



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

TESE DE DOUTORADO

KARINA ANTERO ROSA RIBEIRO

GENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA

EM LARGA ESCALA:

IMPACTO NA MEDICINA

TRANSFUSIONAL

CAMPINAS

2009



KARINA ANTERO ROSA RIBEIRO

***GENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA EM LARGA
ESCALA: IMPACTO NA MEDICINA
TRANSFUSIONAL***

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutora em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. LILIAN MARIA DE CASTILHO

CAMPINAS

2009

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R354g Ribeiro, Karina Antero Rosa
Genotipagem eritrocitária em larga escala: impacto na medicina transfusional / Karina Antero Rosa Ribeiro. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Lílian Maria de Castilho
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Microarranjos de DNA. 2. Genotipagem. 3. Antígenos. 4. Anticorpos. 5. Sangue – Transfusão. I. Castilho, Lílian Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Blood group genotyping in large scale: impact in transfusional medicine

Keywords:

- Microarray and DNA
- Genotyping
- Antigens
- Antibodies
- Blood transfusion

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Lílian Maria de Castilho

Prof^ª. Dr^º. Sara Terezinha Olalla Saad

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

Prof^º. Dr^º. Dante Mário Langhi Júnior

Prof^º. Dr^º. Wilson Baleotti Júnior

Data da defesa: 06-08-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

Karina Antero Rosa Ribeiro

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



Membros:

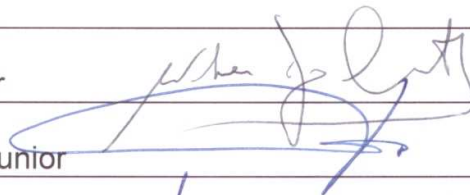
1. Prof. Dr. Wilson Baleotti Júnior

2. Prof. Dr. Dante Mario Langhi Junior

3. Prof^a. Dr^a. Sara Terezinha Olalla Saad

4. Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Rios Barjas Castro

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



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06/08/2009

Dedicatória

Este trabalho é dedicado

A DEUS, pois somente através de sua Graça tudo se tornou possível,

e a todos àqueles que tiveram paciência de esperar por mim:

meu esposo Rodrigo,

meu filho Luccas

e a meus pais, Sérgio e Teresinha.

Agradecimentos

A **DEUS**, pela presença constante em minha vida, me concedendo saúde, paz e a realização de sonhos. “A graça é dada por Deus, mas o conhecimento nasce do esforço”. (Autor desconhecido)

A **Profa. Dra. Lilian Castilho**: é muito difícil traduzir em poucas linhas toda a amizade, o apoio e as lições de conhecimento que você dedicou a mim durante os últimos 7 anos. Penso que expressar o meu agradecimento por palavras seja o mínimo que posso fazer para demonstrar o quanto você foi e certamente continuará sendo minha grande mestre e fonte de inspiração profissional.

“O conhecimento por si só não propicia a felicidade verdadeira se não estiver acompanhado de satisfação.” (Autor desconhecido). Não há dúvidas do quanto, durante estes anos, foi para mim uma enorme satisfação ter você como orientadora, conduzindo-me gentilmente pelo caminho do conhecimento e abrindo-me as portas de novas oportunidades. Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Jordão Pellegrino Jr.**: pela amizade e carinho com que sempre me recebeu, e em especial pela sua dedicação e grandiosa contribuição, que conferiram a este trabalho características singulares, sem as quais, muito se teria perdido. “Os nossos conhecimentos são a reunião do raciocínio e experiência de numerosas mentes.” (Ralph Waldo Emerson).

Ao meu grande amor, **Rodrigo Ribeiro**: meu refúgio, exemplo de caráter, generosidade, coragem, determinação e otimismo.

Aos meus **pais**, que sempre me permitiram ir de encontro às minhas aspirações e que me ensinaram que humildade e honestidade são passos fundamentais para a concretização de todo e qualquer objetivo.

A todos os **pacientes e doadores** voluntários de sangue que prontamente se dispuseram a colaborar com este trabalho, concedendo-me a oportunidade de fazer ciência.

Aos colaboradores **Ricardo Omoto** (Hospital São Rafael) e **Dra. Ana Paula Cozac** (Hemocentro de Ribeirão Preto) pelo apoio na coleta das amostras de sangue dos pacientes falciformes.

Agradecimentos (cont.)

A FAPESP pelo importante auxílio financeiro desta pesquisa e ao Hemocentro da Unicamp, pela disposição do ambiente adequado para a realização do trabalho.

As minhas amigas de laboratório: Débora, Thaís P., Daphne, Daiane, Fernanda e Thaís pela amizade desprendida e apoio durante a realização deste trabalho e em especial a Mara Heloísa, grande colaboradora, cuja ajuda foi valiosa durante a fase de bancada deste trabalho e a Roseli (Lili), pelo importante suporte técnico durante minha gestação.

Aos profs. e Drs. Vagner de Castro e Marcelo Addas Carvalho pelas interessantes observações e contribuições durante a minha qualificação.

A Maria de Fátima (Fafá), Monira e Fernanda (Imunohemato), Ucha (Hemostasia) Andréa, Marcela e João (Controle de Qualidade) e Leonardo e Arlete (Apoio didático) pelo suporte técnico-administrativo.

E a todos os demais que de forma direta ou indireta participaram deste projeto, seja na sua construção ou no desejo de que ele se concretizasse.

A todos, muito obrigada!

Epígrafe

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo,

uma vez possuído.”

Confúcio.

*Trabalho realizado no **Laboratório de Pesquisa de Grupos Sanguíneos**
(Laboratório de Ensino) do Hemocentro da Unicamp com o auxílio financeiro da
FAPESP (Proc. n. 05/55787-9).*

Resumo

Neste século uma nova tecnologia está gradativamente se infiltrando na medicina transfusional e complementando as técnicas sorológicas: a genotipagem de grupos sanguíneos através de diferentes métodos moleculares. O futuro dos grupos sanguíneos sem dúvida envolve a biologia molecular. Neste contexto, novos procedimentos técnicos se tornam necessários para possibilitar a introdução da genotipagem de grupos sanguíneos na rotina transfusional bem como, a investigação de novos polimorfismos característicos de duas diferentes populações: doadores de sangue e pacientes. A tecnologia baseada em “microarrays” tem sido avaliada para detecção de polimorfismos de grupos sanguíneos. Com a perspectiva de que esta metodologia permitirá a realização da genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala de forma automatizada e rápida, os objetivos deste trabalho foram: validar em uma população brasileira os chips de DNA para a genotipagem dos principais alelos de grupos sanguíneos; determinar a frequência genotípica dos principais alelos de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e, viabilizar a criação de um banco de dados eletrônico com as características genotípicas comuns e raras de doadores voluntários de sangue, possibilitando a compatibilidade sanguínea mais exata entre doadores e pacientes portadores de anemia falciforme. Os resultados obtidos durante a validação do “microarray” mostraram concordância com os resultados da genotipagem convencional e a fenotipagem. A genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala utilizando a plataforma HEA BeadChip possibilitou a determinação da frequência dos principais genótipos dos sistemas de grupos sanguíneos em uma população brasileira de doadores voluntários de

sangue e demonstrou agilidade na identificação de alelos raros. Esta metodologia possibilitou também a criação de um banco de dados de doadores genotipados, através do qual foi possível promover a compatibilidade mais exata entre doadores de sangue e os pacientes falciformes. A partir deste banco de dados composto por 948 doadores, foi possível encontrar sangue fenótipo compatível (RhCc, RhEe, Do(a/b), Jk(a/b), Fy(a/b), S/s e K1/K2) para 134 dos 144 pacientes falciformes avaliados. Onze (11/144) pacientes aloimunizados, que apresentavam discrepâncias entre os resultados da fenotipagem e da genotipagem passaram a receber sangue compatível levando em consideração os resultados do genótipo. Estes pacientes se beneficiaram das transfusões recebidas, uma vez que houve aumento dos níveis de hemoglobina e aumento no intervalo entre as transfusões. Estes resultados nos levam a crer que esta metodologia poderá ser utilizada como complemento à hemaglutinação e possível substituição da mesma para alguns sistemas de grupos sanguíneos. Este trabalho que utilizou a metodologia de “microarray” para genotipagem de grupos sanguíneos pela primeira vez no Brasil abre a possibilidade de determinar os alelos de grupos sanguíneos em larga escala e constituir um banco de genótipos de grupos sanguíneos raros que poderão ser disponibilizados para consulta pela internet em situações onde a hemaglutinação não forneça resultados seguros para a realização da transfusão sanguínea. Esta tecnologia demonstrou ser um procedimento rápido e eficiente para busca de sangue fenótipo compatível para pacientes portadores de anemia falciforme permitindo assim a redução da aloimunização e a compatibilidade mais exata diminuindo o risco de reações transfusionais hemolíticas.

Abstract

In this century a new technology is gradually infiltrating in the transfusion medicine and complementing the serological techniques: blood group genotyping through a series of molecular methods. The future of blood groups undoubtedly involves molecular biology. In this context, new technical procedures are necessary to make possible the introduction of blood group genotyping in the blood bank. The microarray-based technology has been evaluated for detection of blood group polymorphisms in large scale. We evaluated the usefulness of a high-throughput genotyping based on DNA microarrays commercially available to obtain a fully typed donor database to be used for a better matching between Sickle Cell Disease (SCD) Patients and donors to prevent adverse transfusion reactions. We selected DNA samples from 144 SCD patients with multiple (receiving > 5 units) transfusions previously phenotyped for ABO, Rh(D, C, c, E, e), K1, Fy^a and Jk^a. We also selected DNA samples from 948 Brazilian blood donors whose ABO/RhD phenotype matched that of the patients. All samples were analyzed by DNA array analysis (HEA BeadchipTM, BioArray Solutions) to determine polymorphisms associated with antigen expression for 11 blood group systems (Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Dombrock, Lutheran, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton, Scianna). Based on genotype results we were able to predict phenotype compatible donors needed in order to provide compatible units to this group of patients. Based on their ABO/Rh phenotype we were able to find in this pool of donors compatible units for 134 SCD patients. In addition, we also determined the frequency of clinically relevant blood group antigens and identified donor blood with rare phenotypes in the studied population. Our results demonstrate that the DNA array

technology can identify blood group genotypes for SCD patients and is useful to readily identify compatible donors for those patients. This routine DNA analysis of donors and recipients would allow the selection of donors for given recipients on the basis of the respective antigen repertoires. We can use the information obtained by molecular methods to identify donors who may meet the special requirements, and serologic tests are performed only on those samples. The provision of antigen-negative blood forms the basis for safe blood transfusion by minimizing the risk of adverse transfusion reactions and alloimmunization. The implementation of automated platforms allows all donors to be genotyped, expanding the blood donor extended antigen database and the reduction of extended phenotype testing. With this additional tool, more donors presenting with rare and uncommon antigens are discovered, which improves the likelihood that patients requiring frequent transfusions will be provided with antigen-specific blood.

Lista de abreviaturas

Sigla	Descrição
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
RHT	Reação hemolítica transfusional
AHAI	Anemia hemolítica auto imune
DHPN	Doença hemolítica Peri natal
TAD+	Teste direto da antiglobulina positivo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Análise dos fragmentos da digestão dos produtos da reação em cadeia da polimerase
PCR-ASP	Reação em cadeia da polimerase alelo específica
RhD-negativos	Indivíduos portadores do fenótipo Rh(-)
ETDA	Ácido etileno diamino tetracético
Taq DNA	Enzima DNA polimerase
HEA BeadChip™	Plataforma de “microarray”
eMAP	Elongation-mediated multiplex analysis of polymorphisms
HbSS	Indivíduo homozigoto para a Hemoglobina S
dNTP	Desoxinucleotídeos
Rh	Sistema Rh
RhC	Antígeno RhC
Rhc	Antígeno Rhc
RhE	Antígeno RhE

Lista de abreviaturas cont.

Rhe	Antígeno Rhe
Fy^b	Antígeno Fy ^b
Fya	Antígeno Fy ^a
Jka	Antígeno JK ^a
K1	Antígeno Kell 1
Fy(b-)	Fenótipo Fy(b-)
Fy(b+)	Fenótipo Fy(b+)
FY*B	Alelo B do gene <i>FY</i>
FY*A	Alelo A do gene <i>FY</i>
<i>RHCE</i>	Gene <i>RHCE</i>
RhCE	Proteína RhCE
TEB	Tris EDTA Borato
LISS	Low ionic strength salt solution
GEL-LISS	Técnica de hemaglutinação em gel
μl	Microlitro
ml	Mililitro
ng	Nanograma
μg	Micrograma
g	Giros
pb	Pares de base
Primers	Sequência de oligonucleotídeos sintéticos
DO	Densidade óptica

Lista de abreviaturas cont.

LS	Low signal
IC	Indeterminated call
AA	Homozigose para o alelo selvagem (alta frequência)
AB	Heterozigose para o alelo selvagem
BB	Homozigose para o alelo mutado (baixa frequência)

Lista de tabelas

	<i>Título</i>	<i>Página</i>
Tabela 1	Possíveis consequências da aloimunização eritrocitária.....	29
Tabela 2.	Limitações da Hemaglutinação.....	32
Tabela 3.	Alelos avaliados na genotipagem individual.....	44
Tabela 4.	Enzimas utilizadas para digestão dos produtos dos PCR-RFLP..	45
Tabela 5.	Alelos e SNPs contidos no HEA BeadChip™	53
Tabela 6.	Falhas técnicas que conduzem a presença da sigla <i>IC</i>	59
Tabela 7.	Amostras com Resultados de genotipagem x fenotipagem Duffy discordantes observadas durante a validação da técnica de “microarray”.....	65
Tabela 8.	Resultado dos genótipos de pacientes e doadores obtidos para os principais sistemas de grupos sanguíneos.....	66
Tabela 9.	Resultados das frequências genóticas observadas em doadores de sangue e pacientes falciformes.....	67
Tabela 10.	Aloanticorpos de grupos sanguíneos em pacientes politransfundidos portadores de anemia falciforme.....	68
Tabela 11.	Discrepâncias observadas entre o fenótipo e o genótipo em 15 amostras de DNA de pacientes falciformes.....	68
Tabela 12.	Fenótipos deduzidos dos genótipos e número de doadores compatíveis para pacientes falciformes.....	70
Tabela 13.	Fenótipos deduzidos dos genótipos de pacientes falciformes sem doadores compatíveis.	73

Tabela 14.	Fenótipos raros identificados a partir dos genótipos em 948 doadores.....	78
Tabela 15.	Fenótipos de difícil caracterização sorológica.....	79
Tabela 16	Comparação entre os métodos de genotipagem convencional, genotipagem pela técnica de “microarray” (larga escala) e fenotipagem por hemaglutinação	85
Tabela 17.	Limitações da tecnologia “microarray”.....	87

Lista de figuras

Título	Página
Figura 1. Inserção dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária.....	24
Figura 2. Distribuição dos antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos.....	25
Figura 3. SNP missense na região codificadora do gene KEL: polimorfismo K/k.....	26
Figura 4. Deleção de nucleotídeo: alteração no quadro de leitura gene <i>ABO</i> .	26
Figura 5. SNP na região reguladora (T>C) do <i>GATA box</i> : alteração na expressão do antígeno Fy ^b nos eritrócitos.....	27
Figura 6. Conversão gênica entre os genes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> : formação de alelos híbridos.....	27
Figura 7. Adição de nucleotídeos - mudança no quadro de leitura: um mecanismo responsável pela não expressão do antígeno RhD nas hemácias.....	28
Figura 8. Deleção em sítio de splicing: remoção completa do exon 5 do gene <i>GYPB</i> desencadeia o fenótipo S-s-.....	28
Figura 9. Foto gel de agarose para identificação polimorfismos <i>RH*C/c</i> e gel de acrilamida para identificação polimorfismos <i>JK*A/B</i>	51
Figura 10. Géis de acrilamida para identificação polimorfismos <i>FY*A/B</i> , <i>GATA (N/M)</i> , <i>RH*E/e</i> e <i>GYPB*S/s</i>	51
Figura 11. Hibridização e emissão de fluorescência.....	55
Figura 12. Resumo das etapas da técnica de “microarray” - plataforma HEA BeadChip TM	56

Figura 13.	Sistema automatizado de captura e análise de dados AIS Data Acquisition Basis™	57
Figura 14.	Emissão dos resultados: Intensidade gráfica do Sinal (cada primer) de discriminação entre cada alelo.....	58
Figura 15.	Relatório de resultado (doadores) gerado automaticamente pelo sistema após a aquisição da intensidade de hibridização.....	59
Figura 16.	Imagem do software de análise wHEA™	60
Figura 17.	Ilustração da planilha eletrônica utilizada para seleção eletrônica do perfil genético de doadores e pacientes.....	61
Figura 18.	Frequência genotípica observada por Hashmi et al.....	78

Sumário

	<i>Página</i>
1.0 Introdução	23
2.0 Objetivos	36
3.0 Casuística	38
4.0 Materias e métodos	40
4.1 Materiais utilizados.....	41
4.2 Métodos empregados.....	48
5.0 Resultados	62
5.1 Validação da plataforma HEA BeadChip™ (BioArray Solutions) para a genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala.....	63
5.2 Genotipagem em larga escala de doadores de sangue e pacientes.....	64
5.3 Seleção e transfusão de sangue fenótipo compatível para os pacientes falciformes a partir dos resultados dos genótipos.....	69
6.0 Discussão	74
6.1 Comparação entre os resultados de genotipagem e fenotipagem durante a validação da plataforma HEA BeadChip™.....	75
6.2 Genotipagem em larga escala de doadores de sangue e pacientes.....	76

Sumário (cont.)

