



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGUÍNEOS NO SUPORTE
TRANSFUSIONAL PARA PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME**

Daiane Cobianchi da Costa

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas. Sob orientação da Profa. Dra. Lilian Maria de Castilho.

Campinas
2011

DAIANE COBIANCHI DA COSTA

**GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGUÍNEOS NO
SUPORTE TRANSFUSIONAL PARA PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas.

Orientadora: Profa. Dra Lilian Maria de Castilho

Campinas

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

C823m Costa, Daiane Cobianchi da
Genotipagem de grupos sanguíneos no suporte transfusional para
pacientes com anemia falciforme. / Daiane Cobianchi da Costa. --
Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Lilian Maria de Castilho
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genotipagem. 2. Microarranjos de DNA. 3. Anemia Falciforme.
4. Sangue-transfusão. 5. Antígenos. I. Castilho, Lilian Maria de. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Título em inglês: Blood group genotyping in transfusion support for sickle cell disease patients

- Keywords:**
- Genotyping
 - Microarray and DNA
 - Sickle cell disease
 - Blood - transfusion
 - Antigens

Titulação: Mestrado em Clínica Médica
Área de Concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lilian Maria de Castilho
Prof. Dr. Maria Lourdes Barjas-Castro
Prof. Dr. Dante Mário Langhi Junior

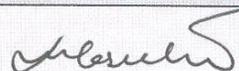
Data da defesa: 25-04-2011

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Daiane Cobianchi da Costa

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lilian Maria de Castilho

Membros:

1. Prof.^a Dr^a. Lilian Maria de Castilho



2. Prof.^a. Dr^a. Maria Lourdes Barjas-Castro



3. Prof. Dr. Dante Mario Langhi Junior



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/04/2011

Dedicatória

*Dedico este trabalho a Deus,
pois sem Ele, nada seria possível
e em especial aos meus pais,
Toninho e Marilda,
por suas histórias de sucesso
na educação dos filhos,
diante de todas as adversidades.*

Agradecimentos

A *DEUS*, por ter me dado forças e iluminado meu caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

À *Profa. Dra. Lilian Castilho* por acreditar em mim, pela sua competência científica e orientação dada, e que me ensinou com prazer e dedicação parte do que sei, bem como pela disponibilidade, amizade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao *Prof. Dr. Jordão Pellegrino Jr.* pela amizade, carinho, paciência e atenção com que sempre me tratou, pela disposição em sempre me ajudar e em especial pelos conselhos, críticas, sugestões e apoio de grande contribuição para o desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Ao *Prof. Wilson Baleotti*, pela sua amizade e pelos importantes ensinamentos em Imunohematologia durante a graduação.

À *Dra. Simone* e ao *Dr. Vagner*, pelas contribuições durante a minha qualificação.

Aos *meus pais, Toninho e Marilda*, que me apoiaram desde o começo desta jornada, não deixando que as dificuldades nem o desânimo me fizessem desistir dos meus sonhos, que dedicaram suas vidas para me proporcionar educação, amor e carinho, não medindo esforços na concretização deste ideal e que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre fizeram entender que o futuro, é feito a partir da constante dedicação no presente.

Ao meu irmão *Danilo* e minha cunhada *Ana Maria* pelo carinho, apoio e incentivo em todos os momentos.

Agradecimentos (cont.)

À *minha amada família*, pelos valores, incentivo, força e encorajamento, em especial a minha avó Alzira e aqueles que me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria.

Ao meu namorado *Guilherme*, o qual mesmo longe, sempre esteve ao meu lado durante esta caminhada, sempre me incentivando a superar os obstáculos e a lutar pelos meus ideais. Agradeço também pela compreensão e paciência enquanto estávamos separados pela distância. Tenho certeza que estas dificuldades só contribuíram para o fortalecimento e o amadurecimento do nosso amor.

Ao *Tuto, Cidinha e Thaís* pelo carinho, dedicação e por acreditarem em mim.

A todos os *pacientes e doadores voluntários de sangue* que colaboraram com este trabalho.

Aos colaboradores *Ricardo Omoto e Dra Angela Zanetti* (Hospital São Rafael) pelo apoio na coleta das amostras de sangue dos pacientes falciformes e dos doadores voluntários de sangue.

A *FAPESP* (Fundação de amparo a pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto, ao *ICTS* (Instituto de Ciência e Tecnologia do Sangue) pelo apoio financeiro e ao Hemocentro da Unicamp, pela estrutura adequada para a realização do trabalho.

Agradecimentos (cont.)

Às amigas do laboratório, *Débora, Daphne, Karina, Gláucia e Jeane*, por toda a ajuda prestada, pela amizade, pelo encorajamento constante e por serem tão boas amigas, por formarmos uma equipe agradável, de respeito e sempre prontas para ajudar umas às outras.

À *Roseli*, pela amizade, carinho e valiosa ajuda em momentos que precisei.

Aos *funcionários* e *alunos* de diversos setores do Hemocentro que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, seja no auxílio de desenvolvimento de técnicas, coleta de dados, conselhos ou dicas: *Magda, Maria de Fátima Locatelli, Fernanda* (Imunohematologia), *Ucha* (Hemostasia), *Dulcinéia* (Biologia Molecular), *colegas* do Laboratório de Controle de Qualidade, *colegas* do Laboratório de Imunologia Plaquetária, *Zelma* (Transfusão Externa), *Leonardo* (Informática) e as demais pessoas que também estiveram presentes.

À *Dra Marion Reid* e *Kim Hue-Roye* (New York Blood Center), pelo carinho e atenção com que me receberam e disposição em ajudar a analisar meus dados.

Muito obrigada!

Daiane

EPÍGRAFE

*“ Errar é o primeiro passo para aprender e
Aceitar o desafio é o primeiro passo pra vencer.”*

Flávio Vieira

*Trabalho realizado no **Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos Eritrocitários** do Hemocentro da Unicamp com o auxílio financeiro da FAPESP Proc. n. 2008/07544-8 (DCC) e 2009/05924-0 (LC) e do INCTs – Instituto Nacional de Ciência e tecnologia do sangue.*

RESUMO

A genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala pela técnica de “microarray” tem se mostrado importante para doadores e pacientes, pois permite a determinação simultânea de múltiplos alelos que codificam antígenos de grupos sanguíneos e pode contribuir para a seleção mais exata de unidades de sangue compatíveis para pacientes politransfundidos. Neste trabalho, avaliamos a utilização da genotipagem em larga escala em 283 amostras de DNA de pacientes falciformes e, em 504 amostras de DNA de doadores de sangue pela plataforma HEA BeadChip™ na seleção de doadores fenótipo compatíveis em 4 níveis de compatibilidade de antígenos de grupos sanguíneos. Com o auxílio de um software e considerando que todos os doadores eram do grupo sanguíneo O, fomos capazes de encontrar um número significativo de doadores de sangue antígeno-negativo para pacientes aloimunizados e não aloimunizados quando buscamos por compatibilidade Nível 1 (ABO, D e um aloanticorpo) e Nível 2 (ABO, D, C, c, E, e, K1). Em Nível 1 encontramos uma média de 482 doadores compatíveis e em Nível 2 uma média de 237 doadores compatíveis. Entretanto, a média de doadores compatíveis Nível 3 (ABO, D, C, c, E, e, K1, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Di^a) foi de 75 e, Nível 4 (ABO, D, C, c, E, e, K1, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Di^a, Lu^a, Lu^b, M, N, Do^a, Do^b, Hy, Jo^a, k, Js^b) foi de 31. Além disto, realizamos compatibilidade genética para 35 pacientes com as amostras de DNA dos pacientes e das unidades de sangue compatibilizadas para eles por técnicas sorológicas. Vinte e hum pacientes apresentaram discrepâncias para vários antígenos entre o seu perfil antigênico e as unidades de sangue sorologicamente compatibilizadas para eles, o que demonstra que as técnicas moleculares são superiores às técnicas sorológicas na identificação de unidades de sangue compatíveis para estes pacientes.

ABSTRACT

DNA arrays, with their high-throughput capability are particularly suited for mass screening donors because they permit the simultaneous determination of multiple alleles encoding RBC antigens and can facilitate the provision of more extensively matched blood for patients. Based on this we evaluated the usefulness of DNA array technology to provide a means to precisely genotype match donor blood units to the antigen-negative type of patients with SCD. We searched for compatible units for 283 SCD patients performing extended human erythrocyte antigen (xHEA) typing on the patient samples and on 504 donor samples. The degree of matching was determined at 4 increasingly stringent levels of compatibility. Using a special software, we were able to find 482 compatible donors for Level 1 (ABO, D and 1 Antibody) , 237 for Level 2 (ABO, D, C, c, E, e, K1), 75 for Level 3 (ABO, D, C, c, E, e, K1, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Di^a) and 31 for Level 4 (ABO, D, C, c, E, e, K1, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Di^a, Lu^a, Lu^b, M, N, Do^a, Do^b, Hy, Jo^a, k, Js^b). We also investigated antigen-match RBC units with 35 recipients using blood group genotypes at the 4 levels of matching stringency. Units selected were serologically matched to the patients based on their ABO, Rh and K phenotypes and presence of antibody (ies). Twenty-one from 35 SCD patients presented discrepancies or mismatches for multiple antigens between their xHEA antigen profile and the blood units antigen profile serologically matched for them. According to these results we were able to find a better match for the patients in our extended HEA (xHEA)-typed units, and in the majority of cases the degree of matching was enhanced and the patients benefit to receive the transfusions as shown by better *in vivo* RBCs survival. DNA array based blood grouping typing of donors and patients showed to be a cost-effective procedure and has demonstrated improvements in SCD patients care facilitating their transfusion support and preventing the alloimmunization and hemolytic transfusion reactions.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Descrição
Rh	Sistema Rh
RhD	Antígeno RhD
RhC	Antígeno RhC
Rhc	Antígeno Rhc
RhE	Antígeno RhE
Rhe	Antígeno Rhe
VS	Antígeno do sistema Rh denominado VS
<i>RHD</i>	Gene <i>RHD</i>
<i>RHCE</i>	Gene <i>RHCE</i>
<i>RHD-CE-D^S</i>	Gene híbrido <i>RHD-CE-D^S</i>
<i>RHDΨ</i>	Pseudogene <i>RHD</i>
<i>RHCE*C/c</i>	Genes alelos Cc
<i>RHCE*E/e</i>	Genes alelos Ee
RhD-	Fenótipo RhD-negativo
RhD+	Fenótipo-positivo
<i>RHCE*ceBI</i>	Variante do Gene <i>RHCE</i>
<i>RHCE*ceSM</i>	Variante do Gene <i>RHCE</i>
DAR	Antígeno RhD parcial DAR
DIIIa	Antígeno RhD parcial DIIIa
Fy ^a	Antígeno Fy ^a

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (CONT.)

Fy^b	Antígeno Fy^b
Fy(b-)	Fenótipo Fy(b-)
Fy(b+)	Fenótipo Fy(b+)
<i>FY</i>*A	Alelo A do gene <i>FY</i>
<i>FY</i>*B	Alelo B do gene <i>FY</i>
Jk^a	Antígeno Jk^a
K1	Antígeno Kell 1
AA	Homozigose para o alelo selvagem (alta frequência)
AB	Heterozigose para o alelo selvagem
BB	Homozigose para o alelo mutato (baixa frequência)
DHPN	Doença Hemolítica Peri-natal
AHAI	Anemia Hemolítica Auto-Imune
RTH	Reação Transfusional Hemolítica
HbSS	Indivíduo homocigoto para a Hemoglobina S
HGH	Hormônio do Crescimento Humano
PCR	Reação de cadeia da polimerase / Polimerase Chain Reaction
AS-PCR	Técnica de PCR alelo-específico
PCR-RFLP	Técnica de PCR seguida por análise dos fragmentos
HEA BeadChipTM	Plataforma de “microarray”
Primers	Sequências de oligonucleotídeos sintéticos
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
dNTP	Desoxinucleotídeos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (CONT.)

eMAP	Elongation-mediated multiplex analysis of polymorphisms
Taq DNA	Enzima DNA polimerase
DNA	Fita de nucleotídeos
INTRON	Região do gene que não codifica aminoácidos
EXON	Região do gene que codifica aminoácidos
DO	Densidade Óptica
LS	Low signal
IC	Indeterminated call
Ng	Nanograma
pb	Pares de bases
Mg	Micrograma
μl	Microlitro
ml	Mililitro
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
TAD+	Teste direto da antiglobulina positivo
TEB	Tris EDTA Borato

LISTA DE TABELAS

Título	Página
Tabela 1. Conseqüências da aloimunização eritrocitária.....	43
Tabela 2. Limitações da Hemaglutinação.....	46
Tabela 3. Alelos e SNPs contidos no HEA BeadChip™.....	68
Tabela 4. Variações de temperatura de anelamento e número de ciclos das técnicas de PCR utilizadas.....	75
Tabela 5. Sequências de primers utilizados na determinação dos polimorfismos <i>DI*A/DI*B</i> , <i>FY*A/FY*B</i> , <i>FY-GATA</i> , <i>KEL*1/KEL*2</i> , <i>JK*A/JK*B</i> , <i>RHCE*Ee</i> de acordo com CASTILHO et al, 2002.....	76
Tabela 6. Enzimas utilizadas para digestão dos produtos dos PCR-RFLP.....	77
Tabela 7. Sequências de primers utilizados para a determinação de <i>RHD</i> e <i>RHDΨ</i> de acordo com CASTILHO et al, 2002.....	80
Tabela 8. Sequências de <i>primers</i> utilizadas para a determinação das variantes do gene <i>RHCE</i>	82
Tabela 9. Enzimas utilizadas para digestão dos produtos do PCR-RFLP das variantes <i>RHCE</i>	82
Tabela 10. Primers utilizados na técnica de PCR para a determinação da variante <i>DIIIa</i>	83
Tabela 11. Enzimas utilizadas para digestão dos produtos do PCR-RFLP das variantes <i>RHD*DIII^a</i> e <i>RHD*DAR</i>	84
Tabela 12. Sequência de <i>Primers</i> utilizados na técnica de PCR para a determinação da variante <i>DAR</i>	85
Tabela 13. Resultados dos genótipos de doadores e frequência genotípica observada para os principais sistemas de grupos sanguíneos.....	94

LISTA DE TABELAS (CONT.)

Tabela 14.	Resultados das frequências alélicas observadas em doadores.....	95
Tabela 15.	Resultados dos genótipos de pacientes falciformes e frequência genotípica observada para os principais sistemas de grupos sanguíneos.....	96
Tabela 16.	Resultados das frequências alélicas observadas nos pacientes falciformes estudados.....	97
Tabela 17.	Fenótipos identificados de difícil caracterização sorológica devido a falta de insumos.....	98
Tabela 18.	Fenótipos raros identificados nas amostras de doadores e pacientes.....	98
Tabela 19.	Resultados de Fenótipos e Genótipos <i>FY/GATA</i> em 283 pacientes falciformes.....	99
Tabela 20.	Resultados da genotipagem Dombrock em 283 pacientes falciformes.....	100
Tabela 21.	Variante <i>RHCE</i> encontradas em pacientes falciformes.....	101
Tabela 22.	Variante <i>RHCE</i> identificadas em pacientes falciformes.....	102
Tabela 23.	Variante <i>RHD</i> identificadas em pacientes falciformes.....	102
Tabela 24.	Número e especificidade dos anticorpos encontrados em 98 pacientes falciformes aloimunizados.....	103
Tabela 25.	Média de doadores de sangue compatíveis em 4 níveis para pacientes falciformes.....	106
Tabela 26.	Discrepâncias encontradas em 14 pacientes cronicamente transfundidos	107
Tabela 27.	Frequências de haplótipos RH em pacientes e doadores de sangue de Campinas e Salvador.....	119

LISTA DE FIGURAS

Título	Página
Figura 1. Inserção dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária Figura adaptada de Reid (REID, 2008).....	41
Figura 2. Distribuição dos antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos (AVENT, 2008).....	42
Figura 3. Hibridização e emissão de fluorescência.....	70
Figura 4. Resumo das etapas da técnica de “microarray” - plataforma HEA BeadChip TM	70
Figura 5. Sistema automatizado de captura e análise de dados AIS 400 (Array Imaging System).....	71
Figura 6. Emissão dos resultados: Intensidade gráfica do Sinal (cada primer) de discriminação entre cada alelo.....	72
Figura 7. Relatório de resultado do genótipo (doadores) gerado automaticamente pelo sistema após a aquisição da intensidade de hibridização.....	73
Figura 8. Imagem do software de análise wHEA TM : possibilita a discriminação alélica.....	73
Figura 9. Relatório de resultados de fenótipos deduzidos dos genótipos (paciente) gerado automaticamente pelo sistema após a aquisição da intensidade de hibridização para cada amostra analisada.....	74
Figura 10. Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo <i>DI*A/DI*B</i>	77
Figura 11. Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo <i>FY*A/ FY*B</i>	78

LISTA DE FIGURAS (CONT.)

Figura 12.	Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo <i>GATA Normal (W/W) e Mutado (M/M)</i>	78
Figura 13.	Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo <i>KEL*1/KEL*2</i>	78
Figura 14.	Foto gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo <i>JK*A/JK*B</i>	79
Figura 15.	Foto do gel de poliacrilamida a 12% para identificação do polimorfismo <i>RHCE*Ee</i>	79
Figura 16.	Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo <i>RHD</i>	80
Figura 17.	Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo <i>RHD*Ψ</i>	81
Figura 18.	Foto do gel do produto de PCR da reação <i>RHCE*1132 G>C Exon 8</i> , digerido após digestão enzimática com <i>Tsp45 I</i>	82
Figura 19.	Foto do gel do produto de PCR da reação <i>RHCE*818 C>T Exon 6</i> , digerido após digestão enzimática com <i>Mwo I</i>	83
Figura 20.	RFLP após digestão com a enzima <i>Ban I</i> dos produtos de PCR amplificados em gel de agarose a 2%.....	84
Figura 21.	RFLP após digestão com a enzima <i>Hph I</i> dos produtos de PCR amplificados em gel de agarose a 2%.....	85
Figura 22.	Níveis de compatibilidade estabelecidos baseados no trabalho de Klapper e colaboradores e de acordo com as necessidades da população brasileira.....	86
Figura 23.	A figura ilustra a tela inicial de acesso ao software.....	87
Figura 24.	Tela do software onde é selecionado o paciente para o qual será feita a busca de compatibilidade.....	88

LISTA DE FIGURAS (CONT.)

- Figura 25.** Tela do software que permite selecionar a região de origem dos doadores..... **88**
- Figura 26.** A figura ilustra a tela gerada pelo software, indicando em gráficos de níveis de compatibilidade (Nível 2, 3 e 4) a quantidade de doadores encontrados..... **89**
- Figura 27.** A figura ilustra o gráfico do nível 2 selecionado (em vermelho), mostrando que a busca por compatibilidade para o paciente selecionado será realizada para nível 2..... **89**
- Figura 28.** Resultados dos fenótipos de 29 doadores compatíveis em nível 2 encontrados para o paciente selecionado..... **90**
- Figura 29.** Exemplo da busca eletrônica de doadores de sangue em 4 níveis de compatibilidade para um paciente falciforme que apresentava em seu prontuário anticorpos anti-D, anti-C e anti-Di^a..... **105**
- Figura 30.** Paciente recebendo sangue O Rh e K compatível..... **108**
- Figura 31.** Paciente fenotipado como R₀r (C -, E-), K- e recebendo unidades de sangue ABO/Rh e K fenótipo compatível..... **108**
- Figura 32.** Paciente recebendo unidades de sangue ABO, Rh e K fenótipo compatível apresentando um baixo rendimento transfusional e um anticorpo não identificado..... **109**

	Página
1. Introdução.....	39
2. Objetivos.....	53
3. Casuística.....	57
4. Materiais e Métodos.....	61
4.1 Materiais utilizados.....	63
4.2 Métodos empregados.....	66
5. Resultados.....	91
5.1 Genotipagem em larga escala dos alelos de grupos sanguíneos em amostras de doadores voluntários de sangue e de pacientes falciformes.....	93
5.1.1 Identificação de pacientes Fy(b-) que apresentaram a mutação -33T>C.....	99
5.1.2 Genotipagem Dombrock em pacientes falciformes.....	100
5.1.3 Identificação de variantes de antígenos do Sistema Rh.....	101
5.2 Aloimunização nos pacientes falciformes estudados.....	102
5.3 Seleção de doadores compatíveis para pacientes falciformes através do software.....	104
5.4 Compatibilidade genética em pacientes politransfundidos.....	106
6. Discussão.....	111
7. Conclusões.....	123
8. Referências Bibliográficas.....	127
9. Apêndice.....	137

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados pela presença ou ausência de antígenos na membrana eritrocitária. Estes antígenos, como parte integrante dos componentes da membrana, possuem características polimórficas bem definidas (ISSIT e ANSTEE, 1998).

Os antígenos eritrocitários são herdados geneticamente e definidos por sequências específicas de aminoácidos, constituindo proteínas que podem ou não estar ligadas a carboidratos ou a lipídios. A diversidade dos antígenos de grupos sanguíneos, como para qualquer outro traço biológico, encontra-se ao nível do gene (REID e YAZDANBAKHS, 1998).

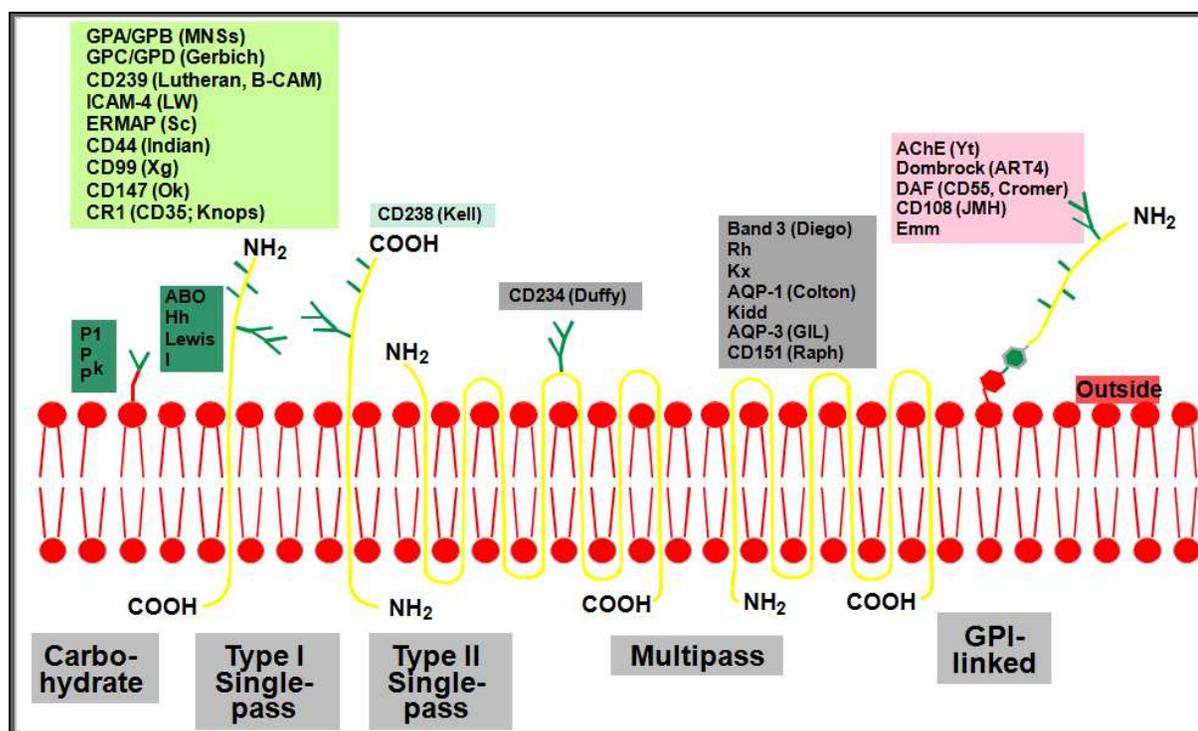


Figura 1: Inserção dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária. Figura adaptada de Reid (REID, 2008).

Atualmente, de acordo com a Nomenclatura da Sociedade Internacional de Transusão Sanguínea (ISBT), estão descritos 328 antígenos eritrocitários, distribuídos em 30 sistemas de grupos sanguíneos (DANIELS et al, 2009). Os sistemas Rh, MNS e Kell são os mais complexos, contendo 50, 46 e 31 antígenos, respectivamente.

Os genes que codificam os 30 sistemas de grupos sanguíneos já foram clonados e sequenciados, e as bases moleculares associadas com a maioria dos antígenos já foram determinadas (REID, 2009).

