares

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RFLP – *Restriction Fragment Lenght Polymorhpism*

TAD – Teste de antiglobulina direto

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

Pro – Prolina

qPCR – Quantitative-PCR

Rh – Sistema de Grupo sanguíneo Rh

RhD – antígeno D do sistema Rh

SLC4A1 - Gene que codifica a Banda 3

Wr^a – antígeno Wr^a

Wr^b – antígeno Wr^b

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
1.1. Histórico 16
1.2. Sistema Diego 17
1.3.* Banda 3 e o gene *SLC4A1 19
1.4. Antígeno Diego como marcador antropológico 21
2. HIPÓTESE 24
3. JUSTIFICATIVA 24
4. OBJETIVO GERAL 25
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25
6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS 26
7. MATERIAIS 27
7.1. Kit de Extração de DNA 27
7.2. Marcador molecular 27
7.3. Enzima de Restrição 27
7.4. Taq polimerase 27
7.5. Primers 27
7.6. Gel Loading Dye Purple (6x) 27
7.7. Controles 27
7.8. Anti-soro 28
8. MÉTODOLOGIA 29
8.1. Análise estatística 29
8.2. Amostras de doadores de sangue 29
8.2.1. Critérios de Inclusão e Exclusão 29
***8.2.2.* Número de participantes da pesquisa** 30
8.3. Extração de DNA 30
8.4. GENOTIPAGEM 31
9. RESULTADOS 35
10. DISCUSSÃO 36
11. CONCLUSÕES 43
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 44

1. INTRODUÇÃO

Durante quase 30 anos o sistema de grupo sanguíneo Diego ficou limitado a dois antígenos apenas, Di^a e Di^b, e através de novas investigações e estudos moleculares subsequentes foram classificados mais 20 antígenos a este sistema, sendo 17 novos antígenos incluídos no período de 1995 a 1998, dois no ano 2000 e um (antígeno DISK) em 2010 (POOLE et al. 2010). Na prática transfusional, o antígeno Di^a é considerado o mais importante devido a sua imunogenicidade e ao significado clínico do seu anticorpo correspondente, com envolvimento em reações transfusionais hemolíticas e doença hemolítica perinatal (DHPN).

1.1. Histórico

O primeiro caso de antígeno associado ao sistema Diego foi relatado em por Layrisse, Arends e Dominguez (1955) através de um caso de DHPN na *Maternidad Concepción*, Caracas. Ao nascer, a criança aparentou estar normal clínica e hematologicamente, porém evoluiu com icterícia após 12 horas que se tornou cada vez mais grave até o óbito em três dias. Nesta época ainda não era realizada a dosagem de bilirrubina, porém diante dos sintomas clínicos foi fechado o diagnóstico de DHPN. Amostras de soro da mãe foram encaminhadas para o Centro de Investigações do Banco de Sangue de Caracas e instaurou-se investigação do caso. Embora o teste de antiglobulina direta (TAD) no sangue da criança fosse positivo reagindo fortemente, nenhum anticorpo foi identificado no soro materno quando testado com painel de células selecionadas. Não foram incluídos testes com o sangue do pai e incompatibilidades ABO ou Rh foram descartadas. Suspeitou-se então de um anticorpo de baixa incidência. Este foi descrito como um dos seis anticorpos chamados de “privados” ou “fator sanguíneo familiar”, que era restrito a uma única família, como eles acreditavam. Meses após, foi realizado um teste com as hemácias do pai e o soro da mãe e observado uma reação forte de aglutinação. O novo antígeno descoberto, presente nas hemácias do pai e do feto foi denominado Diego em homenagem ao nome da família (LAYRISSE; ARENDS; DOMINGUEZ, 1955; LEVINE, 1954).

Em 1955 a mãe aloimunizada com o anticorpo anti-Diego procurou Layrisse e informou uma nova gestação, tornando possível maiores investigações. Foram estudadas quatro gerações desta família, notando que apesar da grande parte dos

membros serem caucasianos, alguns apresentavam traços indígenas, revelando assim a miscigenação racial. Com base nas informações obtidas, começaram a observar características físicas da população de diferentes países, testando 286 indivíduos com soro anti-Diego pelo teste indireto de antiglobulinahumana. A frequência do antígeno nas populações encontradas contrariou a teoria de que era um fator restrito a uma só família e demonstrou que era um antígeno de incidência relativamente alta na Venezuela e provavelmente na América do Sul, com influência genética e antropológica e que induzia a formação de um anticorpo de significância clínica.

Após treze anos (1967), Thompson, Childers e Hatcher identificaram outro antígeno no grupo sanguíneo Diego através de um novo anticorpo contra um antígeno de alta frequência populacional encontrado no soro de 2 índias mexicanas multíparas previamente transfundidas, sendo este antígeno então denominado $Diego^{b}$ e antitético ao primeiro antígeno descoberto denominado $Diego^{a}$. O conhecimento das bases moleculares do sistema do grupo sanguíneo Diego e o desenvolvimento de ensaios moleculares para identificar seus alelos permitiram melhor avaliação da frequência dos alelos *DI*A* e *DI*B* em diferentes populações.

1.2. Sistema Diego

Segundo a classificação da ISBT (International Society of Blood Transfusion), o sistema Diego corresponde ao número 010, e o símbolo do sistema é DI. Atualmente conta com 22 antígenos classificados e é um sistema em expansão. Possui três antígenos de alta incidência - Di^{b}, encontrado universalmente na maioria das populações (Dean, 2005), Wr^{b} e DISK – e três pares de antígenos antitéticos - Di^{a}/Di^{b}, Wr^{a}/Wr^{b} e o mais recentemente descoberto DISK, antitético ao Wu. Os outros 16 antígenos aqui não mencionados, porém descritos em tabela (Tabela 1), são de baixa incidência populacional e seus anticorpos sem importância clínica conhecida. Já os anticorpos correspondentes dos antígenos Di^{a}, Di^{b} e Wr^{a} são os mais significativos, pois são capazes de induzir a formação de anticorpos implicados em reações transfusionais hemolíticas e DHPN moderada a grave (FIGUEROA, 2013).

Tabela 2: Nomes para os alelos do grupo sanguíneo DI (ISBT 010).

				*DI*02* codifica Di^b, Wr^b, DISK
Fenótipo	**Nome do Alelo**	**Mudança de Nucleotídeo**	**Exon**	**Alteração de Aminoácidos**
DI:1,–2 or Di(a+b-)	*DI*01* or *DI*A*	c.2561C>T	19	p.Pro854Leu
DI:–1,2 or Di(a–b+)	*DI*02* or *DI*B*			
DI:3,–4 or Wr(a+b–)	*DI*02.03*	c.1972G>A	16	p.Glu658Lys
DI:5 or Wd(a+)	*DI*02.05*	c.1669G>A	14	p.Val557Met
DI:6 or Rb(a+)	*DI*02.06*	c.1643C>T	14	p.Pro548Leu
DI:7 or WARR+	*DI*02.07*	c.1655C>T	14	p.Thr552Ile
DI:8 or ELO+	*DI*02.08*	c.1294C>T	12	p.Arg432Trp
DI:9,–22 or Wu+, DISK–	*DI*02.09*	c.1694G>C	14	p.Gly565Ala [1]
DI:10 or Bp(a+)	*DI*02.10*	c.1707C>A	14	p.Asn569Lys
DI:11 or Mo(a+)	*DI*02.11*	c.1967G>A	16	p.Arg656His
DI:12 or Hg(a+)	*DI*02.12*	c.1966C>T	16	p.Arg656Cys
DI:13 or Vg(a+)	*DI*02.13*	c.1663T>C	14	p.Tyr555His
DI:14 or Sw(a+)	*DI*02.14.01*	c.1937G>A	16	p.Arg646Gln
DI:14 or Sw(a+)	*DI*02.14.02*	c.1936C>T	16	p.Arg646Trp
DI:15 or BOW+	*DI*02.15*	c.1681C>T	14	p.Pro561Ser
DI:16 or NFLD+	*DI*02.16*	c.1287A>T; c.1681C>G	12 14	p.Glu429Asp; p.Pro561Ala
DI:17 or Jn(a+)	*DI*02.17*	c.1696C>T	14	p.Pro566Ser
DI:18 or KREP+	*DI*02.18*	c.1696C>G	14	p.Pro566Ala
DI:19 or Tr(a+)	*DI*02.19*	c.1653G>C	14	p.Lys551Asn
DI:20 or Fr(a+)	*DI*02.20*	c.1438G>A	13	p.Glu480Lys
DI:21 or SW1+	*DI*02.21 idêntico a DI*02.14.02?*	c.1936C>T	16	p.Arg646Trp
Fenótipo nulo				
Di(a–b–)	*DI*02N.01*	c.1462G>A	13	p.Val488Met [2]

Fonte: ISBT - International Society of Blood Transfusion.
Disponível em: <http://www.isbtweb.org> Acesso em: jun. 2019.