Página

6.3 Seleção e transfusão de sangue fenótipo compatível para os pacientes falciformes a partir dos resultados dos genótipos.....	79
6.4 Métodos de genotipagem convencional, “microarray” e fenotipagem para antígenos de grupos sanguíneos: vantagens e desvantagens.....	84
7.0 Conclusões	88
8.0 Referências bibliográficas	91
9.0 Apêndices	98

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

Os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados pela presença ou ausência de antígenos na membrana eritrocitária. Estes antígenos são parte integrante dos componentes da membrana e possuem características polimórficas bem definidas (1).

Os antígenos eritrocitários são herdados geneticamente e caracterizados por sequências de aminoácidos específicas, constituindo proteínas que podem ou não estar ligadas a carboidratos ou a lipídios (2) (Figura 1). A diversidade dos antígenos de grupos sanguíneos, como qualquer outro traço biológico, encontra-se ao nível do gene (3-4).

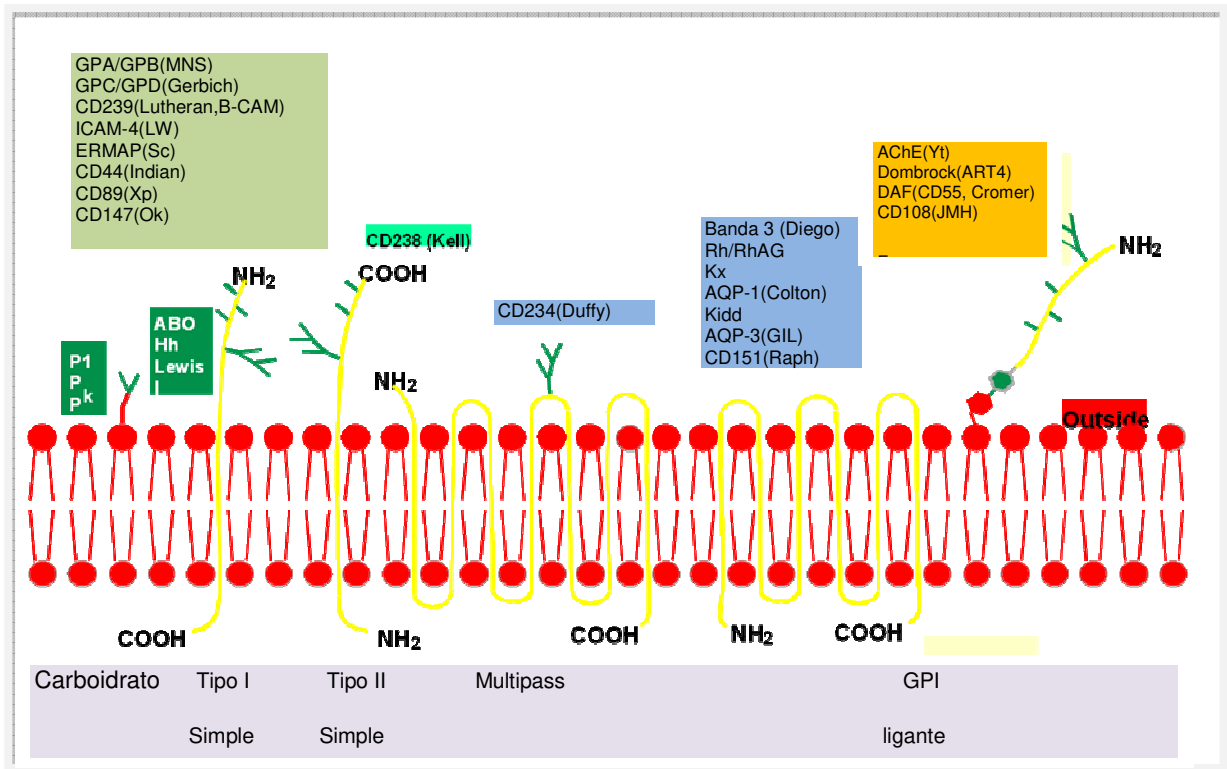


Figura 1. Inserção dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária. Adaptado de Reid (4)

De acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), existem atualmente 308 antígenos eritrocitários distribuídos em 30 sistemas de grupos sanguíneos (5) (Figura 2). Os sistemas Rh, MNS e Kell são os mais complexos, contendo 50, 46 e 34 antígenos, respectivamente.

Os genes que codificam 29 das 30 proteínas que contém os antígenos de grupos sanguíneos já foram sequenciados. O gene que codifica os antígenos do sistema P, apesar de já ter sido atribuído ao cromossomo específico, ainda não foi clonado (6).

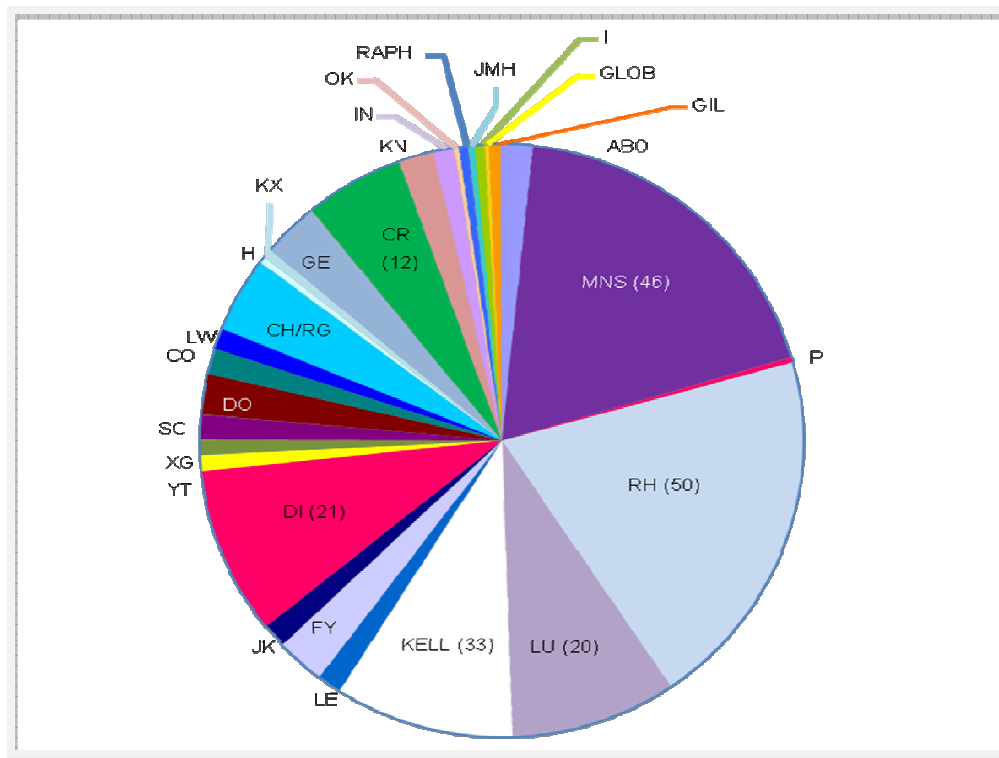


Figura 2. Distribuição dos antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos. Adaptado de Avent (2).

Muito se descobriu sobre a complexidade dos antígenos de grupos sanguíneos após a clonagem dos genes que os codificam, pois o

conhecimento da sequência gênica possibilitou a identificação de diversas formas polimórficas destes genes.

Os polimorfismos de grupos sanguíneos originam-se predominantemente de mutações de ponto (SNPs) mas, processos como recombinações gênicas, deleções e inserções (Figuras 3-8) também ocorreram ao longo da evolução dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos e promoveram o desenvolvimento de formas variantes destes genes (7-8).

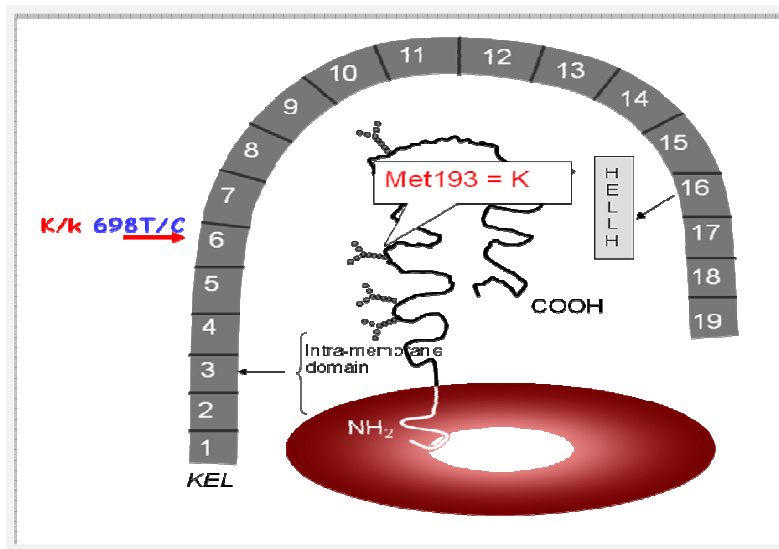


Figura 3. SNP missense no gene KEL: polimorfismo K/k e representação esquemática da glicoproteína Kell e a proteína adjacente XK. Adaptado de Wester et al (4).

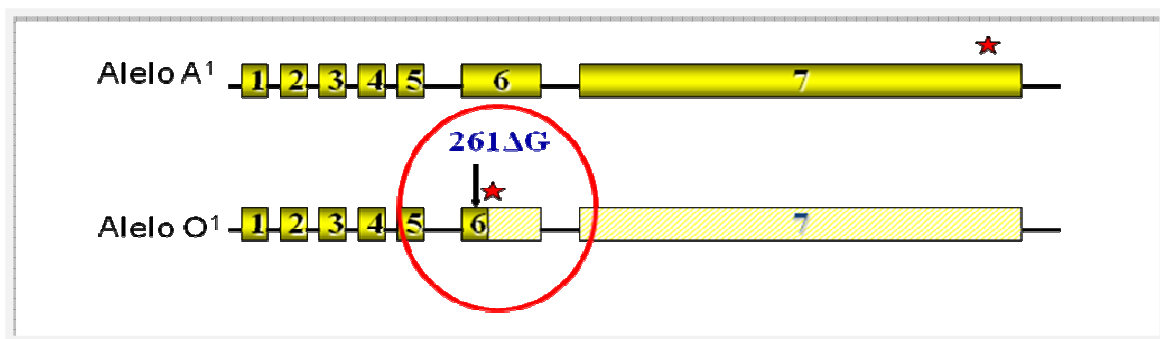


Figura 4. Deleção de nucleotídeo: alteração no quadro de leitura gene ABO. Adaptado de Reid&Lomas-Francis (3)

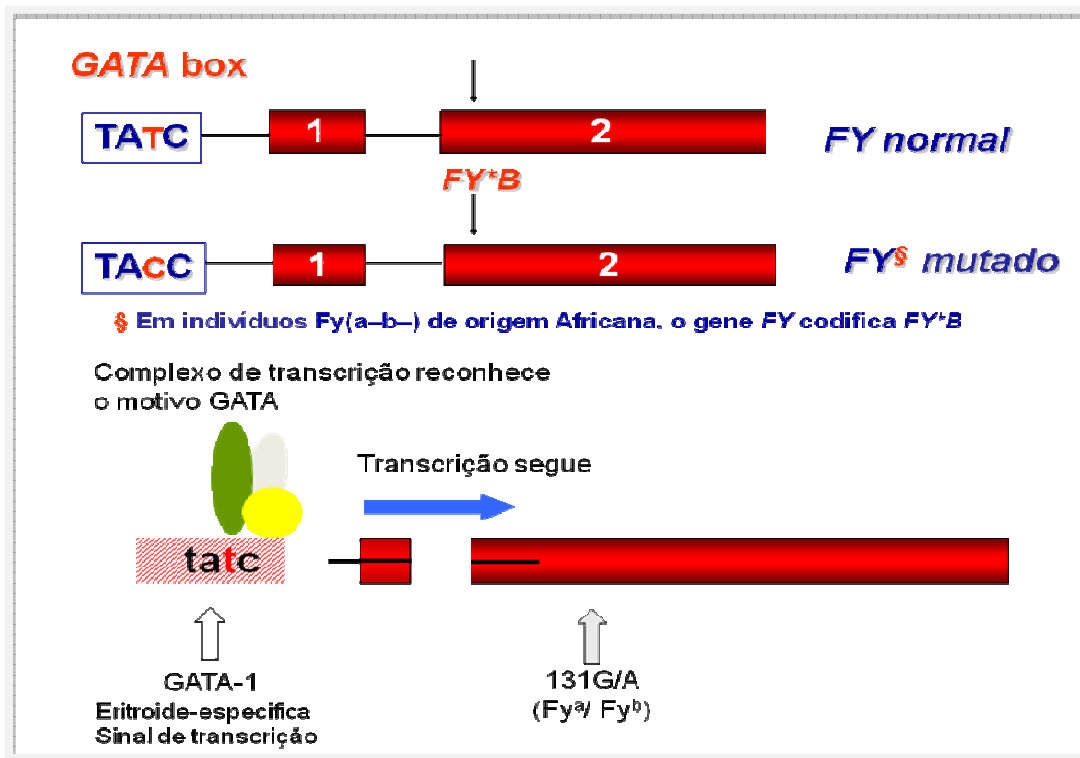


Figura 5. SNP na região reguladora (T>C) do *GATA box*: alteração na expressão do antígeno Fy^b nos eritrócitos. Adaptado de Reid&Lomas-Francis (3).