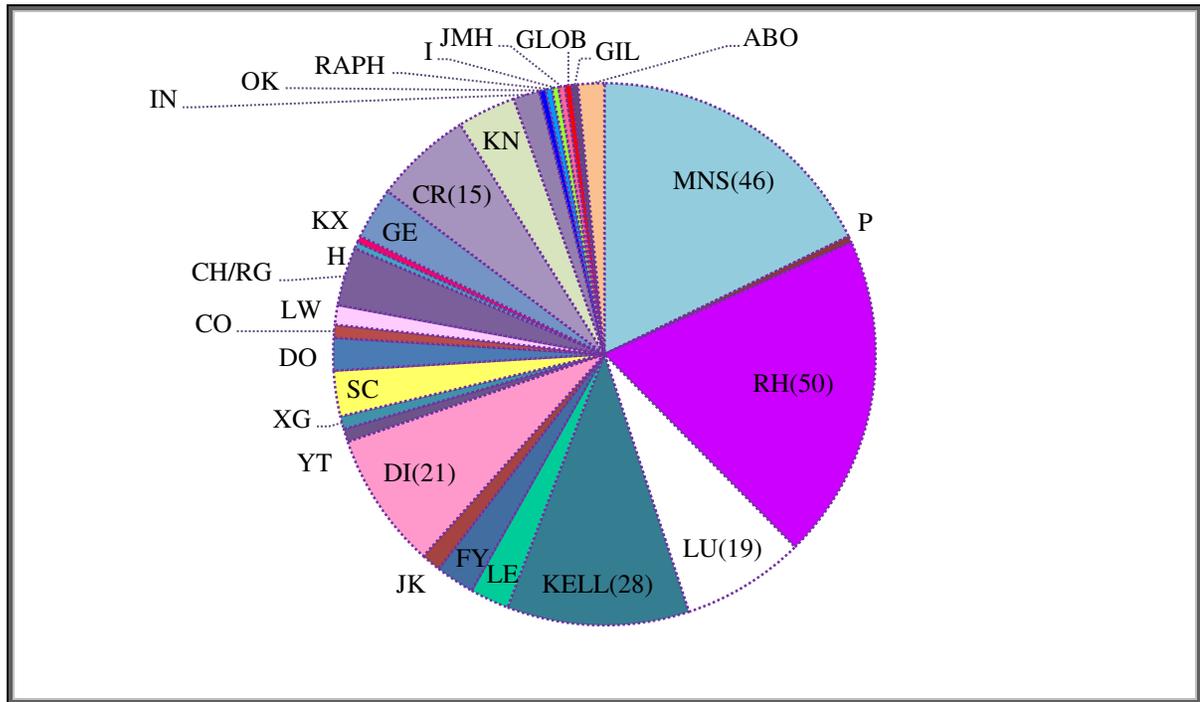


Figura 2: Distribuição dos antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos (AVENT, 2008).

Assim, o conhecimento da sequência gênica possibilitou a identificação de diversas formas polimórficas destes genes o que melhorou muito o entendimento da complexidade dos antígenos de grupos sanguíneos.

Os polimorfismos de grupos sanguíneos originam-se predominantemente de mutações de ponto, principalmente os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), mas recombinações gênicas, deleções e inserções também ocorreram ao longo da evolução dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos e promovem o desenvolvimento de formas variantes destes genes (DANIELS, 2005; WESTER et al, 2005).

Pelo fato dos antígenos de grupos sanguíneos estarem presentes na parte externa da membrana eritrocitária, eles são extremamente importantes na medicina transfusional, uma vez

que a ausência de um antígeno pode levar à aloimunização de um indivíduo após transfusão de hemácias com o respectivo antígeno e aumentar seu risco transfusional nas transfusões subsequentes (**REID, 1997; ISSIT e ANSTEE, 1998**).

Pacientes que recebem regime de transfusão de sangue crônica tais como, os pacientes portadores de anemia falciforme, podem desenvolver anticorpos a uma centena de antígenos eritrocitários. A maior causa de aloimunização nestes pacientes é a diferente distribuição destes antígenos entre doadores de ancestralidade Européia e os pacientes falciformes de ancestralidade africana (**CHOU e WESTHOFF, 2009**).

Um efeito indesejável grave diretamente associado às transfusões é aquele que resulta em hemólise do sangue transfundido, devido a anticorpos pré-formados no plasma do receptor. Segundo Poole e Daniels (**POOLE e DANIELS, 2007**), a aloimunização apresenta consequências negativas aos pacientes politransfundidos (Tabela 1), dentre os quais se destacam o aumento do risco de reação transfusional hemolítica e a redução do número de bolsas de sangue compatíveis para futuras transfusões.

Tabela 1: Consequências da aloimunização eritrocitária

- | |
|--|
| - Aumento do risco de reações transfusionais hemolíticas e destruição dos eritrócitos alogênicos |
| - Destruição dos eritrócitos autólogos (Anemia Hemolítica Auto-Imune – AHAI) |
| - Destruição dos eritrócitos do feto (Doença Hemolítica Peri-Natal – DHPN) |
| - Danos a tecidos e órgãos transplantados |
| - Redução do número de bolsas de sangue compatível |

A transfusão de sangue incompatível, que causa reação transfusional hemolítica imediata com destruição intravascular das hemácias transfundidas, pode levar à morte. A grande maioria destes casos está relacionada à incompatibilidade ABO, uma vez que os anticorpos anti-A e anti-B ativam o Sistema Complemento e estão presentes em altas concentrações no plasma (**PETZ, 1989; ISSIT e ANSTEE, 1998**).

Pacientes que recebem transfusão de sangue e componentes sanguíneos podem desenvolver anticorpos a vários antígenos eritrocitários. Estes pacientes, meses ou até mesmo anos após as transfusões, podem apresentar reações transfusionais hemolíticas tardias, com destruição extravascular das hemácias, devido a anticorpos não detectados em testes pré-transfusionais. Os anticorpos mais implicados na reação transfusional hemolítica tardia são os dirigidos contra antígenos dos sistemas Rh(34%), Kidd(30%), Duffy(14%) e Kell(13%) (**MOLISSON et al, 1988**). Aloanticorpos desenvolvidos contra outros antígenos eritrocitários ocorrem em menos que 1% da população (**GIBLETT, 1961, 1977; HOELTGE et al, 1995; GEIFMAN-HOTZMAN et al, 1997**).

O significado clínico dos anticorpos anti-eritrocitários depende da frequência do antígeno (que pode variar em diferentes origens étnicas) e da sua imunogenicidade. A ocorrência de anticorpos irregulares em pacientes politransfundidos estimulou vários pesquisadores a determinar a frequência da aloimunização em populações distintas, levando em consideração as diferenças étnicas existentes entre elas (**ISSIT, 1994**).

A literatura apresenta vários estudos mostrando a frequência da produção de anticorpos irregulares, em populações selecionadas de pacientes politransfundidos (**ORLINDA et al, 1978; COLES et al, 1981; BLUMBERG et al, 1983; DAVIES et al, 1986; REISNER et al, 1987; COX et al, 1988; VICKINSKY et al, 1990; ROSSE et al, 1990**). Estes autores mostraram que a prevalência de formação de anticorpos em pacientes com anemia aplástica, leucemia mielóide aguda, insuficiência renal e hemorragia gastrointestinal era similar (11-16%). Em pacientes com hemoglobinopatias, o índice de aloimunização encontrado foi mais alto (29%). Outros relataram que a probabilidade mais alta (33,4%) de resposta imune a antígenos eritrocitários, foi encontrada em pacientes com anemias hemolíticas auto-imunes, cirrose hepática e síndromes mielodisplásicas (**SALMON et al, 1990**).

Considerando as frequências gênicas e a prevalência destes anticorpos em diferentes populações (**GIBLETT, 1961**), estimou que a probabilidade de um indivíduo produzir um ou mais anticorpos anti-eritrocitários é de aproximadamente 1%, por unidade de sangue transfundida.

Na prática transfusional atual, devido ao risco associado à transfusões e gestações futuras, tem-se procurado minimizar as chances de um indivíduo formar aloanticorpos anti-eritrocitários. Alguns autores estimulam as transfusões intra-raciais em pacientes portadores de anemia falciforme (**ORLINDA et al, 1978**). Outros, recomendam transfusões fenotipicamente compatíveis com os antígenos eritrocitários mais imunogênicos (D, K, E, c, C, e, Fy^a, Jk^a, S) (**COLES et al, 1981; SALMON et al, 1990**). A fenotipagem eritrocitária é essencial também na confirmação de aloanticorpos e facilita a identificação de anticorpos que podem ser formados no futuro.

Os procedimentos de fenotipagem são baseados no princípio da hemaglutinação, que é o método clássico para testes de antígenos de grupos sanguíneos e anticorpos. Esta técnica tem sido utilizada por décadas, requer poucos equipamentos e quando executada da forma correta, apresenta especificidade e sensibilidade apropriada para a segurança transfusional da maioria dos pacientes que necessitam de transfusão sanguínea (**REID, 2009**).

A fenotipagem eritrocitária apesar de muito utilizada em laboratórios de imunohematologia, apresenta certas limitações técnicas e clínicas (Tabela 2), depende da disponibilidade de anti-soros raros e reagentes de alto custo que, associado a outros fatores de ordem técnica, dificultam a sua utilização, tornando-os algumas vezes até mesmo inviáveis na rotina transfusional. Por exemplo, ainda é difícil fenotipar corretamente um paciente recentemente transfundido devido à presença de hemácias do doador na sua circulação (**REID et al, 2000a, 2000b**).

Tabela 2: Limitações da Hemaglutinação

Limitações Técnicas
- Teste subjetivo (interpretação subjetiva)
- Procedimentos trabalhosos e dispendiosos para a determinação de diversos antígenos
- Alto custo dos reagentes, em especial dos soros raros
- Requer o uso de soros confiáveis
- Indisponibilidade de anti-soros comerciais para muitos antígenos
Limitações Clínicas
- Fenotipagem de pacientes com transfusões recentes
- Fenotipagem de hemácias de pacientes com autoanticorpos
- Falha na determinação da zigosidade <i>RHD</i>
- Dificuldade de transfundir pacientes aloimunizados

Diante dessas limitações, tem se procurado identificar meios mais seguros para evitar as reações transfusionais em pacientes politransfundidos. Atualmente tem merecido destaque os procedimentos de genotipagem molecular (**REID et al, 2000a; ROZMAN et al, 2000; CASTILHO et al, 2002a, 2002b**).

Desde a clonagem e sequenciamento dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos, tem havido um grande progresso nos mecanismos moleculares que levam à diversidade dos antígenos de grupos sanguíneos. Alguns destes mecanismos são: mutação de ponto, deleção, inserção, mecanismos de *splicing* alterados, *crossing over* intragênico, *crossing over* intergênico, conversão gênica e outros rearranjos gênicos. No entanto, a maioria dos polimorfismos de grupos sanguíneos surgem de mutações de ponto *missenses* ou seja, de uma

mudança na identidade do aminoácido codificado (**AVENT, 1997; REID e YASDANBAKHS, 1998**).

A utilização das ferramentas de biologia molecular tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da Imunohematologia, aumentando a segurança e eficácia transfusional de pacientes politransfundidos, como os portadores de anemia falciforme. Isto pode ser facilmente visualizado durante os procedimentos de genotipagem de grupos sanguíneos, onde as técnicas moleculares suprem as deficiências das técnicas de hemaglutinação, principalmente na fenotipagem de pacientes com transfusão recente, quando há hemácias do doador na circulação do receptor e, em pacientes com autoanticorpos (**ROZMAN et al, 2000; CASTILHO et al, 2002a, 2002b**).

As técnicas moleculares podem ainda identificar a presença de genes que codificam antígenos de grupos sanguíneos fracamente expressos na membrana, contribuindo para a prevenção de possíveis reações transfusionais hemolíticas (**REID, 2007**).

Enquanto os testes de hemaglutinação avaliam os produtos dos genes de grupos sanguíneos, a genotipagem detecta a sequência do DNA responsável pela expressão destes produtos (os antígenos eritrocitários). Desta forma, a genotipagem torna-se uma excelente alternativa para os casos onde os testes de hemaglutinação não apresentam eficiência (**DANIELS, 2005; REID e LOMAS-FRANCIS, 2002; CASTILHO et al, 2002a**).

Os protocolos moleculares atualmente empregados na genotipagem de grupos sanguíneos baseiam-se na reação de polimerase alelo-específico (AS-PCR), PCR seguido por análises dos fragmentos com enzimas de restrição (PCR-RFLP) (**REID e YASDANBAKHS, 1998; REID e RIOS, 1999; DENOMME et al, 2000**) e, mais recentemente as plataformas de microarray. (**BEIBOER et al, 2005; HASHMI et al, 2005**).

Uma das principais aplicações clínicas da genotipagem de grupos sanguíneos é auxiliar no processo de identificação de anticorpos de pacientes recentemente transfundidos e encontrar sangue fenótipo compatível para os mesmos. Estudos mostram que a presença de leucócitos nos produtos de sangue transfundidos não interferem na genotipagem de grupos

sanguíneos (REID, 1997; REID et al, 2000a; RIOS, 1999; ROZMAN et al, 2000; CASTILHO et al, 2002a).

Outra aplicação clínica da genotipagem inclui situações onde as hemácias estão revestidas com anticorpos IgG (isto é, na presença de um teste direto da antiglobulina positivo TAD+), pois a maioria dos anti-soros utilizados para a fenotipagem são reativos pelo teste da antiglobulina (REID et al, 2000a; CASTILHO et al, 2001).

A genotipagem molecular tem sido utilizada também para identificar pacientes falciformes com fenótipo Fy(b-), que podem ser transfundidos de forma segura com hemácias Fy(b+), sem o risco de desenvolverem anticorpos anti-Fy^b (REID e RIOS, 1999; CASTILHO et al, 2000).

Dois terços da população de origem Africana com fenótipo Fy(a-b-), possuem o gene *FY*B* com uma mutação no promotor eritróide (GATA) que leva a ausência de expressão da proteína Duffy e, conseqüentemente, do antígeno Fy^b na superfície das hemácias. No entanto, a proteína é expressa em outros tecidos, como por exemplo, nas células do endotélio de vasos sanguíneos (TOURNAMILLE et al, 1995; IWAMOTO et al, 1996; PARASOL et al, 1998).

A genotipagem pode ser empregada na seleção do sangue a ser transfundido em pacientes falciformes que apresentam anticorpos dirigidos à antígenos de alta frequência populacional (REID e LOMAS-FRANCIS, 2002). Isto é particularmente útil, quando anticorpos não estão disponíveis ou são fracamente reativos. Um bom exemplo, é o polimorfismo de grupo sanguíneo Dombrock em que, a genotipagem tem sido utilizada para determinar o perfil antigênico de pacientes e doadores e auxiliar no processo de identificação dos anticorpos presentes, diminuindo assim os efeitos de potenciais reações hemolíticas.

A possibilidade de identificar variantes Rh que ocorrem predominantemente em Africanos (HUANG, 1997; HEMKER et al, 1999; WESTHOFF et al, 2001; CASTILHO et al, 2001), bem como os mecanismos moleculares envolvidos, pode também ser de grande auxílio na prevenção da aloimunização contra o antígeno RhD em pacientes falciformes politransfundidos e inclusive identificar novos alelos.

Considerando ainda que alguns sistemas de grupos sanguíneos como Rh, Kell, Kidd e Diego estão diretamente envolvidos em reações transfusionais hemolíticas (**HUANG, 1997; ZELINSKI, 1998**) é importante avaliar o papel destes sistemas em pacientes portadores de hemoglobinopatias através de estudos sorológicos, moleculares e clínicos.

Embora a genotipagem venha complementar o teste de hemaglutinação, o genótipo de uma pessoa pode não se correlacionar com o fenótipo. Existem situações onde a genotipagem detecta a presença de um gene que não é expresso e, portanto, a proteína não é expressa na superfície das hemácias. Estas discrepâncias entre fenótipo e genótipo são atribuídas às transfusões crônicas ou maciças, em que o fenótipo do paciente reflete o sangue transfundido, alterações no gene que afetam sua transcrição (mutação de ponto em elementos reguladores, mutação em sítios de *splice*, *stop codon* prematuro), ausência da proteína de interação necessária para a expressão do antígeno na superfície da hemácia, *crossing over* e outros rearranjos gênicos (**REID et al, 2000b**). Portanto, os resultados devem ser cuidadosamente interpretados, principalmente na aplicação clínica.

Por exemplo, para uma correlação adequada entre o fenótipo e genótipo no sistema Rh em populações de ascendência Africana é necessário analisar a presença do pseudogene *RHD* e do gene híbrido *RHD-CE-D*. Quando estes genes estão presentes, fenótipo e genótipo são discordantes e deve-se considerar o resultado do fenótipo (**RODRIGUES et al, 2002**). Esta análise é extremamente importante na seleção do sangue para pacientes falciformes transfundidos (**SINGLETON et al, 2000**).

Embora este método tenha contribuído para importantes avanços na caracterização molecular dos antígenos de grupos sanguíneos, esta poderosa ferramenta só é utilizada em pequena escala, para resolução de casos isolados (**RODRIGUES et al, 2004; CASTILHO et al, 2005**), uma vez que para cada paciente ou doador analisado, dezenas de alelos diferentes devem ser pesquisadas para garantir a eficiência da análise, o que desencadeia a execução de diversas técnicas de PCR para cada amostra tornando a técnica trabalhosa dependendo da quantidade de alelos pesquisados, demandando o uso de muitos reagentes e horas de trabalho, além de exigir profissionais qualificados na execução dos procedimentos e interpretação dos resultados.

A alternativa para a resolução destes conflitos é a aplicação de técnicas moleculares que permitem o trabalho em larga escala (tecnologia de Microarray), ou seja, a triagem automatizada dos SNPs dos grupos sanguíneos, identificando em uma mesma amostra diversos antígenos em um único procedimento, possibilitando uma compatibilidade mais exata entre doadores e receptores. Isto possibilitaria um considerável aumento na qualidade de vida dos pacientes falciformes politransfundidos, pelo aumento da sobrevivência das hemácias transfundidas, e uma redução acentuada no uso de técnicas que pesquisam a presença de anticorpos em pacientes, minimizando desta forma, os custos com a automação.

A tecnologia Microarray, utiliza uma PCR multiplex que faz a amplificação simultânea de vários fragmentos de DNA onde ocorrem os polimorfismos, por meio de sondas de oligonucleotídeos depositadas em uma placa (vidro, sílica ou outros suportes) que, quando hibridizadas com DNAs alvo emitem fluorescência. A fluorescência emitida é detectada e interpretada por um sistema automatizado capaz de avaliar a intensidade da fluorescência e fornecer resultados que são facilmente visualizados através de gráficos ou tabelas de genótipos e fenótipos deduzidos a partir do resultado do genótipo (**PETRIK, 2001**).

Este procedimento é indicado para genotipagem principalmente por possuir uma plataforma rápida de genotipagem (análise de diversas amostras ao mesmo tempo), com excelente discriminação alélica, redução no número de procedimentos isolados (execução de um único PCR multiplex) e resultado altamente automatizado (**ANSTEE, 2005; HASHMI et al, 2005**).

Estas características conferem à técnica de microarray um valor laboratorial relevante no que se refere ao aumento da qualidade e precisão das técnicas utilizadas na rotina Imunohematológica (**DENOME e VAN, 2005**). A rapidez e a confiabilidade de resultados proporcionados por esta tecnologia aumentarão a exatidão da compatibilidade entre doador e receptor, bem como a segurança das transfusões. Além disto, ampliará significativamente o conhecimento dos grupos sanguíneos na população brasileira.

A genotipagem de grupos sanguíneos por “microarray” pode também ser útil para a criação de bancos de dados eletrônicos de doadores com características genotípicas raras, o que

permitiria a troca de amostras de sangue fenotipado entre serviços de Hemoterapia, possibilitando a identificação de doadores mais compatíveis com os pacientes em tempo reduzido (**ANSTEE, 2005**). Esta metodologia apresenta ainda grande potencial para fornecer importantes informações sobre o perfil molecular completo dos antígenos eritrocitários de grupos sanguíneos de populações miscigenadas.

Estudos preliminares utilizando a tecnologia BeadChip™ (**HASHMI et al, 2005**) para identificação de 18 polimorfismos de grupos sanguíneos em 1000 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue possibilitaram validar esta metodologia para utilização na população brasileira (**RIBEIRO et al, 2009**).

Apesar de alguns protocolos de genotipagem de grupos sanguíneos estarem bem estabelecidos e já validados em nossa população torna-se ainda necessário a implementação dos mesmos na clínica como forma de auxílio direto. Embora estudos já tenham sido realizados demonstrando que a genotipagem de grupos sanguíneos pode contribuir, substancialmente, na qualidade da transfusão de sangue fenotipado, sobretudo em pacientes que necessitam de transfusões de repetição, como por exemplo, pacientes portadores de anemia falciforme (**CASTILHO et al, 2002a, 2002b, RIBEIRO et al, 2009**), ainda não foram estabelecidos os protocolos para utilização clínica.

Não existem na literatura estudos de acompanhamento e aproveitamento transfusional dos pacientes falciformes transfundidos com sangue fenotipado a partir dos resultados do genótipo e portanto ainda não foi estabelecida uma conduta transfusional para estes pacientes.

Confirmadas as expectativas de que a genotipagem de grupos sanguíneos supere na prática todas as deficiências das atuais técnicas de fenotipagem, acreditamos que em um breve período de tempo, a tecnologia de análise em larga escala substituirá boa parte dos atuais procedimentos de hemaglutinação e conseqüentemente a atual configuração dos laboratórios de imunohematologia, o que permitirá a realização de genotipagem de grupos sanguíneos na rotina de bancos de sangue de forma automatizada, rápida e segura.

Os novos conhecimentos obtidos com o auxílio desta tecnologia poderão reduzir drasticamente os riscos do desenvolvimento de aloanticorpos em pacientes falciformes que

recebem transfusão sanguínea, o que representaria um estimado valor na clínica transfusional, tanto no que diz respeito à redução de custos quanto à qualidade e segurança dos procedimentos.

Recentemente a literatura apresentou um estudo observacional prospectivo mostrando ser teoricamente possível para um serviço de transfusão, criar e manter um estoque de unidades de sangue tipadas por DNA, utilizando a plataforma de Microarray, para facilitar a busca de sangue para pacientes aloimunizados e aumentar o grau de compatibilidade para pacientes não aloimunizados (**KLAPPER et al, 2010**). Futuros estudos são necessários para determinar a utilidade e a aplicação que a estratégia utilizada no estudo observacional pode ter na prática.

Pelo fato de acreditarmos que a biologia molecular pode ser uma alternativa importante na determinação do perfil antigênico e auxiliar no esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos com as diversas variantes de grupos sanguíneos, consideramos fundamental a realização de estudos que possam contribuir no aumento da segurança transfusional dos pacientes portadores de hemoglobinopatias, como por exemplo, os pacientes falciformes.

O fato de não existirem estudos de acompanhamento e aproveitamento transfusional dos pacientes falciformes com sangue fenotipado a partir dos resultados do genótipo e a necessidade da aplicação da genotipagem estendida na prática clínica, nos estimulou a realizar um estudo que permitisse buscar por uma melhor conduta transfusional para estes pacientes. A partir desse estudo, acreditamos que é possível estabelecer uma estratégia eficiente para busca de unidades compatíveis para pacientes falciformes.

2. OBJETIVOS

Considerando a importância da genotipagem de grupos sanguíneos na segurança transfusional de pacientes portadores de anemia falciforme, bem como os mecanismos moleculares envolvidos na expressão dos antígenos de grupos sanguíneos nestes pacientes, foram nossos objetivos:

1. Realizar genotipagem em larga escala para os sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Diego, Colton, Scianna, Dombrock, Lutheran e Landsteiner-Weiner em pacientes falciformes e seus potenciais doadores de sangue;

2. Identificar pacientes com fenótipo Fy(b-) que podem seguramente ser transfundidos com hemácias Fy(b+);

3. Identificar variantes de antígenos do sistema Rh que podem estar envolvidas na aloimunização de pacientes portadores de anemia falciforme;

4. Verificar a frequência dos alelos Dombrock e sua importância na aloimunização de pacientes falciformes politransfundidos;

5. Desenvolver uma estratégia eficiente para encontrar unidades de sangue com alto grau de compatibilidade para pacientes falciformes utilizando análises moleculares por microarray para garantir a qualidade da transfusão de sangue fenotipado nestes pacientes.

3. *CASUÍSTICA*

3.1 Amostras de sangue

Após consentimento informado, foram coletadas amostras de sangue periférico de doadores voluntários de sangue e pacientes falciformes politransfundidos em tubo de 5ml anticoaguladas com EDTA.