Os primeiros 3 relatos de anticorpos com especificidade anti-Di^a estavam envolvidos em casos de DHPN grave e estudos posteriores demonstraram a formação do anticorpo já durante a gravidez. Apesar de estar mais associado à DHPN, alguns estudos demonstraram sua capacidade de ativar complemento e causar hemólise in vitro, logo o risco de reações transfusionais imediatas ou tardias graves. (FIGUEROA, 2013)

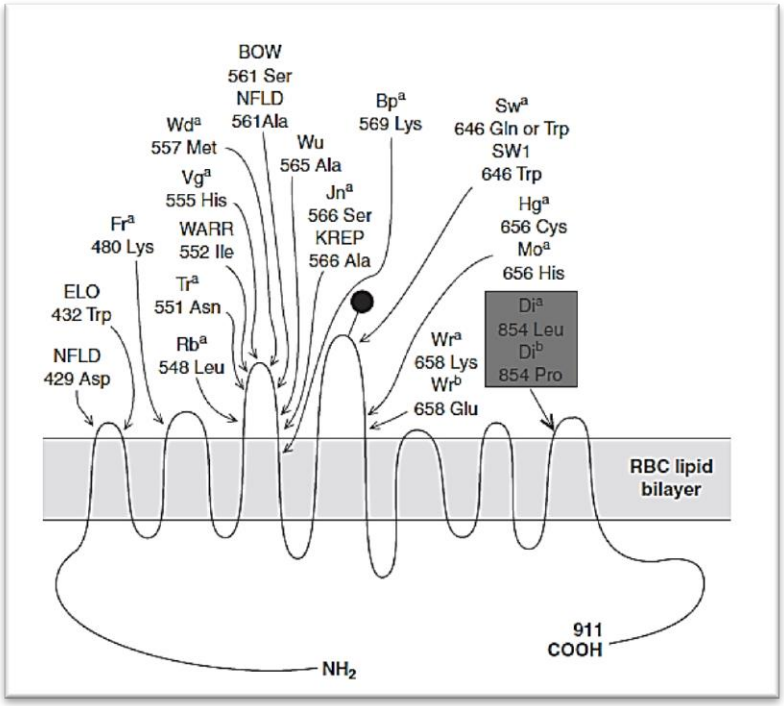
O evento imunológico de desenvolvimento de anticorpos anti-Di^a ocorre mais comumente durante parto por cesariana, quando há hemorragia materno-fetal, podendo ocorrer também após trauma, ou procedimentos como amniocentese, cordocentese, aborto e outros que envolvem sangramento. Porém, a aloimunização nesses casos só se dá através da troca sanguínea entre mulher negativa para Di^a e feto que herdou o antígeno do pai. Hundric-Haspl et al. (2003) relataram um caso de DHPN em uma criança de 3 semanas que recebeu alta 3 dias logo após o nascimento, clinicamente saudável. Cinco dias após, foi readmitida com anemia e hiperbilirrubinemia moderada. O teste de antiglobulina direta (TAD) já se mostrava positivo no nascimento, porém com eluato negativo. Os testes foram repetidos, desta vez utilizando células Di^a positivas e foi identificado o anti-Di^a no soro da mãe e no eluato do RN. A mulher tinha história de duas gravidezes anteriores, nunca tinha sido transfundida e teve sangramento abaixo do saco gestacional no início da terceira gestação. O recém-nascido foi tratado com fototerapia e injeção de eritropoietina com sucesso. A aloimunização já havia ocorrido, porém não detectada, pois as células de triagem eram negativas para o antígeno Diego.

1.3. Banda 3 e o gene *SLC4A1*

Composta de 911 aminoácidos, a banda 3 é a proteína de membrana mais abundante no eritrócito, correspondendo a cerca de 25% do total de proteínas, o que pode representar mais de um milhão de cópias por célula (POOLE, 1999). É uma proteína de 95kD com múltiplas passagens pela membrana da hemácia, atravessando a membrana 14 vezes (Figura1). Sua expressão é limitada aos eritrócitos e aos rins nas células dos túbulos distais e coletores, onde está envolvida na secreção ácida. Nas hemácias, seus domínios transmembranares funcionam como transportador de ânions bicarbonato (HCO^3) e cloro (Cl^-), participando do transporte de dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões; enquanto a região

amino-terminal da proteína é fundamental para manter a integridade celular através da sua interação com o citoesqueleto auxiliando na ancoragem da membrana ao esqueleto da espectrina subjacente, mantendo a forma bicôncava e conferindo estabilidade e flexibilidade celular.

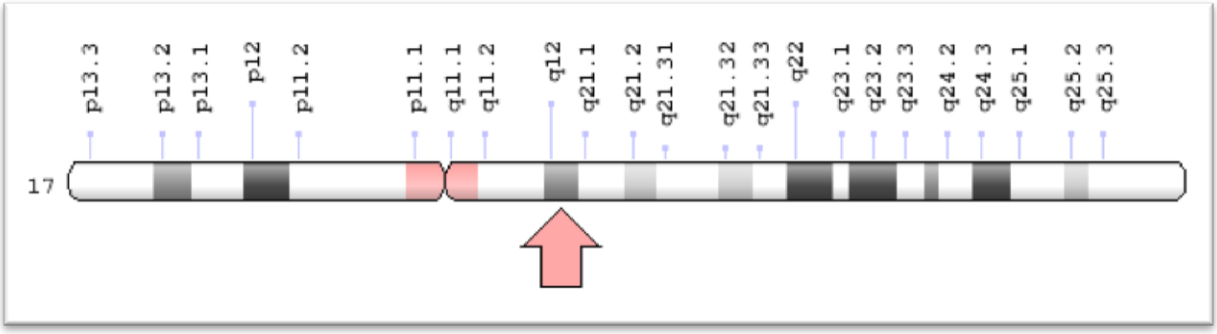
Figura 1: Representação esquemática da Proteína Banda 3 e a localização dos antígenos do sistema Diego com destaque para os antígenos estudados nesta pesquisa - Di^a/Di^b.



Fonte: Adaptado de REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012).

O gene que codifica a Banda 3 é o *SLC4A1*, localizado no cromossomo 17q12-q21 (Figura 2) e está organizado em 20 exons dentro de uma sequência genômica de 20 Kb. O símbolo alternativo do gene é AE1, que significa *Anion Exchanger 1* (Trocador aniônico). Diversas formas variantes da banda 3 têm sido descritas na literatura, pois o *SLC4A1* se trata de gene altamente polimórfico (BRUCE et al. 1994). Estas variantes podem ser relacionadas a patologias tais como, Neuroacantocitose (HARDIE et al. 1991; KAY et al. 1991), Esferocitose hereditária (HS) (JAROLIM et al. 1992), Ovalocitose do sul da Ásia (SAO) (JAROLIM et al. 1991; MOHANDAS et al. 1992; SCHOFIELD et al. 1992; TANNER, 1997), a alterações na sua atividade de transporte de anions, tais como a banda 3-Memphis (JAROLIM et al. 1992) e a Banda 3 HT (High Transport) (BRUCE, 1993); bem como a expressão dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo Diego (DEAN, 2005).

Figura 2 - Localização citogenética do gene SLC4A1 no cromossomo 17, braço longo (17q12-21).



Fonte: Genetics Home Reference – US National Library of Medicine.
Disponível em <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SLC4A1#location> Acesso em: jun. 2019.