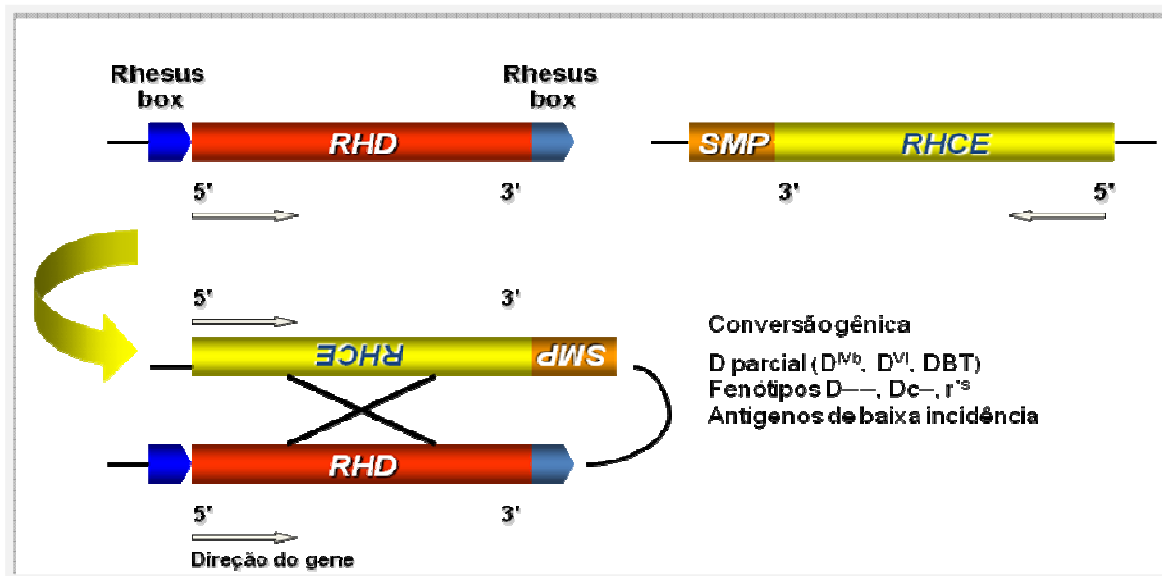


Figura 6. Conversão gênica entre os genes *RHD* e *RHCE*: formação de alelos híbridos. Adaptado de Reid&Lomas-Francis (3)

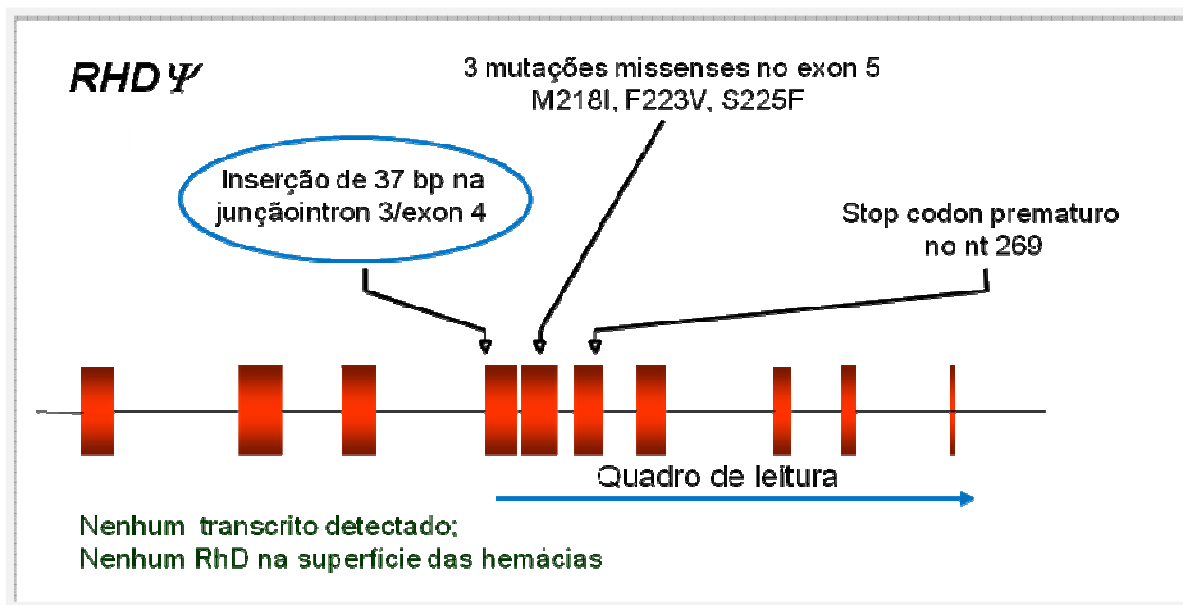


Figura 7. Adição de nucleotídeos - mudança no quadro de leitura: um mecanismo responsável pela não expressão do antígeno RhD nas hemácias.

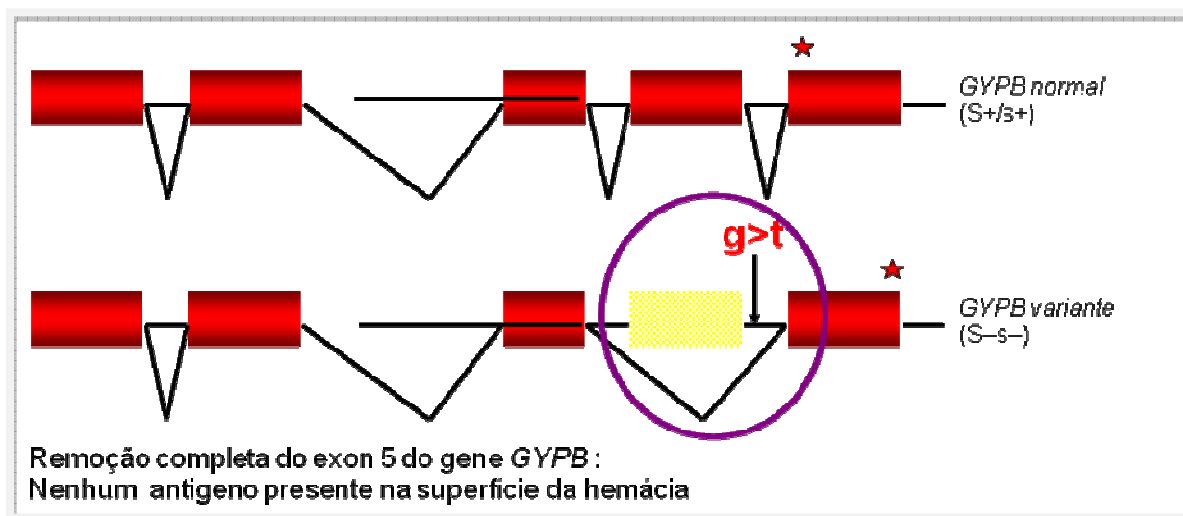


Figura 8. Deleção em sítio de splicing: remoção completa do exon 5 do gene *GYPB* desencadeia o fenótipo S-s-.

Pelo fato dos antígenos de grupos sanguíneos estarem presentes na parte externa da membrana eritrocitária, eles apresentam importância 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, além de aumentar o risco transfusional nas transfusões subsequentes (9-10).

Pacientes que recebem transfusão de sangue podem desenvolver anticorpos contra diversos de antígenos eritrocitários. De acordo com Poole e Daniels (11), 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.

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%) (12). Aloanticorpos desenvolvidos contra outros antígenos eritrocitários ocorrem em menos que 1% da população (13-16).

Tabela 1. Possíveis consequências da aloimunização eritrocitária

Aumento do risco de reação transfusional
Redução do número de bolsas de sangue compatível
Destruição dos eritrócitos alogênicos (reação hemolítica transfusional - RHT)
Destruição dos eritrócitos autólogos (anemia hemolítica auto imune -AHAI)
Destruição dos eritrócitos do feto (doença hemolítica Peri-natal - DHPN)
Danos a tecidos transplantados

O significado clínico dos anticorpos anti-eritrocitários depende da frequência do antígeno (que pode variar em diferentes origens étnicas), da sua imunogenicidade e de situações clínicas específicas. 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 (17).

A literatura apresenta estudos mostrando a frequência da produção de anticorpos irregulares em populações selecionadas de pacientes politransfundidos (18-19). Estes trabalhos 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-ímmunes, cirrose hepática e síndromes mielodisplásicas (20).

Considerando as frequências gênicas e a prevalência destes anticorpos em diferentes populações, Giblett (13) 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 a 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 (21). Outros têm recomendado transfusões fenotipicamente compatíveis com os antígenos eritrocitários mais imunogênicos: D, Kell, RhE, Rhc, Fy^a, Jk^a, S e s (18,20). A fenotipagem eritrocitária é essencial para a confirmação de aloanticorpos e também pode facilitar a identificação de anticorpos que podem ser formados no futuro.

O método clássico para fenotipagem de grupos sanguíneos se baseia no princípio da hemaglutinação (22-23). Segundo Reid (24), este procedimento, que utiliza métodos sorológicos, foi largamente adotado por ser, até então, um teste de baixo custo e por apresentar eficiência, quando bem executado, nos testes de compatibilidade entre pacientes e doadores de sangue.

Apesar de constantemente utilizado nos bancos de sangue, o teste de hemaglutinação apresenta limitações técnicas e clínicas que merecem atenção (Tabela 2).

Atualmente, estas limitações da fenotipagem podem ser supridas com o uso de técnicas moleculares (22,24-28), as quais têm contribuído para aumentar a segurança e eficácia dos procedimentos transfusionais de pacientes politransfundidos (23-24,29).

Tabela 2. Limitações da Hemaglutinação

Limitações técnicas
Interpretação subjetiva
Procedimentos trabalhosos, demorados e pouco automatizados
Alto custo dos reagentes, em especial dos soros raros
Muitos soros raros não são registrados e são de origem humana
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 zigozidade <i>RHD</i>
Poucos doadores fenotipados para um pequeno número de antígenos, limitando os estoques e registro de doadores raros

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 (7,22,25).

Entre as indicações para a realização de testes moleculares em imunohematologia estão a identificação dos antígenos eritrocitários em pacientes recém-transfundidos, em pacientes com teste direto da antiglobulina positivo (TAD+) e a identificação do risco do desenvolvimento de doença hemolítica peri natal (DHPN) (22,30-31).

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 (24).

Os procedimentos moleculares atualmente empregados na genotipagem de grupos sanguíneos baseiam-se na reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP e PCR alelo específico).

A técnica de genotipagem por PCR, apesar de bastante eficiente, pode ser 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.

Assim, embora o método de PCR 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 (32-35), uma vez que, para cada paciente ou doador analisado, dezenas de alelos diferentes devem ser pesquisados para garantir a eficiência da análise, o que só pode ser feito através da execução de diversos protocolos de PCR.

A alternativa é a aplicação de técnicas moleculares que permitam o trabalho em larga escala (tecnologia de microarranjos -“microarray”), ou seja, a

identificação em uma mesma amostra de diversos antígenos em um único procedimento.

A técnica de “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 (29).

Este procedimento é indicado para a genotipagem em larga escala por ser 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 totalmente automatizado (32-33).

A genotipagem de grupos sanguíneos por “microarray” também pode ser útil para a criação de banco de dados eletrônicos de doadores com características genóticas raras, o que permitiria a troca de amostras de sangue fenotipado entre os serviços de Hemoterapia, possibilitando a identificação de doadores mais compatíveis com os pacientes em tempo reduzido (32). Esta metodologia apresenta ainda grande potencial para fornecer importantes informações sobre o perfil molecular completo dos antígenos eritrocitários de grupos sanguíneos de populações miscigenadas.

Semelhante a um censo demográfico, a identificação dos sistemas de grupos sanguíneos por meio de avançadas técnicas de tipagem por DNA poderá ajudar a desenvolver procedimentos mais seguros para transfusão, a cadastrar portadores de sangues raros e a prevenir doenças hemolíticas em recém-nascidos causadas por incompatibilidade sanguínea dos pais.

Com o desenvolvimento destas plataformas de análise em larga escala, o custo da genotipagem tem sido reduzido drasticamente e a esperança é que esta metodologia permita a realização da genotipagem de grupos sanguíneos de forma automatizada, rápida e segura, para que possa ser utilizada nas rotinas dos bancos de sangue.

No entanto, para se estabelecer protocolos seguros de genotipagem de grupos sanguíneos é importante realizar uma triagem sistemática dos alelos e variantes de grupos sanguíneos de uma determinada população para que seja possível substituir com segurança as técnicas sorológicas atualmente empregadas nas rotinas de bancos de sangue. Embora muitos pesquisadores estejam trabalhando neste contexto (2,35-41), poucos dados foram publicados e a diversidade genética dos grupos sanguíneos em algumas populações ainda continua desconhecida.

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

Diante da possibilidade de utilização de plataformas automatizadas para a realização da genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala e, considerando o importante papel da biologia molecular na medicina transfusional, os nossos objetivos foram:

1. Validar em duas populações brasileiras uma plataforma de “microarray” para a genotipagem em larga escala dos principais alelos de grupos sanguíneos;
2. Determinar a frequência genotípica dos principais alelos de grupos sanguíneos em doadores de sangue e pacientes portadores de anemia falciforme;
3. Avaliar a eficiência da utilização de uma plataforma de “microarray” para genotipagem em larga escala na constituição de bancos de doadores de sangue genotipados para os principais alelos de grupos sanguíneos e na busca de fenótipos raros;
4. Verificar a possibilidade de aplicação da tecnologia “microarray” na seleção de sangue compatível para pacientes politransfundidos.

CASUÍSTICA

3.0 CASUÍSTICA

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

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

a. 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 1.000 amostras de sangue de doadores voluntários do Hemocentro da Unicamp.

b. Amostras de sangue de pacientes portadores de anemia falciforme politransfundidos

Foram coletadas 160 amostras de sangue de pacientes portadores de Anemia Falciforme (homozigotos para hemoglobina S) atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, no Hospital São Rafael, Salvador, Bahia e no Hemocentro de Ribeirão Preto. Estes pacientes tinham recebido no mínimo 5 (cinco) transfusões de concentrado de hemácias e tinham sido previamente fenotipados para os antígenos ABO, Rh (D, C, c, E, e), K1, Fy^a, Jk^a e S/s por testes de hemaglutinação.

MATERIAS E MÉTODOS

4.0 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS UTILIZADOS

4.1.1 Cartões Gel (*ID-Micro Typing Cards*)

Os cartões ID-Liss/Coombs utilizados na realização da fenotipagem eritrocitária e foram obtidos junto à Diamed AG ®, Morat, Switzerland. Cada cartão ID-Liss/Coombs, continha 6 microtubos e, em cada um deles, uma mistura de gel e soro antiglobulina humana poliespecífica.

4.1.2 Tampão LISS Modificado (Diluyente 2)

Tampão de baixa força iônica, utilizado na diluição dos anti-soros e das hemácias, para a realização da fenotipagem (Diamed AG ®, Morat, Switzerland).

4.1.3 Suspensão de hemácias a 0,8%

Foram preparadas suspensões de hemácias a 0,8%, em LISS modificado (Diluyente 2). Após lavar 3 vezes as hemácias em solução fisiológica, usando centrifugação a 100 *g* durante 1 minuto, a cada vez, 2 µl do concentrado de hemácias obtido foi ressuspenso em 0,5 ml de LISS modificado.

4.1.4 Anti-soros

Os anti-soros empregados na determinação dos antígenos pesquisados derivaram das empresas Immucor, Norcross, GA e Diamed AG ®, Morat, Switzerland.

4.1.5 Diluição dos Anti-soros

As diluições dos anti-soros foram realizadas em tampão LISS modificado (diluyente 2) na razão 2 contra hemácias específicas. A diluição de trabalho foi definida na última diluição que apresentou reação de aglutinação de 4 + do anti-soro com o antígeno correspondente.

4.1.6 Kits de extração de DNA

Para a extração do DNA do sangue periférico foi utilizado o Kits comercial QIAamp Blood Mini Kit da Qiagen (Chattlesworth,CA, EUA).

4.1.7 Taq DNA Polimerase

As enzimas Taq DNA polimerase, utilizadas nas reações de PCR convencional foram obtidas da Invitrogen ® (Carlsbad, CA). O Kit contendo 5 unidades/ μ l desta enzima, incluía 1 ml de tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH8.4) e 500 mM de KCl e 1 ml de $MgCl_2$ 50mM. O protocolo de PCR multiplex para genotipagem em larga escala utilizou 5,0 U da enzima DNA

polimerase de alta fidelidade Hot Start *Taq* DNA polimerase (Chattlesworth,CA, EUA) em cada reação.