O número de amostras coletadas e sua classificação estão descritos abaixo:

3.1.1 Amostras de sangue de doadores voluntários de sangue

Após serem considerados aptos à doação de sangue (de acordo com os procedimentos operacionais da instituição), foram coletadas 504 amostras de sangue de doadores voluntários de sangue de repetição, sendo 308 doadores de Campinas e região atendidos no Hemocentro da Unicamp em Campinas, São Paulo e 196 doadores de Salvador atendidos no Hospital São Rafael em Salvador, Bahia.

3.1.2 Amostras de sangue de pacientes portadores de anemia falciforme

Foram coletadas amostras de sangue, de 283 pacientes portadores de anemia falciforme (homozigotos para hemoglobina S), atendidos no ambulatório de Hematologia e Hemoterapia do Hemocentro da Unicamp e no Hospital São Rafael, Salvador, Bahia. Estes pacientes foram previamente fenotipados para ABO, Rh (D, C, c, E, e) e K por testes de hemaglutinação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

4.1.1 Kits de extração de DNA

Para a extração do DNA do sangue periférico foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit da empresa Qiagen® (Chattlesworth, CA, US). O kit incluía Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, QIAamp colunas, tubos de lise e proteinase K.

4.1.2 Água livre de nuclease

A água livre de nuclease utilizada neste trabalho foi adquirida da empresa Applied Biosystems® (Foster City, CA, US). Este reagente foi utilizado na etapa final da extração de DNA, na reconstituição dos primers e nas reações de microarray.

4.1.3 Etanol

O etanol utilizado no protocolo de extração foi obtido da empresa Allkimia (Campinas, SP, BR).

4.1.4 Primers

Os primers utilizados para os protocolos de PCR convencional foram obtidos da empresa Invitrogen® (Carlsbad, CA, US) e estão descritos nas Tabelas 5, 7, 8, 10 e 12.

Para a execução da Técnica de “microarray” foram utilizadas as sondas (primers) contidas no Human Erythrocyte Antigen Kit (HEA 1.2), adquiridos da empresa BioArray Solutions (Warren, NJ, USA). O HEA 1.2 Kit continha junto as sondas específicas (Tabela 3), as soluções de 1X tampão de PCR (10mM Tris-HCl , pH 8.0, 50mM KCl, 0,1 % Triton X-100), 3,5mM MgCl e 200umol de cada dNTP e outros reagentes, que serão descritos oportunamente.

4.1.5 Enzimas de restrição

As enzimas de restrição utilizadas neste trabalho foram adquiridas das empresas New England Biolab® (Beverly MA) e MBI Fermentas® (Amherst, NY, USA) e foram utilizadas para digestão dos produtos de PCR de acordo com o polimorfismo estudado (Tabela 6, 9 e 11).

4.1.6 Taq DNA Polimerase

As enzimas Taq DNA polimerase, utilizadas nas reações de PCR convencional foram obtidas da Invitrogen® (Carisbad, CA). O Kit contendo 5 unidades/UI desta enzima, incluía 1ml de tampão 10X (200mM Tris-HCL (pH8.4) e 500mM de KCl e 1ml de MgCl₂ 50mM. O protocolo de PCR multiplex para genotipagem em larga escala utilizou 5,0U da enzima DNA polimerase de alta fidelidade Hot Start Taq DNA polimerase (Chattlesworth, CA, EUA) em cada reação.

4.1.7 dNTP 10Mm

As dNTPs foram obtidas da empresa Invitrogen® (Carisbad, CA). Para as reações de amplificação foram utilizadas dNTPs na concentração de 10mM (diluição de 20ul de cada nucleotídeo em 120ul de água deionizada).

4.1.8 Marcadores moleculares

Marcadores de 20pb, 50pb (New England Biolab®, Beverly, MA, US), 100pb (Fermentas Life Science®, Burlington, ON, CA), foram utilizados na análise do tamanho dos fragmentos de DNA.

4.1.9 Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) 10x

Este tampão foi preparado, dissolvendo 108g de Tris (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, US), 55g de ácido bórico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, US) e 40ml de EDTA 0,5M pH 8.0 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, US), em 1000ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

4.1.10 Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) 1x

O tampão TEB 1X foi preparado diluindo 100ml de TEB 10X em 900ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

4.1.11 Gel de agarose a 2%

A solução de agarose foi preparada dissolvendo 2g de agarose (Invitrogen ®, Carlsbad, CA, US) em 100ml de TEB 1X. Esta solução era aquecida em forno microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, era adicionado a ela 50µg de brometo de etídio (Invitrogen ®, Carlsbad, CA, US).

4.1.12 Gel de poliacrilamida 12%

A solução de poliacrilamida foi preparada misturando 23,3ml de acrilamida 40% (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD, US), 8,8ml de TEB 10X, 55ml de ddH₂O, 363µl de persulfato de amônio 10% (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD, US) e 16µl de TEMED (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD, US). Esta solução era colocada em uma placa de vidro, previamente preparada, até que ocorresse a sua polimerização.

4.1.13 Plataforma HEA BeadChip™

O HEA BeadChip™ (Human Erythrocyte Antigen), plataforma de “microarray” da empresa BioArray Solutions Ltd., Warren, NJ – USA, foi utilizado para a genotipagem de pacientes falciformes e doadores de sangue.

Esta plataforma, o HEA BeadChip™, utiliza um kit de reagentes comercializados pela empresa BioArray Solutions que contém todos os reagentes necessários para a execução da técnica, incluindo: lâminas de vidro com chips de DNA (sondas de oligonucleotídeos específicas) com capacidade para 8 ou 96 amostras, uma solução denominada HEA eMAP PCR Mix (contendo sondas de oligonucleotídeos, dNTPs e tampão para a reação de PCR multiplex) e outros reagentes (enzima ExoSAPIT (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway) e Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia Biotech) que são utilizados durante as outras etapas da técnica.

O HEA BeadChip™ (Human Erythrocyte Antigen), plataforma de “microarray” da empresa BioArray Solutions Ltd., Warren, NJ – USA, foi utilizado para a genotipagem de pacientes falciformes e doadores de sangue.

4.2 Métodos Empregados

4.2.1 Coleta e classificação das amostras e extração do DNA

Todas as 504 amostras de sangue de doadores voluntários de sangue e 283 amostras de sangue de pacientes falciformes pretendidas foram coletadas, após assinatura do termo de consentimento. As amostras foram classificadas, os respectivos DNAs foram extraídos de leucócitos utilizando-se o QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAamp, Qiagen, Missisauga, Canadá) e armazenados a -20°C .

Após extração, a qualidade/quantidade do DNA foi avaliada através de leitura óptica da absorbância (DO 260/280nm) e da concentração em ng/uL através de um equipamento de espectrofotometria (NanoDrop ND – 1000 Fullspectrum UV/Vis Spectrophotometer, Wilmington, DE 19810 USA).

As amostras de sangue cuja concentração final do DNA foram inferiores a 20ng/ul ou o valor de absorbância (DO 260/280) estavam fora do intervalo 1.7-1.9nm, tiveram o DNA extraído novamente, uma vez que, estas amostras podem apresentar quantidades significativas da sigla *LS* (*low signal*), que caracteriza a ausência de fluorescência mínima detectada pelo sistema automatizado.

4.2.2 Determinação em larga escala do perfil genético dos grupos sanguíneos em doadores voluntários e pacientes falciformes

Considerando que esta tecnologia já encontra-se padronizada em nosso laboratório (RIBEIRO et al, 2009), realizamos a genotipagem em larga escala de todas as amostras coletadas. Utilizamos a versão do Kit HEA (HEA 1.2 BeadChip™ Bioarray Solutions) que

contém os polimorfismos adicionais Kp^a/Kp^b , Js^a/Js^b e variantes do gene *RHCE* (VS, V, r's) importantes para indivíduos de origem Africana como os pacientes falciformes. A descrição dos procedimentos realizados encontra-se a seguir:

1. PCR multiplex e purificação da reação

Cada reação de PCR multiplex, realizada para que houvesse a amplificação das sequências alvo do DNA de todos os polimorfismos avaliados, utilizou 200ng de DNA, 50pmol da mistura de primers fosforilados, 1X tampão de PCR (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), 3.5mM MgCl₂, 200µmol de cada dNTP (HEA eMAP PCR Mix) e 5,0U de Hot Start Taq DNA polimerase, totalizando um volume final de 25µl. Em todas as reações foram incluídos uma amostra controle positivo (amostra com genótipo e fenótipo conhecido) e um controle negativo (água ao invés de DNA). Devido à ausência de DNA, este controle negativo deve apresentar como resultado em todos os polimorfismos a sigla *LS* (“*Low Signal*”). Caso algum polimorfismo apresente resultado ao invés da sigla *LS*, os valores de fluorescência (medida da emissão de luz) devem ser inferiores a 200 para que o teste seja considerado não contaminado. Amostras contendo DNA apresentam sinais máximos de fluorescência que variam de 2.000 a 12.000.

As amplificações foram feitas no termociclador GeneAmp Thermal Cycler Elmer 9700 (Foster City, CA), através do seguinte protocolo: desnaturação a 95°C por 15 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94°C; 20 segundos a 62°C; 20 segundos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Ao término da reação de PCR multiplex, foram obtidos 24 amplificações gênicas para cada amostra de DNA.

Tabela 3: Alelos e SNPs contidos no HEA BeadChip™

Sistema de grupo sanguíneo	Alelos	SNPs
Rh	<i>C/c</i>	307 C>T
		109 Ins
	<i>E/e</i>	676 G>C
	<i>VS</i>	733 C>G
	<i>V</i>	1006 G>T
Kell	<i>K/k</i>	698 T>C
	<i>Js^a/Js^b</i>	1910 C>T
	<i>Kp^a/Kp^b</i>	961 C>T
Duffy	<i>Fy^a/Fy^b</i>	125 G>A
	<i>GATA (Silencing FY)</i>	-33 T>C
	<i>Fy^x[Fy(b+^w)]</i>	265 C>T
Kidd	<i>Jk^a/Jk^b</i>	838 G>A
MNS	<i>M/N</i>	59 C>T
	<i>S/s</i>	143 T>C
	<i>Silencing S</i>	Ex5 230 C>T
	<i>Silencing S</i>	Int5 g>t
	Lutheran	<i>Lu^a/Lu^b</i>
Dombrock	<i>Do^a/Do^b</i>	793 A>G
	<i>Hy+/Hy-</i>	323 G>T
	<i>Jo(a+)/Jo(a-)</i>	350C >T
Landsteiner-Wiener	<i>LW^a/LW^b</i>	308 A>G
Diego	<i>Di^b/Di^a</i>	2561 C>T
Colton	<i>Co^a/Co^b</i>	134 C>T
Scianna	<i>Sc1/Sc2</i>	169 G>A
Hemoglobin S	<i>HgbS</i>	173 A>T

2. Remoção do excesso de primers e dNTP

A remoção de todo o excesso de reagentes do produto da reação de PCR multiplex foi feita através da adição de 2µl da solução ExoSAPIT a 6.5µl do produto de PCR amplificado, seguido da incubação a 37°C por 25 minutos e a 80°C por 15 minutos.

3. Obtenção da fita simples de DNA

Após a limpeza do produto do PCR multiplex, fitas simples de DNA de cada uma das amostras de DNA de doadores e de pacientes foram obtidas através da digestão enzimática do produto do PCR multiplex com 0.5 unidades de lambda exonuclease em tampão 1X, a 37°C por 25 minutos, e incubação final a 75°C por 10 minutos.

4. Hibridização do DNA alvo ao BeadChip™

Uma alíquota de 10µl de produto do PCR multiplex (DNA em fita simples) foi adicionada ao mesmo volume de uma mistura contendo 3U da enzima Thermo Sequenase, 1X tampão da enzima e 1µmol de cada dNTP (dCTP marcada com fluoróforos). Em cada BeadChip™, foi adicionado um volume de 15µl desta mistura. As lâminas contendo os chips foram então incubadas a 53°C por 15 minutos, para que houvesse ou não a hibridização do DNA alvo amplificado às sondas pré existentes no HEA BeadChip™. Diante da hibridização, seguia-se a extensão das fitas de DNA pela técnica “elongation-mediated multiplex analysis of polymorphisms” (eMAP), que através da enzima Thermo Sequenase adiciona dNTPs a nova fita de DNA formada (Figura 3). Depois de completado o período de incubação, todos os BeadChip™ foram lavados 3 vezes com água destilada, a fim de, remover todo e qualquer excesso de dNTP, a fim de, minimizar a emissão indesejada de sinal.

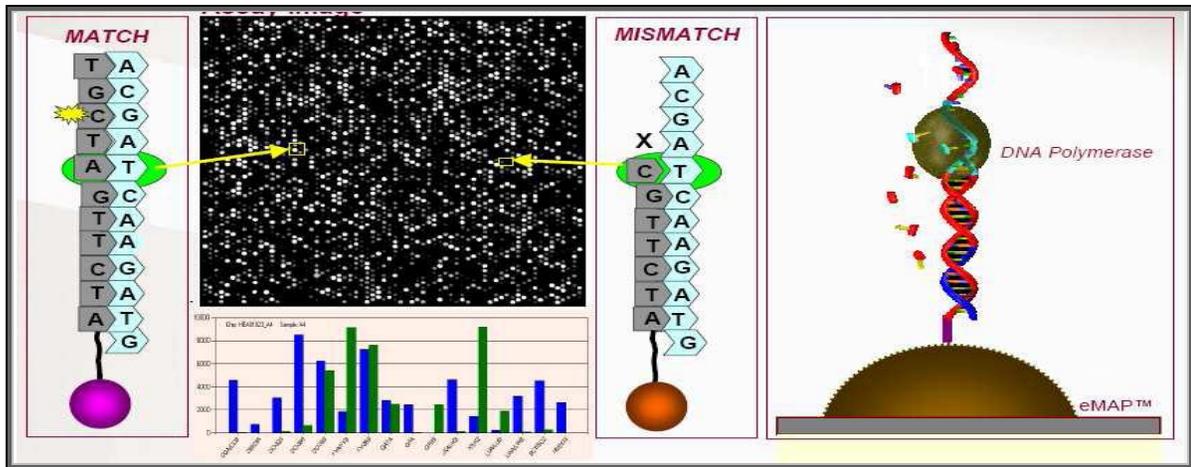


Figura 3: Hibridização e emissão de fluorescência. Em (a) é possível ver a emissão da fluorescência (visualizada através de um ponto branco na imagem) que ocorreu em função da hibridização do DNA alvo com a sonda pré-existente no BeadChip™. Em (b) não houve hibridização entre o DNA alvo e a sonda e desta forma, não se visualiza a emissão da Fluorescência.

O resumo de todos os procedimentos que compõe a técnica de genotipagem em larga escala da plataforma HEA BeadChip™ que duram em média 5 horas encontra-se na Figura 4.

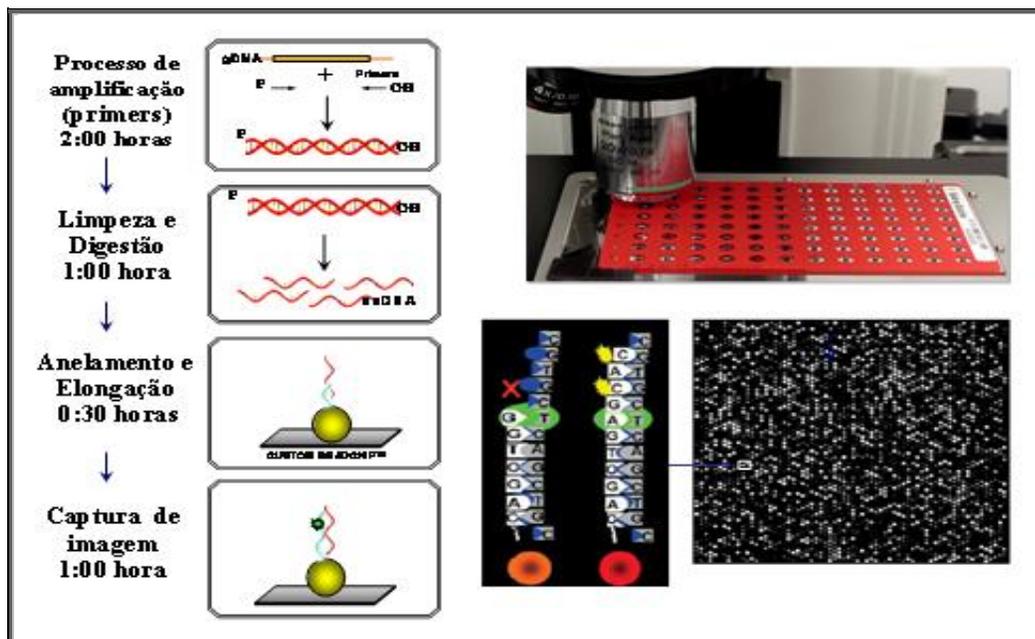


Figura 4: Resumo das etapas da técnica de “microarray” - plataforma HEA BeadChip™.

5. Aquisição automática da imagem e análise dos dados obtidos e interpretação dos resultados

Ao término da hibridização, as lâminas contendo o BeadChip™ foram levadas à um sistema de captura de imagem, o AIS Data Acquisition Basis™ (BioArray Solutions Information System), responsável pela captura e decodificação da fluorescência (Figura 5). Este sistema é composto por um leitor óptico de código de barras (lâminas) e um microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera fotográfica interligada a um software, o wHEA™ (Web-Based Human Erythrocyte antigen and Hemoglobinopathy analysis – BioArray Solutions, Ltda), que possibilita a identificação e interpretação do alelo hibridizado através da comparação dos valores de fluorescência obtidos com os valores de fluorescência dos polimorfismos depositados no Banco de Dados Basis™ (BioArray Solutions). A emissão dos resultados é feita na forma de tabelas e gráficos (Figuras 6 a 9).



Figura 5: Sistema automatizado de captura e análise de dados AIS 400 (Array Imaging System). Este sistema é formado por um microscópio de fluorescência acoplado a um leitor de código de barras e a um computador. Cada lâmina contendo os chips de DNA possui um código de barras que a identifica e fornece ao sistema importante informações sobre a localização das beads na lâmina.

Após a leitura do código de barras, o microscópio inicia a leitura de cada um dos BeadChip™ e transmite a captura da imagem para um sistema capaz de detectar a imagem e determinar a quantidade de fluorescência emitida por cada bead.

Na plataforma HEA BeadChip™, cada polimorfismo é representado por um par de sondas contendo um alelo normal e um alelo mutado. Durante a hibridização, somente as sequências de DNA que hibridizaram totalmente com as sondas de oligonucleotídeos tem suas sequências complementadas (processo de extensão do DNA) e são capazes de emitir intensos sinais de fluorescência. A intensidade da fluorescência produzida por um par de sondas, uma contendo o alelo A (normal) e a outra, o alelo B (mutado), forneceram a base para a discriminação dos alelos.

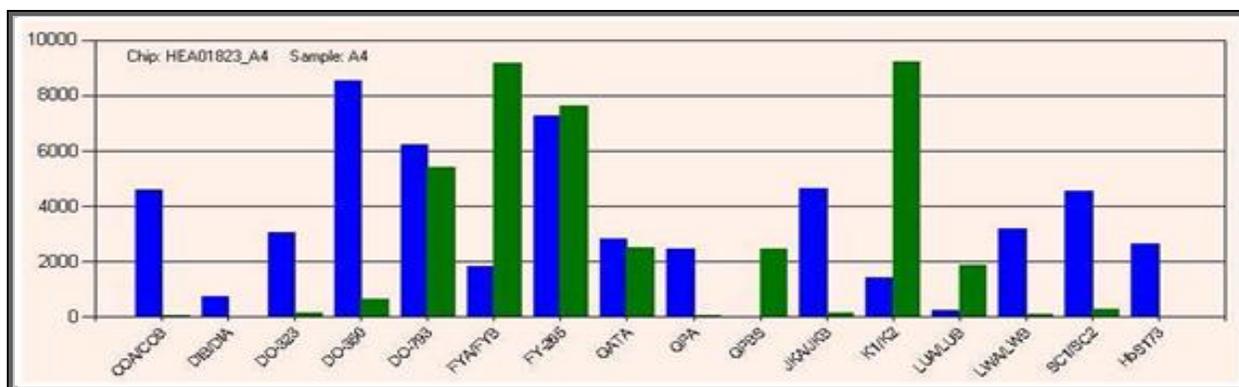


Figura 6: Emissão dos resultados: Intensidade gráfica do Sinal (cada primer) de discriminação entre cada alelo. O eixo-X contém o nome de cada polimorfismo e o eixo-Y contém a intensidade do sinal emitido. Para cada gene estudado há um par de sondas. Um para o alelo A (WT-Normal) e outra para o alelo B (mutado). Neste gráfico, o alelo B está em verde e o alelo A está representado em azul. Desta forma, a presença de dois alelos B significa homozigose para a este alelo enquanto que a presença de dois alelos A significa homozigose para este alelo, e no caso de existir um alelo A e um B, isto significa heterozigose para o alelo em questão. Desta forma, após o término da reação, é possível obter imediatamente os genótipos AA, BB e/ou AB para cada um dos polimorfismos estudados.

The top screenshot shows the 'WHEA GENOTYPE Result Table' with columns for markers like B1, B2, D3E, D5E, D7S, D8S, D9S, D10S, D11S, D12S, D13S, D14S, D15S, D16S, D17S, D18S, D19S, D20S, D21S, D22S, D23S, D24S, D25S, D26S, D27S, D28S, D29S, D30S, D31S, D32S, D33S, D34S, D35S, D36S, D37S, D38S, D39S, D40S, D41S, D42S, D43S, D44S, D45S, D46S, D47S, D48S, D49S, D50S, D51S, D52S, D53S, D54S, D55S, D56S, D57S, D58S, D59S, D60S, D61S, D62S, D63S, D64S, D65S, D66S, D67S, D68S, D69S, D70S, D71S, D72S, D73S, D74S, D75S, D76S, D77S, D78S, D79S, D80S, D81S, D82S, D83S, D84S, D85S, D86S, D87S, D88S, D89S, D90S, D91S, D92S, D93S, D94S, D95S, D96S, D97S, D98S, D99S, D100S. The bottom screenshot shows the 'WHEA PHENOTYPE Result Table' with columns for markers like RFL, KAI, KAI2, Duffy, MHC, Lutheran, Diego, Canton, Donnan, Lanthanase, Sialinase, and HLA. The table lists samples HEA102M_1 through HEA102M_8 and HEA102M_9, with results for each marker.

Figura 7: Relatório de resultado do genótipo (doadores) gerado automaticamente pelo sistema após a aquisição da intensidade de hibridização. (AA) significa homoziguidade para o alelo Selvagem, assim como (BB) indica presença do alelo mutado em homozigose, enquanto que (AB) caracteriza o alelo em questão como sendo heterozigoto e relatório de resultado do fenótipo deduzido do genótipo, onde o sinal (+) significa presença do alelo e (0) significa ausência do alelo.

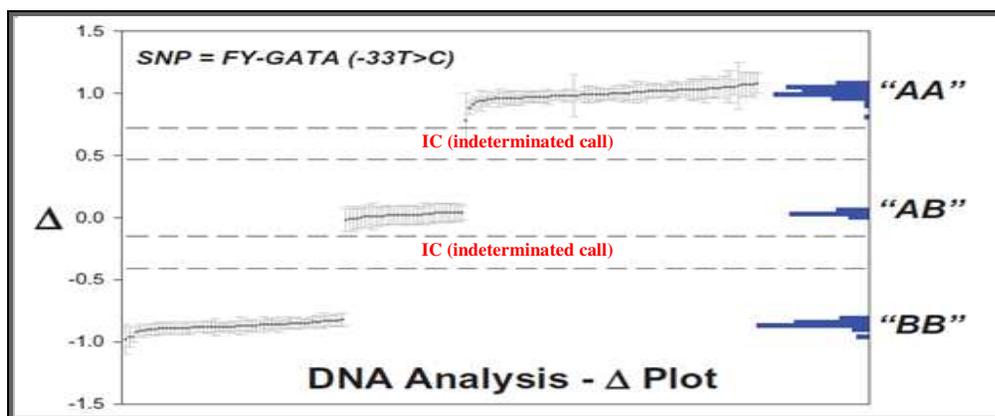


Figura 8: Imagem do software de análise wHEATM: possibilita a discriminação alélica. Amostras situadas entre as linhas tracejadas (-0,5 a -0,1 e 0,5 a 0,75) apresentam com resultado a sigla IC, demonstrando a incapacidade do software em caracterizar o alelo.