O polimorfismo Di^a/Di^b resulta da substituição de um único aminoácido na 7^a alça extracelular, entre os segmentos intramembranares 13 e 14, da proteína banda 3 (troca do nucleotídeo 2561C>T no gene *SLC4A1*). A expressão do antígeno Di^a é determinada pela presença de Leucina na posição 854, enquanto que a expressão do antígeno Di^b é caracterizada pela presença de Prolina na mesma posição da cadeia polipeptídica da banda 3 (BRUCE et al. 1994). Após o sequenciamento do gene *SLC4A1* da Banda 3 (TANNER; MARTIN; HIGH, 1988) e a descoberta da localização dos alelos *DI A* e *DI B* (BRUCE et al. 1994), novos antígenos foram incorporados a este sistema.

O fenótipo Diego null Di(a-b-) não foi detectado em nenhum indivíduo saudável, refletindo a importância fisiológica da Banda 3, podendo ser considerado incompatível com a vida (COZAC, 2004; LAYRISSE; ARENDS; DOMINGUEZ, 1955).

1.4. Antígeno Diego como marcador antropológico

O antígeno Di^a é raro entre caucasianos e negros, mas relativamente comum entre índios sul americanos e asiáticos de origem mongol. Como o antígeno Di^a geralmente é detectado em pessoas orientais, como chineses e japoneses, e por essas populações compartilharem da mesma ancestralidade, ele é chamado de fator mongolóide. A diferença de prevalência deste antígeno torna de interesse para a antropologia e à medicina transfusional (WEI, 2013; KOMATSU et al. 2004).

A porcentagem do fenótipo Di(a+) na população geral, segundo Poole (1999), é inferior a 0,1%, quando excluídos asiáticos e índios, portanto, uma alta incidência deste alelo em doadores de sangue de determinada população sugere uma importante participação destas raças na miscigenação das regiões estudadas.

Junqueira e Castilho (2002) usaram o teste de antiglobulina indireto com soro anti-Di^a para estudar dois grupos de índios brasileiros: Carajas, grupo residente em Santa Izabel - MT e Kaingaques, localizados em uma reserva próxima a Palmas - PR. Em 36% das amostras coletadas entre os Carajás houve reação positiva e entre os Kaingaques o resultado subiu para 46%. Indicadores mais atuais de grandes hemocentros brasileiros vêm demonstrando que o antígeno Di^a possui representatividade importante na população, logo o risco de aloimunização é grande e, portanto, deve ser investigado em doadores e pacientes e na rotina pré-natal para garantir a segurança transfusional e materno-fetal.

No entanto, a prevalência do antígeno Di^a entre as populações ainda não está bem definida (KOMATSU et al. 2004). Anticorpos contra antígenos de baixa incidência, são mais difíceis de identificar na rotina pré-transfusional pois as células de triagem e de painel muitas vezes não expressam esses antígenos.

Células de triagem de anticorpos usadas na Coréia, por exemplo, são na sua maioria importadas da Europa e, portanto, produzidas com hemácias de populações onde o antígeno é raramente encontrado, o que impossibilitaria a detecção do anti-Di^a (MUN; LEE; NO, 2012). Entre os coreanos a frequência do antígeno é relativamente alta, estimada em 6,4-14,5%, consequentemente, a frequência do anticorpo anti-Di^a também. Um caso de reação transfusional hemolítica aguda foi relatado na Coréia em 2012. O paciente foi tipado como O Rh positivo e apresentou pesquisa de anticorpo irregular (PAI) e prova cruzada negativas. Durante uma cirurgia de artroplastia de joelho recebeu 2 unidades de concentrado de hemácias e não houve nenhum episódio de reação transfusional no pós-operatório. Duas semanas após, passou por uma nova cirurgia, agora do joelho esquerdo. Recebeu transfusão novamente e 5 minutos após, notaram a urina com cor avermelhada, suspeita de hemoglobinúria. Foi solicitada então a repetição de todos os testes pré-transfusionais incluindo TAD e urinálise e como tratamento imediato, foi administrado 10mg de furosemida. Os resultados demostraram compatibilidade entre o sangue transfundido e o do paciente, PAI negativa, porém com TAD positivo.

A amostra foi encaminhada para outro laboratório que identificou a presença de anti-Di^a (MUN; LEE; NO, 2012).

Apesar da dificuldade em se obter soro anti-Di^a para fenotipar hemácias de doadores, os avanços tecnológicos no diagnóstico molecular e a clonagem e sequenciamento do gene *SLC4A1* que codifica a banda 3, permitem atualmente identificar com segurança os genes alelos *DI*A/DI*B* utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Assim, através da genotipagem é possível determinar a frequência destes alelos nas diferentes populações e encontrar hemácias de doadores Di(a+) que possam ser incluídas nos reagentes de triagem e painéis de identificação de anticorpos.

2. HIPÓTESE

A grande miscigenação populacional definiu um novo perfil fenotípico e imunohematológico, pois o aumento do antígeno Di^a na população doadora ocasionou aumento na incidência do anticorpo correspondente nos receptores (pacientes). Raros são os estudos que demonstram a representatividade deste antígeno nas diferentes regiões brasileiras. A miscigenação da população do Distrito Federal (DF) é um fator determinante deste novo perfil e espera-se encontrar uma frequência do antígeno Di^a maior que a citada na literatura.

3. JUSTIFICATIVA

A triagem sorológica com uso de hemácias positivas para o antígeno Di^a é recomendada nas rotinas pré-natais e pré-transfusionais e painéis de identificação devem preferencialmente conter mais de uma célula positiva para critérios de exclusão.

Sabe-se que o anticorpo anti-Di^a pode causar hiperbilirrubinemia no neonato, pois a reação com as células do neonato é tão forte quanto em células de adulto e diferentemente do sistema Rh, não existe profilaxia para a sensibilização pelo antígeno Di^a (HUNDRIC-HASPL, 2003). A presença de anticorpos anti-Di^a na circulação da gestante ainda não é identificada na rotina pré-natal, pois o antígeno muitas vezes não está presente nas células de triagem ou simplesmente por não incluir a PAI na bateria de exames obrigatórios (NARDOZZA, 2007).

Por se tratar de reagente de alto custo, o soro comercial não está disponível em todos os serviços. É um dos motivos pelo qual não é incluído o antígeno na fenotipagem estendida dos pacientes politransfundidos. Sendo estes então, os mais susceptíveis à aloimunização por anti-Di^a. Estudo recente realizado no HBDF – Hospital de Base do Distrito Federal demonstrou incidência de 13,5% do anticorpo contra o antígeno Di^a entre os pacientes portadores de anemia falciforme submetidos ao procedimento de exsanguíneo transfusão, confirmando a necessidade de um método para a detecção do mesmo (LUSTOSA; ROCHA; PRAZERES, 2016).

4.OBJETIVO GERAL

Demonstrar a representatividade do antígeno Di^a no DF de acordo com os números de prevalência na população doadora, bem como sua relevância na medicina transfusional e materno-fetal diante da incidência do seu anticorpo nos receptores do DF.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de antígeno Di^a entre os doadores voluntários de sangue do DF e comparar com outras populações das diferentes regiões do país.
- Determinar a incidência do anticorpo anti-Di^a nos pacientes atendidos pela rede do DF.
- Reforçar obrigatoriedade de células positivas para Di^a nos kits de triagem e painel de hemácias para identificação de anticorpo.
- Reforçar a importância da identificação de anticorpos irregulares na rotina pré-natal.

6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O uso das amostras dos doadores de sangue foi autorizado mediante TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido) já existente assinado no momento que antecede a doação, no qual expressa a seguinte mensagem “Autorizo a utilização dos dados e materiais coletados para fins de estatística e pesquisa, resguardando o sigilo das informações”. A pesquisa só terá início após aprovação por este comitê.

Dentre os riscos aos envolvidos, estão o vazamento de dados de identificação e reações adversas no local da punção para obtenção de amostra. Para estes riscos, há providências que deverão ser tomadas para minimizá-los.

O protocolo de identificação com os dados do doador/paciente será mantido em sigilo, sem identificação nominal, sendo esta substituída por identificação numérica, assegurando o direito do sigilo pré-estabelecido nas determinações da Resolução CNS 466/2012.