4.1.8 dNTP 10mM

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

4.1.9 Primers

Os primers utilizados para os protocolos de PCR convencional foram obtidos da empresa Invitrogen ® (Carlsbad, CA) e estão descritos na Tabela 3.

Para a execução da técnica de “microarray” foram utilizados as sondas (primers) contidas no Human Erythrocyte Antigen Kit (HEA), adquiridos da empresa BioArray Solutions (Warren, NJ, USA). O HEA kit continha junto às sondas específicas (Tabela 4), as soluções de 1X tampão de PCR (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 3.5 mM MgCl e 200 µmol de cada dNTP e outros reagentes, que serão descritos oportunamente.

4.1.10 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 4).

Tabela 3. Alelos avaliados na genotipagem individual. Sequencia primers Castilho et al (25).

Grupo Sanguíneo	Alelos	Polimorfismo	Sequência dos primers
Duffy	Fy ^a /Fy ^b	125 G>A	5'-TCCCCCTCAACTGAGAACTC -3' 5'-AAGGCTGAGCCATACCAGAC -3'
	Fy ^x	265 C>T	5'-CAAGGCCAGTGACCCCCATA -3' 5'-CATGGCACCGTTTGGTTCAG -3'
Duffy-GATA	Silency Duffy	-33 T>C	5'-CAAGGCCAGTGACCCCCATA -3' 5'-CATGGCACCGTTTGGTTCAG -3'
Kidd	JK ^a /JK ^b	838 G>A	5'-TGAGATCTTGGCTTCCTAGG-3' 5'-ATTGCAATGCAGGCCAGAGA-3'
Kell	K/k	698 T>C	5'-AAGCTTGGAGGCTGGCGCAT -3' 5'-CCTCACCTGGATGACTGGTG -3'
MNS	GYPB (S/s)	143 T>C	5'GGTAAGACTGACACATTACCTCAC-3' 5'GAAACGATGGACAAGTTGACGC-3'
Rh	RhE/e	676 G>C	5'-GGC AAC AGA GCA AGA GTC CA -3' 5'-CTG ATC TTC CTT TGG GGG TG -3'
	RhC/c (N68S)	203 A>T	5'-CAGGGCCACCACCATTTGAA 3' 5' -GAACATGCCACTTCACTCCAG 3' 5' -TCGGCCAAGATC TGACCG 3' 5' -TGATGACCACCT TCCCAGG 3'
	RhD		5' -GTG TCT GAA GCC CTT CCA TC -3' 5'-GAA ATC TGC ATA CCC CAG GC -3' 5'ATT AGC TGG GCA TGG TGG TG 3'

4.1.11 Marcadores moleculares

Marcadores de 100 pb e 1 kb (Invitrogen ®, Carlsbad, CA e MBI Fermentas ®, Amherst, NY, USA), foram utilizados na análise do tamanho dos fragmentos de DNA.

Tabela 4. Enzimas utilizadas para digestão dos produtos dos PCR-RFLP

Grupo Sanguíneo	Alelos	Polimorfismo	Enzima de Restrição
Duffy	Fy ^a /Fy ^b	125 G>A	<i>Ban I</i>
	Fy ^x	265 C>T	<i>MspA I</i>
Duffy-GATA	Silency Duffy	-33 T>C	<i>Sty I</i>
Kidd	Jk ^a /Jk ^b	838 G>A	<i>Mnl I</i>
Kell	K/k	698 T>C	<i>Bsm I</i>
	GYPB (S/s)	143 T>C	<i>Afl III</i>
Rh	RhE/e (A226P)	676 G>C	<i>Mnl I</i>

4.1.12 Tampão Tris-Borato (TEB) 10x

Este tampão foi preparado, dissolvendo-se 108 g de Tris (Sigma Chemical CO), 55 g de ácido bórico (Sigma Chemical CO) e 40 ml de EDTA 0,5 M pH 8.0 (Sigma Chemical CO), em 1000 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

4.1.13 Tampão Tris-Borato (TEB) 1x

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

4.1.14 Gel de agarose (1%, 1,5% e 2%)

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 1,5 g de agarose (Invitrogen ®, Carlsbad, CA) em 100 ml de TEB 1X. Esta solução era aquecida em forno e microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, era adicionado a ela 50 µg de brometo de etídio (Invitrogen ®, Carlsbad, CA).

4.1.15 Gel de poliacrilamida 12%

A solução de poliacrilamida foi preparada misturando-se, em, 23,3 ml de acrilamida 40% (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD), 8,8 ml de TEB 10X, 55 ml de ddH₂O, 363 µl de persulfato de amônio 10% (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD) e, 66 µl de TEMED (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD). Esta solução era colocada em uma placa de vidro, previamente preparada, até que ocorresse a sua polimerização.

4.1.16 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 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), λ exonuclease (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway) e Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia Biotech)) que são utilizados durante as outras etapas da técnica.

4.2 MÉTODOS EMPREGADOS

4.2.1 Fenotipagem eritrocitária

A fenotipagem eritrocitária dos antígenos de grupos sanguíneos (ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd, S/s) foi determinada através do teste de hemaglutinação em gel em todos dos doadores voluntários de sangue.

Após identificação dos cartões de fenotipagem (com 6 microtubos em cada cartão) 50 µl das hemácias em teste a 0,8% diluídas em Diluente 2 foram adicionadas aos microtubos contendo gel e soro antiglobulina humana. A seguir, 25 µl do anti-soro diluído, contendo anticorpos específicos ao antígeno a ser estudado foram adicionados ao mesmo tubo. Após incubação a 37⁰C durante 15 minutos, os cartões foram centrifugados a 70 g por 10 minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação do gel teste.

4.2.2 Extração de DNA

Depois de identificadas, todas as amostras de sangue tiveram o DNA genômico extraído dos leucócitos de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do Kit de extração utilizado, tendo sido ao final, obtido um volume de 100uL de DNA em solução de cada amostra de sangue coletado.

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 Full-spectrum UV/Vis Spectrophotometer, Wilmington, DE 19810 USA).

As amostras de sangue cuja concentração final do DNA foram inferiores à 20ug/ul ou o valor de absorbância (DO 260/280) estavam fora do intervalo 1.7-1.9 nm, 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.

4.2.3 Genotipagem eritrocitária convencional

A genotipagem convencional (PCR e digestão enzimática) dos principais antígenos de grupos sanguíneos (Tabela 2) foi realizada em 250 amostras de DNA dos doadores de sangue, a fim de que, os resultados destas genotipagens pudessem servir como parâmetro de comparação para as reações da técnica de “microarray”, uma vez que estas amostras foram utilizadas como controle positivo da reação.

Para a execução da genotipagem convencional, foram utilizados diferentes tipos protocolos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde, independente do tipo de PCR desenvolvido, cada reação individual continha 200 ng de DNA, 50 pmol de cada *primer*, 2 nmol de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase, cofator, tampão e água destilada em um volume final de 50

μl. Os ciclos de amplificação foram executados em um termociclador Perkin Elmer 9700 (Foster City, CA, USA).

Para a identificação dos polimorfismos *FY*A/B*, *FY-GATA*, *K/k*, *JK*A/B*, *GYPB S/s*, e *RH*E/e*, o seguinte protocolo de PCR-RFLP foi utilizado: 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 de 10 minutos a 72°C.

Os polimorfismos *RHD(+/-)* e *RH*C/c* (PCR-ASP) foram identificados (Figura 9a) através do protocolo: desnaturação a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C; 1 minuto a 65°C; 3:30 minutos a 72°C e extensão final do DNA por 7 minutos a 72°C.

Os produtos do PCR-RFLP foram digeridos overnight com enzimas de restrição apropriadas (Tabela 3). As reações de digestão enzimática utilizaram 10 μl do produto de PCR e, 10 μl da mistura de enzima/tampão, totalizando um volume final de 20 μl, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a digestão, foi possível analisar os fragmentos de PCR-RFLP através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (Figura 9b e 10).

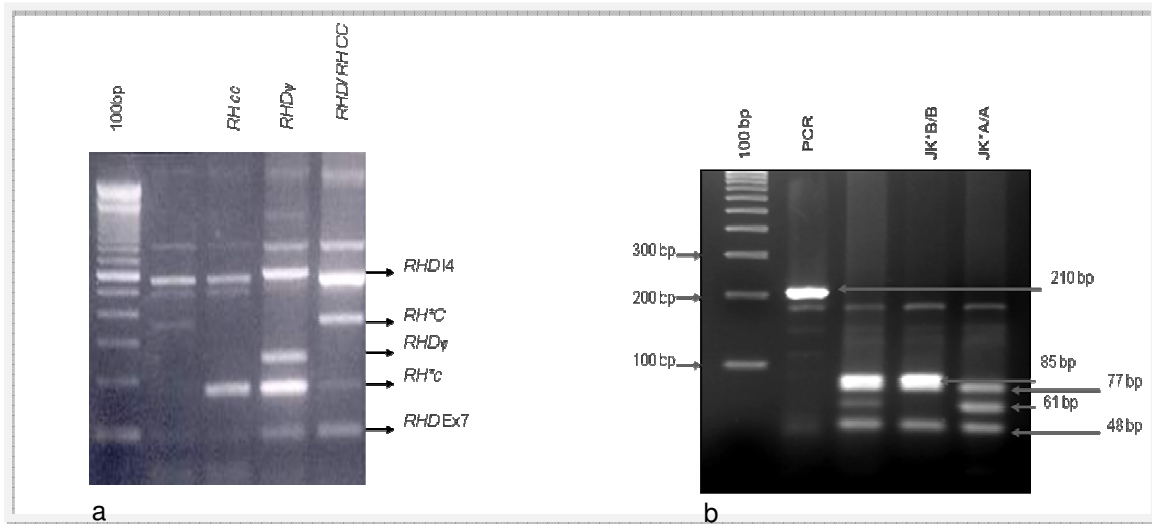


Figura 9. Foto gel de agarose (a) para identificação polimorfismos *RH^{*C/c}* e gel de acrilamida (b) para identificação polimorfismos *JK^{*A/B}*.

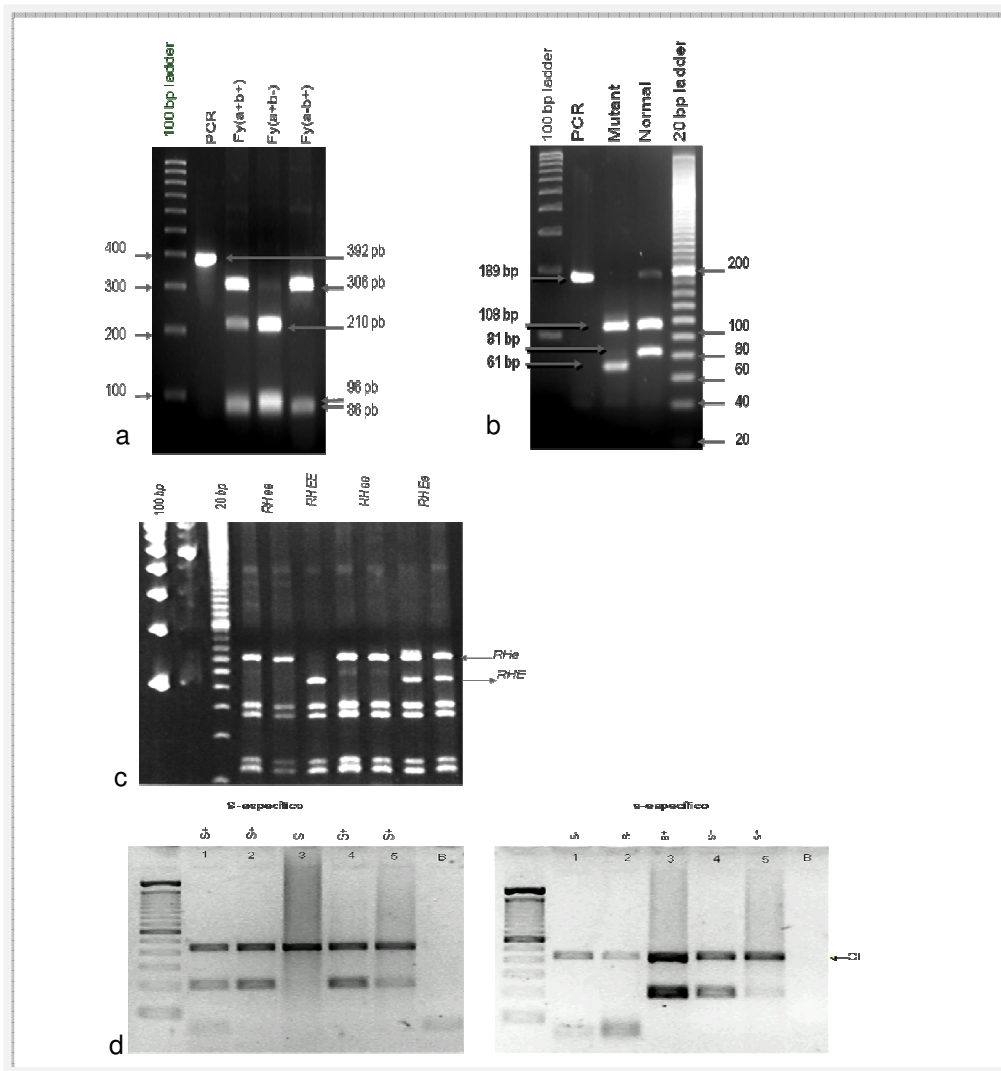


Figura 10. Géis de acrilamida para identificação polimorfismos *FY^{*A/B}* (a), *GATA (N(normal)/M(mutado))* (b), *RH^{*E/e}* (c) e *GYPB^{*S/s}* (d).

4.2.4 Genotipagem em larga escala: PCR multiplex, hibridização e leitura dos chips

O protocolo utilizado para a realização da genotipagem em larga escala através da plataforma HEA BeadChip™ foi padronizado segundo Hashmi et al (33). A descrição dos procedimentos realizados encontra-se a seguir:

4.2.4.1 PCR-Multiplex e purificação da reação

Cada reação de PCR multiplex, realizada para que houvesse a amplificação das sequências alvo do DNA (Tabela 5) de todos os polimorfismos avaliados, utilizou 200 ng de DNA, 50 pmol da mistura de primers fosforilados, 1X tampão de PCR (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 3.5 mM MgCl₂, 200 μmol de cada dNTP (HEA eMAP PCR Mix) e 5,0 U de Hot Start *Taq* DNA polimerase, totalizando um volume final de 25 μl. 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 ampliações foram feitas no termociclador Perkin 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 20 ampliações gênicas para cada amostra de DNA.

Tabela 5. Alelos e SNPs contidos no HEA BeadChip™

Sistema de grupo sanguíneo	Alelos	SNPs
Rh	<i>RH*C/c</i>	103 T>C
	<i>RH*E/e</i>	226 C>G
Duffy	<i>FY*A/B</i>	125 G>A
	<i>FY*B-265</i>	265 C>T
Duffy-GATA	<i>Fy(a- b-)</i>	-33 T>C
Dombrock	<i>DO*A/B</i>	793 A>G
	<i>HY*1/2</i>	323 G>T
	<i>JO*A/B</i>	350 C>T
Kidd	<i>JK*A/B</i>	838 G>A
Kell	<i>K*1/2</i>	698 T>C
MNS	<i>GYP A (M/N)</i>	59 C>T
	<i>GYP B (S/s)</i>	143 T>C
	<i>GYP B (silencing)</i>	230 G>T
	<i>GYP B (silencing)</i>	+5 intron 5 (g>t)
Landstainer-Wiener	<i>LW*A/B</i>	308 A>G
Lutheran	<i>Lu*A/B</i>	230 A>G
Scianna	<i>SC*1/2</i>	169 A>G
Colton	<i>Co*A/B</i>	230 A>G
Diego	<i>Di*A/B</i>	2561 C>T
Hemoglobina S	<i>HgbS</i>	173 A>T

4.2.4.2 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 2 µl da solução ExoSAPIT a 6.5 µl do produto de PCR amplificado, seguido da incubação a 37⁰C por 25 minutos e a 80⁰C por 15 minutos.

