

Frequency of Antigen Di^a in academics of a university in the state of Santa Catarina, Brazil

Frequência do antígeno Di^a em acadêmicos de uma universidade do estado de Santa Catarina

ABSTRACT | Introduction: *The Di^a Antigen is part of the Diego blood group system. It has a low frequency in the general population (1 to 6%), but with higher frequency in Asian (10%) and indigenous (36%) populations. The Brazilian ethnic composition is influenced by the indigenous ethnicity. Objectives: Identify carriers and establish the phenotypic frequency of the Di^a antigen in university students from a university in Santa Catarina state - Brazil. Detect carriers of rare DI phenotype (a+ b-). Contribute with information to the hemodiagnostic reagents industry about manufacture of reagents for the identification of these irregular antibodies. Methods: Sixty-five blood samples were collected and submitted to the erythrocyte phenotyping method to identify the Di^a antigen through tube hemagglutination tests with anti-Di^a serum. Data on birthplace, ethnic descent and information about blood transfusion, blood donation and diseases history were collected from those enrolled for research. Results: Di^a antigen phenotype was positive in 1.5% of the sample. The positive sample was an individual of indigenous descent, born in a region whose indigenous population was part of the ethnic composition. Of the sample studied, 25.8% declared themselves to be of indigenous descent. Conclusion: Although infrequent, it is possible to identify the Di^a antigen in the population studied, since the indigenous ethnicity is part of the ethnic composition.*

Keywords | Blood groups; Antigens; Phenotype.

RESUMO | Introdução: O Antígeno Di^a faz parte do sistema de grupo sanguíneo Diego. Ele possui baixa frequência na população em geral (1 a 6%), porém com frequência maior em população asiática (10%) e indígena (36%). A composição étnica brasileira tem influência da etnia indígena. **Objetivos:** Identificar portadores do antígeno Di^a e estabelecer a frequência fenotípica dele em universitários de uma universidade do estado de Santa Catarina-Brasil, detectar portadores de fenótipo raro DI (a+ b-) e contribuir com informações para a indústria de reagentes em hemodiagnóstico na confecção de reagentes para identificação desses anticorpos irregulares. **Métodos:** Foram coletadas 65 amostras de sangue submetidas ao método de fenotipagem eritrocitária para identificação do antígeno Di^a através de testes de hemaglutinação em tubo, com soro anti-Di^a. Dos arrolados para pesquisa, foram coletados dados referentes a naturalidade, descendência étnica e informações sobre transfusão sanguínea, doação de sangue e histórico de doenças dos participantes. **Resultados:** A fenotipagem para o antígeno Di^a foi positiva em 1,5% da amostra. A amostra positiva se tratava de um indivíduo com descendência indígena, natural de uma região cuja população indígena fazia parte da composição étnica. Da amostra estudada, 25,8% dos participantes declararam-se com descendência indígena. **Conclusão:** Embora infrequente, é possível identificar o antígeno Di^a na população estudada, uma vez que a etnia indígena faz parte da composição étnica.

Palavras-chave | Grupos sanguíneos; Antígenos; Fenótipo.

¹Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí/SC, Brasil.

²Clínica Fernanda Bortolozo. Balneário Camboriú/SC, Brasil.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), existem mais de 300 antígenos eritrocitários descritos na literatura, os quais estão agrupados em 43 sistemas de grupos sanguíneos¹. Dentre esses sistemas, há o de grupo sanguíneo Diego, que foi relatado pela primeira vez em 1953, em um caso de Doença Hemolítica do feto e do recém-nascido²⁻⁴.

O sistema de grupo sanguíneo Diego é constituído por 23 antígenos¹ localizados na glicoproteína banda 3 codificada pelo gene *SLC44A1*, localizado no cromossomo 17q21.31⁴⁻⁷. Dentre os antígenos do sistema, destaca-se o antígeno Di^a, que tem baixa frequência na população branca e negra (1 a 6%) e alta frequência em asiáticos (10%), sendo que em indígenas da América do Sul é considerado marcador antropológico, pelo fato de ser mais frequente nessa população (36%)^{3-5,8-10}. Em um estudo de Baleotti⁸ foi encontrada uma frequência de 75,7% nos índios Parakanã, a maior já publicada.