A participação requer a doação de 5ml de sangue periférico. Serão utilizadas as mesmas amostras coletadas antes da doação de sangue total, utilizadas para os exames imnohematológicos de rotina. Tal conduta evita uma nova punção exclusiva para a pesquisa. O procedimento não afeta a saúde dos voluntários, mas pode haver a presença de dor ou hematoma no local da punção venosa. Os materiais utilizados para a coleta serão descartáveis, estéreis e apirogênicos, de maneira a eliminar quaisquer riscos importantes. Eventualmente, a pesquisadora poderá realizar um procedimento de coleta exclusiva para obtenção da amostra para a pesquisa, somente em casos de pacientes aloimunizados com resultado inconclusivo para a pesquisa do antígeno em questão.

A pesquisadora responsável e aceita as responsabilidades pela condução científica do projeto e garante a não utilização do material genético e dos dados obtidos nesta pesquisa para qualquer outro projeto de pesquisa ou fins não citados neste projeto. Todo o material biológico será descartado corretamente ao final do estudo. Os resultados deste estudo poderão ajudar na conduta transfusional de pacientes em transfusão crônica e/ou aloimunizados.

7. MATERIAIS

7.1. Kit de Extração de DNA

Para a extração de DNA genômico, foi utilizado o kit comercial *ReliaPrepTM Blood gDNA Miniprep System* da empresa Promega® Madison,WI.

7.2. Marcador molecular

Foi utilizado marcador molecular de nome comercial: 100bp DNA Ladder do fabricante Promega Corporation®, Madison, WI.

7.3. Enzima de Restrição

A enzima utilizada foi a MspI da *New England BioLab*®, Ipswich, MA.

7.4. Taq polimerase

A Taq polimerase usada nas reações são da Promega Corporation®, Madison, WI.

7.5. Primers

Os primers Diego Sense e Antisense são da IDT - *Integrated DNA Technologies*®, Coralville, IA.

Tabela 3 - *Primers SENSE e AntiSENSE.*

SENSE	ANTISENSE
Peso molecular: 6.0068g/mol	Peso molecular: 6,182.1 g/mol
25 nmole DNA Oligo, 20 BASES	25 nmole DNA Oligo, 20 BASES

Fonte: IDT – Integrated DNA Technologies – Bula do Primer.

7.6. Gel Loading Dye Purple (6x)

Corante de carregamento da New England BioLab®, Ipswich, MA.

7.7. Controles

Para validação da genotipagem foram utilizadas duas amostras de fenótipo conhecido e com genótipos previamente determinados *DI*B/DI*B* e *DI*A/DI*B*, fornecidas pelo laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos do

Hemocentro da Unicamp. Estes, juntos com o marcador molecular auxiliaram na definição do genótipo através do padrão de separação das bandas.

7.8. Anti-soro

O anti-soro anti-Di^a foi produzido *in house* através de amostra de paciente com tipagem ABO conhecida, “AB”, aloimunizado isoladamente para Di^a. O mesmo foi previamente testado e validado. Em todas as reações foram utilizadas como controle positivo e negativo as células de triagem.

8. MÉTODOLOGIA

Trata-se de estudo observacional descritivo transversal, onde as amostras dos doadores voluntários eram as mesmas utilizadas nos exames imunohematológicos colhidas no ato da doação. As amostras foram submetidas à extração de DNA para então serem analisadas em técnica de PCR-RFLP, ou seja, reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) seguida por análise de fragmentos com enzimas de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), para a detecção dos alelos *DI*A* e *DI*B*. As amostras cedidas pela Fundação Hemocentro de Brasília (FHB) foram analisadas no do Laboratório de Imunologia de Transplantes (LIT) da própria instituição utilizando de todo seu maquinário e insumos.

As 305 amostras de sangue foram investigadas, inicialmente, através de técnica de genotipagem, determinando a presença dos alelos *DI*A* e *DI*B*. Na presença do alelo *DI*A* realizou-se a fenotipagem do antígeno Di^a por técnicas sorológicas, para constatar concordância entre fenótipo e genótipo.

8.1. Análise estatística

Os dados foram avaliados usando análises estatísticas descritivas por meio de frequências absolutas e porcentagens, e os resultados foram organizados em tabelas.

8.2. Amostras de doadores de sangue

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética de Pesquisa CEP/FEPECS/SES/DF (Parecer n°: 2.231.206), foram coletadas amostras de sangue anticoaguladas com EDTA de 400 doadores voluntários de sangue atendidos na FHB no período de março de 2018 a abril de 2018. As amostras foram associadas à numeração de 001 a 400 de modo aleatório, sem distinção por tipagem sanguínea, sexo, número de doações ou qualquer outra característica diferencial. Foram excluídas apenas amostras em quarentena aguardando resultado confirmatório de sorologia positiva.

8.3. Critérios de Inclusão e Exclusão:

Para a realização deste estudo foi utilizada amostragem aleatória simples, sem distinção sexo ou idade para doadores voluntários e serão incorporados ao

estudo dados quantitativos de pacientes aloimunizados atendidos pela rede de hospitais da Secretaria de Saúde do DF.

Para doadores de sangue o critério de inclusão foi passar pela triagem clínica e ser aceito para efetuar a coleta de acordo com os preceitos definidos pelo Ministério da Saúde. E como critério de exclusão, todos aqueles que forem impedidos de doar por questões de segurança. As amostras serão obtidas no ato da doação por punção venosa e em tubos com EDTA.

Para pacientes, o critério de exclusão foi a PAI negativa, e como critério de inclusão a PAI positiva com identificação prévia do anti-Di^a. Foram apenas analisados os registros do sistema automatizado.

8.3.1. Número de participantes da pesquisa

Foi utilizada a fórmula para cálculo de amostragem de população finita (Figura 3), levando em consideração a quantidade anual de candidatos à doação que de fato efetuaram a mesma, considerando nível de confiança de 95% e erro amostral de 0.05%.

Figura 3 - Fórmula para cálculo de amostragem de população finita e legenda.

$$n = \frac{N \cdot \hat{p} \cdot \hat{q} \cdot \left(Z_{\alpha/2}\right)^2}{\hat{p} \cdot \hat{q} \cdot \left(Z_{\alpha/2}\right)^2 + (N-1) \cdot E^2}$$

Onde:

n = número de indivíduos na amostra

Z α/2 = valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado.

p = proporção populacional de indivíduos Di^a positivo

q = proporção populacional de indivíduos Di^a negativo (q = 1 – p).

E = Margem de erro ou Erro de Estimativa

Fonte: Próprio Autor.

8.4. Extração de DNA

Após identificação, as amostras de sangue foram submetidas ao processo de extração de DNA genômico utilizando o kit comercial *ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System* da empresa Promega® (Madison,US) de acordo com o

recomendado pelo fabricante do Kit utilizado. O volume obtido ao final foi de 150ul de DNA de cada amostra de sangue coletado.

Após a extração e identificação correta de cada DNA, os tubos foram armazenados corretamente, em freezer a -30ºC, para posterior quantificação dos mesmos. A qualidade de todos os DNAs extraídos foi analisada, avaliando-se a densidade óptica na relação 260/280, onde valores de D.O. entre 1,7 e 1,9 e concentrações maiores que 50ng/µL foram considerados ideais para o sucesso da amplificação. Com adaptações no protocolo de PCR, foram incluídas também as amostras com concentrações acima de 20ng/µL.

8.5. GENOTIPAGEM

A genotipagem para o grupo sanguíneo Diego foi realizada por meio de PCR-RFLP (PCR seguida por análise de fragmentos com enzimas de fragmentação). Os reagentes foram fornecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos do Hemocentro da Unicamp.

As amostras foram segregadas de acordo com a concentração de DNA (>20ng/µL ou <20ng/µL) e, a fim de se obter a melhor performance possível no ensaio, foram utilizadas apenas aquelas consideradas de bom rendimento (>20ng/µL).

O procedimento seguiu protocolo específico descrito na Tabela 3, validado pelo Laboratório supracitado, garantindo assim a reprodutibilidade do teste. O espaço físico, equipamentos e materiais utilizados são do LIT/FHB.