4.2.4.3 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 digestão enzimática do produto do PCR multiplex com 0.5 unidades de λ exonuclease em tampão 1X, à 37⁰c por 25 minutos, e incubação final a 75⁰C por 10 minutos.

4.2.4.4 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 53⁰C 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 11).

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 .

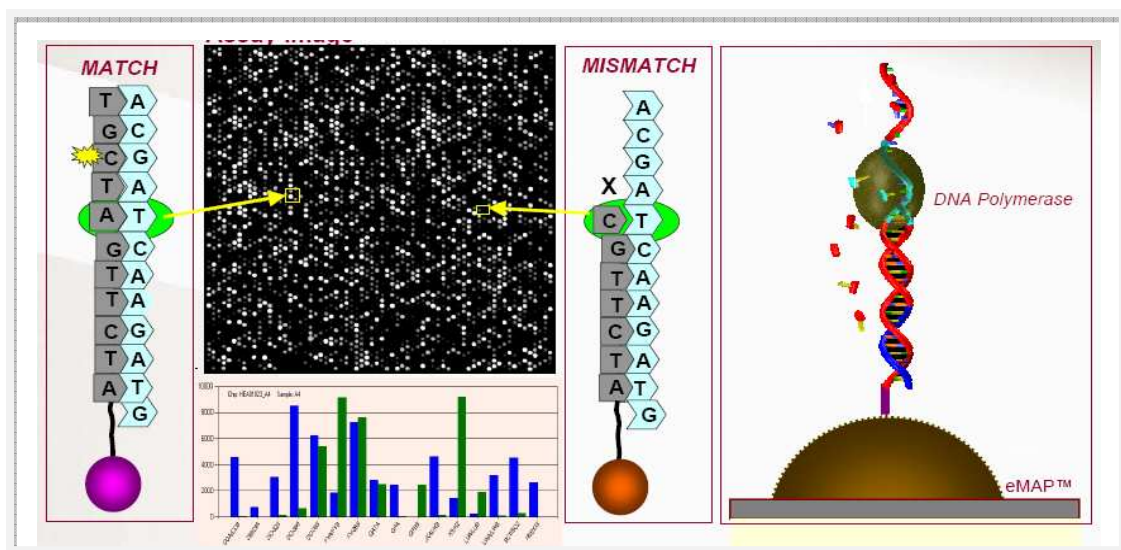


Figura 11. Hibridização e emissão de fluorescência. Em (a) é possível ver a emissão da fluorescência (visualizada através de um ponto branco na imagem) que ocorreu em função da hibridização do DNA alvo com a sonda pré-existente no BeadChip™. Em (b) não houve hibridização entre o DNA alvo e a sonda e 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 12.

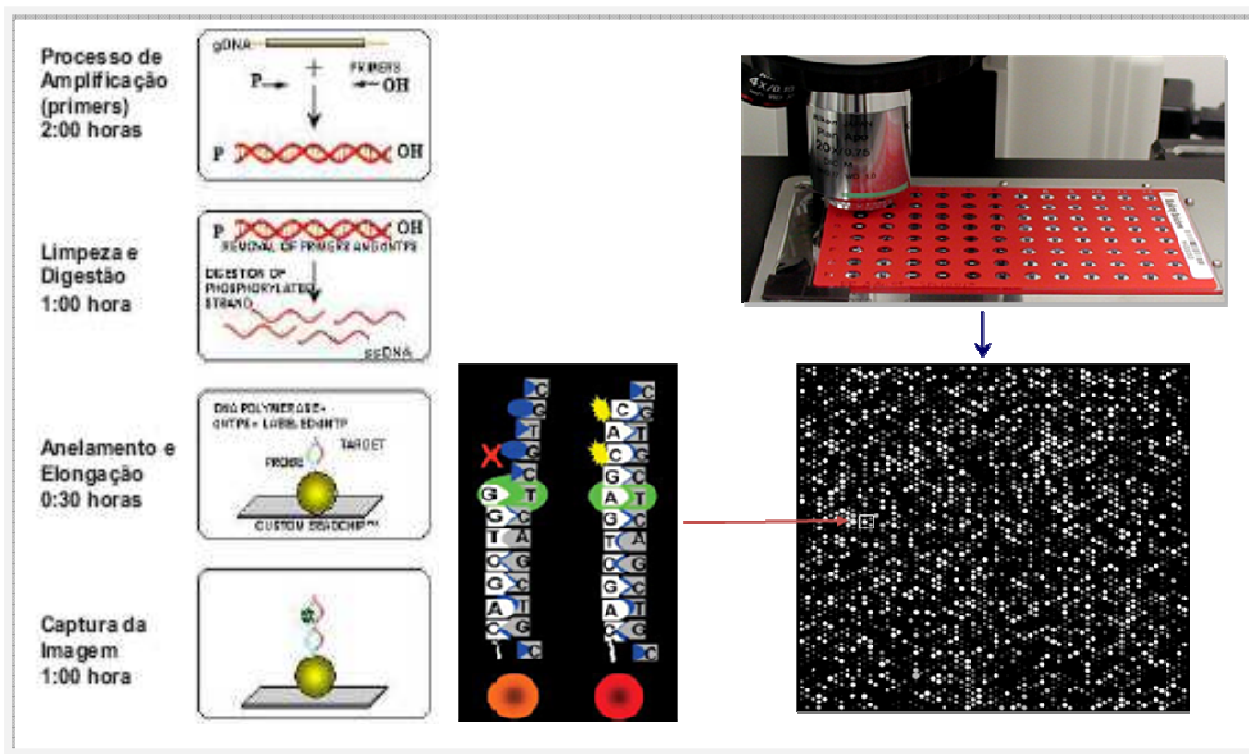


Figura 12. Resumo das etapas da técnica de “microarray” - plataforma HEA BeadChip™

4.2.4.5 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 13). 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, Ltd), 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 14-15).



Figura 13. 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.

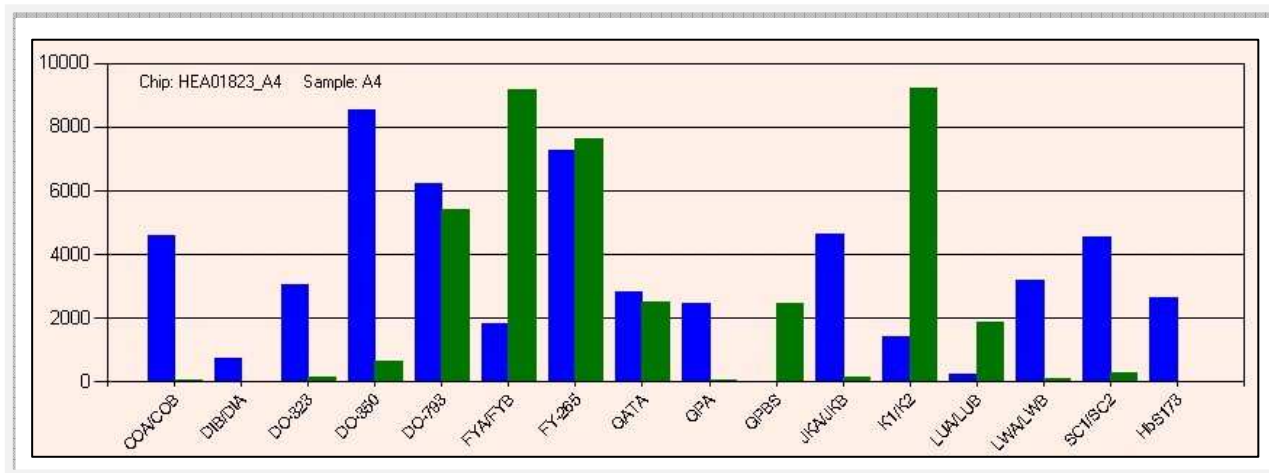


Figura 14. Emissão dos resultados: Intensidade gráfica do Sinal (cada primer) de discriminação entre cada alelo. O eixo-X contém o nome de cada polimorfismo e o eixo-Y contém a intensidade do sinal emitido. Para cada gene estudado há um par de sondas. Um para o *alelo A* (WT-Normal) e outra para o *alelo 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 homocigose para a este alelo enquanto que a presença de dois alelos A significa homocigose para este alelo, e no caso de existir um alelo A e um B, isto significa heterocigose 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.

Problemas relacionados a falhas técnicas (Tabela 6) durante o desenvolvimento dos procedimentos da plataforma HEA BeadChip™ podem conduzir a resultados inconclusivos, com a presença da sigla **IC** (*indeterminated call*). Esta sigla indica que o software responsável pela análise dos polimorfismos, o wHEA, não foi capaz de fazer a discriminação alélica do polimorfismo em questão (Figura 16).

As siglas **LS (low signal)** ou **IC (indetermined call)** podem aparecer como resultado de qualquer um dos 20 polimorfismos analisados (Figura 15) e ambas inviabilizam a interpretação do resultado.

Tabela 6. Falhas técnicas que conduzem a presença da sigla **IC**

- pipetagem incorreta de reagentes
- ausência de produtos (amplicon) para o polimorfismo em questão
- hibridização (elongação) ineficiente
- pós-PCR inadequado:
- limpeza do PCR ineficiente
- desnaturação inadequada

Polymorphism	RnC	RnE	COMCOB	DIA/DIB	DO-323	DO-330	DO-738	FYA/FYB	FY-235	GATA	GYA	GPBS	GPB-230	GPB-H15	JKA/JKB	KIK2	LU/LUB	LU/LMB	SC1/S2	HSB173
PVL_249 HEA16296_1	Result	Ax	AB	AA	BB	AA	AA	BB	AB	AA	AB	AB	AA	AA	AB	BB	BB	AA	AA	AA
	Comment																			
PVL_250 HEA16296_2	Result	AB	AB	AA	BB	AA	AA	AA	AB	AA	AB	Ax	AB	AA	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	Comment																			
PVL_251 HEA16296_3	Result	Ax	AB	AB	BB	AA	AA	AB	AA	AA	xx	AB	AA	AA	AB	AB	BB	AA	AA	xx
	Comment										IC									IC
PVL_252 HEA16296_4	Result	AB	AB	AA	BB	AA	AA	AB	BB	AA	AA	xB	BB	AA	AA	Ax	xB	xx	AA	Ax
	Comment																LS			
PVL_253 HEA16296_5	Result	BB	AA	AA	BB	AA	AA	BB	AB	AA	AB	AB	AA	AA	AB	BB	BB	AA	AA	AA
	Comment																			
PVL_254 HEA16296_6	Result	Ax	xB	AA	AB	AA	AA	BB	AB	AA	AA	xx	AB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	AA
	Comment										LS									
PVL_255 HEA16296_7	Result	AB	AA	AA	BB	AA	AA	AB	AB	AA	AA	xx	AB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	Ax
	Comment										LS									IC
PVL_256 HEA16296_8	Result	Ax	AA	AB	BB	AA	AA	BB	BB	AA	BB	xx	AB	AA	AA	AA	BB	BB	AA	AA
	Comment										IC									

Figura 15. Relatório de resultado (doadores) gerado automaticamente pelo sistema após a aquisição da intensidade de hibridização. (AA) significa homozigotidade 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. **Em destaque (vermelho)**, alguns polimorfismos com resultados inconclusivos devido à presença de LS e IC.

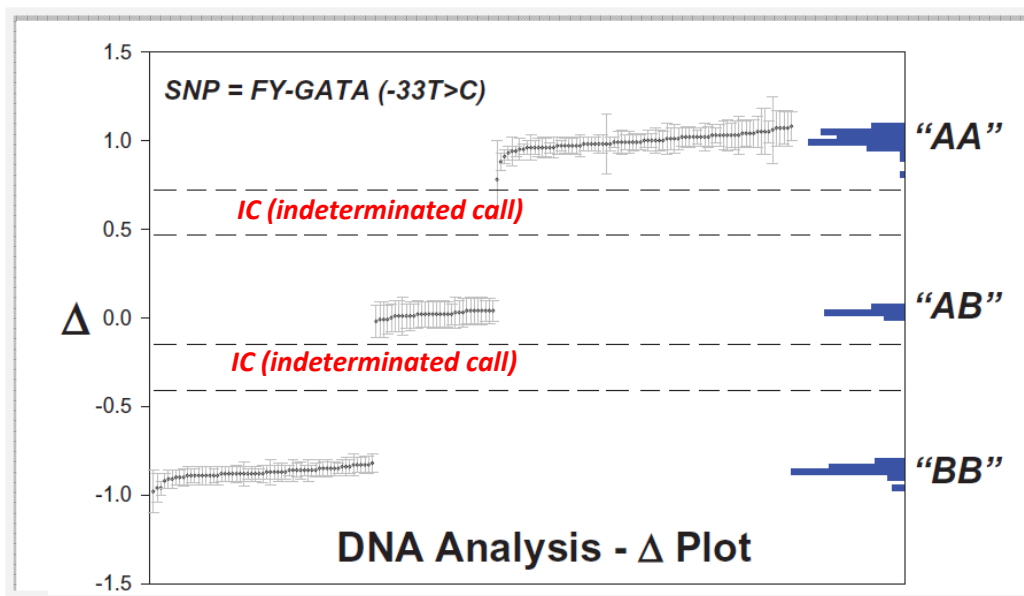


Figura 16. Imagem do software de análise wHEA™: possibilita a discriminação alélica. Amostras situadas entre as linhas tracejadas (-0,5 a -0,1 e 0,5 a 0,75) apresentam com resultado a sigla IC, demonstrando a incapacidade do software em caracterizar o alelo.

4.2.5 Criação do banco de dados

Durante a realização da genotipagem em larga escala das amostras de DNA dos doadores de sangue e pacientes, uma planilha eletrônica foi elaborada (Figura 17) para que fosse possível a inserção dos resultados de genotipagem e de fenotipagem, quando estes últimos estivessem disponíveis.

Através do uso do recurso de filtros, esta planilha eletrônica possibilitou a busca de determinados perfis gênicos de grupos sanguíneos, permitindo a localização de doadores e pacientes com o perfil selecionado em um curto período de tempo.

4.2.6 Cálculos de frequências gênicas

Os cálculos das frequências gênicas foram realizados de acordo com o descrito por Beiguelman (42).

	A	B	V	W	AB	AC	AD	AE	AG	AJ	AK
1	Atualização: 18/07/08										
3	DESTAS PLANILHAS FORAM EXCLUÍDOS TODOS OS PACIENTES E DOADORES COM IC ou LS (TOTAL AN)										
4											
5	FENÓTIPO GENÓTIPO DOADORES										
6	ABO	D	RH C	RH E	DO-793	FY*A/B	FY-265	GATA	GPBS	JK*A/B	K*1/2
167	O	-	AA	AA	BB	BB	AA	BB	BB	AA	BB
264	O	-	AA	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB
524	O	-	AA	AA	BB	BB	AA	BB	BB	AB	BB
699	A	-	AA	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB
882	A	-	AA	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AB	BB
953											

Figura 17. Ilustração da planilha eletrônica utilizada para seleção eletrônica do perfil gênico de doadores e pacientes.

RESUMEN

5.0 RESULTADOS

5.1 Validação da plataforma HEA BeadChip™ (BioArray Solutions) para a genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala

Para a validação da plataforma HEA BeadChip™ nas populações estudadas, foram selecionadas 250 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue para análise. Os fatores preponderantes para esta validação foram:

5.1.1 Controles

Em todas as baterias de testes, o resultado dos controles negativo, denominados “branco”, contendo água ao invés de DNA, e dos controles positivo, amostras previamente genotipadas e/ou fenotipadas para os principais sistemas de grupos sanguíneos, foram os esperados, ou seja, os controles negativo apresentaram a sigla “LS” e as amostras controles positivo apresentaram resultados idênticos aos obtidos por genotipagem convencional e pela fenotipagem.