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Phenotyping by DNA Analysis Report

Report Date/Time: February 4, 2011 08:21 PM Sample ID: DSACCR_1348
 Chip Read Date/Time: November 19, 2010 12:30 PM Chip ID: 00AA057_2

Blood Group	Antigen	Result	Notes
Rh	D	+	
	C	+++	
	c	+	
Kell	K	+	
	k	+	
	K ₁	+	
	K ₂	+	
	K ₃	+	
	K ₄	+	
Kidd	Jk ^a	+	
	Jk ^b	+	
Kidd	Jk ^a	+	
	Jk ^b	+	
Duffy	Fy ^a	+	
	Fy ^b	+	
MN	M	+	
	N	+	
	S	+	
Lutheran	L ^u	+	
	L ^u b	+	
Elster	El ^a	+	
	El ^b	+	
Carton	C ¹	+	
	C ²	+	
Bombay	H ^a	+	
	H ^b	+	
	H ^c	+	
Landsteiner-Wasserman	S, W ^a	+	
	S, W ^b	+	
Bernese	Bu ¹	+	
	Bu ²	+	
Humanoid B	B ⁰	+	

Assay: Standard NGS
 Notes:
 Method: Standard NGS
 Date: 02/04/2011 08:21 PM
 Operator: [unreadable]
 Instrument: Illumina HiSeq 2000
 Software: Illumina CASAVA 1.8.2
 Reference: [unreadable]

Figura 9: Relatório de resultados de fenótipos deduzidos dos genótipos (paciente) gerado automaticamente pelo sistema após a aquisição da intensidade de hibridização para cada amostra analisada.

4.2.3 Cálculos de frequências gênicas

Os cálculos das frequências gênicas foram realizados de acordo com o descrito por Beiguelman (BEIGUELMAN, 2003).

4.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da Polimerase (PCR) utilizou 200ng de DNA, 50pmol de cada primers, 2nmol de cada dNTP, 1.0U de *Taq* DNA polimerase e tampão em um volume final de 50µl. Todas as reações de PCR incluíram um protocolo padrão com variações na temperatura de anelamento e o número de ciclos encontrados na Tabela 4, realizados em um termociclador GeneAmp Thermal Cycler Elmer 9700 (PE Applied Biosystems). A análise final dos produtos de

PCR obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2,0%, e gel de poliacrilamida 12%. As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se nas Tabelas 5, 7, 8, 10 e 12.

Tabela 4: Variações de temperatura de anelamento e número de ciclos das técnicas de PCR utilizadas

Genotipagem	Temperatura de Anelamento	N° de ciclos
<i>DI*A/DI*B, FY*A/FY*B, FY-GATA, KEL*1/KEL*2, JK*A/JK*B, RHCE*Ee</i>	20 segundos a 94°C, 20 segundos a 62°C, 20 segundos a 72°C	35
<i>RHD, RHDΨ</i>	1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, 3 minutos e 30 segundos a 72°C	32
<i>RHD*DIIIa e RHD*DAR</i>	25 segundos a 95°C, 15 segundos a 62°C, 20 segundos a 72°C	35
<i>RHCE*ceBI</i>	20 segundos a 94°C, 20 segundos a 58°C, 20 segundos a 72°C	35
<i>RHCE*ceSM</i>	20 segundos a 94°C, 20 segundos a 60°C, 20 segundos a 72°C	35

4.2.5 Análise dos fragmentos de PCR após digestão com enzimas de restrição (RFLP)

Os produtos de PCR amplificados foram digeridos *overnight* com enzimas de restrição apropriadas (New England Biolab®, e MBI fermentas®, Amherst, NY) em um volume final de 20µl, utilizando-se 10µl do produto de PCR e 10µl da mistura de enzima/tampão, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A análise do tamanho dos fragmentos obtidos com a digestão enzimática foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2% e poliacrilamida 12%. As enzimas de restrição encontram-se descritas nas Tabelas 6, 9 e 11.

4.2.6 Genotipagem convencional para a determinação dos polimorfismos *DI*A/DI*B*, *FY*A/FY*B*, *FY-GATA*, *KEL*1/KEL*2*, *JK*A/JK*B*, *RHCE*Ee*

A genotipagem convencional dos principais antígenos de grupos sanguíneos foi realizada para 35 amostras de DNA de pacientes falciformes e doadores voluntários, nas quais obtivemos *LS* (*low signal*) ou *IC* (*Indeterminated call*) na genotipagem por microarray. Para a determinação dos antígenos de grupos sanguíneos dos Sistemas Diego, Duffy, Duffy-GATA, Kell, Kidd e Rh (Ee) foi realizada uma técnica de PCR-RFLP (PCR seguido de digestão enzimática) com *primers* específicos para cada sistema estudado (descritos na Tabela 5).

Tabela 5: Sequências de primers utilizados na determinação dos polimorfismos *DI*A/DI*B*, *FY*A/FY*B*, *FY-GATA*, *KEL*1/KEL*2*, *JK*A/JK*B*, *RHCE*Ee* de acordo com CASTILHO et al, 2002

Grupo sanguíneo	Alelos	Polimorfismos	Sequências dos primers
Diego	<i>DI*A/DI*B</i>	2561 T>C	5'-TGG CGC ATG CAC TTA TTC AC -3' 5'-TTC CTG AAG ATG AGC GGC AG -3
Duffy	<i>FY*A/FY*B</i>	125 G>A	5' – TCCCCCTCAACTGAGAACT - 3' 5' – AAGGCTGAGCCATAACCAGAC – 3'
Duffy-GATA	<i>FYnull</i>	- 33 T>C	5' – CAAGGCCAGTGACCCCCATA – 3' 5' – CATGGCACCGTTTGGTTCAG – 3'
Kell	<i>KEL*1/KEL*2</i>	698 T<C	5' – AAGCTTGGAGGCTGGCGCAT – 3' 5' – CCTCACCTGGATGACTGGTG – 3'
Kidd	<i>JK*A/JK*B</i>	838 G>A	5' – TGAGATCTTGGCTTCCTAGG – 3' 5' – ATTGCAATGCAGGCCAGAGA – 3'
Rh	<i>RHCE* Ee</i>	676 G>C	5' – GGC AAC AGA GCA AGA GTC CA – 3' 5' – CTG ATC TTC CTT TGG GGG TG – 3'

Os produtos do PCR-RFLP foram digeridos overnight com enzimas de restrição apropriadas (Tabela 6) e após a digestão, foi possível analisar os fragmentos de PCR-RFLP através de eletroforese em gel de agarose a 2% e poliacrilamida a 12% (Figuras 10 a 15).

Tabela 6: Enzimas utilizadas para digestão dos produtos dos PCR-RFLP

Grupo Sanguíneo	Alelos	Polimorfismo	Enzimas de restrição
Diego	<i>DI*A/DI*B</i>	2561 T>C	<i>Msp I</i>
Duffy	<i>FY*A/FY*B</i>	125 G>A	<i>Ban I</i>
Duffy-GATA	Silency Duffy	-33 T>C	<i>Sty I</i>
Kell	<i>KEL*1/KEL*2</i>	698 T>C	<i>Bsm I</i>
Kidd	<i>JK*A/JK*B</i>	838 G>A	<i>Mnl I</i>
Rh	<i>RHCE*Ee (A226P)</i>	676 G>C	<i>Mnl I</i>

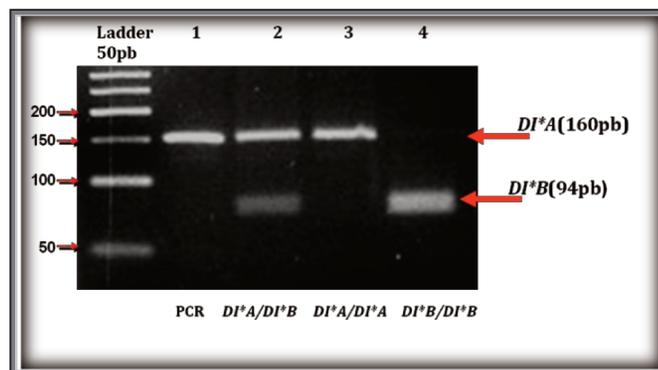


Figura 10: Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo *DI*A/DI*B*.

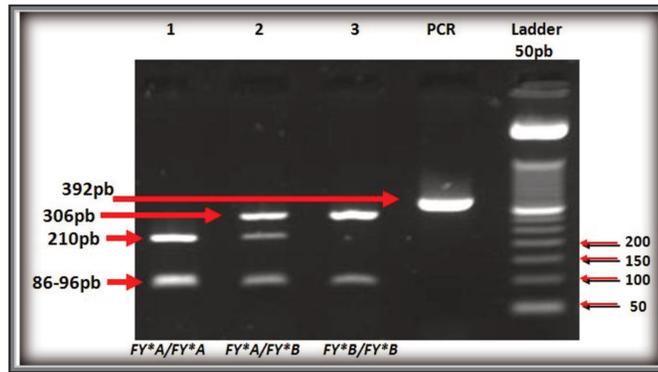


Figura 11: Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo *FY*A/FY*B*.

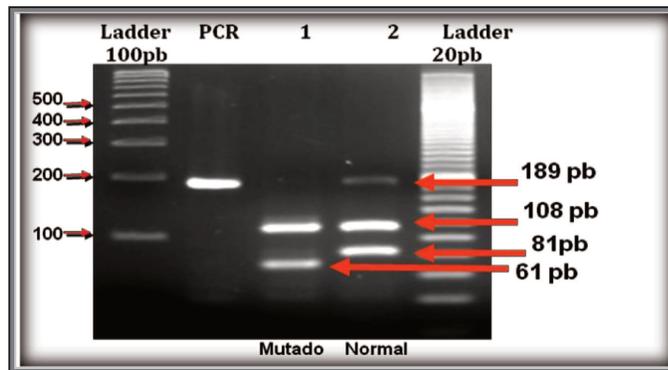


Figura 12: Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo *GATA Normal (W/W) e Mutado (M/M)*.

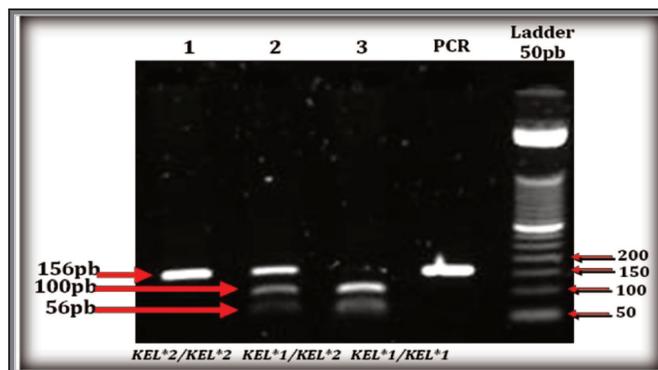


Figura 13: Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo *KEL*1/KEL*2*.

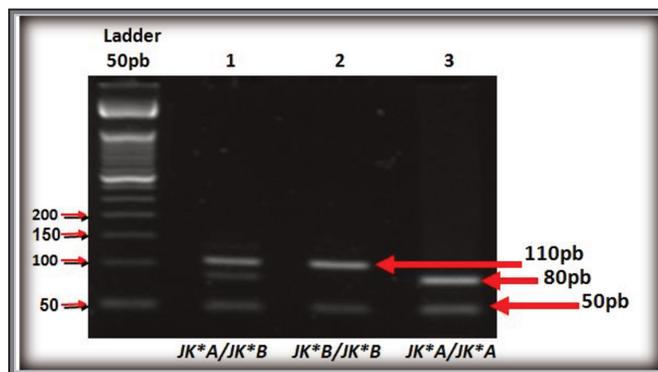


Figura 14: Foto gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo

*JK*A/JK*B*.

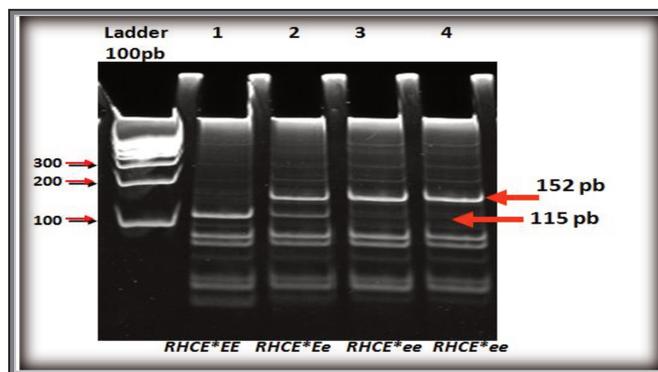


Figura 15: Foto do gel de poliacrilamida a 12% para identificação do polimorfismo *RHCE*Ee*.

4.2.7 Genotipagem *RHD*

Para a determinação do gene *RHD* foi realizada uma técnica de PCR alelo-específico que permitiu a amplificação de 2 regiões genômicas: Intron 4 e Exon 7. Foram utilizados *primers* que permitem determinar a presença do gene *RHD*, pela análise direta do produto de PCR, após eletroforese em gel de agarose a 2,0% (Figura 16). Em cada reação foi adicionado um controle interno (HGH) para sucesso de amplificação. As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na Tabela 7.

Tabela 7: Sequências de primers utilizados para a determinação de *RHD* e *RHDΨ* de acordo com CASTILHO et al, 2002

Grupo sanguíneo	Alelos	Sequências dos primers
Rh	<i>RHD</i>	5' – AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA – 3'
		5' – ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC – 3'
		5' – GGG TTG GCT GGG TAA GCT CT – 3'
		5' – GAA CCT GCT CTG TGA AGT GCT – 3'
	<i>RHD*Ψ</i>	5' – AAT AAA ACC AGT AAG TTC ATG TGG – 3'
		5' – AAC CTG GGA GGC AAA TGT TT – 3'
HGH		5'TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTTA 3'
		5'CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTTTC 3'

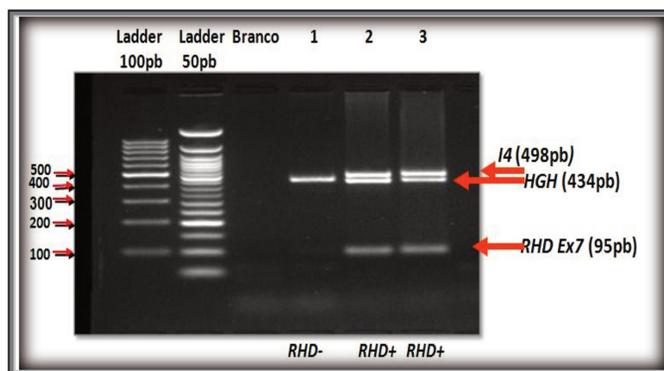


Figura 16: Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo *RHD*.

4.2.8 Determinação do Pseudogene (*RHDΨ*)

Para determinação do pseudogene *RHD* foi realizada uma técnica de PCR alelo específico que permite a detecção da duplicação de 37pb no gene *RHD*. Foram utilizados *primers* que permitem determinar a presença do pseudogene *RHD*, pela análise direta do produto de PCR, após eletroforese em gel de agarose a 2,0% (Figura 17). Em cada reação foi adiciona um controle

interno (HGH) para sucesso de amplificação. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na Tabela 7.

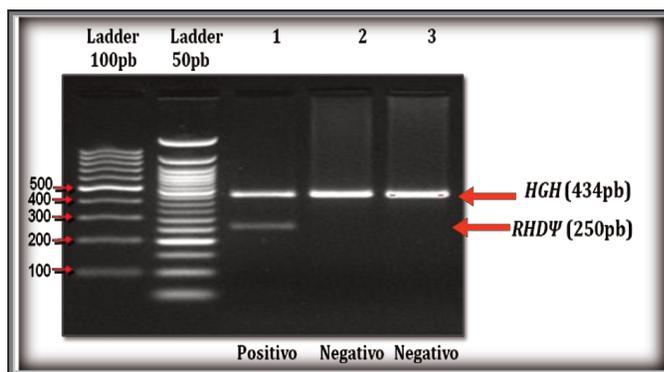


Figura 17: Foto do gel de agarose a 2% para identificação do polimorfismo *RHD*Ψ*.

4.2.9 Determinação das variantes *RHCE*ceBI* (*RHCE*818C>T*) e *RHCE*ceSM* (*RHCE*1132G>C*)

Para a determinação de variantes do gene *RHCE* predominantes em populações de origem Africana foi realizada genotipagem convencional através de uma técnica de PCR-RFLP utilizando *primers* específicos (Tabela 8) para a determinação dos alelos *RHCE*ceBI* (*RHCE*ce 48C, 818T*) e *RHCE*ceSM* (*RHCE*ce 48C, 818T, 1132C*). Os produtos do PCR-RFLP foram digeridos overnight com enzimas de restrição apropriadas (Tabela 9) e após a digestão enzimática foi possível analisar os fragmentos de PCR-RFLP através de eletroforese em gel de agarose a 2% (Figuras 18 e 19).

Tabela 8: Sequências de *primers* utilizadas para a determinação das variantes do gene *RHCE*

Variantes	Polimorfismos	Sequências dos primers
<i>RHCE*ceBI</i>	<i>RHCE 818 C>T</i>	5'-GAGTGTGATGGGTGCCTAGGATGCTGAGCACCT-3' 5'-CCTGCTGGCCTTCAGCCAAAGCAGAGAGCA-3'
<i>RHCE*ceSM</i>	<i>RHCE 1132 G>C</i>	5'-CTGGAGGCTCTGAGAGGTTAAAGG-3' 5'-CATAGACATCCAGCCACACGGCA-3'

Tabela 9: Enzimas utilizadas para digestão dos produtos do PCR-RFLP das variantes *RHCE*

Variantes	Polimorfismos	Enzimas de restrição
<i>RHCE*ceBI</i>	<i>RHCE 818 C>T</i>	<i>MwoI</i>
<i>RHCE*ceSM</i>	<i>RHCE 1132 G>C</i>	<i>Tsp45I</i>

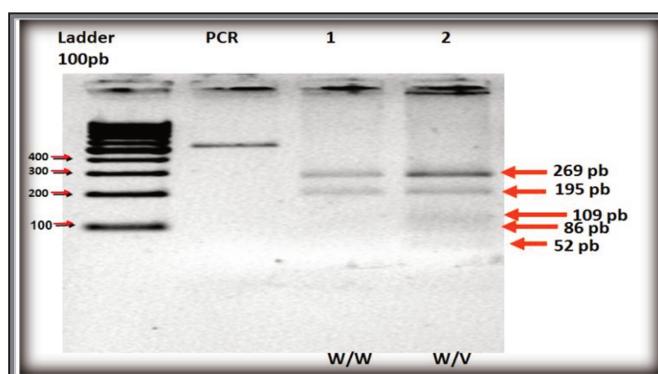


Figura 18: Foto do gel do produto de PCR da reação *RHCE*1132 G>C* Exon 8, digerido após digestão enzimática com *Tsp45 I*. Os fragmentos 269, 195, 52pb na reação *RHCE*1132C* determinam tipo selvagem (wild type) e os fragmentos 269, 109, 86, 52pb determinam a variante *RHCE*ceSM*.

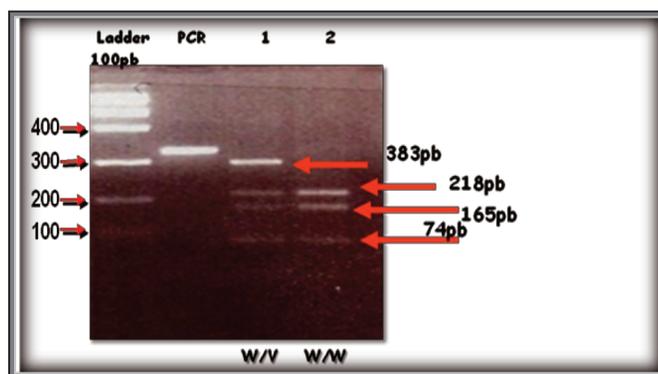


Figura 19: Foto do gel do produto de PCR da reação RHCE*818 C>T Exon 6, digerido após digestão enzimática com *Mwo* I. Os fragmentos 218, 165, 74 e 21pb na reação RHCE*818T determinam tipo selvagem (wild type) e os fragmentos 383, 74, 21pb determinam a variante *RHCE*ceBI*.

4.2.10 Determinação da variante *RHD*DIIIa*

A determinação da variante DIIIa foi realizada através de uma técnica de PCR-RFLP previamente padronizada em nosso laboratório (CASTILHO et al, 2005) amplificando-se o exon 3 do gene *RHD* que contém a mutação específica da variante *RHD*DIIIa*. Foram utilizados *primers* específicos (Tabela 10) para a identificação da mutação 455A>C no exon 3 do gene *RHD* e os produtos do PCR-RFLP foram digeridos overnight com enzimas de restrição apropriadas (Tabela 11).

Tabela 10: Primers utilizados na técnica de PCR para a determinação da variante DIIIa

Variante	Primers	Sequências dos primers
<i>RHD*DIIIa</i>	RHDEX3F	5'-TAT TCG GCT GGC CAC CAT GA-3'
	RHDI3R	5'-TTC TAA TTT TGC CTG TAA TC-3'

Tabela 11: Enzimas utilizadas para digestão dos produtos do PCR-RFLP das variantes *RHD*DIIIa* e *RHD*DAR*.

Variantes	Polimorfismos	Enzimas de restrição
<i>RHD*DIIIa</i>	455A>C	<i>Ban I</i>
<i>RHD*DAR</i>	1025T>C	<i>Hph I</i>

Após a digestão, foi possível analisar os fragmentos de PCR-RFLP através de eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 20).

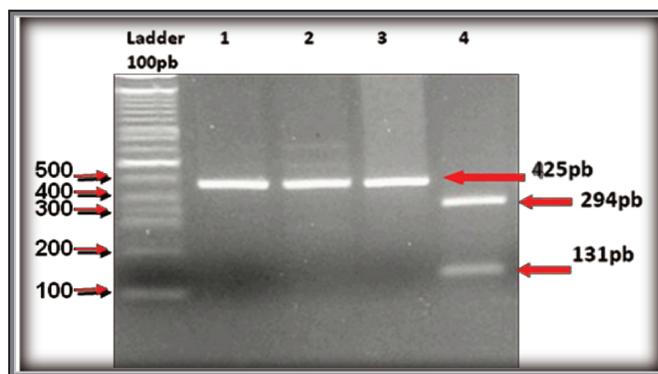


Figura 20: RFLP após digestão com a enzima *Ban I* dos produtos de PCR amplificados em gel de agarose a 2%. Amostra 1: Produto de PCR não digerido. Amostras 2 e 3: *RHD* normal. Amostra 4: *RHD*DIIIa* homocigota.

4.2.11 Determinação da variante *RHD*DAR*

A determinação da variante *RHD*DAR* foi realizada através de uma técnica de PCR-RFLP previamente padronizada em nosso laboratório (CASTILHO et al, 2005) amplificando-se o exon 7 do gene *RHD* que contém a mutação específica da variante *RHD*DAR*. Foram utilizados *primers* específicos (Tabela 12) para a identificação da mutação 1025T>C no exon 7 do gene *RHD* e os produtos do PCR-RFLP foram digeridos overnight com enzimas de restrição apropriadas (Tabela 11).

Tabela 12: Sequência de *Primers* utilizados na técnica de PCR para a determinação da variante DAR

Variante	<i>Primers</i>	Sequências dos primers
<i>RHD*^{DAR}</i>	RHD16F	5'- TCA TAC TGT GGT CCG TAA AC-3'
	RHDEX7R	5'- CAA TCA TGA CCA TTG CC - 3'

Após a digestão, foi possível analisar os fragmentos de PCR-RFLP através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (Figura 21).

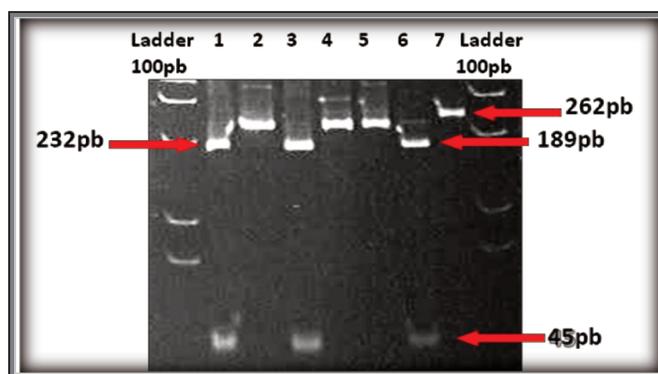


Figura 21: RFLP após digestão com a enzima *Hph* I dos produtos de PCR amplificados em gel de poliacrilamida a 12%. Amostras 1, 3 e 6: *RHD*^{DAR}* heterozigotas. Amostras 2, 4 e 5: *RHD*^{DAR}* homozigotas. Amostra 7: Produto de PCR não digerido.