Tabela 4 - Protocolo de PCR para *DI*A/DI*B.*

PCR: DIEGO*A/B	Amostra com **BOA** concentração
Água de injeção	34,4
10X PCR buffer (com 15mM MgCl2)	5
$MgCl_2$	2
dNTP (10mM)	1
DIEGO F (100ng/µL) <= 100 ng/µL	1
DIEGO R (100ng/µL) <= 90 ng/µL	1,1
Taq polymerase (5.0 U)	0,5
Volume do Mix	**45**
DNA (100ng/µl)	5
Volume final	**50**
Programa do Termociclador: 95ºC-5min; (94ºC-20seg, 62ºC-20seg, 72ºC-20seg) por 35 ciclos, então, 72ºC 10min e 4ºC∞).	

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos do Hemocentro – Unicamp.

Os ensaios de PCR foram projetados para amplificar um segmento de 149pb na corrida eletroforética do exon 19 de SLC4A1 para confirmação da amplificação.

Em todas as reações de PCR um tubo contendo água foi utilizado como controle negativo da reação. Os primers, sequência de oligonucleotídeos sintéticos, usados para determinar os alelos *DI*A/DI*B* foram descritos em tabela (Tabela 4).

Tabela 4 - Sequência de oligonucleotídeos dos Primers utilizados.

Primer	Oligonucleotídeos
Diego SENSE	5'- TGG CGC ATG CAC TTA TTC AC -3'
Diego ANTISENSE	5'- TCC CTG AAG ATG AGC GGC AG -3'

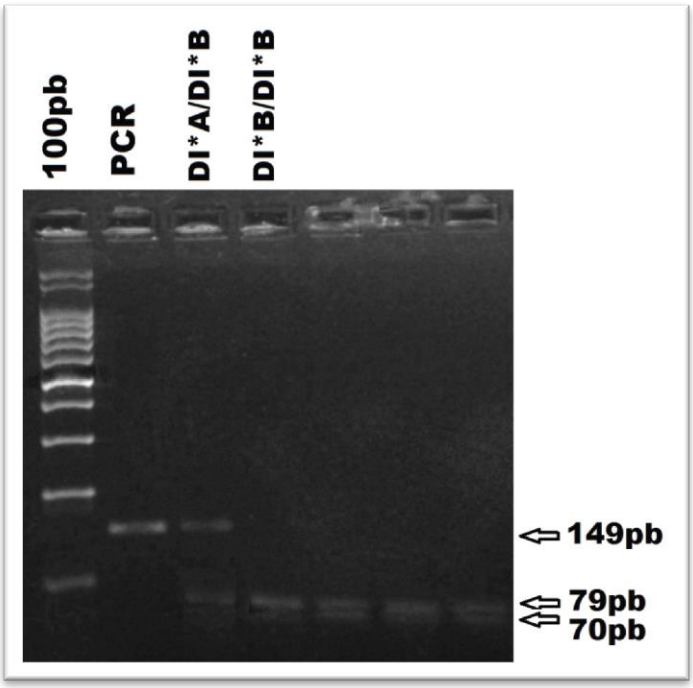
Fonte: IDT – Integrated DNA Technologies – Bula do Primer.

O produto final da PCR foi analisado em gel de agarose a 2% preparado em tampão TBE 1X contendo o corante Brometo de etídio, para certificar que houve a amplificação. Em todos os géis, um marcador de 100pb foi utilizado. O gel de agarose foi submetido à corrente elétrica por 20 minutos a 80Volts e a visualização foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

8.6. Enzima de Restrição

A enzima de restrição MSPI não reconhece o sítio de restrição do polimorfismo *DI*A,* mas reconhece o sítio de restrição do alelo *DI*B*. Assim, foi possível diferenciar os alelos *DI*A* e *DI*B*. A ação da enzima, diante do polimorfismo cliva o produto de amplificação do exon 19 gerando 2 bandas de 70 e 79pb quando revelado em gel de agarose após corrida eletroforética (Figura 4). Na ausência do polimorfismo do alelo *DI*B* o sítio de restrição é abolido, portanto, visualiza-se uma banda única de 149pb (alelo *DI*A*). A enzima utilizada, da new *England BioLab*® é qualificada como *Time-Saver*, ou seja, capaz de digerir o substrato de DNA em 15 minutos.

Figura 4 - Corrida em Gel de agarose. Padrão para amplificação e Digestão dos fragmentos para idenficação doa lelos *DI*A/DI*B* com ladder de 100pb.



Fonte: Próprio Autor.

O procedimento para a digestão seguiu protocolo específico e validado descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Protocolo de digestão da enzima Mspl para identificação dos alelos *DI*A/DI*B.*

PCR: DIEGO*A/B	Amostra com **BOA** concentração
Água de injeção	7,5
Buffer	2
Enzima: Mspl	0,5
Volume do Mix	**10**
Produto de PCR (amplicon)	10
Volume final	**20**
Incubar a 37ºC - 15min.Alelos: *DI*A*= 149pb *DI*B*= 79pb e 70pb.	

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos do Hemocentro – Unicamp.

8.7. Pesquisa do Antígeno Dia

A pesquisa do antígeno Di^a foi realizada através da técnica de hemaglutinação em gel utilizando uma suspensão de hemácias a 0,1% de concentração (10µL de hemácias + 1000µL de ID-Diluente 2). Em seguida, são adicionados 50µL de suspensão da amostra de hemácias ao cartão e 25µL do soro

anti-Di^{a}. O ID-Cartão passa por incubação a 37ºC por 15 minutos em incubadora específica (ID-Incubadora) e depois por centrifugação de 10 minutos na ID-Centrífuga. A leitura da reação é feita de forma manual, considerando como reação positiva aquelas nas quais as hemácias permanecem suspensas pelo gel, parcialmente ou por toda extensão do gel. E uma reação negativa é onde todas as hemácias se movem para o fundo do gel (Figura 5). Para garantia de eficácia do soro, os reagentes de triagem com célula positiva e negativa para o antígeno Di^{a} foram usadas como controle negativo e positivo.

Figura 5 - Representação da técnica de gel com suas diferentes intensidades de aglutinação.

Fonte: Disponível em: <http://www.hu.ufsc.br/documentos/pop/servico_de_hemoterapia/POP_-_Teste_de_compatibilidade.pdf> Acesso em: jun. 2019.

9. RESULTADOS

Foi analisado um total de 305 amostras de doadores voluntários de sangue que compareceram à Fundação Hemocentro de Brasília. O genótipo *DI*B/DI*B* foi o mais frequente, presente em 294 amostras (3,6%), seguido de 11 amostras apresentando o alelo *DI*A* em heterozigose *DI*A/DI*B,* representando então o fenótipo Di^a positivo, o que constitui uma porcentagem genotípica de 96.4%. Nenhuma amostra foi genotipada como *DI*A/DI*A*, genótipo considerado muito raro. A frequência alélica neste grupo pesquisado foi de 0,02 para o alelo *DI*A* e 0,98 para *DI*B*.

Todas as amostras com presença do alelo *DI*A* foram testadas sorologicamente para avaliar a concordância entre fenótipo e genótipo. Houve concordância em 100% das amostras testadas. Foram realizados 305 RFLPs e 11 fenotipagens eritrocitárias determinadas pelo método de hemaglutinação em gel. A presença do antígeno Di^a foi confirmada com antissoro anti-Di^a produzido na própria unidade através de soro de pacientes aloimunizados e testados previamente. Já o antígeno Di^b, de alta frequência, não possui antissoros comerciais e nem caseiros para sua identificação.

Tabela 6 - Frequência genotípica e alélica em doadores para o Sistema Diego.

Genótipo	**Fenótipo**	**Amostras**	
		Freq.	**n**
DI*B / DI*B	Di(a-b+)	96.4%	294
DI*A / DI*B	Di(a+b+)	3.6%	11
			Total: 305
Antígeno	**Alelo**	**Frequência Alélica**	
Di^a	*DI*A*	0,01	
Di^b	*DI*B*	0,09	

Fonte: Próprio Autor.