5.1.2 Concordância entre os resultados de genótipos obtidos entre as técnicas de genotipagem convencional (PCR-ASP ou PCR-RFLP) e a técnica de “microarray”

Após a genotipagem das 250 amostras de DNA de doadores utilizadas para a validação do método, pelas técnicas de genotipagem convencional e pela técnica de “microarray” (HEA BeadChip™), os resultados obtidos em ambas as técnicas moleculares foram totalmente concordantes.

5.1.3 Reprodutibilidade dos resultados

A reprodutibilidade do método HEA BeadChip™ foi avaliada através da análise em duplicata de 1 amostra de DNA de doador escolhida aleatoriamente antes do início da genotipagem, para cada plataforma de oito chips, perfazendo o total de 30/250 amostras analisadas. Como os resultados obtidos com a mesma amostra em duplicata foram concordantes, o método demonstrou ter boa reprodutibilidade.

5.1.4 Concordância entre os resultados da genotipagem e de fenotipagem

Houve concordância entre os resultados dos fenótipos e dos genótipos para os sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS em todas as amostras analisadas. No entanto, no sistema Duffy, foram observadas 46 (18,4%) discrepâncias entre os resultados de fenotipagem e de genotipagem (Tabela 7) relacionadas aos polimorfismos FY-GATA e FY-265, responsáveis por alterações na expressão do antígeno Fy^b nos eritrócitos. Estas amostras foram genotipadas como *FY*B* e fenotipadas como Fy(b-).

5.2 Genotipagem em larga escala de doadores de sangue e pacientes

Após a realização da genotipagem em larga escala pela técnica de “microarray” de todas as amostras coletadas, 52 (5,2% do total de 1000) amostras de DNA de doadores de sangue e 16 (10% do total de 160) amostras de DNA de pacientes apresentaram resultados inconclusivos (**LS** ou **IC**) para diferentes polimorfismos.

Estas amostras foram excluídas da análise final dos resultados restando 948 amostras de DNA de doadores e 144 amostras de DNA de pacientes falciformes.

Tabela 7. Amostras com resultado de genotipagem x fenotipagem Duffy discordantes observadas durante a validação da técnica de “microarray”

N. amostras	Fenótipo	Genótipo HEA BeadChip™			Genotipagem convencional		
		FY	GATA	FY-265	FY	-GATA	FY-265
8	Fy(a-b-)	FY*B/B	AB	AB	FY*B/B	AB	AB
29	Fy(a+b-)	FY*A/B	AB	AA	FY*A/B	AB	AA
9	Fy(a-b-)	FY*B/B	BB	AA	FY*B/B	BB	AA

Total: 46

Interpretação dos genótipos GATA e FY-265: AB - heterozigoto para a mutação -33T>C ou 265C>T; BB - homozigoto mutado e AA - homozigoto normal.

Os resultados dos genótipos obtidos para os principais sistemas de grupos sanguíneos utilizando a plataforma HEA BeadChip™ nas amostras de DNA de doadores e pacientes estão apresentados no Tabela 8.

A análise dos resultados da genotipagem em larga escala utilizando a plataforma HEA BeadChip™ nos dois grupos estudados (doadores e pacientes), possibilitou a determinação do perfil antigênico através do cálculo de frequência dos genótipos apresentados (Tabela 9). Não foi encontrada diferença significativa nas frequências genotípicas observadas entre os dois grupos.

Tabela 8. Resultado dos genótipos de pacientes e doadores obtidos para os principais sistemas de grupos sanguíneos

Pacientes n=144		Genótipo							
Alelos	<i>C/c</i>	<i>E/e</i>	<i>FY*A/B</i>	<i>GATA</i>	<i>FY-265</i>	<i>DO*A/B</i>	<i>HY</i>	<i>JO*A</i>	<i>KEL*1/2</i>
AA	55	102	13	84	144	10	141	134	0
AB	66	36	62	40	0	69	3	10	4
BB	23	6	69	20	0	65	0	0	140

Doadores n=948		Genótipo							
Alelos	<i>C/c</i>	<i>E/e</i>	<i>FY*A/B</i>	<i>GATA</i>	<i>FY-265</i>	<i>DO*A/B</i>	<i>HY</i>	<i>JO*A</i>	<i>KEL*1/2</i>
AA	322	683	114	654	920	133	920	910	2
AB	464	246	455	238	28	426	27	36	46
BB	162	19	379	86	0	389	1	2	901

Pacientes n=144		Genótipo							
Alelos	<i>JK*A/B</i>	<i>GYP A</i>	<i>GYP B</i>	<i>GYPB*S</i> "Silence"	<i>LU*A/B</i>	<i>DI*A/B</i>	<i>CO*A/B</i>	<i>SC*1/2</i>	<i>LW*A/B</i>
AA	48	45	10	141	0	0	141	141	143
AB	69	72	56	3	6	0	3	3	1
BB	27	27	78	0	138	144	0	0	0

Doadores n=948		Genótipo							
Alelos	<i>JK*A/B</i>	<i>GYP A</i>	<i>GYP B</i>	<i>GYPB*S</i> "Silence"	<i>LU*A/B</i>	<i>DI*A/B</i>	<i>CO*A/B</i>	<i>SC*1/2</i>	<i>LW*A/B</i>
AA	265	284	86	939	2	2	920	929	939
AB	493	493	360	3	45	36	27	29	9
BB	190	171	502	6	901	910	1	0	0

Dos 144 pacientes falciformes politransfundidos estudados, 42 (29%) possuíam aloanticorpos (Tabela 10). Destes 42 pacientes aloimunizados, 15

apresentaram discrepâncias entre os resultados do fenótipo e do genótipo para os sistemas Rh, Duffy e Kidd (Tabela 11).

Tabela 9. Resultados das frequências genóticas observadas em doadores e pacientes falciformes.

Genótipo	C/c	E/e	FY*A/B	GATA	FY-265	DO*A/B	HY	JO*A	KEL*1/2
Pacientes									
<i>n</i> = 144									
AA	0-38	0-71	0-09	0-58	1	0-07	0-98	0-93	0
AB	0-46	0-25	0-43	0-28	0	0-48	0-02	0-07	0-03
RR	0-16	0-04	0-48	0-14	0	0-45	0	0	0-97
Doadores									
<i>n</i> = 948									
AA	0-34	0-72	0-12	0-69	0-97	0-14	0-97	0-96	0
AB	0-49	0-26	0-48	0-25	0-03	0-45	0-03	0-04	0-05
BB	0-17	0-02	0-40	0-06	0	0-41	0	0	0-95

Genótipo	IK*A/B	GYPA	GYPB	GYPB'S 'Silence'	LU*A/B	DI*A/B	CO*A/B	SC*1/2	LW*A/B
Pacientes									
<i>n</i> = 144									
AA	0-33	0-31	0-07	0-98	0	0	0-98	0-98	0-99
AB	0-48	0-50	0-39	0-02	0-04	0	0-02	0-02	0-01
RR	0-19	0-19	0-54	0	0-96	1	0	0	0
Doadores									
<i>n</i> = 948									
AA	0-28	0-30	0-09	0-99	0	0	0-97	0-98	0-99
AB	0-52	0-52	0-38	0,00	0-05	0-04	0-03	0-02	0-01
BB	0-20	0-18	0-53	0,01	0-95	0-96	0	0	0

No sistema Rh, dois pacientes foram fenotipados como RhEE e genotipados como *RH*Ee*. Outros dois pacientes foram fenotipados como RhEe e genotipados como *RH*ee* e, um paciente foi fenotipado como Rhee e genotipado como *RH*Ee*. Com relação aos alelos *RH*Cc*, quatro pacientes foram fenotipados como Rhcc e genotipados como *RH*Cc* e, um paciente foi fenotipado como RhCc e genotipado como *RH*cc*. No sistema Kidd, um paciente foi fenotipado como Jk(a-b+) e genotipado como *JK*A/B* e outros três pacientes foram fenotipados como Jk(a+b+) e genotipados como *JK*B/B*. No sistema Duffy, um paciente foi fenotipado como Fy(a+b-) e genotipado como *FY*B/B*.

Tabela 10. Aloanticorpos de grupos sanguíneos em 42/144 pacientes politransfundidos portadores de anemia falciforme.

Anticorpos detectados	Número de pacientes
Anti-E	9
Anti-K	7
Anti-C, -E	5
Anti-U	1
Anti-C, -e	1
Anti-C, -K, -Jk ^b	4
Anti-E, -Fy ^a , -Jk ^b , -S	1
Anti-E, -Jk ^a	5
Anti-E, -K, -Di ^a	2
Anti-K, -S	3
Anti-S, -Fy ^a	2
Anti-S, -Jk ^a	2
Total	42

Tabela 11. Discrepâncias observadas entre o fenótipo e genótipo em 15 amostras de DNA dos pacientes falciformes

Genótipo	Fenótipo		
	RhEE	RhEe	Rhee
Sistema Rh			
<i>RHCE*E/e</i>	2	0	1
<i>RHCE*e/e</i>	0	2	0
Sistema Rh	RhCC	RhCc	Rhcc
<i>RHCE*C/c</i>	0	0	4
<i>RHCE*c/c</i>	0	1	0
Sistema Kidd	Jk(a+b-)	Jk(a+b+)	Jk(a-b+)
<i>JK*A/JK*B</i>	0	0	1
<i>JK*B/JK*B</i>	0	3	0
Sistema Duffy	Fy(a+b-)	Fy(a+b+)	Fy(a-b+)
<i>FY*B/FY*B</i>	1	0	0

5.3 Seleção e transfusão de sangue fenótipo compatível para os pacientes falciformes a partir dos resultados dos genótipos

Os fenótipos deduzidos dos genótipos dos doadores e pacientes com resultados conclusivos foram inseridos em uma planilha, criando um banco de dados que foi utilizado para a busca da compatibilidade eletrônica, de acordo com a compatibilidade inicial entre os fenótipos ABO e Rh do paciente e do doador.

Desta forma, foi possível encontrar sangue compatível para 134 (93%) dos 144 pacientes falciformes (Tabela 12). Para os 10 pacientes restantes (7%), a dificuldade em encontrar sangue fenótipo compatível foi devido à baixa frequência dos fenótipos que eles apresentam (Tabela 13), como por exemplo os fenótipos R_2R_Z e R_2R_2 .

Onze pacientes falciformes politransfundidos aloimunizados que apresentaram discrepâncias entre os resultados da fenotipagem e genotipagem, se beneficiaram ao receber sangue fenótipo compatível a partir dos resultados do genótipo, observado pela elevação dos níveis de hemoglobina e diminuição da frequência entre as transfusões.

Tabela 12. Fenótipos deduzidos dos genótipos e número de doadores compatíveis para pacientes falciformes

Fenótipo ABO/Rh	Fenótipos deduzidos dos genótipos	nº pacientes falciformes	nº doadores compatíveis
O R ₀ r	K-, Fy(a-)	1	47
O R ₀ r	K-, Jk(b-)	1	23
O R ₀ r	K-, S-, Jk(b-)	1	4
O R ₀ r	K-, S-, Jk(a-)	1	1
O R ₀ r	K-, Fy(a-), s-	3	3
O R ₀ r	K-, Fy(a-), S-	1	24
O R ₀ r	K-, Fy(a-), S-, Jk(b-)	1	8
O R ₀ r	K-, Fy(a-), Jk(b-)	1	16
O R ₀ r	K-, Fy(a-), S-, Jk(b-), Do(a-)	1	4
O R ₀ r	K-, Jk(a-), Do(a-)	2	5
O R ₁ r	K-, Jk(a-)	1	94
O R ₁ r	K-, S-, Jk(a-)	2	45
O R ₁ r	K-, Fy(a-), s-, Jk(b-)	1	6
O R ₁ r	K-, S-, Fy(a-)	2	92
O R ₁ r	K-, S-, Fy(a-), Jk(b-)	1	23
O R ₁ r	K-, Fy(b-)	1	46
O R ₁ r	K-, Jk(b-), s-, Do(a-)	1	4
O R ₁ r	K-, S-, Do(a-)	2	90
O R ₁ r	K-, Fy(b-), Do(a-)	2	19
O R ₁ r	K-, Fy(b-), S-, Do(a-)	1	12
O R ₁ r	K-, Fy(a-), Jk(a-), Do(a-)	1	10
O R ₁ r	K-, Fy(a-), S-, Do(a-)	1	42
O R ₁ r	K-, Fy(a-), Jk(a-), S-, Do(a-)	1	7
O R ₁ r	K-, Fy(a-), Jk(b-), S-, Do(a-)	1	11
O R ₁ r	K-, Fy(a-), Jk(a-), S-, Do(b-)	1	3
O R ₁ r	K-, Do(b-)	1	59
O R ₂ r	K-, S-	1	92
O R ₂ r	K-, S-, Fy(a-)	1	41
O R ₂ r	K-, S-, Fy(a-), Jk(a-)	1	5
O R ₂ r	K-, S-, Fy(a-), Do(a-)	2	18
O R ₁ R ₁	K-, Fy(a-)	1	44
O R ₁ R ₁	K-, S-, Fy(b-), Do(a-)	1	4
O R ₁ R ₁	K-, Jk(a-), Do(a-)	1	12
O R ₁ R ₁	K-, Jk(b-)	1	27

Tabela 12 (cont.) Fenótipos deduzidos dos genótipos e número de doadores compatíveis para pacientes falciformes

Fenótipo ABO/Rh	Fenótipos deduzidos dos genótipos	nº pacientes falciformes	nº doadores compatíveis
O R₁R₁	K-, Jk(a-)	1	28
O R₁R₁	K-, S-, Fy(a-)	1	19
O R₁R₁	K-, Fy(a-), S-, Jk(b-)	2	3
O R₁R₁	K-, Do(b-)	1	17
O R₁R₂	Jk(b-)	1	152
O R₁R₂	K-, S-	1	278
O R₁R₂	K-, Fy(b-), Jk(b-)	1	16
O R₁R₂	K-, Fy(a-), Jk(b-)	1	68
O R₁R₂	K-, S-, Fy(a-), Do(a-)	1	52
O R₁R_Z	K-, Do(a-)	1	49
O R₁R₂	K-, S-, Fy(a-), Do(a-)	1	52
O R₁R_Z	K-, Do(a-)	1	49
O R₁R_Z	S-, Fy(a-), Jk(b-)	1	3
O R₂R_Z	K-, S-, Jk(b-)	1	1
O rr	K-	1	58
O rr	K-, S-	1	28
O rr	K-, Fy(b-)	1	12
O rr	K-, S-, Jk(a-), Do(a-)	1	1
O rr	S-, Fy(b-), Do(a-)	1	3
O rr	K-, Jk(b-), Do(b-)	1	2
O r'r	K-, s-, Jk(b-), Do(a-)	1	8
O r'r''	K-	1	71
B R₀r	K-, S-, Fy(a-), Jk(b-), Do(a-)	2	4
B R₀r	K-, S-	1	46
B R₁r	K-, S-	1	202
B R₁r	K-, Fy(a-), Jk(b-)	1	51
B R₁r	K-, S-, Fy(a-)	1	95
B R₁r	K-, Do(a-)	1	165
B R₁r	K-, S-, Fy(a-), Do(a-)	2	42
B R₂r	K-, S-, Jk(b-)	1	24
B R₂r	K-, S-, Jk(a-)	1	32
B R₁R₁	K-	1	104
B R₁R₁	K-, S-	1	47
B R₁R₂	K-, S-, Do(a-)	1	126
B R₁R₂	K-, S-, Fy(a-), Jk(a-), Do(a-)	1	9

Tabela 12 (cont.) Fenótipos deduzidos dos genótipos e número de doadores compatíveis para pacientes falciformes