A realização de estudos para determinar a frequência do antígeno Di^a em determinadas regiões é de grande relevância, pois o anticorpo desenvolvido contra o antígeno (anti-Di^a) é de importância clínica, já que está implicado em reações transfusionais e na doença hemolítica do feto e do recém-nascido. Diante do exposto, é importante a utilização de hemocomponentes com a presença de Di^a para a identificação de anticorpos irregulares, anti-Di^a. Sendo assim, o portador desse antígeno também poderá disponibilizar esse hemocomponente como matéria-prima para indústria de hemoterapia, a fim de produzir reagentes para laboratórios de imuno-hematologia^{2,3,10-12}.

O antígeno Di^a está relacionado a outro antígeno do sistema, o Di^b, que é de alta frequência na população (99,9%)^{6,7,13}. Ambos se diferem por uma única alteração de aminoácido, a leucina, que é responsável pela expressão do antígeno Di^a, e a prolina, que é responsável pela expressão do antígeno Di^b^{3,6,7,9,14,15}. Sendo assim, são formados os fenótipos Di (a-b+), com uma frequência de 99,9% na população; Di (a+ b+) com frequência de 0,1%; Di (a+ b-), fenótipo raro presente em 0,01% na população; e Di (a- b-), que é incompatível com a vida. Nesse sentido, portadores do antígeno Di^a podem ter o fenótipo (a+ b+) ou o fenótipo raro Di (a+ b-)^{5,6,13}.

O fenótipo Di (a+ b-) tem importância clínica na transfusão sanguínea, pois, devido à alta frequência do antígeno Di^b

na população, o portador desse fenótipo, caso venha a precisar de uma transfusão, terá dificuldade de encontrar sangue compatível e, ao ser exposto a esse antígeno, o seu sistema imunológico poderá sensibilizá-lo, desenvolvendo anticorpos anti-Di^b de classe IgG, que poderão comprometer possíveis transfusões futuras, as quais serão novamente incompatíveis, o que pode afetar o tratamento desse paciente e causar nele reações transfusionais¹⁶.

Ao ter ciência de que possui esse grupo sanguíneo raro poderá alertar a equipe médica a fim de evitar a aloimunização com transfusão de sangue incompatível. Ainda, uma vez identificado como portador de fenótipo raro, estando em condições de saúde ideal, ele poderá se disponibilizar como doador de sangue e salvar a vida de pacientes com o mesmo fenótipo.

MÉTODOS

Após aprovação e emissão do parecer pelo Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos, os acadêmicos da Universidade do Vale do Itajaí foram convidados, via e-mail, a participar da pesquisa, e os interessados compareceram ao Laboratório de Bioquímica e Imunologia da Universidade, em horários pré-agendados, para assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e posterior coleta de amostra sanguínea e de dados. Foram coletadas 65 amostras anticoaguladas com EDTA, e as informações, tais como grupo sanguíneo, se é doador de sangue, se já recebeu transfusão, se tem diagnóstico de alguma doença, naturalidade, descendência indígena e descendência familiar, foram coletadas a partir do preenchimento de um questionário. As amostras de sangue foram armazenadas na geladeira a 5 °C e posteriormente centrifugadas a 2.500 rpm por cinco minutos para separação das hemácias para o método de fenotipagem eritrocitária para identificação do antígeno Di^a por testes de hemaglutinação em tubo¹⁷.

Inicialmente, foi realizada uma validação da técnica do estudo com os reagentes que seriam utilizados, o antissoro anti-Di^a comercial e um antissoro humano contendo anticorpos anti-Di^a. Como controle positivo, foram utilizadas 50 uL da suspensão de hemácias comercial a 3% com o antígeno Di^a.

No teste de validação do soro comercial, foram realizados dois testes, um utilizando 10 uL do reagente e outro

utilizando 25 uL do reagente diluído com 25 uL de albumina a 6%. Já no teste de validação do soro humano, foram realizados dois testes, um utilizando 25 uL do soro e outro, 50 uL.