4.2.12 Desenvolvimento de estratégia para busca de unidades de sangue com alto grau de compatibilidade para pacientes falciformes

De acordo com os resultados obtidos nas genotipagens em larga escala dos doadores e pacientes falciformes, desenvolvemos uma estratégia eficiente para seleção não só de doadores compatíveis, mas também das unidades de sangue nos estoques dos Serviços de Hemoterapia. A estratégia desenvolvida foi a compatibilidade eletrônica em níveis de compatibilidade baseado no trabalho de Klapper e colaboradores (KLAPPER et al, 2010) e de acordo com a necessidade da

população brasileira. Para tal, foi desenvolvido um software, que facilitou e tornou mais rápida a busca por unidades compatíveis para os pacientes. Os níveis estabelecidos encontram-se na Figura 22.

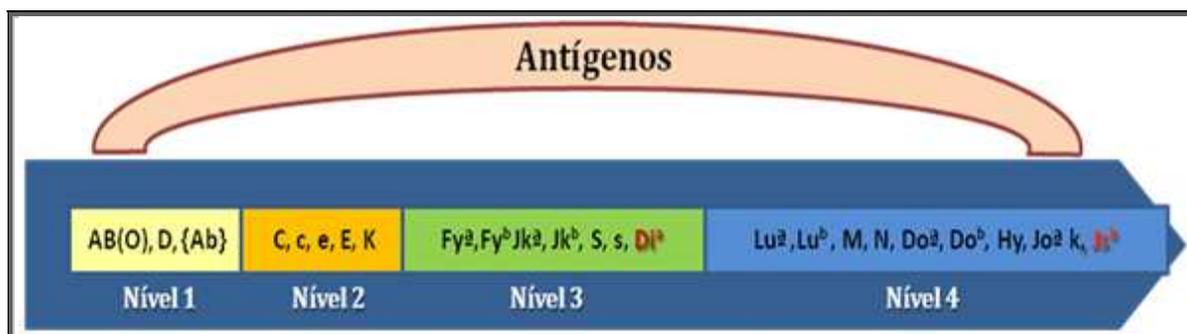


Figura 22: Níveis de compatibilidade estabelecidos baseados no trabalho de Klapper e colaboradores e de acordo com as necessidades da população brasileira, no nível 3 adicionamos o antígeno Di^a e no nível 4 adicionamos o antígeno Js^b, que são antígenos importantes para pacientes falciformes.

4.2.13 Propostas de compatibilidade genética que podem melhorar a segurança transfusional de pacientes falciformes

Para que pudéssemos comparar se realmente a compatibilidade genética era superior a compatibilidade sorológica para pacientes politransfundidos, realizamos a compatibilidade genética de acordo com os resultados obtidos pelo HEA BeadChipTM entre as amostras de DNA de pacientes politransfundidos e das unidades de sangue de doadores que foram compatibilizadas para eles, no laboratório de Imunohematologia, nos 4 níveis de compatibilidade estabelecidos na Figura 22.

4.2.14 Desenvolvimento de um software para realização de compatibilidade genética eletrônica

Durante a realização da genotipagem em larga escala das amostras de DNA dos pacientes e doadores de sangue, foi desenvolvido um software para que fosse possível a inserção dos resultados de genotipagem, quando estes estivessem disponíveis e para realizar a compatibilidade eletrônica em níveis de compatibilidade estabelecidos entre pacientes falciformes e doadores.

Com o auxílio desse software foi possível realizar compatibilidade eletrônica permitindo a busca de doadores com alto grau de compatibilidade para os pacientes falciformes, de acordo com o perfil gênico selecionado em um curto período de tempo.

As telas abaixo ilustram como foi realizada a busca de doadores compatíveis para pacientes falciformes utilizando-se o software desenvolvido especificamente para este trabalho. (Figuras 23 a 28).



Figura 23: A figura ilustra a tela inicial de acesso ao software.

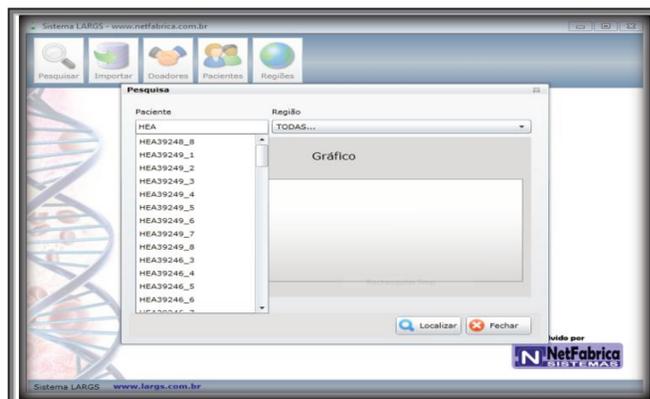


Figura 24: Tela do software onde é selecionado o paciente para o qual será feita a busca de compatibilidade. No software todas as amostras de doadores e pacientes são identificadas pelo número do chip da lâmina que foi utilizada para a genotipagem em larga escala.

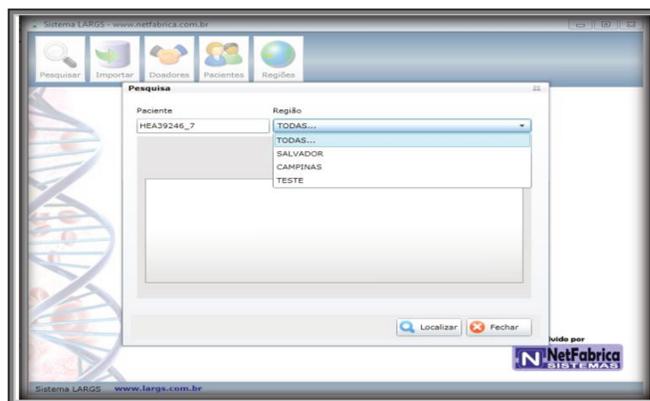


Figura 25: Tela do software que permite selecionar a região de origem dos doadores que serão compatibilizados para os pacientes falciformes.

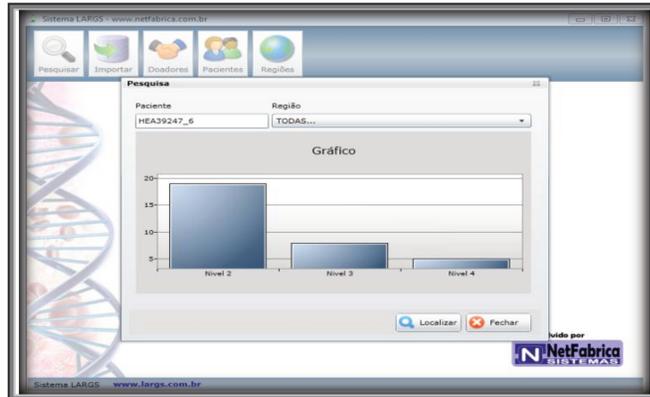


Figura 26: A figura ilustra a tela gerada pelo software, indicando em gráficos de níveis de compatibilidade (Nível 2, 3 e 4) a quantidade de doadores encontrados para o paciente selecionado.

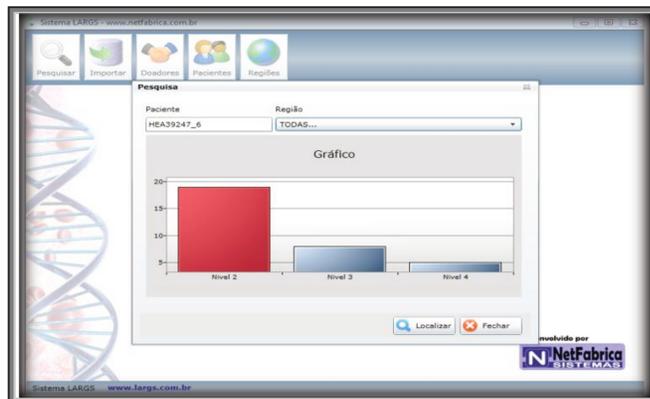


Figura 27: A figura ilustra o gráfico do nível 2 selecionado (em vermelho), mostrando que a busca por compatibilidade para o paciente selecionado será realizada para nível 2.

Chip	Sample	Região	ABO	D	c	C	e	E	K	Fy*	Fy*	Jk*	Jk*	S	s	C
HEA39246_7	PC 15	1	O POS	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0
HEA39259-5	FCZG	2	O POS	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0
HEA39261-7	JOT	2	O POS	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0
HEA39262-2	DMP	2	O POS	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	+	0
HEA39262-5	KCSS	2	O POS	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0
HEA39264-8	SAC	2	O POS	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0
HEA39265-8	EAD	2	O POS	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	+	+	0
HEA39268-5	CSA	2	O POS	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	0
HEA39268-6	QHP	2	O POS	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0
HEA39271-1	ACAR	2	O POS	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0
HEA39273-6	LAC	2	O POS	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	+	+	0
HEA42551_7	DOA 16	1	O POS	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0
HEA42561_6	DOA 34	1	O POS	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0

Figura 28: Resultados dos fenótipos de 29 doadores compatíveis em nível 2 encontrados para o paciente selecionado (Fenótipo em negrito).

5. RESULTADOS

5.1 Genotipagem em larga escala dos alelos de grupos sanguíneos em amostras de doadores voluntários de sangue e de pacientes falciformes

A genotipagem em larga escala dos alelos de grupos sanguíneos pela técnica de HEA BeadChip™ foi realizada em 504 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue e em 283 amostras de DNA de pacientes falciformes. Esta análise possibilitou a determinação das frequências genotípicas e alélicas dos principais genes de grupos sanguíneos na população estudada (Tabelas 13 a 16).

Os resultados das frequências genotípicas e alélicas de grupos sanguíneos observadas nos doadores voluntários de sangue encontram-se nas Tabelas 13 e 14 e os resultados das frequências genotípicas e alélicas observadas nos pacientes falciformes encontram-se nas Tabelas 15 e 16.

Foram identificados nas amostras estudadas 209 fenótipos de difícil caracterização sorológica em virtude da ausência ou dificuldade na obtenção dos anti-soros comerciais para identificação destes antígenos (Tabela 17).

Além disso, nestas amostras foram identificados 11 fenótipos raros, ou seja, fenótipos com frequência menor que 1% da população (Tabela 18).

Tabela 13: Resultados dos genótipos de doadores e frequência genotípica observada para os principais sistemas de grupos sanguíneos

Doadores	C/c	E/e	Genótipo																			
			K1/K2	K3/K4	K6/K7	JKA/JKB	FYA/FYB	GATA	FY-265	GPA	GPB	GYPB*Del	GYPB.P2	LUA/LUB	DIA/DIB	COA/COB	DO-793	DO-350	DO-323	LWA/LWB	SC1/SC2	
Campinas																						
n= 308																						
AA	128	240	0	0	0	105	36	224	300	88	33	307	303	308	0	1	286	34	297	298	308	307
	0,42	0,78	0	0	0	0,34	0,12	0,73	0,97	0,29	0,11	0,997	0,98	1,00	0	0,003	0,93	0,11	0,96	0,97	1,00	0,997
AB	123	61	7	4	11	143	130	61	8	158	110	0	5	0	22	10	22	149	11	10	0	1
	0,40	0,20	0,02	0,01	0,04	0,46	0,42	0,20	0,03	0,51	0,36	0	0,02	0	0,07	0,032	0,07	0,48	0,04	0,03	0	0,003
BB	57	7	301	304	297	60	142	23	0	62	165	1	0	0	286	297	0	125	0	0	0	0
	0,19	0,02	0,98	0,99	0,96	0,19	0,46	0,07	0	0,20	0,54	0,003	0	0	0,93	0,964	0	0,41	0	0	0	0
Salvador																						
n= 196																						
AA	98	155	0	0	0	74	9	71	192	38	20	193	185	195	0	0	194	20	189	189	196	196
	0,50	0,79	0	0	0	0,38	0,05	0,36	0,98	0,19	0,10	0,98	0,94	0,99	0	0	0,99	0,10	0,96	0,96	1,00	1,00
AB	78	37	7	0	9	94	79	79	4	108	11	0	9	0	17	6	2	84	7	7	0	0
	0,40	0,19	0,04	0	0,05	0,48	0,40	0,40	0,02	0,55	0,06	0	0,05	0	0,09	0,03	0,01	0,43	0,04	0,04	0	0
BB	20	4	189	196	187	28	108	46	0	50	165	3	2	1	179	190	0	92	0	0	0	0
	0,10	0,02	0,96	1,00	0,95	0,14	0,55	0,23	0	0,26	0,84	0,02	0,01	0,01	0,91	0,97	0	0,47	0	0	0	0
Geral																						
n= 504																						
AA	226	395	0	0	0	179	45	295	492	126	53	500	488	503	0	1	480	54	486	487	504	503
	0,45	0,78	0	0	0	0,36	0,09	0,59	0,98	0,25	0,11	0,99	0,968	0,998	0	0,002	0,95	0,11	0,96	0,97	1,00	0,998
AB	201	98	14	4	20	237	209	140	12	266	121	0	14	0	39	16	24	233	18	17	0	1
	0,40	0,19	0,03	0,01	0,04	0,47	0,41	0,28	0,02	0,53	0,24	0	0,028	0	0,08	0,032	0,05	0,46	0,04	0,03	0	0,002
BB	77	11	490	500	484	88	250	69	0	112	330	4	2	1	465	487	0	217	0	0	0	0
	0,15	0,02	0,97	0,99	0,96	0,17	0,50	0,14	0	0,22	0,65	0,01	0,004	0,002	0,92	0,966	0	0,43	0	0	0	0

Tabela 14: Resultados das frequências alélicas observadas em doadores

Doadores	Rh			Kell			Kidd			Duffy			MNS			Lutheran			Diego			Colton			Dombrock			LW			Scianna				
	c	e	C	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	JK ^a	JK ^b	Fy ^a	Fy ^b	M	N	S	Lu ^a	Lu ^b	Lu ^s	Di ^a	Di ^b	Co ^a	Co ^b	Do ^a	Do ^b	Jo ^a	Jo ^b	Hy	LW ^a	LW ^b	LW ^s	Sc1	Sc2		
Campinas 308	NEG	57	127	8	240	301	0	304	0	297	0	60	104	142	83	63	87	169	34	286	0	297	1	0	287	124	34	0	0	308	0	308	0	307	
	%	18,5	41,2	2,6	77,9	97,7	0	98,7	0	96,4	0,0	19,5	33,8	46,1	26,9	20,5	28,2	54,9	11,0	92,9	0	96,4	0	0	93,2	40,3	11,0	0	0	100	0	100	0	100	
	POS	251	181	300	68	7	308	4	308	11	308	248	204	166	225	245	221	139	274	22	308	11	307	308	21	184	274	308	308	308	0	308	1	308	1
Salvador 196	%	81,5	58,8	97,4	22,1	2,3	100	1,3	100	3,6	100	80,5	66,2	53,9	73,1	79,5	71,8	45,1	89,0	7,1	100	3,6	100	100	6,8	59,7	89,0	100	100	100	0	100	0	100	0
	NEG	20	98	4	155	189	0	196	0	187	0	28	74	108	91	50	38	175	21	179	1	190	0	0	194	92	20	0	0	196	0	196	0	196	
	%	10,2	50,0	2,0	79,1	96,4	0	100	0	95,4	0,0	14,3	37,8	55,1	46,4	25,5	19,4	89,3	10,7	91,3	0,5	96,9	0	0	99,0	46,9	10,2	0	0	100	0	100	0	100	0
Geral 504	POS	176	98	192	41	7	196	0	196	9	196	168	122	88	105	146	158	21	175	17	195	6	196	196	2	104	176	196	196	196	0	196	0	196	0
	%	89,8	50,0	98,0	20,9	3,6	100	0	100	4,6	100	85,7	62,2	44,9	53,6	74,5	80,6	10,7	89,3	8,7	99,5	3,1	100	100	1,0	53,1	89,8	100	100	100	0	100	0	100	0
	NEG	77	225	12	339	412	0	425	0	407	0	63	154	218	157	102	97	303	43	391	1	413	0	0	412	188	48	0	0	426	0	426	0	425	0
Geral	%	15,3	44,6	2,4	67,3	81,7	0	84,3	0	80,8	0	12,5	30,6	43,3	31,2	20,2	19,2	60,1	8,5	77,6	0,2	81,9	0	0	81,7	37,3	9,5	0	0	84,5	0	84,3	0	84,3	
	POS	427	253	466	87	14	478	3	478	20	478	397	311	241	309	367	361	148	423	37	477	16	477	478	21	272	424	478	478	478	0	478	1	478	1
	%	84,7	50,2	92,5	17,3	2,8	94,8	0,6	94,8	4,0	94,8	78,8	61,7	47,8	61,3	72,8	71,6	29,4	83,9	7,3	94,6	3,2	94,6	94,8	4,2	54,0	84,1	94,8	94,8	94,8	0	94,8	0	94,8	0,2

Tabela 15: Resultados dos genótipos de pacientes falciformes e frequência genotípica observada para os principais sistemas de grupos sanguíneos

		Genótipo																				
Pacientes Falciforme	C/c	E/e	K1/K2	K3/K4	K6/K7	JKA/JKB	FYA/FYB	GATA	FY-265	GPA	GPB	GYPB*Del	GYPB.P2	LUA/LUB	DIA/DIB	COA/COB	DO-793	DO-350	DO-323	LWA/LWB	SC1/SC2	
Campinas																						
n= 181																						
AA	108	126	0	0	0	71	15	65	179	57	20	181	175	181	0	0	172	15	168	174	181	181
	0,60	0,70	0	0	0	0,39	0,08	0,36	0,99	0,31	0,11	1,0	0,97	1,00	0	0	0,95	0,08	0,93	0,96	1,00	1,00
AB	62	50	11	1	19	85	62	75	2	94	56	0	6	0	12	6	9	87	13	6	0	0
	0,34	0,28	0,06	0	0,10	0,47	0,34	0,41	0,01	0,52	0,31	0	0,03	0	0,07	0,03	0,05	0,48	0,07	0,03	0	0
BB	11	5	170	180	162	25	104	41	0	30	105	0	0	0	169	175	0	79	0	1	0	0
	0,06	0,03	0,94	0,99	0,90	0,14	0,57	0,23	0	0,17	0,58	0	0	0	0,93	0,97	0	0,44	0	0,01	0	0
Salvador																						
n= 102																						
AA	55	82	0	0	0	53	5	26	100	29	8	101	100	102	0	0	99	11	92	93	102	102
	0,54	0,80	0	0	0	0,52	0,05	0,25	0,98	0,28	0,08	0,99	0,98	1,00	0	0	0,97	0,11	0,90	0,91	1,00	1,00
AB	39	20	5	3	5	34	30	42	2	61	31	0	2	0	4	2	3	46	10	8	0	0
	0,38	0,20	0,05	0,03	0,05	0,33	0,29	0,41	0,02	0,60	0,30	0	0,02	0	0,04	0,02	0,03	0,45	0,10	0,08	0	0
BB	8	0	97	99	97	15	67	34	0	12	63	1	0	0	98	100	0	45	0	1	0	0
	0,08	0	0,95	0,97	0,95	0,15	0,66	0,33	0	0,12	0,62	0,01	0	0	0,96	0,98	0	0,44	0	0,01	0	0
Geral																						
n= 283																						
AA	163	208	0	0	0	124	20	91	279	86	28	282	275	283	0	0	271	26	260	267	283	283
	0,58	0,73	0	0	0	0,44	0,07	0,32	0,99	0,30	0,10	0,996	0,97	1,00	0	0	0,96	0,09	0,92	0,94	1,00	1,00
AB	101	70	16	4	24	119	92	117	4	155	87	0	8	0	16	8	12	133	23	14	0	0
	0,36	0,25	0,06	0,01	0,08	0,42	0,33	0,41	0,01	0,55	0,31	0	0,03	0	0,06	0,03	0,04	0,47	0,08	0,05	0	0
BB	19	5	267	279	259	40	171	75	0	42	168	1	0	0	267	275	0	124	0	2	0	0
	0,07	0,02	0,94	0,99	0,92	0,14	0,60	0,27	0	0,15	0,59	0,004	0	0	0,94	0,97	0	0,44	0	0,01	0	0

Tabela 16: Resultados das frequências alélicas observadas nos pacientes falciformes estudados

Pacientes Falciformes	Rh		Kell				Kidd			Duffy			MNS			Lutheran			Diego			Colton			Dombrock			LW		Scianna					
	c	C	e	E	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Di ^a	Di ^b	Co ^a	Co ^b	Do ^a	Do ^b	Jo ^a	Hy	LW ^a	LW ^b	Sc1	Sc2			
Campinas 181	NEG	11	108	5	126	170	0	180	0	162	0	25	71	104	95	30	57	105	20	169	0	175	0	0	172	78	15	1	1	0	181	0	181	0	
	%	6,1	59,7	2,8	69,6	93,9	0	99,4	0	89,5	0	13,8	39,2	57,5	52,5	16,6	31,5	58,0	11,0	93,4	0	96,7	0	0	95,0	43,1	8,3	0,6	0,6	0	100	0	100	0	
Salvador 102	NEG	8	55	0	83	98	0	99	0	97	0	15	52	67	58	12	29	66	8	99	0	100	0	0	99	45	12	1	1	0	102	0	102	0	
	%	7,8	53,9	0	81,4	96,1	0	97,1	0	95,1	0	14,7	51,0	65,7	56,9	11,8	28,4	64,7	7,8	97,1	0	98,0	0	0	97,1	44,1	11,8	1,0	1,0	0	100	0	100	0	
Geral 283	NEG	19	163	5	209	268	0	279	0	259	0	40	123	171	153	42	86	171	28	268	0	275	0	0	271	123	27	2	2	0	283	0	283	0	
	%	6,7	57,6	1,8	73,9	94,7	0	98,6	0	91,5	0	14,1	43,5	60,4	54,1	14,8	30,4	60,4	9,9	94,7	0	97,2	0	0	95,8	43,5	9,5	0,7	0,7	0	100	0	100	0	
Geral 283	POS	264	120	278	74	15	283	4	283	24	283	243	160	112	130	241	197	112	255	15	283	8	283	283	12	160	256	281	281	283	0	283	0	283	0
	%	93,3	42,4	98,2	26,1	5,3	100	1,4	100	8,5	100	85,9	56,5	39,6	45,9	85,2	69,6	39,6	90,1	5,3	100	2,8	100	100	4,2	56,5	90,5	99,3	99,3	100	0	100	0	100	0

Tabela 17: Fenótipos identificados de difícil caracterização sorológica devido a falta de insumos

Genótipos	Fenótipos deduzidos	Número de amostras
<i>FY*B 265</i>	Fy ^x	16
<i>HY-/HY+</i>	Hy+/Hy-	31
<i>JO*A-/JO*A+</i>	Jo(a+)/Jo(a-)	41
<i>LU*A/LU*B</i>	Lu(a+b+)	55
<i>KEL*1/KEL*2</i>	K+k+	30
<i>CO*A/CO*B</i>	Co(a+b+)	36
Total		209

Tabela 18: Fenótipos raros identificados nas amostras de doadores e pacientes

Genótipos	Fenótipos deduzidos	Número de amostras
<i>GYPB*del</i>	S-s-U-	5
<i>GYPB.P2</i>	S-s-U ^{var}	2
<i>GYPB.NY</i>	S-s-U ^{var}	1
<i>HY/HY</i>	Hy-	2
<i>DI*A/DI*A</i>	Di(a+ b-)	1
Total		11

5.1.1 Identificação de pacientes Fy(b-) que apresentaram a mutação -33T>C

Na análise dos resultados para o sistema Duffy, dos 283 pacientes falciformes estudados foram identificados 132 (46,6%) pacientes que apresentam o fenótipo Fy(b-) com a presença da mutação -33 T>C no promotor eritróide GATA, que inibe a expressão do antígeno Fy^b na superfície das hemácias mas não em outros tecidos. Os resultados dos fenótipos e genótipos encontrados nestes pacientes encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19: Resultados dos Fenótipos e Genótipos *FY/GATA* em 283 pacientes falciformes

Fenótipos	<i>FY/GATA</i>								Genótipos
	n	%	nt 125	n	GATA	n	nt 265	n	
Fy (a+ b+)	35	12,4	G/A	35	T/T	35	C/C	35	<i>FY*A/FY*B</i>
					T/T	36	C/C	34	<i>FY*B/FY*B</i>
Fy (a- b+)	96	33,9	A/A	96	T/C	60	C/C	59	<i>FY*B/FY*B-33</i>
						60	C/T	2	
						60	C/T	1	
Fy (a+ b-)	77	27,2	G/G	20	T/T	20	C/C	20	<i>FY*A/FY*A</i>
			G/A	57	T/C	57	C/C	57	<i>FY*A/FY*B-33</i>
Fy (a- b-)	75	26,5	A/A	75	C/C	75	C/C	75	<i>FY*B-33/FY*B-33</i>

5.1.2 Genotipagem Dombrock em pacientes falciformes

Na genotipagem Dombrock de 283 pacientes estudados, 21 (7,4%) pacientes foram genotipados como *DO*A/DO*A*, 111 (39,2%) como *DO*A/DO*B* e 112 (39,6%) como *DO*B/DO*B*. Encontramos ainda 23 (8,1%) pacientes heterozigotos para o SNP 350 que caracteriza o alelo *JO*A*, 14 (4,9%) pacientes heterozigotos para o SNP 323 que caracteriza o alelo *HY* e 2 (0,7%) homozigotos para o SNP 323 que caracteriza o fenótipo Hy(-). Os resultados podem ser visualizados na Tabela 20.