Fenótipo ABO/Rh	Fenótipos deduzidos dos genótipos	nº pacientes falciformes	nº doadores compatíveis
B R₁R₂	K-, Fy(a-), Jk(b-), Do(a-)	1	25
B R₁R_Z	S-, Fy(a-), Jk(b-)	1	3
A R₀r	K-, Fy(b-), Jk(b-)	1	2
A R₀r	K-, S-, Fy(b-)	1	3
A R₀r	K-, S-, Fy(b-), Jk(a-)	1	3
A R₀r	K-, Jk(b-), Do(a-)	1	16
A R₀r	K-, S-, Jk(a-), Do(a-)	1	5
A R₀r	K-, Fy(a-), Do(a-)	1	31
A R₀r	K-, Fy(a-), S-, Do(a-)	1	17
A R₁r	K-, S-, Fy(b-), Do(a-)	1	17
A R₁r	K-	3	394
A R₁r	K-, S-, Jk(b-)	1	78
A R₁r	K-, S-	2	258
A R₁r	K-, s-	1	66
A R₁r	K-, Do(a-)	1	230
A R₁r	K-, Jk(b-), Do(a-)	1	56
A R₁r	K-, S-, Do(a-)	1	134
A R₁r	K-, S-, Jk(b-), Do(a-)	2	33
A R₁r	K-, S-, Fy(a-), Do(a-)	1	61
A R₁r	K-, Fy(a-), Jk(a-), Do(a-)	1	16
A R₁r	K-, Fy(a-), Jk(a-), Do(a-)	1	9
A R₁r	K-, s-, Fy(a-), Jk(b-)	2	8
A R₁r	K-, S-, Fy(a-), Jk(a-)	1	25
A R₁r	K-, S-, Jk(a-)	1	59
A R₁r	K-, S-, Fy(a-)	1	131
A R₁R₁	K-, s-, Jk(a-), Do(a-)	1	5
A R₁R₁	K-, S-, Jk(a-), Do(a-)	1	8
A R₁R₁	K-, S-, Jk(b-), Do(a-)	1	9
A R₁R₁	K-, Fy(b-), Jk(a-), Do(a-)	1	3
A R₁R₁	K-, S-, Fy(a-), Jk(a-), Do(a-)	1	3
A R₁R₂	K-, S-, Jk(b-)	1	108
A R₁R₂	K-, s-, Jk(b-)	1	29
A R₁R₂	K-, s-, Fy(b-)	1	9
A R₁R₂	K-, Fy(a-), Jk(b-)	1	93

Tabela 12 (cont.) Fenótipos deduzidos dos genótipos e número de doadores compatíveis para pacientes falciformes

Fenótipo ABO/Rh	Fenótipos deduzidos dos genótipos	nº pacientes falciformes	nº doadores compatíveis
R ₁ R ₂	K-, Do(a-)	1	325
A R ₁ R ₂	K-, S-, Jk(a-), Do(a-)	1	37
A R ₁ R _Z	K-	1	57
A R ₁ R _Z	K-, S-, Fy(a-)	1	25
A R ₁ R _Z	K-, Do(b-)	1	24
A RR	K-	1	68
A RR	K-, Jk(b-), Do(a-)	1	10
A r'r	K-, S-, Jk(b-)	1	9
A r''r	K-, Do(a-)	1	8
AB R ₁ r	K-, S-, Do(a-)	1	155
AB R ₁ r	K-, S-, Fy(a-), Jk(b-), Do(a-)	2	18
AB R ₁ r	K-, Fy(a-), Do(b-)	1	34
AB R ₂ r	K-, S-, Do(a-)	2	126
Total		134	

Tabela 13. Fenótipos deduzidos dos genótipos de pacientes falciformes sem doadores compatíveis

Fenótipo ABO/Rh	Fenótipos deduzidos dos genótipos	nº pacientes falciformes	nº doadores compatíveis
O R ₁ R ₁	K-, Jk(b-), Do(b-)	1	0
O R ₁ R _Z	K-, S-, Jk(a-), Do(b-)	1	0
O R ₂ R _Z	K-, Jk(b-), s-, Do(a-)	1	0
O R ₂ R _Z	K-, Fy(a-), Jk(a-), Do(a-)	1	0
O R ₂ R _Z	K-, Jk(b-), S-, Do(a-)	1	0
B R ₂ R ₂	K-, S-, Jk(b-)	1	0
A R ₀ r	K-, S-, Fy(b-), Jk(b-), Do(a-)	1	0
A R ₁ R ₁	K-, S-, Fy(b-), Jk(a-), Do(b-)	1	0
A r'r'	K-, Fy(a-)	1	0
A r'r'	K-, Jk(b-), Do(b-)	1	0
Total		10	0

DISCUSSÃO

6.0 DISCUSSÃO

6.1 Comparação entre os resultados de genotipagem e fenotipagem durante a validação da plataforma HEA BeadChip™

Nas 250 amostras estudadas durante a validação da plataforma HEA BeadChip™, houve concordância entre os resultados de fenotipagem e genotipagem para os antígenos dos sistemas Rh, Kell, Kidd e MNS.

No sistema Duffy, os resultados de fenotipagem e genotipagem não foram concordantes em 46 (18,4%) amostras em função de alterações qualitativas e/ou quantitativas nos antígenos codificados pelo gene *FY*B*. Estas amostras foram genotipadas como *FY*B* e fenotipadas como Fy(b-) (Tabela 7).

Esta discrepância observada entre os resultados, pode ocorrer devido à presença de uma mutação no promotor eritróide GATA (nt -33C), frequente em descendentes de africanos e que impede a expressão do antígeno Fy^b nas hemácias. Nestes casos, o gene *FY*B* é expresso em outros tecidos, como por exemplo, nas células do endotélio de vasos sanguíneos (43). A presença do polimorfismo 265T no gene *FY* de Caucasianos, pode também causar resultados discrepantes entre o fenótipo e o genótipo. Estas mutações levam a um enfraquecimento da expressão do antígeno Fy^b nas hemácias, conhecido como fenótipo Fy^x, geralmente interpretado como Fy(b-) na rotina de fenotipagem (44,50).

Assim, para uma correlação apropriada entre o fenótipo e o genótipo no sistema Duffy é necessário analisar a presença da mutação GATA e do

polimorfismo 265T. Quando GATA e a expressão do gene *FY*B* estão normais, fenótipo e genótipo são concordantes. Quando GATA está mutado, ou o gene *FY*B* se expressa fracamente nas hemácias (fenótipo Fy^x), observa-se uma falsa discrepância entre o fenótipo e o genótipo, devido à ausência ou fraca expressão do antígeno Fy^b nas hemácias.

Pacientes com fenótipo $Fy(b-)$ e genótipo *FY* B* com GATA mutado ou que apresentam o polimorfismo 265T, podem ser seguramente transfundidos com hemácias $Fy(b+)$, sem o risco de aloimunização, uma vez que o gene *FY*B* é expresso em outros tecidos. A utilização da fenotipagem associada à genotipagem, em pacientes politransfundidos, pode reduzir a necessidade de sangue $Fy(b-)$, um fenótipo presente em somente um terço da população brasileira. Neste estudo, quarenta e seis (18,4%) dos 250 doadores $Fy(b-)$ identificados como *FY*B* poderiam, teoricamente, receber sangue com o fenótipo $Fy(b+)$.

6.2 Genotipagem em larga escala de doadores de sangue e pacientes

A utilização da técnica de “microarray” para genotipagem em larga escala possibilitou a determinação da freqüência gênica de 20 alelos de grupos sanguíneos em uma população de 948 doadores voluntários de sangue e 144 pacientes falciformes.

Não foi encontrada diferença significativa nas freqüências genotípicas observadas entre os grupos de doadores 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 genótípicas encontradas entre os doadores de sangue e pacientes falciformes.

Ao serem comparadas as frequências genótípicas obtidas neste trabalho com as frequências obtidas por Hashmi et al (34) que utilizaram a mesma tecnologia, verificamos que a população aqui estudada apresenta frequências similares às encontradas em populações Hispânicas, com exceção do alelo $D1^*A$, demonstrando a influência indígena na população brasileira (51).

Estes resultados são interessantes tendo em vista que era esperado que as frequências genótípicas das populações que constituíram este trabalho estivessem mais próximas de populações Africanas, uma vez que houve grande influência africana na composição racial dos indivíduos brasileiros.

Neste trabalho, identificamos 16/948 (1,68%) doadores de sangue com fenótipos raros que geralmente ocorrem em menos que 1% da população (Tabela 14). Este resultado foi surpreendente uma vez que a frequência de alelos raros por nós encontrada nesta população, foi superior a encontrada em outras populações (Figura 18).

A possibilidade de identificar doadores de sangue raros através de uma metodologia de genotipagem em larga escala abre perspectivas para a criação

de um programa nacional de doadores raros que possibilitaria a busca de unidades de sangue compatíveis para pacientes portadores de anticorpos raros.

Tabela 14. Fenótipos raros identificados a partir dos genótipos de 948 doadores

Genótipo	Fenótipo deduzido	Número de amostras/ frequência genotípica
<i>GYPB*del</i>	S-s-U-	6 (0.630)
<i>DO-323 G>T</i>	Hy-	1 (0,105)
<i>DO-350 C>T</i>	Jo(a-)	2 (0.210)
<i>LU*A/A</i>	Lu(a+b-)	2 (0.210)
<i>KEL *1/1</i>	K+k-	2 (0.210)
<i>DI*A/A</i>	Di(a+b-)	2 (0.210)
<i>CO*B/B</i>	Co(a-b+)	1 (0,105)
Total		16 (1.68)

Figura 18. Frequência genotípica observada por Hashmi et al (34)

Genotype	AFA (n = 690)			ASN (n = 51)			CAU (n = 1243)			HIS (n = 119)		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB
FYA/FYB	0.04	0.19	0.77	0.69	0.25	0.06	0.18	0.43	0.39	0.15	0.45	0.4
GATA	0.12	0.33	0.55	0.98	0.02	0	0.97	0.02	0.01	0.68	0.26	0.06
FY-265	0.99	0.01	0	1.00	0	0	0.98	0.02	0	0.99	0.01	0
GYPBS	0.07	0.24	0.69	0.08	0.12	0.8	0.14	0.4	0.46	0.13	0.32	0.55
GYPA	0.41	0.32	0.27	0.27	0.57	0.16	0.34	0.44	0.22	0.39	0.44	0.17
K1/K2	0	0.02	0.98	0	0	1.00	0	0.05	0.95	0	0.02	0.98
JKA/JKB	0.54	0.37	0.09	0.22	0.53	0.25	0.3	0.44	0.26	0.36	0.42	0.22
DO-323	0.92	0.08	0	1.00	0	0	1.00	0	0	1.00	0	0
DO-350	0.92	0.07	0.01	1.00	0	0	1.00	0	0	0.95	0.05	0
DO-793	0.09	0.41	0.50	0.06	0.31	0.63	0.13	0.51	0.36	0.13	0.53	0.34
LUA/LUB	0	0.06	0.94	0	0.02	0.98	0	0.05	0.95	0.01	0.02	0.97
SC1/SC2	1.00	0	0	1.00	0	0	0.98	0.02	0	0.99	0.01	0
DIB/DIA	1.00	0	0	1.00	0	0	1.00	0	0	1.00	0	0
COA/COB	1.00	0	0	1.00	0	0	1.00	0	0	1.00	0	0
LWA/LWB	1.00	0	0	1.00	0	0	1.00	0	0	1.00	0	0
HbS173	0.95	0.05	0	1.00	0	0	1.00	0	0	1.00	0	0

AFA= indivíduos Afro-Americanos, ASN=Asiáticos, CAU=Caucasianos e HIS=Hispanicos

Além da ocorrência destes genótipos raros, também foram identificados em nossas amostras 1.230 fenótipos de difícil caracterização sorológica em virtude da ausência ou dificuldade na obtenção dos antisoros comerciais para a

identificação dos antígenos (Tabela 15). Este fato demonstra que a utilização desta plataforma (HEA BeadChip™) em doadores de sangue possibilita a identificação de hemácias com diferentes fenótipos eritrocitários em um tempo reduzido. Isto facilitaria a constituição de painéis de hemácias de identificação de anticorpos e, conseqüentemente, a resolução de problemas imunohematológicos complexos.

Tabela 15. Fenótipos identificados de difícil caracterização sorológica

Genótipo	Fenótipo deduzido	Número de amostras
<i>FY*B 265</i>	Fy ^x	28
<i>DO-323 G>T</i>	Hy+	27
<i>DO-350 C>T</i>	Jo(a+)	36
<i>LU*A/B</i>	Lu(a+b+)	45
<i>KEL*1/2</i>	K+k+	45
<i>DI*A/B</i>	Di(a+b+)	36
<i>DO*A/A</i>	Do(a+b-)	133
<i>DO*A/B</i>	Do(a+b+)	426
<i>DO*B/B</i>	Do(a-b+)	389
<i>CO*A/B</i>	Co(a+b+)	27
<i>LW*A/B</i>	Lw(a+b+)	09
<i>SC*1/2</i>	SC:1,2	29
Total		1.230

6.3 Seleção e transfusão de sangue fenótipo compatível para os pacientes falciformes a partir dos resultados dos genótipos

As conseqüências da aloimunização em pacientes portadores de anemia falciforme têm levado alguns autores a recomendar transfusões fenotipicamente compatíveis para os antígenos dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd (45,52-53).

O sucesso da utilização de protocolos de sangue fenotipado, depende da correta interpretação da fenotipagem destes pacientes. Quando se consegue realizar a fenotipagem eritrocitária do paciente, antes da primeira transfusão, os testes de hemaglutinação nos fornecem resultados seguros, uma vez que não existe interferência das hemácias do doador na circulação do receptor.

Quando a fenotipagem é realizada após a transfusão de concentrado de hemácias, a interpretação dos resultados dos testes de hemaglutinação é difícil, devido à presença de reações de campo misto (dupla população de células).

Dependendo ainda do número de transfusões recebidas, alguns pacientes passam a expressar o fenótipo do doador, o que além de comprometer a utilização de sangue fenotipado, após algumas transfusões de sangue com fenótipo não compatível, estes pacientes podem desenvolver aloanticorpos contra os antígenos de grupos sanguíneos mais imunogênicos (25-26). Conseqüentemente podem vir a apresentar diminuição na sobrevivência das hemácias transfundidas (reação hemolítica tardia), devido à presença de aloanticorpos não detectados nos testes pré-transfusionais.

A análise dos resultados encontrados nos cento e quarenta e quatro pacientes portadores de anemia falciforme demonstra que 15 dos 42 pacientes

que tinham se aloimunizado (Tabela 10), apresentaram discrepâncias entre os resultados do fenótipo e genótipo para os sistemas Rh, Duffy e Kidd. Nestes casos, tivemos a oportunidade de realizar nova determinação do genótipo pela técnica de “microarray” e também pela técnica de genotipagem convencional e, pudemos verificar, que os fenótipos obtidos pertenciam aos doadores e não aos receptores.

No sistema Rh, dois pacientes foram fenotipados como RhEE e genotipados como *RH*Ee*. Este genótipo foi confirmado com nova determinação e através da análise dos polimorfismos (Cys16, VS) que silenciam ou enfraquecem a expressão do antígeno Rhe. O fenótipo RhEE, foi provavelmente atribuído, devido à unidade de sangue que tinha sido recentemente transfundida. Estes pacientes estavam recebendo sangue com o fenótipo R2R2 (e-negativo), que ocorre na frequência de 1/50 em nossa população. A partir da genotipagem, eles passaram a receber sangue com o fenótipo R2r (Ee), cuja frequência é de 1/7, facilitando, desta forma, o atendimento transfusional do paciente pelo aumento da disponibilidade de sangue.

Outros dois pacientes foram fenotipados como RhEe e genotipados como *RH*ee* e, desenvolveram anti-E, pelo fato de estarem recebendo sangue de acordo com o fenótipo.

Com relação aos alelos *RH*Cc*, um paciente foi fenotipado como RhCc e genotipado como *RH*cc* e, desenvolveu anti-C.