10. DISCUSSÃO

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, sendo composta por etnias de três continentes ao longo de um período de cinco séculos, como os colonizadores europeus, escravos africanos e as populações indígenas locais, o que confere uma variabilidade genética e populações com alto grau de miscigenação, logo, pode haver frequências atípicas de determinados antígenos.

A fundação de Brasília ocorreu na década de 60 promovendo grande migração principalmente de paulistas, mineiros e nordestinos para a construção da então capital do Brasil. Esses ficaram conhecidos como candangos. Os novos moradores tornaram sua população sincrética e altamente miscigenada, misturando todas as raças representando a identidade de todo o Brasil. Estima-se que cerca de 30% da população residente no DF hoje seja imigrante, o que faz da cidade uma mistura muito rica de raças, cultura, costumes e culinária (GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL, 2019).

Sabe-se que o antígeno Di^a é marcador antropológico de descendentes de indígenas e asiáticos e, por se tratar de uma região onde a população é composta por indivíduos altamente miscigenados, o DF se torna importante objeto de estudo, uma vez que, atualmente vivem mais de 6 mil índios no seu território em área urbana. Os dados são apontados em uma pesquisa feita em 2015 pela Companhia de Planejamento do DF (Codeplan) com os moradores que se autodeclaram indígenas. E segundo o último censo demográfico do IBGE, há um valor 6 vezes maior de moradores que se dizem pertencer a raças ditas amarelas.

Tabela 6 - População residente no DF por Cor ou Raça e segundo a situação de domicílio.

População do Distrito Federal	***Cor ou raça***	
	Amarela	*Indígena*
2.570.160	*41.522*	*6.128*
%	*1.7*	*0.3*

Fonte: adaptado de IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Tabela 2094 - População residente por cor ou raça e religião.

Nos demais estados brasileiros, 96,5% da população autodeclarada indígena concentra-se principalmente na área urbana, bem como no DF, que tem a taxa de

97%. Sua distribuição nas regiões administrativas (RA) não apresenta padrão evidente, exceto por sua maior aparição em Ceilândia, onde estão 13% do povo indígena do DF. A FHB não possui múltiplos postos de coleta, sendo este serviço concentrado em uma única central, a qual além de efetuar as coletas, também processa e distribui hemocomponentes para as agências transfusionais de cada Hospital Regional. Portanto, toda população do DF se direciona à central para fazer as doações, logo, a RA na qual residem os doadores participantes desta pesquisa não foi informada.

Embora as frequências genotípicas dos alelos *DI*A/DI*B* de algumas regiões do Brasil já tenham sido avaliadas, na região Centro-Oeste, mais especificamente no DF, essa frequência permanecia desconhecida até então. Fato este que torna esta pesquisa inédita. A população brasileira é caracterizada por apresentar uma grande heterogeneidade genética e um nível de miscigenação progressivo e significativo (ORLANDO et al. 2000). Uma alta prevalência de um alelo raro na população pode ser um achado altamente relevante, acarretando implicações importantes na rotina transfusional do serviço.

O antígeno Di^a, até então considerado raro, teve prevalência de 3,6% entre os doadores de sangue do DF com representatividade de 11 amostras do total de 305. O genótipo *DI*B/DI*B*, constitui uma porcentagem genotípica de 96.4%. Os valores encontrados estão em concordância, com outro estudo realizado com doadores de sangue voluntários aleatórios de Maríla, São Paulo, onde 03 doadores apresentaram o antígeno em heterozigose levando a uma frequência alélica de 0,02 para o alelo *DI*A* e 0,98 para *DI*B*, com porcentagem de 3,2% para o genótipo *DI*A/DI*B*. (BALEOTTI, 2002).

Em Ribeirão Preto, estudo semelhante evidenciou valor cerca de duas vezes maior. Foram avaliados 392 doadores de sangue, sendo que 24 apresentaram positividade para o antígeno Di^a e todos em heterozigose, perfazendo uma prevalência de 6,12% com frequência alélica de 0,03. A análise utilizando o teste de Exato de Fisher, comparando estes estudos, não mostrou diferença estatística (p: 0,448) (COZAC,2004).

Estudo similar, ainda mais recente, avaliou 373 doadores voluntários de sangue, atendidos no Hemocentro de Santa Catarina (HEMOSC). O genótipo *DI*A/DI*B* também foi o menos frequente (5,6%), presente em 21 amostras e *DI*B/DI*B*, presente em 352 amostras (94,4%). Mais uma vez o genótipo *DI*A/DI*A*

não foi encontrado. A frequência alélica obtida foi de 0,03 para o alelo *DI*A* e de 0,97 para o alelo *DI*B* (COSTA, 2016). Os dados podem ser avaliados na Tabela 8.

Tabela 7 - Comparação das frequências genotípicas e alélicas entre estados brasileiros.

Genótipo	**Fenótipo**	***Presente Estudo Brasília,DF***		***BALEOTTI, 2002 Marília, SP***		***COZAC, 2004 Ribeirão Preto, SP***		***COSTA, 2016 Santa Catarina***	
		Freq.	**n**	**Freq.**	**N**	**Freq.**	**N**	**Freq.**	**N**
DI*B / DI*B	**Di(a-b+)**	96.4%	294	96.8%	90	93,8%	368	94.4%	352
DI*A / DI*B	**Di(a+b+)**	3.6%	11	3,2%	3	6,12%	24	5.6%	21
			Total: 305		Total: 93		Total: 392		Total: 373
Antígeno	**Alelo**	**Frequência Alélica**							
Di^a	***DI*A***	0,02		0,03		0,02		0,03	
Di^b	***DI*B***	0,98		0,97		0,98		0,97	

Fonte: Próprio Autor.

O fenótipo Di(a+b-) não foi encontrado em nenhuma pesquisa citada quando analisada população geral, sem distinção de raças. A homozigose para o alelo *DI*A* é considerada rara. No estudo de Baleotti (2002) o qual também estudou populações distintas por descendência, este genótipo foi encontrado em 27 índios pertencentes à tribo Parakanã, localizada no estado do Pará, em 1 descendente de japonês e nenhum descendente de africano. A frequência gênica do alelo *DI*A* (0,571) na população indígena foi alta quando comparada a outras populações, pois se trata de uma tribo fechada, não sofreu processo de miscigenação. A frequência do antígeno nos índios Parakanã (75,7%) foi superior a maior frequência já publicada (45,8%) que foi observada da tribo dos Kaingaques por Junqueira e Castilho (2002). O que afirma ainda mais ser um marcador de população indígena.

Em 2014, foram avaliados 209 doadores de sangue descendentes de japoneses no estado do Paraná (FLÔRES et al. 2014). A frequência do alelo *DI*A* foi de 4,31%, e as frequências dos genótipos foram 8,61% para *DI*A/DI*B* e 91,39% para *DI*B/DI*B*. Esta frequência foi semelhante à encontrada por Komatsu et al. *(2004)* em pessoas não relacionadas de Tóquio em 2014. Porém, se comparada à população brasileira, sem distinção de etnia, essa frequência é diferente (Tabela 9).

Tabela 8 - Frequências genotípicas de Diego[a] em descendentes de japoneses em comparação com japoneses e população brasileira mistas.

	FLÔRES, 2014	KOMATSU et al. 2004	Presente Estudo
Genótipo	Descendentes de japoneses (Paraná)	Japoneses	Brasileiros (DF)
DI*A / DI*A	0	0,001	0
DI*A / DI*B	0,086	0,086	0,036
DI*B / DI*B	0,913	0,912	0.964

Fonte: Próprio Autor.

Komatsu, em seu estudo, comparou a população de Ulaanbatar, Mongólia, com chineses e japoneses quanto à presença do antígeno Di^a. Concluiu que não houve diferença significativa na prevalência entre elas. Os autores sugere que essa similaridade ocorra pelo fato dessas populações compartilharem da mesma ancestralidade, ou seja, indicam que o antígeno Di^a é amplamente distribuído entre as populações de origem mongol.

Essa semelhança nas frequências entre brasileiros descendentes de japoneses e japoneses indicam fluxo gênico na população brasileira e reforça ainda mais a importância desse conhecimento para fornecer transfusão segura àqueles que dela necessitam.