Tabela 20: Resultados da genotipagem Dombrock em 283 pacientes falciformes

Amostras de Pacientes	Genótipos	Dombrock - <i>DO</i>			Total de Amostras	%
		nt 793	nt 350	nt 323		
	<i>DO*A/DO*A</i>	A/A	C/C	G/G	21	7,42
	<i>DO*A/DO*B</i>	A/G	C/C	G/G	111	39,22
	<i>DO*B/DO*B</i>	G/G	C/C	G/G	112	39,57
	<i>JO/DOA</i>	A/A	T/C	G/G	5	1,76
	<i>JO/DOB</i>	A/G	T/C	G/G	18	6,36
	<i>HY/DOA</i>	A/G	C/C	T/G	4	1,41
	<i>HY/DOB</i>	G/G	C/C	T/G	10	3,53
	<i>HY/HY</i>	G/G	C/C	T/T	2	0,70

5.1.3 Identificação de variantes de antígenos do sistema Rh

a. Variantes *RHCE*

Variantes do gene *RHCE* foram encontradas nas amostras de pacientes estudadas quando realizamos a genotipagem em larga escala (Tabela 21). Setenta e nove (28%) dos pacientes falciformes estudados apresentaram o alelo homozigoto *RHCE*ce(733G)* que codifica o aminoácido 245 Val e está associado com o fenótipo VS+V+hr^B-, uma variante do antígeno R_he que caracteriza um antígeno e-parcial. Onze pacientes (3,8%) apresentaram o alelo heterozigoto *RHCE*ce(733G)/(1006T)* que codifica os aminoácidos 245Val e 336Cys e está associado com o fenótipo VS+V-hr^B+, uma outra variante do antígeno e. Dez (2,8%) pacientes apresentaram o gene híbrido (*C*)*ce^s/ce^s* responsável pelo enfraquecimento dos antígenos RhC e R_he na membrana eritrocitária.

Tabela 21: Variantes *RHCE* encontradas em pacientes falciformes

Amostras	Alelos <i>RHCE</i> variantes					
	<i>(C)ce^s/ce^s</i>		<i>RHCE*ce(733G)</i>		<i>RHCE*ce(733G)/(1006 G>T)</i>	
	n	%	n	%	n	%
Pacientes	10	3,5	79	28	11	3,8

Foram também pesquisadas variantes do gene *RHCE* em 244 pacientes falciformes pela genotipagem convencional, utilizando a técnica de PCR-RFLP com sequências de primers específicas (Tabela 22). Um (0,04%) dos 244 pacientes estudados apresentou os alelos *RHCE*818T* e *RHCE*1132C* que caracterizam o genótipo *RHCE*ceBI/RHCE*ceSM* responsável pela presença do antígeno Rh STEM e enfraquecimento do antígeno R_he nas hemácias.

Tabela 22: Variantes *RHCE* identificadas em pacientes falciformes

Amostras	Variantes <i>RHCE</i>			
	<i>RHCE*ceBI</i>		<i>RHCE*ceSM</i>	
	n	%	n	%
Pacientes	1	0,004	1	0,004

b. Variantes *RHD*

Com relação às variantes *RHD* estudadas nestes pacientes, verificamos a presença de 5 pacientes portadores da variante *RHD*DIIIa*, 6 pacientes portadores da variante *RHD*DAR* e, 1 paciente portador da variante *RHD*DOL* (Tabela 23).

Tabela 23: Variantes *RHD* identificadas em pacientes falciformes

Amostras	Variantes <i>RHD</i>					
	<i>RHD*DIIIa</i>		<i>RHD*DAR</i>		<i>RHD*DOL</i>	
	n	%	n	%	n	%
Pacientes	5	1,8	6	2,1	1	0,3

5.2 Aloimunização nos pacientes falciformes estudados

Dos 283 pacientes falciformes estudados, 98 (34,6%) apresentaram aloanticorpos (Tabela 24). Destes, 39 possuíam anticorpos contra um único antígeno e 59 pacientes apresentavam múltiplos anticorpos.

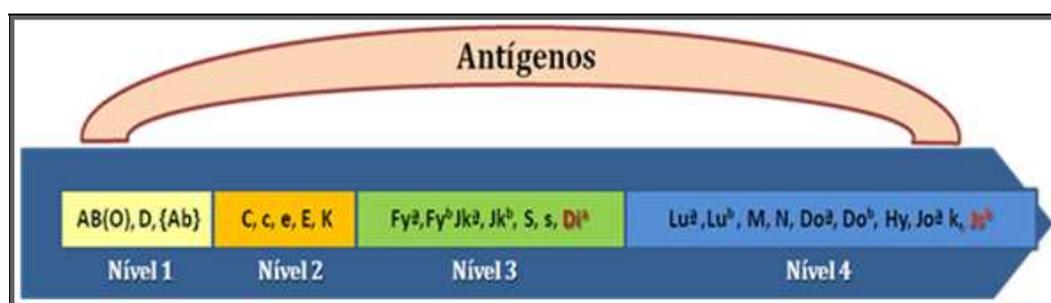
Tabela 24: Número e especificidade dos anticorpos encontrados em 98 pacientes falciformes aloimunizados

Anticorpos detectados	Número de pacientes
Anti-D	4
Anti-E	24
Anti-K	11
Anti-C, -E	17
Anti-c, -E	2
Anti-C, -E, -K	9
Anti-C, -E, -Jk ^b	7
Anti-E, -Fy ^a , -Jk ^b	5
Anti-E, Jk ^a	7
Anti-E, -K, -Di ^a	4
Anti-K, -S	3
Anti-E, -Fy ^a	1
Anti-S, -Fy ^a	3
Anti-C, -K, -Jk ^b	1
Total	98

5.3 Seleção de doadores compatíveis para pacientes falciformes através do software

A seleção de doadores de sangue compatíveis para os pacientes falciformes estudados foi realizada em 4 níveis de compatibilidade (Figura 22) com o auxílio de um software específico desenvolvido para este trabalho. Assim, procuramos avaliar para cada paciente a disponibilidade de doadores compatíveis em cada nível de compatibilidade.

Figura 22: Níveis de compatibilidade estabelecidos no presente trabalho



Com base nos resultados dos genótipos dos doadores e dos pacientes falciformes e de acordo com a compatibilidade definida para cada paciente, foi realizada a busca de doadores de sangue compatíveis em nosso banco de 504 doadores genotipados (308 doadores de Campinas e região e 196 doadores de Salvador).

O exemplo abaixo ilustra a forma como foi realizada a compatibilidade eletrônica pelo software para cada paciente e os resultados obtidos para um determinado paciente.

Como podemos observar (Figura 29), o paciente precisava receber sangue fenótipo compatível no mínimo nível 3 e foram encontrados 23 unidades compatíveis em nível 3 e 3 unidades compatíveis em nível 4.

Figura 29: Exemplo da busca eletrônica de doadores de sangue em 4 níveis de compatibilidade para um paciente falciforme que apresentava em seu prontuário anticorpos anti-D, anti-C e anti-Di^a.

Paciente Falciforme																																						
Fenótipos					Rh				Kell				Kidd		Duffy		MNS		Lutheran		Diego		Colton		Dombrock		LW		Scianna									
Chip	Paciente	Iniciais	ABO	Haplótipo	D	c	C	e	E	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	M	N	s	S	Lu ^a	Lu ^b	Di ^a	Di ^b	Co ^a	Co ^b	Do ^a	Do ^b	Jo ^a	Hy	LW ^a	LW ^b	Sc1	Sc2	
HEA43573_7	PFALCPS_1301	DLS	A	R2r	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0

Doadores Nível 3 - 23 unidades																												
Resultados Fenótipos		Nível 1				Nível 2				Nível 3				Nível 4														
Chip	Pacientes	ABO	haplótipo	D	c	C	e	E	K	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	S	s	Di ^a	Lu ^a	Lu ^b	M	N	Do ^a	Do ^b	Hy	Jo ^a	k	Js ^b		
HEA42142_4	DOACPS_39	A	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+
HEA42142_5	DOACPS_40	A	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HEA42147_4	DOACPS_56	A	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
HEA42151_5	DOACPS_74	A	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HEA42350_7	DOACPS_14	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
HEA43573_8	DOACPS_78	A	rr	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
HEA46719_2	DOACPS_95	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
HEA47154_2	DOACPS_103	A	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HEA46723_2	DOACPS_186	A	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+
HEA47471_5	DOACPS_208	A	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
HEA47472_2	DOACPS_213	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+
HEA47476_7	DOACPS_277	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+
HEA47475_7	DOACPS_269	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+
HEA47474_7	DOACPS_293	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+
HEA47473_5	DOACPS_283	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HEA47473_6	DOACPS_284	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+
HEA47159_5	DOASP_306	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
HEA47159_8	DOASP_309	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HEA42248_1	DOASAO_351	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HEA42256_3	DOASAO_306	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+
HEA42339_4	DOASAO_326	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+
HEA43552_8	DOASAO_27	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+
HEA43560_1	DOASAO_70	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Doadores Nível 4 - 3 unidades																																						
Resultados Fenótipos		Nível 1				Nível 2				Nível 3				Nível 4																								
Chip	Pacientes	ABO	haplótipo	D	c	C	e	E	K	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	S	s	Di ^a	Lu ^a	Lu ^b	M	N	Do ^a	Do ^b	Hy	Jo ^a	k	Js ^b												
HEA46723_2	DOACPS_186	A	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
HEA47475_7	DOACPS_269	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HEA47474_7	DOACPS_293	O	rr	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Com o auxílio do software desenvolvido e considerando que todos os doadores eram do grupo sanguíneo O, foi possível encontrar na média, 11% de unidades compatíveis em Nível 3, 5% de unidades compatíveis em Nível 4 no grupo de doadores de Campinas e região e 20,9% de unidades compatíveis em Nível 3 e 8,7% de unidades compatíveis em Nível 4 no grupo de doadores de Salvador.

Como podemos observar na Tabela 25, encontramos mais doadores compatíveis em nível 3 e 4 para os pacientes falciformes no grupo de doadores de Salvador do que no grupo de doadores de Campinas e região.

Tabela 25: Média de doadores de sangue compatíveis em 4 níveis para pacientes falciformes

Doadores	Compatibilidade							
	Nível 1		Nível 2		Nível 3		Nível 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Campinas	295	96,0	140	45,5	34	11	14	4,5
Salvador	187	95,4	97	49,5	41	20,9	17	8,7

5.4 Compatibilidade genética em pacientes politransfundidos

Em 35 pacientes com solicitação de transfusão foi realizado a compatibilidade genética entre os pacientes e as unidades de sangue dos doadores selecionados pelas técnicas sorológicas no laboratório de Imunohematologia.

Na análise dos nossos resultados, observamos que 14 dos 35 pacientes cronicamente transfundidos apresentavam discrepâncias entre os resultados da genotipagem pelo método xHEA e o da fenotipagem. As principais discrepâncias encontradas ocorreram nos Sistemas RH, FY, JK e MNS e estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26: Discrepâncias encontradas em 14 pacientes cronicamente transfundidos

Genótipo	Fenótipo		
Sistema RH	RhC+c-	RhC+c+	RhC-c+
<i>RHCE*CC</i>	1	2	1
<i>RHCE*Cc</i>	0	4	3
<i>RHCE*cc</i>	0	1	2
	RhE+e-	RhE+e+	RhE-e+
<i>RHCE*EE</i>	0	0	0
<i>RHCE*Ee</i>	1	0	2
<i>RHCE*ee</i>	0	0	11
Sistema Duffy	Fy(a+b-)	Fy(a+b+)	Fy(a-b+)
<i>FY*A/FY*A (T/T)</i>	0	0	0
<i>FY*A/FY*B (T/T)</i>	0	4	2
<i>FY*A/FY*B (T/C)</i>	0	0	0
<i>FY*B/FY*B (T/T)</i>	0	0	6
<i>FY*B/FY*B (T/C)</i>	0	0	2
<i>FY*B/FY*B (C/C)</i>	0	0	0
Sistema Kidd	Jk(a+b-)	Jk(a+b+)	Jk(a-b+)
<i>JK*A/JK*A</i>	2	0	0
<i>JK*A/JK*B</i>	0	3	6
<i>JK*B/JK*B</i>	1	0	2
Sistema MNS	M+N-	M+N+	M-N+
<i>GYP*A*MM</i>	3	1	0
<i>GYP*A*MN</i>	0	9	0
<i>GYP*A*NN</i>	0	0	1
	S+s-	S+s+	S-s+
<i>GYPB*SS</i>	1	0	0
<i>GYPB*Ss</i>	0	5	2
<i>GYPB*ss</i>	0	0	6

Resultados

Na tabela 26 podemos observar as discrepâncias encontradas nos 14 pacientes falciformes politransfundidos. Dez das discrepâncias observadas ocorreram no sistema Rh, 3 discrepâncias ocorreram no sistema Kell, 7 discrepâncias ocorreram no sistema Kidd, 2 ocorreram no sistema Duffy e 3 no sistema MNS.

Além disso, foi observado que 17 pacientes que estavam recebendo sangue compatível nível 1 ou 2, apresentavam discordâncias nos níveis 3 e 4 entre as unidades de sangue compatibilizadas por sorologia em comparação ao perfil antigênico das bolsas que estavam recebendo.

Para melhor compreensão destes resultados, apresentamos abaixo alguns dos exemplos de discrepâncias encontrados entre os resultados do perfil antigênico dos pacientes e das unidades compatibilizadas para eles. (Figuras 30 a 32).

Figura 30: Paciente recebendo sangue O Rh e K compatível.

Chip	ID	D	Nível 2					Nível 3					Nível 4					Nível Complementar					Detail															
			ABO	D	c	C	e	E	K	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	S	s	Di ^a	Lu ^a	Lu ^b	M	N	Do ^a	Do ^b		H _y	Jo ^a	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Di ^b	Co ^a	Co ^b	LW ^a	LW ^b	Sc1	Sc2	HbS
HEA42144_5	1267	Thal	A	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	0	
HEA42360_5	19	CPS	O	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	VS+V+
HEA42360_6	20	CPS	A	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	0	

Figura 31: Paciente fenotipado como R₀r (C -, E-), K- e recebendo unidades de sangue ABO/Rh e K fenótipo compatível.

Resultados Fenótipos			Nível 2					Nível 3					Nível 4					Nível Complementar					Detail																
Chip	ID	D	ABO	D	c	C	e	E	K	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	S	s	Di ^a	Lu ^a	Lu ^b	M	N	Do ^a	Do ^b		H _y	Jo ^a	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Di ^b	Co ^a	Co ^b	LW ^a	LW ^b	Sc1	Sc2	HbS	
HEA42144_1	1270	Thal	O	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	
HEA42360_2	16	CPS	O	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	
HEA42360_3	17	CPS	O	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	
HEA42361_3	25	CPS	O	+	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	
HEA42361_4	26	CPS	O	+	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	VS+V+

Figura 32: Paciente recebendo unidades de sangue ABO, Rh e K fenótipo compatível apresentando um baixo rendimento transfusional e um anticorpo não identificado.

Resultados Fenótipos		Nível 2							Nível 3							Nível 4							Nível Complementar							Detail									
Chip	ID	D	ABO	D	c	C	e	E	K	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	S	s	Di ^a	Lu ^a	Lu ^b	M	N	Do ^a	Do ^b	Hy	Jo ^a	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b		Di ^b	Co ^a	Co ^b	LW ^a	LW ^b	Sc1	Sc2	Hbs	
HEA42050_3	539	SCD	A	+	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	++
HEA42049_7	37	CPS	O	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0
HEA42049_8	38	CPS	O	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0

A Figura 30 apresenta discrepâncias encontradas entre o perfil genético do paciente, que estava recebendo sangue O, Rh e K compatível e dos doadores sorologicamente compatibilizados para ele. Na Figura 31 observamos um paciente fenotipado como R₀r (C-, E-), K- que estava recebendo unidades de sangue ABO, Rh e K fenótipo compatível, pelos resultados da genotipagem observamos que o paciente era R₁R₁, ou seja, C+, c- e além disso, 3 unidades preparadas para ele eram Fy(a+), uma unidade era Di(a+) e outra VS+ e ainda na Figura 32 encontramos um paciente que estava recebendo unidades de sangue ABO, Rh e K fenótipo compatível apresentando um baixo rendimento transfusional e um anticorpo não identificado. Os resultados da genotipagem demonstraram que o paciente era Do^(a-), estava recebendo sangue Do^(a+), no momento suspeitou-se de um anti-Do^a, posteriormente confirmado.

6. DISCUSSÃO

6.1 Genotipagem em larga escala dos alelos de grupos sanguíneos em amostras de doadores voluntários de sangue e de pacientes falciformes

A análise dos resultados obtidos com a genotipagem em larga escala pela técnica HEA BeadChip™ possibilitou a determinação das frequências genóticas e alélicas de 24 genes de grupos sanguíneos em uma população de 504 doadores voluntários de sangue e 283 pacientes falciformes.

Apesar das frequências genóticas observadas em doadores de Salvador estarem mais próximas das encontradas em pacientes falciformes, especialmente para os haplótipos RH, não foi observado diferença estatística significativa entre as frequências genóticas dos 2 grupos de doadores (Salvador e Campinas) e pacientes. A região Sudeste do Brasil possui alta densidade populacional e tem continuamente recebido imigrantes da região nordeste. É também caracterizada pelo alto grau de mistura entre descendentes de Europeus e Africanos. Assim doadores desta região constituem uma amostra representativa de uma população miscigenada, o que poderia talvez explicar esta similaridade de frequências genóticas encontradas entre os doadores de sangue e pacientes falciformes.

Ao compararmos as frequências alélicas por nós obtidas em doadores de sangue com as frequências obtidas por Hashmi (**HASHMI et al, 2007**) que utilizaram a mesma tecnologia, verificamos que a nossa população apresenta frequências similares a Caucasianos e Hispânicos, com exceção do alelo *DI*A* que difere totalmente das populações estudadas por Hashmi, demonstrando a influência indígena na população brasileira (**BALLEOTI et al, 2003**). Estes resultados são interessantes uma vez que esperávamos que as frequências alélicas da nossa população estivessem mais próximas de populações Caucasianas e Africanas.

Na análise dos resultados de todas as amostras de DNA estudadas, encontramos 209 fenótipos de difícil caracterização sorológica devido a ausência ou dificuldade na obtenção dos anti-soros comerciais para identificação dos antígenos. Este resultado demonstra que estes fenótipos podem ser encontrados em um pequeno pool de doadores utilizando-se um método que possibilite a identificação desses antígenos, como a plataforma de microarray aqui empregada.

Em nosso estudo, identificamos ainda 11 fenótipos raros difíceis de se identificar sorologicamente devido a escassez ou inexistência de soros para estas fenotipagens. A tecnologia de Microarray abre a possibilidade de estender a tipagem por DNA a antígenos raros que são difíceis de fenotipar, devido a dificuldade na obtenção de reagentes e possibilita a inclusão de fenótipos raros em painéis de hemácias auxiliando assim a identificação de anticorpos raros e auxilia na resolução de problemas imunohematológicos complexos. É um procedimento rápido para genotipar doador de sangue, aumentando assim os estoques de sangue raro e facilitando a compatibilidade mais exata entre pacientes com aloanticorpos e doadores.

A possibilidade de identificar doadores de sangue raros, ou seja, portadores de fenótipos que ocorrem em menos que 1% da população, através de uma metodologia de genotipagem em larga escala abre perspectivas para a criação de um programa nacional de doadores de sangue raros que possibilitaria a busca de unidades de sangue compatíveis para pacientes portadores de anticorpos raros e, conseqüentemente o aumento da segurança transfusional.

6.1.1 Identificação de pacientes Fy(b-) que podem ser transfundidos com hemácias Fy(b+)

Na análise das amostras identificamos 132 (46,6%) pacientes falciformes com o fenótipo Fy(b-) que teoricamente poderiam receber sangue Fy(b+) pois apresentam a mutação -33 T>C no promotor eritróide GATA. Essa mutação frequente em descendentes de Africanos leva a não expressão do antígeno Fy^b nas hemácias, mas não em outros tecidos. Nestes casos, o gene *FY*B* é expresso em outros tecidos, como por exemplo, nas células do endotélio dos vasos sanguíneos. Pacientes com genótipo *FY*B* com GATA mutado, podem ser transfundidos com hemácias Fy(b+), sem o risco de aloimunização, uma vez que o gene *FY*B* é expresso em outros tecidos (CASTILHO, 2007). Isto significa que a disponibilidade de sangue compatível para estes pacientes pode aumentar consideravelmente.

6.1.2 Genotipagem Dombrock em pacientes falciformes

Devido a dificuldade sorológica em se conhecer a frequência dos antígenos Dombrock e identificar os anticorpos deste sistema e, considerando sua importância clínica, determinamos a frequência dos alelos Dombrock na população de pacientes falciformes estudada para que pudéssemos determinar o risco de aloimunização. Nossos resultados demonstram maior frequência do alelo DO^*B nestes pacientes, o que está de acordo com a literatura em estudos com indivíduos de origem Africana. Isto significa que estes pacientes podem desenvolver anticorpo anti-Do^a com maior frequência do que anti-Do^b. Em nosso estudo, identificamos um paciente com anti-Do^a que apresentava um baixo rendimento transfusional pelo fato de estar recebendo sangue Do(a+) (Figura 32). Além disto, encontramos 2 pacientes portadores do fenótipo raro Hy(-) que podem desenvolver anti-Hy. Como estes anticorpos são difíceis de caracterizar sorologicamente, em situações de baixo rendimento transfusional e suspeita de anticorpos Dombrock, recomendamos selecionar doadores genotipados para transfundir sangue compatível a estes pacientes e assim, evitar reações transfusionais hemolíticas.

6.1.3 Identificação de variantes de antígenos do sistema Rh

Variantes de antígenos do sistema Rh também foram encontradas nos pacientes falciformes estudados. Setenta e nove (28%) dos pacientes falciformes estudados apresentaram o alelo homozigoto $RHCE^*ce(733G)$ que codifica o aminoácido 245Val e está associado com o fenótipo VS+V+hr^B-, uma variante do antígeno Rhe. Onze (3,8%) dos pacientes apresentaram o alelo heterozigoto $RHCE^*ce(733G)/(1006T)$ que codifica os aminoácidos 245Val e 336Cys e está associado com o fenótipo VS+V-hr^B+, uma outra variante do antígeno Rhe. Estes pacientes são fenotipados como e+ mas podem desenvolver anti-e quando transfundidos com sangue e+.

Ficamos impressionados com a alta frequência desta variante nos pacientes estudados, embora já tivéssemos conhecimento que esta variante não é rara em indivíduos de origem Africana.

Dez (2,8%) pacientes apresentaram o gene híbrido $(C)ce^s/ce^s$ responsável pelo enfraquecimento dos antígenos RhC e Rhe na membrana eritrocitária e, portanto, podem

desenvolver anti-C e anti-e quando transfundidos com sangue C+ e e+. A partir destes resultados, investigamos amostras de DNA de 6 pacientes falciformes que apresentaram fraca expressão do antígeno RhC para a presença do gene híbrido (*C*)*ce^s/ce^s*. Esta variante foi encontrada em 5 destes pacientes. Dois pacientes transfundidos com hemácias C+ desenvolveram aloanticorpo anti-C e apresentaram hemólise pós-transfusão. Nossos resultados demonstram a importância de identificar variantes de antígenos Rh nestes pacientes para se evitar a aloimunização e hemólise.

Outras variantes de antígenos do gene *RHCE* foram pesquisadas em 244 pacientes falciformes estudados quando realizamos genotipagem convencional. Encontramos 1 (0,04%) paciente que apresentou resultado heterozigoto para os polimorfismos *RHCE*818C/T* e *RHCE*1132G/C* caracterizando a presença de 2 variantes *RHCE* em heterozigose: *RHCE*ceBI*, e *RHCE*ceSM*. Esses dois alelos codificam um antígeno do sistema Rh de baixa frequência denominado STEM que está associado a um fenótipo Rhe- alterado que também pode levar à aloimunização.

Este estudo se mostra muito importante neste aspecto, pois não existe soro comercial para identificação destas variantes e, portanto muitos pacientes acabam se aloimunizando. Portanto, a compatibilidade genética RH entre pacientes e doadores Afrodescendentes pode auxiliar na redução da aloimunização e das reações transfusionais hemolíticas.