A quantidade estabelecida para fenotipagem se deu conforme a maior intensidade de aglutinação das reações obtida na leitura das reações, sendo considerada como ideal a intensidade de 2+.

Foi estabelecido também confirmatório de resultados positivos das amostras do estudo. Para confirmação de resultados positivos, foi determinada uma nova fenotipagem com uma nova suspensão de hemácias, tendo sido realizados dois testes: um com a mesma quantidade de reagente utilizada no teste anterior e o outro com uma quantidade superior.

A escolha do reagente utilizado para a fenotipagem foi baseada no grupo sanguíneo ABO dos acadêmicos. Para as amostras com o grupo sanguíneo A, B, ou AB, foi utilizado o antissoro anti-Di^a comercial; e para as amostras com o grupo sanguíneo O, foi utilizado o antissoro humano, uma vez que ele é de origem de um indivíduo do grupo sanguíneo O.

Para a fenotipagem, foram adicionadas 50 uL da suspensão de hemácias a 5% em tubo previamente identificado e posteriormente foi adicionado antissoro anti-Di^a. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm por 25 segundos e submetidos à leitura para visualização da intensidade de aglutinação. Após obtenção de resultado negativo nessa primeira etapa, por se tratarem de anticorpos IgG, foram adicionadas ao tubo 200 uL de PEG 15% para potencializar a reação. Em seguida os tubos foram incubados por 15 minutos a 37 °C. Após incubação, foi realizada a lavagem das hemácias por três vezes com salina a 0,9%, e em seguida foram adicionadas 100 uL de anti-IgG humano (AGH) da Marca Lorne para aglutinar as hemácias que estivessem sensibilizadas no caso de amostras positivas, após a centrifugação a 2.500 rpm por 25 segundos. Finalizada a centrifugação, as amostras foram submetidas à leitura para visualização da intensidade de aglutinação. As amostras que apresentaram aglutinação são positivas para o antígeno Di^a. Em relação às amostras que não apresentaram aglutinação, foram adicionadas 50 uL do Controle de Combs de Hemácias da Marca Fresenius, homogeneizadas e centrifugadas a 2.500 rpm por 25 segundos, e então foi realizada a leitura. A aglutinação nessa etapa confirma a

ausência de aglutinação, ou seja, o resultado negativo para o antígeno Di^a^{15,17}.

RESULTADOS

Na validação da quantidade ideal dos reagentes, os testes do soro comercial apresentaram os seguintes resultados: o primeiro teste, com 10 uL, teve intensidade de 1+; e o segundo teste, com 25 uL do reagente diluído com 25 uL de albumina a 6%, apresentou intensidade de 2+, sendo esta estabelecida para a fenotipagem. Os testes do soro humano apresentaram os seguintes resultados: o primeiro teste, com 25 uL, apresentou 1+; e o segundo teste, com 50 uL, 2+, sendo esta intensidade estabelecida para a fenotipagem. Das 65 amostras analisadas, uma apresentou resultado Di^a positivo, com um percentual de 1,5%. A amostra positiva para antígeno Di^a apresentou aglutinação com intensidade de 1+, e para esta amostra foi utilizado o antissoro anti-Di^a comercial. Na confirmação do resultado positivo, os testes mostraram que houve aglutinação, mas com intensidades diferentes. No teste com a mesma quantidade, permaneceu a intensidade de 1+, e no teste com quantidade superior, apresentou 2+. A Figura 1, a seguir, apresenta o registro dos resultados dos testes dessa amostra positiva.

Figura 1 – Resultado positivo da fenotipagem para o antígeno Di^a por teste de hemaglutinação em tubo



Primeira foto (lado esquerdo): resultado com intensidade de 1+. Segunda foto (lado direito): resultado do confirmatório com quantidade superior do reagente com intensidade de 2+. Fonte: Imagem registrada a pelos autores de acordo com os dados obtidos no estudo.