Embora o genótipo *DI*A/DI*A* seja considerado muito raro, não sendo encontrado em nenhuma das pesquisas citadas feitas no Brasil, é importante para suprir a necessidade de possíveis pacientes sensibilizados com anticorpos anti-Di^b que requerem transfusão de sangue. O fenótipo Di(a+b-) apresenta frequência menor que 1% em populações caucasianas (REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012). Através de técnicas sorológicas é impossível selecionar uma bolsa compatível para este paciente devido à falta de reagente anti-Di^b. Neste caso, somente as técnicas de biologia molecular, as quais são capazes de distinguir os alelos *DI*A* e *DI*B*, poderiam auxiliar na resolução deste caso. A genotipagem vem sendo bastante utilizada na elucidação de problemas imunohematológicos complexos, como na identificação de sequências de DNA responsáveis pela expressão de antígenos raros.

Quanto ao gênero dos doadores, embora haja referências de que mulheres possam ter índices maiores de aloimunização, sabe-se que este risco pode ser

influenciado por gestações (SANTOS, 2007). Já a prevalência do antígeno não sofre esta influência, nem mesmo da idade.

A porcentagem do fenótipo Di^a na população geral dos doadores de sangue do DF, quando excluídos asiáticos e índios, é semelhante às outras regiões já estudadas, sugerindo a importante a participação das raças indígena e/ou asiática na miscigenação desta região, o que acarreta implicações transfusionais importantes, pois é possível que o índice de aloimunização ao antígeno Di^a também seja maior que o esperado.

Devido ao fato dos antígenos de grupos sanguíneos serem definidos geneticamente, a diversidade genotípica na população brasileira é bastante ampla, tornando-se, muitas vezes, uma tarefa árdua encontrar compatibilidade entre doadores e receptores de componentes sanguíneos, principalmente entre aqueles em programa de transfusão crônica, os quais ficam mais expostos e susceptíveis a aloimunização. Esse obstáculo pode ser contornado através da realização da fenotipagem eritrocitária para os antígenos mais frequentes das populações e, utilização de protocolos de sangue fenotipado.

A aloimunização eritrocitária por transfusão é fundamentada pela falta de identidade imunológica entre o receptor do sangue e o seu doador, desencadeando então a resposta imunológica contra os antígenos que estão ausentes na membrana de quem recebe. Vários fatores podem estar envolvidos na fisiopatologia da aloimunização, entre eles a influência das etnias, que definem diferentes padrões antigênicos, a imunogenicidade do antígeno, número e frequência das transfusões, a idade que se iniciaram as transfusões, o estado inflamatório crônico do paciente, e a herança de antígenos HLA (ROSSE,1990; SANTOS, 2007).

Um estudo retrospectivo realizado por CRUZ et al. *(*2011) no Hospital Israelita Albert Einstein em São Paulo relatou a incidência e a taxa de aloimunização em pacientes politransfundidos e os principais antígenos eritrocitários relacionados à aloimunização foram E > D > K > C >Di^a > c > Jk^a > S. Dos 57 casos de anticorpos para antígenos de baixa incidência, o anti-Di^a foi o anticorpo mais prevalente nessa população, isolado ou em combinação com outro anticorpo .

Estudo semelhante, realizado por Lustosa, Rocha e Prazeres (2016) no Hospital de Base do DF avaliou os pacientes em programa de transfusão crônica portadores da anemia falciforme. Dos 57 pacientes avaliados, 22 apresentavam PAI

positiva e a prevalência de anticorpos encontrada foi: anti-C > anti-E > anti-Di^a > anti-D > anti-Kell. Sete pacientes (31,8%) apresentaram apenas 1 anticorpo, sendo o anti-Di^a o mais prevalente entre eles. Em contraste com muitos dos anticorpos do sistema Diego, o anti-Di^a geralmente é encontrado como especificidade única, casualmente ocorre em associação a outros anticorpos para antígenos de baixa incidência (REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012).

Park et al. (2003) demonstraram resultado análogo na população asiático-mongolóide, com uma incidência do anticorpo anti-Di^a além da esperada. Dos 11.219 pacientes avaliados, 135 apresentaram resultados positivos na PAI e os anticorpos com maiores taxas de detecção foram: anti-E (36 casos), anti-Le^a (15 casos), anti-Di^a (8 casos), anti-M (6 casos), anti-E + anti-c (6 casos), anti-D (3 casos), e anti-E + anti-C (3 casos) com ordem decrescente.

Tabela 9 - Comparativos de Aloimunização de Pacientes Politransfundidos.

Local e Ano do estudo	**Ordem de incidência de Anticorpos**						
São Paulo, Brasil (2011)	E	D	K	C	Di^a	c	Jk^a
Brasília, Brasil (2016)	C	E	Di^a	D	Kell	-	-
Busan, Korea (2003)	E	Le^a	Di^a	M	E	c	D

Fonte: Próprio Autor.

Tais estudos foram importantes para a recomendação de inclusão do antígeno Di^a nos reagentes de triagem bem como nas células do painel de identificação de anticorpos, embora o mesmo seja considerado antígeno de baixa incidência. Já é de conhecimento global a importância clínica do anticorpo anti-Di^a e sua capacidade de causar reação transfusional grave e DHPN moderada a grave. É uma imunoglobulina de classe IgG com propriedade de ativar complemento e pode ser de ocorrência natural, porém são raros os casos.

Em Tóquio, Japão, FUTAGAWA et al. (2013) relataram um caso de transplante hepático com incompatibilidade sanguínea para o grupo Diego. A receptora era uma mulher de 47 anos de idade com cirrose biliar primária, e sua filha de 18 anos de idade foi a doadora. Testes sorológicos pré-operatórios identificaram a presença de anticorpos contra o antígeno Di^a e Jk^a na receptora. Já a doadora, possuía fenótipo Di^a positivo e Jk^a negativo. Até então, poucos casos com disparidade para o grupo sanguíneo Diego em transplantes tinham sido relatados e

o estudo em questão apresentou detalhes de acompanhamento de longo prazo. O curso clínico da paciente mostrou resultado favorável após o transplante mesmo com a incompatibilidade, indicando que o procedimento pode ser realizado com segurança desde que se assegure que o enxerto está desprovido de sangue residual.

Já no transplante renal, no entanto, o transplante deve ser realizado com cuidado, pois a proteína banda 3 contendo antígenos Diego está presente nos túbulos renais. Embora a proteína banda 3 seja expressa nas células vermelhas do sangue em sinusóides, não é expressa no fígado saudável e, mesmo se for encontrado em um nível de mRNA, os níveis são extremamente baixos.

Considerando a frequência do antígeno Di^a encontrada na população local, os casos relatados de DHPN e de reações hemolíticas relacionadas ao anti-Di^a, seu impacto clínico é indiscutível.

A fenotipagem eritrocitária em pacientes politransfundidos é essencial para minimizar os riscos de complicações devido à aloimunização e garantir a disponibilidade de sangue compatível. A fenotipagem do antígeno Di^a por métodos sorológicos além de ser uma técnica dispendiosa, não possibilita a análise em maior escala e, portanto, a genotipagem vem sendo cada vez mais adotada pelos serviços hemoterápicos. Diferentes metodologias têm sido utilizadas incluindo técnicas de PCR convencionais, PCR em tempo real e plataformas de genotipagem em larga escala. Neste trabalho optamos pela técnica de PCR-RFLP que é de fácil execução e de menor custo e, portanto, com maior possibilidade de viabilizar seu uso como metodologia auxiliar nos serviços de Hemoterapia.

11. CONCLUSÕES

A prevalência do antígeno Di^a entre os doadores voluntários de sangue do DF é de 3,6%.

A alta frequência do antígeno Di^a relatada na população estudada quando comparada com outras populações demonstra a miscigenação ocorrida no DF entre indivíduos asiáticos e indígenas e ressalta a importância de se identificar a presença do antígeno Di^a em doadores a fim de evitar a aloimunização eritrocitária em pacientes e prevenir reações transfusionais e DHPN.