Neste trabalho, com relação às variantes *RHD* estudadas, verificamos a presença de 5 pacientes portadores da variante *RHD*DIIIa*, 6 pacientes portadores da variante *RHD*DAR* e, 1 paciente portador da variante *RHD*DOL*. Todos estes pacientes podem se aloimunizar se receberem sangue RhD-positivo pois estas variantes são classificadas como D parcial.

De acordo com os resultados obtidos nos testes moleculares que identificaram as variantes *RHD* e *RHCE*, verificamos que os antígenos variantes RhD, RhC e Rhe que apresentaram baixa expressão sorológica eram na verdade antígenos parciais que continham SNPs nos genes *RHD* e *RHCE* ou genes híbridos.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura para pacientes falciformes que mostram uma grande recombinação gênica entre os genes *RHD* e *RHCE* em

indivíduos de origem Africana gerando assim um grande número de variantes Rh (**CHOU & WESTHOFF, 2010**).

Assim, a genotipagem *RHD* e *RHCE* em pacientes falciformes tem-se mostrado importante na caracterização destas variantes e na seleção de unidades de sangue compatíveis com o mesmo background genético.

6.2 Aloimunização nos pacientes falciformes estudados

Dos 283 pacientes falciformes estudados, 98 (34,6%) possuíam aloanticorpos (Tabela 17). Destes, 81 (82,6%) apresentavam anticorpos contra antígenos do sistema Rh e 11 (13,6%) contra o antígeno K, demonstrando mais uma vez a importância da utilização de sangue fenotipado para os sistemas Rh e Kell nestes pacientes. Anti-E e anti-C foram os anticorpos do sistema Rh mais encontrados, o que está de acordo com a alta frequência do fenótipo D– C– E– (R₀) em indivíduos de origem Africana. Outros anticorpos (3,8%) identificados incluíram anti-Fy^a, -Jk^a, -Jk^b, -S, e -Di^a em pacientes que estavam recebendo transfusões de sangue Rh e K fenótipo compatível, o que demonstra que para alguns pacientes este nível de compatibilidade não é suficiente para evitar a aloimunização.

6.3 Seleção de doadores compatíveis para pacientes falciformes através do software

O fornecimento de sangue antígeno-negativo para pacientes falciformes é a base para a transfusão segura pela redução do risco de reações adversas e aloimunização (**SCHONEWILLE et al, 2006**). A técnica de microarray é um método que possibilita obter um grande número de doadores extensivamente genotipados e, permite uma seleção mais exata de unidades de doadores compatíveis para pacientes falciformes.

A possibilidade de genotipar um grande número de pacientes e doadores para vários antígenos simultaneamente, juntamente com a análise computadorizada e interpretação dos dados

(RIBEIRO et al, 2009; KLAPPER et al, 2010), viabiliza também o aumento do estoque de unidades de doadores fenótipo compatíveis, facilitando uma compatibilidade mais exata entre paciente e doador de sangue.

Com o a finalidade de reduzir os riscos de possíveis aloimunizações e reações transfusionais, realizamos a seleção de unidades de sangue com alto grau de compatibilidade para pacientes falciformes com base nos resultados da genotipagem em larga escala de todas as amostras estudadas, utilizando a plataforma HEA BeadChip™.

A busca eletrônica de doadores compatíveis para pacientes falciformes foi realizada de acordo com os 4 níveis de compatibilidade propostos por KLAPPER et al, 2010 e adaptados para nossa população com o auxílio de um software desenvolvido para este trabalho. Assim, procuramos avaliar para cada paciente a disponibilidade de doadores compatíveis em cada nível de compatibilidade e como parte da estratégia, compatibilizamos doadores tipo sanguíneo O para todos os pacientes. Encontramos um número significativo de doadores de sangue antígeno-negativo para pacientes aloimunizados e não aloimunizados quando buscamos por compatibilidade Nível 1 (ABO, D e um conhecido aloanticorpo) e Nível 2 (ABO, D, C, c, E, e, K1). Em Nível 1 encontramos uma média de 482 doadores compatíveis e em Nível 2 uma média de 237 doadores compatíveis. Entretanto, a média de doadores compatíveis Nível 3 (ABO, D, C, c, E, e, K1, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Di^a) foi de 75 e, Nível 4 (ABO, D, C, c, E, e, K1, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Di^a, Lu^a, Lu^b, M, N, Do^a, Do^b, Hy, Jo^a, k, Js^b) de 31. A possível razão da queda do número de doadores compatíveis em Nível 3 e Nível 4 é o número de antígenos-negativos necessários e um limitado grupo de doadores Afrodescendentes. Nossos dados sugerem que é mais fácil encontrar maior compatibilidade para pacientes falciformes em doadores de Salvador que apresentam maior influência Africana do que em doadores de sangue de uma população mista como Campinas e região.

A tabela 27 mostra uma análise realizada das frequências de haplótipos RH em pacientes falciformes de Campinas e Salvador e, de doadores de sangue de Campinas e Salvador. Como pode ser observado, encontramos mais doadores RH compatíveis para os pacientes falciformes em doadores de Salvador.

Nossos resultados demonstram que mesmo selecionando um maior pool de doadores de uma população mista, é mais fácil encontrar sangue fenótipo compatível para pacientes falciformes, em uma população com maior número de doadores Afrodescendentes.

Tabela 27: Frequências de haplótipos RH em pacientes e doadores de sangue de Campinas e Salvador

Haplótipo	Pacientes Falciformes						Doadores						
	Campinas		Salvador		Geral		Haplótipo	Campinas		Salvador		Geral	
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	N	%
R ₀ r	64	35,36%	37	36,27%	101	35,69%	R ₀ r	38	12,34%	55	28,06%	93	18,45%
R ₀ r's	4	2,21%	1	0,98%	5	1,77%	R ₀ r's	4	1,30%	2	1,02%	6	1,19%
R ₁ r	39	21,55%	31	30,39%	70	24,73%	R ₁ r	85	27,60%	61	31,12%	146	28,97%
R ₁ R ₁	11	6,08%	8	7,84%	19	6,71%	R ₁ R ₁	56	18,18%	19	9,69%	75	14,88%
R ₁ R ₂	11	6,08%	5	4,90%	16	5,65%	R ₁ R ₂	22	7,14%	13	6,63%	35	6,94%
R ₁ R ₂							R ₁ R ₂	1	0,32%	1	0,51%	2	0,40%
R ₂ r	36	19,89%	14	13,73%	50	17,67%	R ₂ r	33	10,71%	22	11,22%	55	10,91%
R ₂ r's			1	0,98%	1	0,35%	R ₂ r's	1	0,32%	1	0,51%	2	0,40%
R ₂ R ₂	3	1,66%			3	1,06%	R ₂ R ₂	6	1,95%	4	2,04%	10	1,98%
R ₂ R ₂	2	1,10%			2	0,71%	R ₂ R ₂	1	0,39%			1	0,20%
rr	7	3,87%	4	3,92%	11	3,89%	rr	50	16,23%	17	8,67%	67	13,29%
r'r			1	0,98%	1	0,35%	r'r	2	0,65%	1	0,51%	3	0,60%
r'sr	4	2,21%			4	1,41%	r'sr	5	1,62%			5	0,99%
r'r''							r'r''	3	0,97%			3	0,60%
r''r							r''r	1	0,32%			1	0,20%
Total	181		102		283		Total	308		196		504	

6.4 Compatibilidade genética em pacientes politransfundidos

Quando realizamos a compatibilidade genética entre as amostras de DNA de 35 pacientes falciformes politransfundidos, e das unidades de sangue de doadores que foram sorologicamente compatibilizadas para eles, encontramos discrepâncias para vários antígenos. Na tabela 26 podemos observar as discrepâncias encontradas nos 14 pacientes falciformes politransfundidos, o que demonstra que as técnicas moleculares são superiores às técnicas sorológicas, por erros de fenotipagem, pela genotipagem estendida e na identificação de unidades de sangue compatíveis para estes pacientes.

A Figura 30 ilustra discrepâncias antigênicas entre um paciente falciforme e dois doadores. De acordo com os resultados obtidos pela técnica HEA BeadChip™ podemos observar que o paciente poderia se aloimunizar aos antígenos Jk^a, Lu^a, Co^b e VS se fosse transfundido com as unidades sorologicamente compatibilizadas para ele. Na Figura 31 observamos também discrepâncias entre resultados do fenótipo e genótipo de um paciente falciforme e discrepâncias antigênicas. Se este paciente recebesse as unidades de sangue sorologicamente compatibilizadas para ele, poderia se aloimunizar aos antígenos c, Fy^a, Di^a e VS.

Em nosso trabalho, pudemos encontrar uma maior compatibilidade nas unidades genotipadas, o que propiciou um aumento no grau de compatibilidade e, conseqüentemente redução do risco de aloimunização e reações transfusionais.

Aloimunização pode causar graves problemas que vão desde inconvenientes devido à demora na obtenção de unidades compatíveis até reações transfusionais hemolíticas tardias. Acreditamos que a compatibilidade Nível 4 é mais difícil e nem sempre necessária, mas, no nosso trabalho demonstramos que os pacientes falciformes podem se beneficiar ao receberem unidades de sangue com compatibilidade genética pelo menos Nível 3.

Além disto, verificamos a importância da realização da genotipagem estendida no auxílio à identificação de aloanticorpos, muitas vezes mascarados por autoanticorpos ou não identificados pelos limites das técnicas sorológicas. A possibilidade de diferenciação entre alo e autoanticorpos e a identificação de anticorpos raros clinicamente significantes abre uma nova perspectiva de segurança transfusional para os pacientes falciformes.

A genotipagem em larga escala pode contribuir no suporte transfusional com sangue antígeno compatível e também possui um grande potencial para substituir a rotina de testes de fenotipagem, reduzindo custos e tempo de trabalhos envolvidos na tipagem de pacientes e doadores. A utilização de um software específico para esta prática mostrou-se extremamente importante para facilitar a busca de doadores e unidades de sangue compatíveis, bem como, na realização da compatibilidade mais exata.

Os nossos resultados demonstram que a implementação da compatibilidade genética pode melhorar a vida de milhares de pacientes falciformes pelo aumento do grau de compatibilidade e, níveis de segurança e eficiência transfusional. Acreditamos que em um futuro próximo esta prática começará a fazer parte da rotina da maioria dos bancos de sangue que transfundem pacientes falciformes.

7. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos do presente trabalho e as condições em que foi realizada a genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala pela técnica de “microarray” HEA BeadChip™ em amostras de DNA de doadores voluntários de sangue e pacientes portadores de anemia falciforme, podemos concluir que:

- 7.1. A genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala pela técnica de “microarray” utilizada (HEA BeadChip™) é eficiente e pode ser aplicada em amostras de DNA de pacientes e doadores de sangue.
- 7.2. Não foi encontrada diferença estatística significativa nas frequências genotípicas observadas entre os grupos estudados (doadores e pacientes).
- 7.3. A genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala é eficiente na constituição de bancos de doadores de sangue genotipados para antígenos de difícil caracterização sorológica, agiliza a busca de fenótipos raros e de unidades fenótipo compatível para pacientes falciformes politransfundidos.
- 7.4. A genotipagem *FY* em pacientes falciformes auxilia na identificação de pacientes com o fenótipo Fy(b–) que podem receber sangue Fy(b+) aumentando assim a disponibilidade de unidades de sangue fenótipo compatíveis.
- 7.5. Nossos resultados demonstram maior frequência do alelo *DO*B* em pacientes falciformes o que significa que estes pacientes tem maior risco de desenvolver anti-Do^a.
- 7.6. Encontramos uma alta frequência de variantes do antígeno RhD, RhC e Rhe nos pacientes falciformes o que explica o alto índice de aloimunização aos antígenos Rh nestes pacientes.
- 7.7. A compatibilidade eletrônica com o auxílio de um software possibilitou a busca de unidades de doadores em até 4 Níveis de compatibilidade para pacientes falciformes.

- 7.8. Encontramos unidades de sangue com maior grau de compatibilidade para os pacientes falciformes em um grupo de doadores com maior influência Africana do que em um grupo de doadores de uma população mista.
- 7.9. A compatibilidade eletrônica feita a partir de um software é rápida e eficiente para selecionar doadores com compatibilidade mais exata para pacientes falciformes.
- 7.10. A compatibilidade genética é uma alternativa para as limitações dos atuais métodos sorológicos.
- 7.11. A compatibilidade genética é superior à sorológica, pois além de evitar possíveis reações transfusionais por erros de fenotipagem em pacientes com transfusões recentes, também auxilia a minimizar os riscos de aloimunização resultando em melhor aproveitamento transfusional dos pacientes falciformes.

***8. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

1. ISSIT PD, ANSTEE DJ. Applied Blood Group serology. Durhan NC: Montgomery Scientific Publications, 1998.
2. REID ME, YAZDANBAKHS K. Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusion. *Current Opinion in Hematology*. 1998; 5: 93-102.
3. REID ME. From DNA to blood groups. *Immunohematology*. 2008; 24: 166-169.
4. DANIELS G, CASTILHO L, FLEGEL A, GARRATTY G, LEVENE C, LOMAS-FRANCIS C et al. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens: Macao report. *Vox Sanguinis*. 2009; 96: 153-156.
5. REID ME. Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009 (1): 171-177.
6. AVENT N. Large-scale blood group genotyping - clinical implications. *British Journal of Haematology*. 2008; 144: 3-13.
7. DANIELS G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol*. 2005; 14 (3-4): 143-153.
8. WESTER E, STORRY JR, SCHNEIDER K, SOJIKA BN, POOLE J, MARTIN O. Genetic basis of the K0 phenotype in the Swedish population. *Immunohematology*. 2005; 45: 545-549.
9. REID ME. Molecular basis for blood groups and function of carrier proteins, in: *Molecular and Functional Aspects of Blood Group Antigens*. Arlington VA: American Association of Blood Banks. 1997.
10. CHOU ST, WESTHOFF C. Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009: 178-184.
11. POOLE J, DANIELS G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfusion medicine reviews*. 2007; 21: 58-71.

12. PETZ L. Clinical practice of Transfusion Medicine. Churchill Livingstone, 1989.
13. MOLISSON PL, ENGELFRIET CP, CONTRERAS M. Blood Transfusion in Clinical Medicine. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988.
14. GIBLETT E. A critical of theoretical hazard of inter vs. Intra-racial transfusion. Transfusion. 1961; 1: 233-238.
15. GIBLETT E. Blood group alloantibodies: An assessment of some laboratory practices. Transfusion. 1977; 4: 299-408.
16. HOELTGE GA, DOMEN RE, RYBICKI LA, SCHAFFER PA. Multiple red cell transfusions and alloimmunization: experience with 6996 antibodies detected in a total of 159, 262 patients from 1985 to 1993. Arch Pathol Lab Med. 1995; 119: 42-45.
17. GEIFMAN-HOTZMAN O, WOJTOWYCZ M, KOSMAS E, ARTAL R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. Obstet Gynecol. 1997; 89: 272-275.
18. ISSIT PD. Rare-related red cell alloantibody problems. Br J Biomed Sci. 1994; 51: 158-167.
19. ORLINDA AR, UNGER PJ, KOSHY M. Post-transfusion alloimmunization in patients with sickle cell disease. American Journal of Hematology. 1978; 5: 101-106.
20. COLES SM, KLEIN HG, HOLLAND PV. Alloimmunization in two multitransfused patient populations. Transfusion. 1981; 21: 462-466.
21. BLUMBERG N, PECK K, ROSS K, AVILA E. Immune response to chronic red blood cell transfusion. Vox Sang. 1983; 44: 212-217.
22. DAVIES SC, MCWILLIAN AC, HEWITT E, DEVENISH A, BROZOVIC. Red cell alloimmunization in sickle cell disease. Br J Haematol. 1986; 63: 241-245.
23. REISNER EG, KOSTYU DD, PHILIPS G. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. Tissue Antigens. 1987; 30: 161-166.

24. COX JV, STEANE E, CUNNINGHAM G, FRENKEL EP. Risk of alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. Arch Intern Med. 1988; 148: 2485-2489.
25. VICKINSKY EP, EARLES A, JOHNSON RA. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion racially unmatched blood. N Engl J Med. 1990; 322: 1617-1621.
26. ROSSE WF, GALLAGHER D, KINNEY TR. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The cooperative study of sickle cell disease. Blood. 1990; 76: 1431-1437.
27. SALMON CH, CARTRON JP, ROUGER PH. Les Groups Sanguinis. Chez l'Homme. pp371-393,1990.
28. REID ME, RIOS M, POWELL VI, CHARLES-PIERRE D, MALAVADE V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. Transfusion. 2000a; 40: 1-6.
29. REID ME, RIOS M, YAZDANBAKHS K. Applications of molecular biology techniques to transfusion medicine. Semin Hematol. 2000b; 37: 166-176.
30. ROZMAN P, DOVE T, GASSNER C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, Kel, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. Transfusion. 2000; 40: 936-942.
31. CASTILHO L, RIOS M, BIANCO C, PELLEGRINO JJr, ALBERTO FL, SAAD ST et al. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. Transfusion. 2002a; 42(2): 232-238.
32. CASTILHO L, RIOS M, PELLEGRINO JJr, SAAD STO, COSTA FF. Blood group genotyping facilitates transfusion of B-thalassemia patients. J Clin Lab Anal. 2002b; 16(5): 216-220.
33. AVENT N. Human erythrocyte antigen expression: its molecular bases. British Journal of Biomedical Science. 1997; 54(1): 16-37.

34. REID ME, Yasdanbakhsh K. Molecular insights into blood and implications for blood transfusions. *Current Opinion in Hematology*. 1998; 5: 93-102.
35. REID M. Overview of molecular methods in immunohematology. *Transfusion*. 2007; 47: 10S-16S.
36. REID ME, Lomas-Francis C. Molecular approaches to blood group identification. *Current Opinion in Hematology*. 2002; 9: 152-159.
37. REID M, Rios M. Applications of molecular genotyping to immunohematology. *Br J Biomed Sci*. 1999; 56(2): 145-152.
38. DENOMME G, RIOS M, REID ME. *Molecular Protocols in Transfusion Medicine*. San Diego CA: Academic Press, 2000.
39. BEIBOER SH, WIERINGA-JELSMA T, MAASKANT-VAN WIJK PA, VAN DER SCHOOT CE, VAN ZWIETEN R, ROOS D et al. Rapide genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion*. 2005; 45(5): 667-679.
40. HASHMI G, SHARIFF T, SEUL M, VISSAVAJJHALA P, HUE-ROYE K, CHARLES-PIERRE D et al. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion*. 2005; 45: 680-688.
41. RIOS M, CASH K, STRUPP A, UEHLINGER J, REID ME. DNA from urine sediment or bucal cells can be used for blood group molecular genotyping. *Immunohematology*. 1999; 15: 61-65.
42. CASTILHO L, RIOS M, RODRIGUES A, PELLEGRINO JJr, COSTA FF. Blood group genotyping for the management of patients with "warm" antibody-induced hemolytic anemia. *Transfusion Clinique and Biologique*. 2001; 8(S): 166S.

43. CASTILHO L, RIOS M, BIANCO C, ANGELINI MT, ALBERTO FL, SAAD STO et al. High prevalence of FYB-RBC-silent alleles among sickle cell disease patients in Brazil. In: Annual Meeting of the American Association of Blood Banks. 2000: 116S (abstract).
44. TOURNAMILLE C, COLIN Y, CARTRON JP, LE VAN KIM C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nature Genet.* 1995; 10: 224-228.
45. IWAMOTO S, LI J, SUGIMOTO N, OKUDA H, KAJII E. Characterization of the Duffy gene promoter. Evidence for tissue-specific abolishment of expression in Fy(a-b-) of black individuals. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 222: 852-859.
46. PARASOL N, REID ME, RIOS M, CASTILHO L, HARARI I, KOSOWER NS. A novel mutation in the coding sequence of the FY*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. *Blood.* 1998; 92(7): 2237-2243.
47. HUANG CH. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. *Current Opinion in Hematology.* 1997; 4: 94-103.
48. HEMKER MB, LIGTHART PC, BERGER L, VAN RHENEN DJ, VAN DER SCHOOT CE, MAASKANT-VAN WIJK PA. DAR, a new RhD variant involving exon 4, 5 and 7 often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African Black. *Blood.* 1999; 94: 4337-4342.
49. WESTHOFF CM, SILBERSTEIN LE, WYLIE DE, SKAVDAHL M, REID ME. 16 Cys encoded by the RHce gene is associated with altered expression of the e antigen is frequent in the Ro haplotype. *British Journal of Haematology.* 2001; 113: 666-671.
50. ZELINSKI T. Erythrocyte band 3 antigens and the Diego Blood Group System. *Transf. Med. Rev.* 1998; 12: 36-45.
51. RODRIGUES A, RIOS M, PELLEGRINO JJr, COSTA FF, CASTILHO L. The presence of the RHD pseudogene and the hybrid RHD-CE-Ds gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2002; 35: 767-773.

52. SINGLETON BK, GREEN CA, AVENT ND, MARTIN PG, SMART E, DAKA A et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000; 95: 12-18.
53. RODRIGUES A, RIOS M, PELLEGRINO JJr, SAAD STO, COSTA FF, CASTILHO L. Concomitant occurrence of Cys 16 and Val 245 (VS antigen) is associated with expression of weakened in Sickle cell disease patients. *Vox Sanguinis*. 2004, 86: 136-140.
54. CASTILHO L, RIOS M, RODRIGUES A, PELLEGRINO JJr, SAAD STO, COSTA FF. High frequency of partial DIIIa and DAR alleles found in sickle cell disease patients suggests increased risk of alloimmunization to RhD. *Transfusion Medicine*. 2005,15: 49-55.
55. PETRIK J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sanguinis*. 2000; 80: 1-11.
56. ANSTEE D. Goodbye to agglutination and all that? *Transfusion*. 2005; 45: 652-653.
57. DENOME GA, VAN O. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion*. 2005; 45: 660-666.
58. RIBEIRO KR, GUARNIERI MH, COSTA DC, COSTA FF, PELLEGRINO JJr, CASTILHO, L. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sanguinis*. 2009; 83: 147-152.
59. KLAPPER E, ZHANG Y, FIGUEROA P, NESS P, STUBBS J, ABUMUHOR I et al. Toward extended phenotype matching: a new operational paradigm for the transfusion service. *Transfusion*. 2010; 50: 536-546.
60. BEIGUELMAN, B. O sistema Rh. In: Beiguelman, B. Os sistemas sanguíneos eritrocitários. 3ed, Ribeirão Preto: Funpec Editora, 2003: p 107-149.

61. BALEOTTI WJr, RIOS M, REID ME, FABRON AJr, PELLEGRINO JJr, SAAD STO, CASTILHO, L. A novel *DI**A allele without the band 3-Memphis mutation in Amazonian Indians. 2003; 84: 326-330.
62. CASTILHO L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion*, 2007; 47: 28S-31S.
63. SCHONEWILLE H, VAN DE WATERING LMG, Brand A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: is it time to take precautionary measures? *Transfusion*. 2006; 46: 630-635.