Com as informações obtidas pela coleta de dados, foi determinado o perfil dos participantes quanto ao grupo sanguíneo ABO. O grupo mais frequentes foi o O (35%), seguido pelo A (25%), conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Perfil dos participantes quanto ao grupo sanguíneo ABO

Tipo	Número Absoluto	%
A	16	25%
B	5	8%
AB	3	5%
O	23	35%
Não relataram	18	27%

Número absoluto e porcentagem (%). Fonte: Elaborado pelos autores de acordo com os dados obtidos no estudo.

O perfil referente a doenças, transfusão e doação está demonstrado na Tabela 2. Dos participantes, 15% eram doadores de sangue, 3% já haviam sido submetidos à transfusão de sangue e 11% eram portadores de alguma doença.

Tabela 2 – Perfil dos participantes quanto a doenças, doação de sangue e transfusão sanguínea

	Doador	Transfusão	Doenças
Sim	10 (15%)	2 (3%)	7 (11%)
Não	55 (85%)	63 (97%)	56 (86%)
Não relataram	-	-	2 (3%)

Número absoluto e porcentagem (%). Fonte: Elaborado pelos autores de acordo com os dados obtidos no estudo.

Dos 65 participantes, 58 responderam sua naturalidade, sendo as descendências predominantes a italiana, a alemã e a indígena, respectivamente. Dos 58 participantes que responderam ao questionamento, 25,8% declararam descendência indígena e, dessa porcentagem, 25% informaram somente a descendência indígena. A naturalidade dos participantes variou nas regiões do Brasil, sendo a Região Sul a mais predominante, com 80,6%, conforme demonstrado no Gráfico 1, e em mesorregiões do estado de Santa Catarina, conforme demonstrado no Gráfico 2. Além disso, um acadêmico se declarou africano, de origem de Cabo Verde, uma nação localizada em um arquipélago vulcânico perto da costa noroeste da África.

DISCUSSÃO

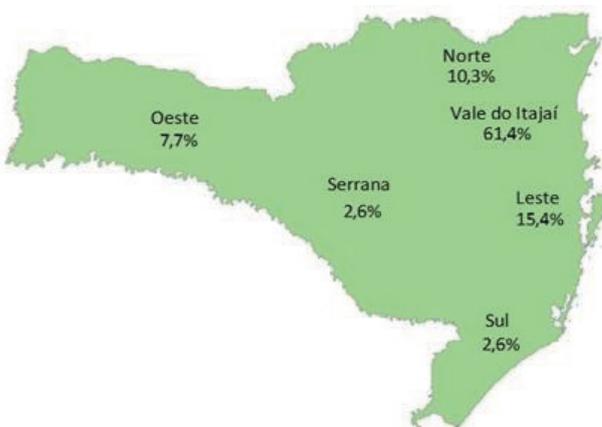
A partir dos dados coletados, foi possível determinar o perfil dos acadêmicos. Quanto ao grupo sanguíneo ABO,

Gráfico 1 – Porcentagem da naturalidade dos participantes conforme as regiões do Brasil



Fonte: Elaborado pelos autores de acordo com os dados obtidos no estudo.

Gráfico 2 – Porcentagem da naturalidade dos participantes conforme as mesorregiões do estado de Santa Catarina



Fonte: Elaborado pelos autores de acordo com os dados obtidos no estudo.

percebeu-se maior frequência do grupo O, seguido pelo grupo A, grupos sanguíneos mais frequentes na população. De acordo com os resultados da coleta de dados, foi encontrada uma frequência de 11% dos participantes que relataram diagnóstico de doenças. As doenças relatadas não eram doenças que necessitassem de uma transfusão

sanguínea. Aqueles que relataram que já receberam transfusão (3%) podem ter sido sensibilizados ao antígeno Di^a e os que eram doadores de sangue (15%) poderiam ter o antígeno Di^a 11%^{2,3,10-12}.

Em relação às descendências dos participantes, predominaram a europeia e a indígena. Vale considerar que a ancestralidade pode depender geograficamente. Pelo fato de o estudo ter sido realizado no estado de Santa Catarina, justifica-se o predomínio dos participantes de descendência europeia e indígenas, uma vez que a composição étnica dessa região é majoritariamente europeia (79,7%), seguida pela população africana (11,4%) e indígena (8,9%)^{19,20}.