Nossos resultados auxiliaram na decisão de inclusão de hemácias positivas para o antígeno Di^a nos reagentes de triagem e painel de identificação de anticorpos utilizados na FHB, o que possibilitará a detecção e identificação de anticorpo anti-Di^a nos receptores de sangue proporcionando maior segurança transfusional.

Este trabalho reforça a importância da análise de antígenos de baixa frequência em diferentes populações para embasar mudanças nas rotinas dos serviços de Hemoterapia com a finalidade de aumentar a segurança transfusional e materno-fetal.

Não foi possível obter dados extensos e concretos a respeito dos índices de aloimunização de pacientes porque os dados ainda são manuais, catalogados em fichas, o que dificultou a busca pelos pacientes sensibilizados contra o antígeno Di^a.

A genotipagem dos alelos *DI*A/DI*B* pode contribuir substancialmente na qualidade da transfusão de sangue em pacientes politransfundidos aloimunizados para os antígenos Di^a e Di^b, pois permite uma seleção mais adequada do sangue a ser transfundido.

A fenotipagem eritrocitária pode ser considerada uma técnica segura para pesquisa do antígeno Di^a, uma vez que a presença do alelo DI A, esteja ele em homozigose ou heterozigose, manifestar-se-á, sorologicamente, como fenótipo Di (a+), porém a genotipagem de grupos sanguíneos vem sendo cada vez mais utilizada pelos serviços, e traz benefícios na segurança de pacientes e principalmente otimização custo-benefício para uso em larga escala.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALEOTTI, W. Estudo molecular dos alelos DI A/ DI B e da banda 3-Memphis na população brasileira. 2002. 83 (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, 2002.

BRUCE, L. J. et al. Band 3 HT, a human red-cell variant associated with acanthocytosis and increased anion transport, carries the mutation Pro-868-->Leu in the membrane domain of band 3. **The Biochemical journal**, v. 293, p. 317–320, 1993.

BRUCE, L. J. et al. Band 3 Memphis variant II: Altered stilbene disulfonate binding and the Diego (Di^a) blood group antigen are associated with the human erythrocyte band 3 mutation Pro854-->Leu. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 23, p. 16155–16158, 1994.

COSTA, D. C. Investigação do polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no Estado de Santa Catarina. 2016. 104fp. Tese (Doutorado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2016.

COZAC, A.P.C.N.C. Estudo do polimorfismo do sistema sangüíneo Diego em populações de brancos, negros, asiáticos, índios e doadores de sangue da região de Ribeirão Preto. 2004. 171f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Clínica Médica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2004

CRUZ, R. O. et al. Prevalence of erythrocyte alloimmunization in polytransfused patients. **Einstein,** São Paulo, v. 9, n. 2, p. 173-178, jun. 2011.

DEAN, L. Blood groups and red cell antigens. In:_____. The Diego blood group. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. cap. 11, The Diego blood group. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2273/> Acesso: jun. 2019.

FIGUEROA, D. The Diego Blood Group system: a review. **Imunohematology**, v. 29, n. 2, p. 73-81, 2013.

FLÔRES, M.A. et al. Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group system polymorphism in Brazilian Japanese descendants. **Transfusion and Apheresis Science**, .v. 50, ed. 1, p. 123-128, 2014

FUTAGAWA, Y. et al. Living-related Liver Transplantation in Diego Blood Group Disparity: a case report. **Transplantation Proceedings**; v. 45, p.814-816, 2013.

GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL. História - Brasília: a cidade-sonho. Disponível em <http://www.df.gov.br/historia/> Acesso em jun. 2019.

HARDIE R.J., et al. Neuroacanthocytosis: a clinical, haematological and pathological study of 19 cases. **Brain**, v.114, p.13-49, 1991.

HUNDRIC-HASPL, Z. et al. Case Report: anti-Diego(a) red blood cell alloantibody as a possible cause of anemia in a 3-week-old infant. **Archive of Medical** Research; v. 34, p. 149-151, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Tabela 2094 - População residente por cor ou raça e religião. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/2094#/n1/all/n2/all/n3/all/v/1000093/p/last%201/c86/allxt/c133/0/d/v1000093%201/l/v,p+c86,t+c133/resultado> Acesso em: jun. 2019.

JAROLIM, P. et al. Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 88, n. 24, p. 11022–11026, 1991.

JAROLIM, P. et al. Band 3 Tuscaloosa: Pro327----Arg327 substitution in the cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 protein associated with spherocytic hemolytic anemia and partial deficiency of protein 4.2. **Blood**, v. 80, n. 2, p. 523–529, 1992.

JUNQUEIRA, P. C.; CASTILHO, L. The history of the Diego blood group. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 24, n. 1, p. 15–23, 2002.
KAY, M. M. B. et al. Brain membrane protein band 3 performs the same functions as erythrocyte band 3. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 7, p. 2778–2782, 1991.

KOMATSU, F. et al. Prevalence of Diego blood group Di(a) antigen in Mongolians: comparison with that in Japanese. **Transfusion Apheresis Science**, v. 30, p. 119-124, 2004.

LAYRISSE, M.; ARENDS, T.; DOMINGUEZ, S. R. Nuevo grupo sanguineo encontrado en descendientes de Indios. **Acta Med Venezolana**, v. 3, p. 132–138, 1955.

LEVINE, P. et al. Rare Human Isoagglutinins and Their Identification. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 24, n. 3, p. 292–304, 1954.

LUSTOSA, B.P.; ROCHA, H.L.; PRAZERES, J.L. Perfil imunohematológico dos pacientes com anemia falciforme que realizam exsanguineotransfusão atendidos no Hospital de Base de Brasília. 2016. 19f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Imunohematologia eritrocitária) - Instituto Estadual de Hematologia Arthur Siqueira Cavalcante, Rio de janeiro, 2016

MOHANDAS, N. et al. Molecular basis for membrane rigidity of hereditary ovalocytosis. A novel mechanism involving the cytoplasmic domain of band 3. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 2, p. 686–692, 1992.

MUN S.H.; LEE, S.H.; NO M.Y. A case of acute hemolytic transfusion reaction due to anti-Di^a antibody – a case report. **Korean J Anesthesiol**, v.63, n. 4, p. 353-356, 2012.
NARDOZZA, L.M.M. ET AL. Anti-Diego alloimmunization: Report of two cases. **Archives of Gynecology and Obstetrics** v 275, n.6, p. 495-497, 2007.

ORLANDO, G.M. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 2, p.111-121, 2000.

PARK TPS, et al. The clinical significance of antibody screening test including Di(a) panel cell in Asian-Mongoloid populations. **Journal Korean Medical Science**, v. 18, p. 669-72, 2003.
POOLE J, et al. Novel high incidence antigen in the Diego blood group system (DISK) and clinical significance of anti-DISK. **Vox Sang**; v. 99, p. 54-55, 2010.

POOLE, J. The Diego blood group system – an update. **Immunohematology**, v.15, n.4, p.135–43, 1999.

SEPLAG Secretaria de Estado de Planejamento, Orçamento e Gestão. **População indígena: Um primeiro olhar sobre o fenômeno do índio urbano na Área Metropolitana de Brasília**. Brasília: 2015

REID, M. E.; LOMAS-FRANCIS, C.; OLSSON, M. L. **The Blood Group Antigen FactsBook**. Third ed. San Diego: Academic Press, 2012.

ROSSE, W.F. et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**, v.76, n. 7, p.1431-1437, 1990.

SANTOS, Francisco W. R. et al. Post-transfusion red cell alloimmunisation in patients with acute disorders and medical emergencies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v. 29, n. 4, p. 369-372, 2007.

SCHOFIELD A.E., et al. The structure of the human red blood cell anion exchanger (EPB3, AE1, Band 3) gene. **Blood,** v.84, p. 2000-2012, 1994.

TANNER, M. J. A. The structure and function of band 3 (AE1): Recent developments (Review). **Molecular Membrane Biology**, v. 14, n. 4, p. 155–165, 1997.

TANNER, M.J.; MARTIN, P.G.; HIGH, S. The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. **Biochemical Journal**, v. 256, n. 3, p.703-712, 1988.

WEI, C.T. et al. Prevalence of Diego blood group antigen and the antibody in three ethnic population groups in Klang valley of Malaysia. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 7, n.1, p. 26-28, 2013.