9. APÊNDICE



A DNA-BASED MATCHING APPROACH THAT PREVENTS THE ALLOIMMUNIZATION AND DEMONSTRATES IMPROVEMENT IN SICKLE CELL DISEASE PATIENTS CARE

Journal:	<i>Journal of Clinical Laboratory Analysis</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Costa, Daiane; Unicamp, INCTS-Hemocentro Pellegrino Jr, Jordao; Unicamp, INCTS-Hemocentro Perdigão, Maria Zelma; Unicamp, INCTS-Hemocentro Gilli, Simone; Unicamp, INCTS-Hemocentro Castilho, Lilian; Universidade Estadual de Campinas, Centro de Hematologia e Hemoterapia
Keywords:	blood group genotypes, DNA array, SCD patients, alloimmunization, genotype-matching

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

A DNA-BASED MATCHING APPROACH THAT PREVENTS THE ALLOIMMUNIZATION AND DEMONSTRATES IMPROVEMENT IN SICKLE CELL DISEASE PATIENTS CARE

32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

Daiane Cobianchi da Costa, Jordão Pellegrino Jr, Maria Zelma
Machado Perdigão, Simone Gilli, Lilian Castilho

52
53
54
55
56
57
58
59
60

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue
Hemocentro Unicamp, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: Lilian Castilho, PhD
Hemocentro, Unicamp
Rua Carlos Chagas, 480, Caixa Postal 6198
CEP 13081-970 Barão Geraldo, Campinas, SP, Brasil
Telephone: (55 19) 3521-8749
Fax: (55 19) 3521-8600
e-mail: castilho@unicamp.br

Running Title: [DNA-based matching approach for SCD patients]

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant n^o 2008/07544-8 (DCC) and 2009/05924-0 (LC)

Abstract

Background: DNA arrays, with their high-throughput capability are particularly suited for mass screening donors because they permit the simultaneous determination of multiple alleles encoding RBC antigens and can facilitate the provision of more extensively matched blood for patients. Based on this we evaluated the usefulness of DNA array technology to provide a means to precisely genotype match donor blood units to the antigen-negative type of patients with SCD. **Methods:** We searched for compatible units for 283 SCD patients performing extended human erythrocyte antigen (xHEA) typing on the patient samples and on 308 random donor samples and 196 African Brazilian donor samples. We also investigated antigen-match RBC units with 35 recipients using blood group genotypes for C, c, E, e, K, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, Lu^a, Di^a, Jsb, Do^a and Do^b. Units selected were serologically matched to the patients based on their ABO, Rh and K phenotypes and presence of antibody (ies). **Results:** We observed that we would be able to find in the African Brazilian donors more extensively matched units to the SCD patients than in the pool of random donors of a mixed Brazilian population. Twenty-one from 35 SCD patients presented discrepancies or mismatches for multiple antigens between their xHEA antigen profile and the blood units antigen profile serologically matched for them. According to these results we were able to find a better match for the patients in our extended HEA (xHEA)-typed units, and in the majority of cases the degree of matching was enhanced and the patients benefit to receive the transfusions as shown by better *in vivo* RBCs survival. **Conclusion:** DNA array based blood grouping typing of donors and patients showed to be a

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

cost-effective procedure and has demonstrated improvements in SCD patients care facilitating their transfusion support and preventing the alloimmunization and hemolytic transfusion reactions.

For Peer Review

Introduction

Transfusion therapy has played an important role in allowing sickle cell disease (SCD) patients to live longer. However, while red blood cell (RBC) transfusions have significantly improved the morbidity and mortality in this patient population, its use is complicated by the high incidence of RBC alloimmunization (1-7).

Alloimmunization often makes finding compatible RBC products difficult and is also associated with delayed hemolytic transfusion reactions (DHTRs) and hyperhemolysis syndrome. In an effort to reduce alloimmunization, some programs have been designed and implemented to provide antigen-matched RBC transfusions to patients with SCD particularly those who are in need of chronic transfusion support (8-9). Although transfusion services establish protocols to reduce alloimmunization, there is no consensus about the phenotype-matching protocols used (10-11). These protocols range from providing limited phenotype-matched RBCs for only D, C, E and K antigens to providing extended phenotype-matched RBCs for C, c, E, e, K, S, Fy^a, and Jk^a antigens prior to transfusion (12-15).

Independent of the protocol used it's also important that the RBC units can be readily available in order to supply the SCD patient's transfusion need (12). An approach to address the RBC antigenic differences between patients with SCD and the random donor pool is to increase recruitment of African donors whose RBCs

1
2
3 more commonly lack C, E, K, S, Fya, Fyb, and Jkb antigens compared to
4
5
6 Caucasian donors (11, 13).
7

8
9 Another approach to supply the SCD patient's transfusion need is to
10 implement a large scale antigen screening to increase the inventory of donors.
11 Because screening a large number of donors for minor antigens by
12 hemagglutination is labor-intensive for testing and data entry and the supply of
13 typing grade reagents may be limited or unavailable, the recently introduced DNA
14 arrays, with their high-throughput capability, have been used for mass screening
15 donors (14-20).
16
17
18
19
20
21
22
23

24
25 In the past fifteen years, molecular DNA-based genetic methods have been
26 provided an excellent tool for improved transfusion therapy for patients with SCD. In
27 previous studies, we demonstrated the relevance of genotype determination of
28 blood groups for the management of multiply transfused patients with SCD disease
29 by allowing the determination of the true blood group genotype, and by assisting in
30 the identification of suspected alloantibodies and the selection of antigen-negative
31 RBCs for transfusion (21, 22).
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 The DNA array analysis of donors and recipients permit the simultaneous
43 determination of multiple alleles encoding RBC antigens and can facilitate the
44 provision of more extensively matched blood for patients by allowing a better
45 selection of donors for given recipients on the basis of the respective antigen
46 repertoires. A study by Klapper and coworkers (23) using the human erythrocyte
47 antigen (HEA) BeadChip DNA analysis and a Web-based inventory management
48 system to model donor-recipient matching showed that even with a limited donor
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 pool, matching for Rh, Kell, Duffy, Kidd and MNS could be achieved at least 50% of
4
5 the time.
6
7

8 We report here the use of the HEA BeadChip to provide a means to precisely
9
10 genotype match donor blood units to the antigen-negative type of patients with
11
12 SCD. We also evaluated the usefulness of DNA array technology to guide selection
13
14 of compatible donor units by large-scale testing of random and African Brazilian
15
16 blood donors in order to prevent (further) alloimmunization and hemolytic
17
18 transfusion reactions.
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Materials and Methods**

28 **Patients**

29
30 We studied DNA samples from 283 SCD patients (homozygous for hemoglobin S)
31
32 previously phenotyped for ABO, Rh(D, C, c, E, e) and K1 who agreed to participate
33
34 in this study by signing an IRB approved informed consent.
35
36
37
38
39

40 **Donors**

41
42 DNA samples from 308 random Brazilian blood donors and 196 Brazilian African
43
44 donors who agreed to participate in this study by signing an IRB approved informed
45
46 consent were selected for HEA analysis (BeadChip, BioArray Solutions, Warren,
47
48 NJ, USA). All donors were repeated donors and group O.
49
50
51
52
53
54

55 **Donor units**

1
2
3 Seventy-five donor units from our blood bank inventory serologically matched for 35
4
5 SCD patients were also selected for HEA typing. Units selected were serologically
6
7 matched to the patients based on their ABO, Rh and K phenotypes and presence of
8
9 antibody (ies). We investigated antigen-match RBC units with recipients using blood
10
11 group genotypes (“dry-matching”) for ABO, D, C, c, E, e, K, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S,
12
13 Lu^a, Di^a, Jsb, Do^a and Do^b. The degree of matching was determined at the four
14
15 increasingly stringent levels of antigen matching proposed by Klapper et al [23] and
16
17 adapted according to the needs of Brazilian population. Level 1 included ABO/RhD
18
19 plus the presence of one antibody; Level 2 included Level 1 plus Rh C, c, E, e and
20
21 K antigens; Level 3 included Level 1 plus Level 2 and Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Di^a
22
23 antigens; Level 4 included Level 1 plus Level 2 plus Level 3 and Lu^a, Lu^b, M, N,
24
25 Do^a, Do^b, Hy, Jo^a, k, Jsb antigens (Figure 1).
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 **Data processing**

37 To perform the data management, a Web-hosted inventory management system
38
39 was designed for this study. An electronic link using this specific software between
40
41 the blood donor units and the patients need was established allowing an automatic
42
43 identification of the most compatible blood.
44
45
46
47

48 **DNA preparation**

49 The genomic DNA was extracted from 200µl aliquots of whole blood by a manual
50
51 spin column separation (QIAmp, Qiagen, Valencia, CA), according to the
52
53 instructions of the manufacturer and eluted into 100µl of buffer. The DNA
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 concentration of each sample was measurement of optical density at 260 and
4
5 280nm and an aliquot of 8 μ l, containing ~10ng of gDNA, was transferred to the
6
7
8 PCR reaction.
9

10 11 12 **HEA BeadChip DNA analysis**

13
14 The DNA array analysis was performed by using the HEA BeadChip containing
15
16 probes directed to polymorphic sites in *RHCE*, *FY* (including *FY-GATA* and *FY265*),
17
18 *DO* (including *HY* and *JO*), *CO*, *DI*, *SC*, *GYP A*, *GYP B* (including markers permitting
19
20 the identification of U-negative and U-variant types), *LU*, *KEL*, *JK*, *LW* and one
21
22 mutation associated with hemoglobinopathies (HgbS) (BioArray Solutions, Warren,
23
24 NJ, USA) for all donors and patients samples. The HEA BeadChip assay was
25
26 performed in accordance with a previously described protocol (17, 18, 22).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 **Results**

40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 **Patients**

42 Of the 283 SCD patients selected, 98 (34.6%) had alloantibodies. Thirty-nine
43
44 patients (39.8%) had an antibody against a single RBC antigen and 59 patients
45
46 (60.2%) had multiple antibodies. The number and antibody specificities found in
47
48 these 98 patients are shown in Table 1.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

53 54 55 56 57 58 59 60 **Predicted phenotype frequencies on SCD patients and blood donors DNA samples**

1
2
3 The frequencies of the xHEA phenotypes observed in the 3 groups (283 SCD
4 patients, 308 random blood donors and 196 African Brazilian donors) are shown in
5
6 Table 2. We observed that we would be able to find in the African Brazilian donors
7
8 more extensively matched units to the SCD patients than in the pool of random
9
10 donors of a mixed Brazilian population.
11
12
13
14
15
16
17

18 **Search of compatible donors**

19
20 Based on genotype results we were able to predict phenotype compatible
21 donors need to this group of SCD patients. We searched for potential compatible
22 donors at the 4 Levels of matching stringency adapted from Klapper et al (Figure 1)
23
24 in our extended 504 HEA typed donors for 98 SCD alloimmunized patients and for
25
26 185 non SCD alloimmunized patients. Using the special software developed for
27
28 searching of compatible units between the blood donor and the patient need we
29
30 were able to find at least 1 compatible donor unit for the 283 SCD patients for
31
32 Levels 1 and 2 (Table 3). Although we have found 60 to 70% of compatible donors
33
34 for Level 3 for the patients need, we were able to find in this pool of donors
35
36 compatible donors for all 29 alloimmunized patients who needed Level 3-matched
37
38 units. We found more compatible donors for Levels 3 and 4 in the African Brazilian
39
40 donors, even with a smaller pool of units typed, than in the random Brazilian
41
42 donors.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 **“Dry matching”**

54
55 Twenty-one from 35 SCD patients presented discrepancies or mismatches
56
57 for multiple antigens between their xHEA antigen profile and the blood units antigen
58
59
60

1
2
3 profile serologically matched for them. The main discrepancies or mismatches
4
5 occurred in RH, FY, JK, MNS and DO systems. We found discrepancies between
6
7 the previous phenotype and genotype-derived phenotype in 14 alloimmunized
8
9 patients chronically transfused who were not having a good *in vivo* RBC survival
10
11 and mismatches for multiple antigens in 17 patients receiving blood units matched
12
13 afor Levels 1 or 2. According to these results we were able to find a better match
14
15 for the patients in our extended HEA (xHEA)-typed units, and in the majority of
16
17 cases the degree of matching was enhanced and the patients benefit to receive the
18
19 transfusions as shown by better *in vivo* RBCs survival. These results were also very
20
21 important to clarify and confirm the specificities of alloantibodies and were essential
22
23 to distinguish between alloantibodies and autoantibodies.
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Discussion

33
34
35
36
37 The provision of antigen-negative blood forms the basis for safe blood
38
39 transfusion by minimizing the risk of adverse transfusion reactions and
40
41 alloimmunization (24).
42
43

44 High-throughput genotyping based on DNA microarrays is a very feasible
45
46 method to obtain a large pool of well-typed blood donors and can contribute to the
47
48 management of transfusions in SCD patients by allowing a more accurate selection
49
50 of donor units to prevent alloimmunization, ensure the best match and transfusion
51
52 safety. The ability to test the patients and a large number of donors simultaneously
53
54 for several antigens, together with computer analysis and interpretation of data
55
56
57
58
59
60

1
2
3 (22,23), makes it feasible to easily increase the inventory of donor units to the SCD
4
5 patients and to facilitate the matching of RBC components to the recipient's blood
6
7 type.
8
9

10 Klapper and colleagues (23) concluded that if patients and donors are
11 extensively DNA typed, it is feasible to provide units for transfusion that are more
12 extensively matched than is the current standard of practice. Our data also show
13 xHEA typing of recipient samples and donor units of known ABO/D status can be
14 used to find RBC compatible units to patients with SCD at the 4 Levels of matching
15 stringency proposed by them. As part of the matching strategy we considered group
16 O donors for all patients and found a sufficient number of antigen-negative units in
17 alloimmunized and non-alloimmunized SCD patients when matching for ABO, D,
18 and known alloantibodies (Level 1) or ABO, D, C, c, E, e and K1 (Level 2) were
19 taken into account. However, the provision of antigen-negative blood for
20 alloimmunized and non alloimmunized patients for Levels 3 and 4 decreased from
21 100% to 50%, although we were able to find compatible donor units for all 29 Level
22 3 antibodies. A possible reason to this lower percentage of compatible donor units
23 for Levels 3 and 4 of matching stringency is the requirement of antigen-negative
24 blood for the SCD cohort and a limited pool of African Brazilian Donors.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 In our institution, patients with SCD who require multiple transfusions are
47 placed on chronic prophylactic transfusion protocols. For effective application of
48 genotyping to such patients it is important that suitably genotyped donors are
49 available. Our data strongly suggest that even selecting large pool of random
50 donors in a mixed population, it is easier to find more extensively match for SCD
51 patients in African donors.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 When we applied a “dry-matching” on 35 SCD patients we found
4 discrepancies or mismatches for multiple antigens between their xHEA antigen
5 profile and the blood units antigen profile serologically matched for them. For those
6 patients, we were able to find a better match in our extended HEA (xHEA)-typed
7 units, enhancing the degree of matching to Levels 3 and 4 and reducing the risk of
8 alloimmunization and delayed transfusion reactions.
9

10
11 The patients who benefit from receiving antigen-matched RBCs based on
12 genotype as shown by better *in vivo* RBCs survival, as assessed by raises in
13 hemoglobin levels and diminished frequency of transfusions, presented
14 autoantibodies underlying clinical significant alloantibodies. The use of this DNA
15 approach was essential to distinguish between those alloantibodies.
16
17

18
19 Alloimmunization may cause several problems ranging from inconvenience
20 due to delay in obtaining matched blood to delayed hemolytic transfusion reaction.
21 We demonstrate the benefits that donor-recipient blood group genotype “dry-
22 matching” would have on reducing the incidence of delayed transfusion reactions.
23 Donor and SCD patient extended matching at Level 3 would also reduce the
24 development of the majority alloantibodies that are currently occurring in more
25 than 90% of the immunized SCD patients.
26
27

28
29 It is not a feasible goal to provide a complete antigen-match blood
30 transfusion to all SCD patients for all antigens. However, extensive DNA-based
31 blood group typing of African donors and patients is shown to be a cost-effective
32 procedure and now chronically SCD patients can be screened at least for the lack
33 of C, c, E, e, K, S, Fy^a, Jk^a and Jk^b antigens.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 The reliable prediction of xHEA phenotypes offers a potential alternative
4 to the current serologic methods of screening donor units and typing transfusion
5 recipients. DNA array technology can contribute to the management of transfusions
6 in SCD patients by facilitating the transfusion support with antigen-matched blood. It
7 has the potential to replace the routine blood group phenotyping reducing costs as
8 well as workload involved in donor and patient antigen typing.
9

10
11 In summary, we showed that the implementation of “dry-matching” can
12 improve the life of thousands of SCD transfused patients by reducing mortality due
13 to transfusion reactions and immunization. We also demonstrated that the degree of
14 enhanced matching was over that which occurred by random chance based only on
15 ABO, Rh and K. Matching at DNA level can provide an added level of safety and
16 efficacy.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Acknowledgments

35
36
37 We thank Débora Castilho Credidio, Marcia Dezan and Glaucia Guelsin for
38 their technical support.
39
40
41
42
43
44
45

46 References

- 47
48
49
50 1. Davies SC, McWilliam AC, Hewitt PE, Devenish A, Brozovic M. Red cell
51 alloimmunization in sickle cell disease. Br. J. Haematol. 1986; 63:241-5.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

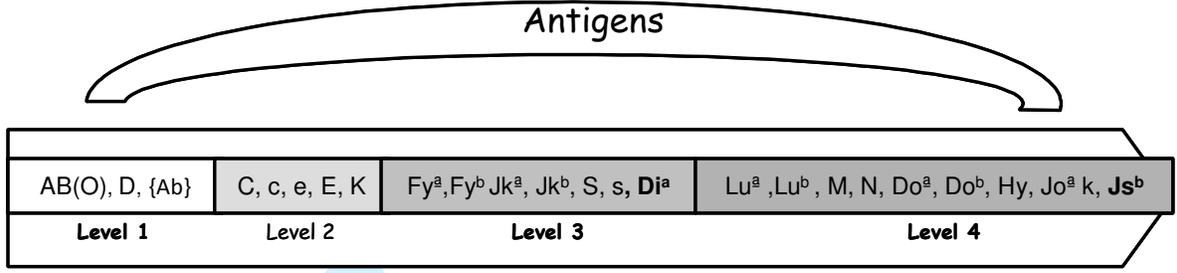
- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
2. Reisner EG, Kostyu DD, Philips G, Walker C, Dawson DV. Alloantibody response in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens* 1986; 30:161-66.
3. Cox JV, Steane E, Cunningham G, Frenkel EP. Risk of alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. *Arch. Intern. Med.* 1988; 148:2485-89.
4. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. *Blood* 1990; 76:1431-37.
5. Vichinsky EP, Earles A, Johnson RA, Hoag MS, William A, Lubin B. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. *N. Engl. J. Med.* 1990; 322:1617-21
6. Giblett ER. A critique of the theoretical hazard of inter-vs-intra-racial transfusion. *Transfusion* 1961; 1:233-38
7. Orlina AR, Sosler SD, Koshy M. Problems of chronic transfusion in sickle cell disease. *J. Clin. Apheresis* 1991; 6:233-40.
8. Tahhan RH, Holbrook LR, Braddy LR, Brewer LD, Christie JD. 1994. Antigen-matched donor blood in the transfusion management of patients with sickle cell disease. *Transfusion* 1994; 34:562-69
9. Ambruso DR, Githens JH, Alcorn R, et al. 1987. Experience with donors matched for minor blood group antigens in patients with sickle cell anemia who are receiving chronic transfusion therapy. *Transfusion* 1987; 27:94-98
10. Castro O, Sandler SG, Houstoun-Yu P, Rana S. Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. *Transfusion* 2002; 42:683-90

11. Sosler SD, Jilly BJ, Saporito C, Koshy M. A simple, practical model for reducing alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol* 1993; 43:103-6
12. Flickinger C. In search of red blood cells for alloimmunized patients with sickle cell disease. *Immunohematology* 2006; 22:136-142
13. Vichinsky EP, Luban N, Wright E, Olivieri N. Prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. *Transfusion* 2001; 41:1086-1092
14. Beiboer SHW, Wieringa-Jelsma T, Maaskant-von Wijk PA, Van der Schoot CE, Van Zwieten R, Roos D, den Dunnen JT, Haas M. Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion* 2005; 45:667-79.
15. Bugert P, McBride S, Smith G, et al. Microarray-based genotyping for blood groups: comparison of gene array and 5'-nuclease assay techniques with human platelet antigen as a model. *Transfusion* 2005; 45:654-9
16. Denomme GA, Van Oene M. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion* 2005; 45:660-6.
17. Hashmi G, Shariff T, Seul M. et al. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* 2005; 45:680-8.
18. Hashmi G, Shariff T, Zhang Yi et al. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion* 2007; 47:736-47.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
19. Veldhuisen B, van der Schoot CE, de Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang* 2009; 97:198-206
 20. Hopp K, Weber K, Bellissimo D, Johnson ST, Pietz B. High-throughput red blood cell antigen genotyping using a nanofluidic real-time polymerase chain reaction platform. *Transfusion* 2010; 50:40-6
 21. Castilho L, Rios M, Pellegrino JJr, Saad STO, Costa FF. Blood group genotyping facilitates transfusion of β thalassemia patients. *Journal of Clinical and Laboratory Analysis* 2002; 16:216-20
 22. Ribeiro KR, Guarnieri MH, Costa DC, Costa FF, Pellegrino Jr J, Castilho L. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang* 2009; 97:147-152
 23. Klapper E, Zgang Y, Figueroa P, Ness P, Stubbs J, Abumuhor I, Bailey J, Epperson L, Tauscher C, Enriquez E, Hashmi G, Seul M. Toward extended phenotype matching: a new operational paradigm for the transfusion service. *Transfusion* 2010; 50:536-546
 24. Schonewille H, van de Watering LMG, Brand A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: is it time to take precautionary measures? *Transfusion* 2006; 46:630-635

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1: Antigen matching stringency levels



or Peer Review

Table 1: Number and antibody specificity in 98 SCD alloimmunized patients

Antibody specificities	Number of patients
Anti-D	4
Anti-E	24
Anti-K	11
Anti-C, -E	17
Anti-c, -E	2
Anti-C, -E, -K	9
Anti-C, -E, -Jk ^b	7
Anti-E, -Fy ^a , -Jk ^b	5
Anti-E, -Jk ^a	7
Anti-E, -K, -Di ^a	4
Anti-K, -S	3
Anti-E, -Fy ^a	1
Anti-S, -Fy ^a	3
Anti-C, -K, -Jk ^b	1

Table 2: Observed phenotype frequencies in SCD patients, random Brazilian donors and Brazilian African donors

		Rh				Kell				Kidd		Duffy		MNS			Lutheran		Diego		Colton		Dombrock			LW		Scianna						
		c	C	e	E	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	JK ^a	JK ^b	Fy ^a	Fy ^b	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Di ^a	Di ^b	Co ^a	Co ^b	Do ^a	Do ^b	Jo ^a	Hy	LW ^a	LW ^b	Sc1	Sc2	
SCD Patients	283	NEG	19	163	5	209	268	0	279	0	259	0	40	123	171	153	42	86	171	28	268	0	275	0	0	271	123	27	2	2	0	283	0	283
		%	6,7	57,6	1,8	73,9	94,7	0	98,6	0	91,5	0	14,1	43,5	60,4	54,1	14,8	30,4	60,4	9,9	94,7	0	97,2	0	0	95,8	43,5	9,5	0,7	0,7	0	100	0	100
		POS	264	120	278	74	15	283	4	283	24	283	243	160	112	130	241	197	112	255	15	283	8	283	283	12	160	256	281	281	283	0	283	0
		%	93,3	42,4	98,2	26,1	5,3	100	1,4	100	8,5	100	85,9	56,5	39,6	45,9	85,2	69,6	39,6	90,1	5,3	100	2,8	100	100	4,2	56,5	90,5	99,3	99,3	100	0	100	0
Random donors	308	NEG	57	127	8	240	301	0	304	0	297	0	60	104	142	83	63	87	169	34	286	0	297	1	0	287	124	34	0	0	0	308	0	307
		%	18,5	41,2	2,6	77,9	97,7	0	98,7	0	96,4	0,0	19,5	33,8	46,1	26,9	20,5	28,2	54,9	11,0	92,9	0	96,4	0	0	93,2	40,3	11,0	0,0	0,0	0	100	0	100
		POS	251	181	300	68	7	308	4	308	11	308	248	204	166	225	245	221	139	274	22	308	11	307	308	21	184	274	308	308	308	0	308	1
		%	81,5	58,8	97,4	22,1	2,3	100	1,3	100	3,6	100	80,5	66,2	53,9	73,1	79,5	71,8	45,1	89,0	7,1	100	3,6	100	100	6,8	59,7	89,0	100	100	100	0	100	0
African donors	196	NEG	20	98	4	155	189	0	196	0	187	0	28	74	108	91	50	38	175	21	179	1	190	0	0	194	92	20	0	0	0	196	0	196
		%	10,2	50,0	2,0	79,1	96,4	0,0	100	0,0	95,4	0,0	14,3	37,8	55,1	46,4	25,5	19,4	89,3	10,7	91,3	0,5	96,9	0,0	0,0	99,0	46,9	10,2	0,0	0,0	0,0	100	0,0	100
		POS	176	98	192	41	7	196	0	196	9	196	168	122	88	105	146	158	21	175	17	195	6	196	196	2	104	176	196	196	196	0	196	0
		%	89,8	50,0	98,0	20,9	3,6	100	0,0	100	4,6	100	85,7	62,2	44,9	53,6	74,5	80,6	10,7	89,3	8,7	99,5	3,1	100	100	1,0	53,1	89,8	100	100	100	0,0	100	0,0

Table 3: Percentage of xHEA compatible donor units for 98 SCD alloimmunized patients and for 185 non SCD alloimmunized patients at the 4 levels of matching stringency.

Matching stringency	Alloimmunized SCD		Non-SCD Alloimmunized	
	Random donors	African donors	Random donors	African donors
Level 1	100%	100%	100%	100%
Level 2	100%	100%	100%	100%
Level 3	61%	67%	72%	74%
Level 4	50%	58%	54%	62%