A população indígena na qual o antígeno Di^a é mais frequente se faz presente na composição étnica do Brasil. A população brasileira é considerada uma das mais heterogêneas do mundo, pois também é composta por população de origem europeia e africana, além da indígena^{8,21,22}.

Neste estudo, avaliou-se também a naturalidade dos acadêmicos, e foi possível observar uma migração fenotípica, resultado do processo de migração de outras regiões do estado de Santa Catarina, do Brasil e até de outro país, o que influenciou nos resultados das descendências. Ainda, foi possível verificar participantes naturais de regiões cuja população indígena é maior, como de Norte (Amazonas e Rondônia) e do Centro-Oeste (Mato Grosso)¹⁹.

A frequência do antígeno Di^a encontrada no presente estudo é de 1,5%, em um total de 65 amostras. Essa frequência se refere a uma amostra com o resultado positivo para o antígeno Di^a. Após contato com o participante na devolutiva do resultado, identificou-se que ele é de descendência indígena, apesar de somente ter relatado italiana na coleta de dados. O acadêmico é natural de Maringá-PR, cujo estado, de acordo com um estudo de Manta e colaboradores¹⁹, caracterizou a população com predominância de origem europeia (71%), seguida de africana (17,5%) e indígena (11,5%)²⁰. Essa informação pode, talvez, explicar o fenótipo do acadêmico. Além disso, a cidade de Maringá tem em sua composição étnica população japonesa, ou seja, asiática²⁰, na qual o antígeno Di^a tem uma frequência maior (10%)¹³. Em um estudo de Baleotti⁸, na região de Marília-SP, foi encontrada uma frequência de 12,7% do antígeno Di^a em um total de 71 amostras de descendentes japoneses. A cidade de Marília, bem como a de Maringá, tem em sua composição étnica

origem japonesa²⁰, o que pode justificar também o fato de esse indivíduo ser portador do antígeno Di^a.

Em um estudo de Costa⁹, realizado na capital de Santa Catarina, foi estudada a frequência do antígeno Di^a em doares de sangue (373 amostras) do estado de Santa Catarina e de pacientes (31 amostras) de um hemocentro. Dos doadores, 21 amostras foram positivas para o antígeno Di^a (5,6%), e dos pacientes, 4 foram positivas (12,9%). Ainda em Santa Catarina, no estudo de Schorner e colaboradores¹⁰, foi encontrada uma frequência de 2,9% em 1.585 amostras de doadores de hemocentros do estado.

Na região de Marília-SP, Baleotti⁸ obteve, em um total de 93 doares de sangue de um hemocentro, três amostras positivas para o antígeno Di^a (3,2%), e Cozac⁵, em Ribeirão Preto, encontrou 24 (6,1%) amostras positivas, de um total de 392 doadores de sangue de um hemocentro.

As análises comparativas com esses estudos foram realizadas para avaliar as frequências já encontradas em estudos em outras regiões do nosso país e no estado de Santa Catarina. Embora existam algumas variações nas frequências encontradas, deve-se considerar a região e a população estudadas (doadores, pacientes ou populações aleatórias).

Quanto ao fenótipo, do resultado obtido da amostra positiva para o antígeno Di^a, esse indivíduo tem duas possibilidades de fenótipo: ele pode ser fenótipo Di (a+ b+), o que é mais provável (99,9%), ou fenótipo raro Di (a+ b-), que apresenta menor frequência (0,1%). Porém, para obter essa informação, será necessária a realização da genotipagem para identificação dos alelos em homozigose ou heterozigose, pois, devido à indisponibilidade do anti-Di^b comercial, essa identificação não é possível por fenotipagem^{6,13}.

CONCLUSÃO

Considerando os objetivos do presente estudo, referentes à identificação do antígeno Di^a do sistema de grupo sanguíneo Diego em acadêmicos de uma universidade no estado de Santa Catarina, relacionando com os dados obtidos a partir do questionário, referentes à naturalidade, à descendência e à frequência encontrada, considerando a população estudada, pode-se concluir que a composição étnica do Brasil e de Santa Catarina, na qual a indígena se

faz presente e o processo de miscigenação indígena versus o processo migratório tornam possível a presença do antígeno Di^a na população em geral (branca e negra) e em regiões cuja a frequência da população indígena é menor.

REFERÊNCIAS

1. International Society of Blood Transfusion [ISBT] | The International Society of Blood Transfusion (ISBT) [Internet]. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology | ISBT Working Party; Jun 2021.
2. Junqueira PC, Castilho L. The history of the Diego blood group. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. Mar 2002;24(1):15-23.
3. Figueroa D. The Diego blood group system: a review. *Immuohematology/ American Red Cross*. 2013;29(2):73-81.
4. Bégat C, Bailly P, Chiaroni J, Mazières S. Revisiting the diego blood group system in amerindians: Evidence for gene-culture comigration. *Plos One*. 2015;10(7):1-14.
5. Cozac APCNC. Estudo do polimorfismo do sistema sanguíneo Diego em populações de brancos, asiáticos, negros, índios e doadores de sangue da região de Ribeirão Preto. [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2004.
6. Nathalang O, Panichrum P, Intharanut K, Thattanon P, Nathalang S. Distribution of DI*A and DI*B Allele Frequencies and Comparisons among Central Thai and Other Populations. *PLOS ONE*. Out 2016;11(10):1-11.
7. Chesor M, Mitundee S, Nathalang S, Thattanon P, Intharanut K, Tobunluepop P, Nathalang O. DI*A and DI*B Allele Frequencies Among Southern Thai Blood Donors. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. Out 2017;34(3):506-9.
8. Baleotti WJ. Estudo molecular dos alelos DI A/DI B e da banda 3-Memphis na população brasileira. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. Dez 2002;24(4).
9. Costa, D. C. Investigação do poliformismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no estado de Santa Catarina; Repositório Institucional da UFSC; 2016.
10. Shorner EJ. et al. Incidência do fenótipo Diego A (Di a) em doadores de sangue da Hemorrede de Santa Catarina. *Hemosc*. 2011.
11. Jethava A, Olivares E, Shariatmadar S. A Case of Hemolytic Disease of the Newborn due to Dia Antibody. *Case Reports in Pediatrics*. 2015;2015:1-3.
12. Góngora, F. B.; Chiriboga-Ponce, R. F. Frecuencia del antígeno y aloanticuerpos del sistema Diego en donantes de sangre. *Gaceta de Mexico*. Jan 2018;154(1).
13. Reid ME, Lomas-Francis C. *The Blood Group Antigen FactsBook*. Elsevier; 2004. ABO blood group system; p. 19-28.
14. Xu XG, He J, He YM, Tao SD, Ying YL, Zhu FM, et al. Distribution of Diego blood group alleles and identification of four novel mutations on exon 19 of SLC4A1 gene in the Chinese Han population by polymerase chain reaction sequence-based typing. *Vox Sanguinis*. Set 2010;100(3):317-21.
15. Girello AL, Kühn TIBB. *Fundamentos da imunohematologia eritrocitária*. 3. ed. São Paulo: SENAC/SP; 2011. 304 p.
16. Roberto P, Martins J, Soares S. Pesquisa de aloimunização após transfusão de concentrados de hemácias em um estudo prospectivo. 2012.
17. Ferreira ÂM et al. *Imuno-hematologia Laboratorial*. 2014; v.1.
18. Novaretti MCZ, Llacer PED, Chamone DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucásides e negróides na cidade de São Paulo. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2020;22(1):23-32.
19. Manta FSN, Pereira R, Vianna R, Beuttenmüller ARR, Gitaí DLG, Silva DA, et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *Plos one*. 2013;8(9).
20. Censo Demográfico 2010. Características da população. Santa Catarina: IBGE; 2010.

21. Carvalho DRS, Santos FR; Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian chromosome lineages. *Am J Hum Genet.* 2001;68:281-286.

22. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* Dez 2002;100(1):177-82.

Correspondência para/Reprint request to:

Priscila de Souza

Universidade do Vale do Itajaí,

R. Uruguai, 458,

Itajaí/SC, Brasil

E-mail: pri090298@gmail.com

Recebido em: 20/05/2022

Aceito em: 07/11/2022