No sistema Kidd, um paciente foi fenotipado como Jk(a-b+) e genotipado como JK^*A/B . Este paciente, estava recebendo sangue com o fenótipo Jk(a-), que ocorre na frequência de 1/5 em nossa população. A partir da genotipagem, eles passaram a receber sangue com o fenótipo Jk(a+) cuja frequência é de 1/2, facilitando, desta forma, o atendimento transfusional do paciente pelo aumento da disponibilidade de sangue compatível. Outros três pacientes foram fenotipados como Jk(a+b+) e genotipados como JK^*B/B e, um deles desenvolveu anti-Jk^a.

No sistema Duffy, um paciente foi fenotipado como Fy(a+b-) e genotipado como FY^*B/B e, desenvolveu anti-Fy^a pelo fato de estar recebendo sangue de acordo com o fenótipo.

A determinação do genótipo no sistema Duffy em pacientes falciformes, pode ainda contribuir para a seleção adequada do sangue a ser utilizado na transfusão, em especial, para os pacientes que apresentam o fenótipo Fy(a-b-) como já mencionado.

Os 15 pacientes que apresentaram discrepâncias entre os resultados do fenótipo e genótipo foram selecionados para receberem transfusões de sangue (2 a 3 unidades) fenótipo-compatível, baseado nos resultados de genotipagem obtidos.

Após as transfusões, o acompanhamento clínico de onze destes pacientes demonstrou que eles se beneficiaram das transfusões recebidas, uma vez que houve aumento dos níveis na hemoglobina e aumento do

intervalo entre as transfusões, que passou de 7 para 35 a 40 dias, demonstrando que houve maior sobrevida e aproveitamento das hemácias transfundidas.

Nossos resultados sugerem que a genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala contribui substancialmente na qualidade da transfusão de sangue fenotipado, sobretudo em pacientes que necessitam de transfusões de repetição, como por exemplo, os pacientes portadores de anemia falciforme.

A relevância da genotipagem de grupos sanguíneos para seleção de sangue antígeno-negativo para transfusão destes pacientes foi previamente demonstrada (10,19), no entanto, o sucesso desta seleção depende também da disponibilidade de um estoque de unidades de sangue de doadores fenotipados.

Neste estudo, foi demonstrada a facilidade de selecionar unidades de sangue compatível para pacientes falciformes utilizando a plataforma HEA BeadChip™, genotipando pacientes e doadores e estabelecendo a compatibilidade eletrônica entre eles, de acordo com o fenótipo ABO e Rh de cada um.

Apesar da diversidade genotípica encontrada entre os pacientes e que praticamente cada um necessitava de um fenótipo antígeno-negativo diferente, foi possível encontrar sangue compatível para a maioria. Apenas para 10 pacientes não foi possível encontrar sangue fenótipo compatível no pool de doadores analisado.

Com base nas frequências gênicas observadas em nossa população, seria necessário um banco de dados composto com aproximadamente 2000 doadores de sangue para que fosse possível encontrar amostras de sangue fenótipo compatível para estes 10 pacientes.

Os resultados por nós obtidos foram de encontro às recentes discussões da comunidade científica (2,29,32-33,35,37) que afirmam que a tecnologia “microarray” pode ser utilizada no gerenciamento, acompanhamento e controle das transfusões dos pacientes falciformes e demais pacientes politransfundidos, pois permite uma seleção mais exata das unidades de sangue compatíveis para prevenir a aloimunização e potenciais reações hemolíticas.

Estes resultados demonstram que a metodologia de genotipagem em larga escala através da tecnologia “microarray” é bastante eficiente no que diz respeito à constituição de bancos de doadores genotipados possibilitando a busca rápida de unidades de sangue fenótipo-compatível para pacientes falciformes e politransfundidos.

6.4 Métodos de genotipagem convencional, “microarray” e fenotipagem para antígenos de grupos sanguíneos: vantagens e desvantagens

Quando comparamos os métodos de genotipagem convencional, HEA BeadChip™ e hemaglutinação, verificamos que a técnica de “microarray” mostrou-se mais rápida, eficiente e apresentou menor custo (Tabela 16).

Tabela 16. Comparação entre os métodos de genotipagem convencional, genotipagem pela técnica de “microarray” (larga escala) e fenotipagem por hemaglutinação.

	Fenotipagem Hemaglutinação	Genotipagem convencional	HEA BeadChip™
Amostras estudadas	96	96	96
PCR necessários	0	18	1
Digestão enzimática	0	6 a 8	0
Eletroforese	0	diversas	0
Reações de aglutinação	2400	0	0
Tempo estimado	100-120 horas	100 - 120 horas	10 horas
Custo estimado	R\$ 15.000,00	R\$ 8.640,00	R\$ 2.750,00

A estimativa de custo dos três procedimentos levou em consideração todos os materiais de consumo envolvidos nos procedimentos e que seriam necessários para a execução de 96 tipagens para 18 polimorfismos de grupos sanguíneos. No caso da genotipagem pela técnica de “microarray”, o incremento de novos polimorfismos não acarreta acréscimo no valor do chip, mas ao contrário, a inclusão de um número maior de amostras analisadas em uma única placa diminui substancialmente o valor do chip.

Com relação à fenotipagem, vale ressaltar que alguns anti-soros como anti-Do, anti-Yt, anti-Co, anti-LW não estão disponíveis comercialmente e, portanto, estes antígenos são difíceis de serem fenotipados. Outras desvantagens da hemaglutinação em relação ao “microarray” dizem respeito às limitações da técnica já anteriormente apresentadas (Tabela 2) e ao tempo gasto na obtenção dos resultados.

No procedimento de genotipagem por “microarray”, uma vez que todos os recursos (reagentes e materiais) estejam disponíveis, uma única pessoa é capaz de avaliar cerca de 50 a 96 amostras de DNA com segurança a cada 10 horas.

Dentre as vantagens da tecnologia “microarray” destaca-se a possibilidade de genotipar os pacientes e um grande número de doadores simultaneamente para vários antígenos e ainda agilizar a busca de fenótipos raros. Isto facilita a criação de um estoque de sangue fenotipado importante na seleção de componentes sanguíneos para pacientes politransfundidos e, a criação de um banco de dados com genótipos raros que poderia ser disponibilizado para consulta via internet para utilização em transfusões de pacientes portadores de anticorpos raros.

A análise automatizada dos resultados impede interpretações errôneas, aumentando a confiabilidade dos resultados, que podem ser rapidamente utilizados para aplicação na clínica transfusional. No entanto, vale ressaltar que como toda técnica, a genotipagem em larga escala também apresenta limitações (Tabela 17).

Com o desenvolvimento destas plataformas, o custo da genotipagem tem sido reduzido drasticamente. A esperança é que esta metodologia permita a realização da genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala de forma automatizada, rápida e segura e que possa ser utilizada nas rotinas dos bancos de sangue.

Tabela 17. Limitações da tecnologia “microarray”

Limitações técnicas
Boa qualidade do DNA (>20ng/ul e absorbância-DO entre 1.7-1.9)
Contaminação pode levar a perda de um grande número de resultados
Necessita de acesso a internet para análise dos dados
Mão de obra qualificada (conhecimento molecular dos grupos sanguíneos)
Técnica ainda não licenciada pela ANVISA

A aplicação da biologia molecular em Imunohematologia sem dúvida terá um grande impacto na medicina transfusional. Os problemas encontrados na rotina de doadores de sangue, como a busca de hemácias antígeno-negativo e, a identificação correta de indivíduos RhD-negativo serão facilmente solucionados. Na área da medicina transfusional, a possibilidade de fornecer sangue fenótipo compatível para pacientes politransfundidos abre uma nova perspectiva podendo inclusive reduzir o número de testes pré-transfusionais.

Embora seja pouco provável que a genotipagem molecular venha substituir totalmente a hemaglutinação nos próximos anos, estas técnicas utilizadas em conjunto têm um valor potencial importante na segurança transfusional e materno-fetal.

CONCLUSÕES

7.0 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:

1. Foi possível padronizar e validar uma plataforma de “microarray” para genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala em uma população brasileira.
2. Para obtenção de resultados de genótipos conclusivos de todos os polimorfismos presentes na plataforma HEA BeadChip™ é importante que a concentração do DNA esteja acima de 20 ng/μl e que os valores de absorvância(DO) de 260-280nm estejam entre 1,7 a 1,9.
3. Não foi encontrada diferença significativa nas freqüências genóticas observadas entre os grupos estudados (doadores e pacientes).
4. A genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala pela técnica de “microarray” analisada (HEA BeadChip) é mais rápida, mais eficaz e apresentou menor custo, quando comparada à genotipagem convencional, e à técnica de hemaglutinação.
5. A utilização da técnica de “microarray” possibilita a realização da genotipagem de grupos sanguíneos em pacientes e em um grande número de doadores simultaneamente para vários antígenos.

6. A genotipagem em larga escala é eficiente na constituição de bancos de doadores de sangue genotipados para os principais alelos de grupos sanguíneos e agiliza a busca de fenótipos raros.

7. Neste trabalho, identificamos 16/948 (1,68%) doadores de sangue com fenótipos raros que geralmente ocorrem em menos que 1% da população.

8. A realização da genotipagem de grupos sanguíneos para numerosos polimorfismos em pacientes e doadores de sangue utilizando uma única plataforma facilita a seleção de unidades de sangue compatível para pacientes aloimunizados e, pode estabelecer a compatibilidade eletrônica entre eles.

9. O acompanhamento clínico de onze pacientes falciformes que receberam transfusões de sangue compatível de acordo com os resultados do genótipo demonstrou que eles se beneficiaram das transfusões recebidas, uma vez que houve aumento dos níveis na hemoglobina e aumento do intervalo entre as transfusões, que passou de 7 para 35 a 40 dias, demonstrando maior sobrevivência e aproveitamento das hemácias transfundidas.

10. A genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala contribui substancialmente na qualidade da transfusão de sangue fenotipado, sobretudo em pacientes que necessitam de transfusões de repetição, como por exemplo, os pacientes portadores de anemia falciforme.

11. Embora seja pouco provável que a genotipagem molecular venha substituir totalmente a hemaglutinação nos próximos anos, estas técnicas utilizadas em conjunto têm um valor potencial importante na segurança transfusional e materno-fetal.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lomas-Francis C. Testing for rare blood donors by DNA analysis. *ISBT Science Series*.2006;1;213-19.
2. Avent ND. Large-scale blood group genotyping – clinical implications. *British Journal of Haematology*.2008;144:3-13.
3. Reid ME, Lomas-Francis C. *The Blood Group Antigen – Facts Book*. 2.ed. Elsevier: London, 2005.
4. Reid ME. From DNA to blood groups. *Immunohematology*.2008;24:166-69.
5. Daniels G, Castiho L, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, et al. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for red blood cell surface antigens: Macao report. *Vox Sanguinis*.2008;96:153-56.
6. Lögdberg L, Reid ME, Lamont RE, Zelinski T. Human blood group genes 2004: chromosomal locations and cloning strategies. *Transfus Med Rev*. 2005;19(1):45-57.
7. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol*.2005;14(3-4):143-53.
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. Issitt PD, Anstee DJ. *Applied Blood Group serology*. Durhan NC: Montgomery Scientific Publications, 1998.

11. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfusion medicine reviews*. 2007;21:58-71.
12. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988.
13. Giblett ER. A critique of the theoretical hazard of inter-vs-intra-racial transfusion. *Transfusion* 1961;1:233-38.
14. Giblett ER. Blood group alloantibodies: An assessment of some laboratory practices. *Transfusion*. 1977;4:299-408.
15. 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.
16. Geifman-Hotzman O, Wojtowycz M, Kosmas E, Artal R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. *Obstet Gynecol*. 1997;89:272-275.
17. Issitt PD. Race-related red cell alloantibody problems. *Br J Biomed Sci*, 1994;51:158-67.
18. Coles SM, Klein HG, Holland PV. Alloimmunization in two multitransfused patient populations. *Transfusion*. 1981;21:462-66.
19. Blumberg N, Peck K, Ross K, Avila E. Immune response to chronic red blood cell transfusion. *Vox Sang*. 1983;44:212-17.
20. Salmon CH, Cartron JP, Rouger PH. *Les Groupes Sanguins*. Masson-Paris: Chez l'Homme. pp371-393, 1990.

21. Orlina AR, Sosler SD, Koshy M. Problems of chronic transfusion in sickle cell disease. *J. Clin. Apheresis* 1991; 6:233-40.
22. Reid ME, Lomas-Francis C. Molecular approaches to blood group identification. *Current Opinion in Hematology*. 2002;9:152-159.
23. Strauss D, Reid ME. Value of DNA-based assays for donor screening and regulatory issues. *Immunohematology*. 2008;24:175-9.
24. Reid ME. Overview of molecular methods in immunohematology. *Transfusion*. 2007;47:10S-6.
25. Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino JJr, Alberto FL, Saad STO, Costa FF. DNA-based typing for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion*. 2002; 42:232-38.
26. 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.
27. Castilho L, Rios M, Pellegrino Jr J, Saad STO, Costa FF, Reid ME. A Novel FY allele in Brazilians. *Vox Sanguinis*. 2004;87:190-195.
28. Castilho L, Rios M, Rodrigues A, Pellegrino JRJ, 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.
29. Petrik, J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sangüinis*, 2001;80:1-11.

30. van der Schoot CE, Tax GH, Rijnders RJ, et al. Prenatal typing of Rh and Kell blood group system antigens: the edge of a watershed. *Transfus Med Rev.* 2003;17(1):31–44.
31. Flegel WA, Wagner FF, Muller TH, Gassner C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med.* 1998;8:281-302
32. Anstee DJ. Goodbye to agglutination and all that? *Transfusion.* 2005;45:652-3.
33. 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.
34. Hashmi, G. Red blood cell antigen phenotype by DNA analysis. *Transfusion.* 2007;47:60S-3.
35. Karpasitou K, Drago F, Crespiatico L, Paccapelo C, Truglio F, Frison S, et al. Blood group genotyping for Jka/Jkb, Fya/Fyb, S/s, K/k, Kpa/Kpb, Jsa/Js b, Coa/Cob, and Lua/Lub with microarray beads. *Transfusion.* 2008;48:505-512.
36. Beiboer SHW, Wieringa-Jelsma T, Maaskant-Von Wijk PA, van der Schoot CE, van Zwieterem R, Roos D, den Dunnen JT, Haas M. Rapide genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion,* 2005;45:667-79.
37. Hashmi G, Shariff T, Zhang Y, Cristobal J, Chau C, Seul M, Vissavajhala P, Baldwin C, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, Lomas-Francis C, Reid ME. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion.* 2007;47:736-47.
38. Denome GA, Van O. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion.* 2005;45:6006-6.

39. Burget P, McBride S, Smith G, Dugrillon A, Klüter H, Ouwehand WH, Metcalfe P. 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.
40. Wu YY, Csako G. Rapid and/or high-throughput genotyping for human red blood cell, platelet and leukocyte antigens, and forensic applications. *Clinica Chimica Acta*. 2006;363:165-176.
41. Avent ND: Large scale blood group genotyping. *Transfus ClinBiol* 2007; 14:10–15.
42. Beiguelman, B. O sistema Rh. In: Beiguelman, B. Os sistemas sangüíneos eritrocitários. 3ed, Ribeirão Preto: Funpec Editora, 2003.p.107-49.
43. 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;10:224-28.
44. 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 na altered erythrocyte phenotype. *Blood* 1998;92:2237-43.
45. Davies SC, McWilliam AC, Hewitt PE, Devenish A, Brozovic M. Red cell alloimmunization in sickle cell disease. *Br. J. Haematol*. 1986; 63:241-5.
46. Heitman, J.; Agre, P. A new face of the Rhesus antigen. *Nat Genet*. 2000;26(3):258-9.
47. Noizat-Pirenne, F; Le Pennec, Py; Mouro, I; Rouzaud, Am; Juszczark, G; Roussel, M; Lauroua, P; Krause, C; Rouger, P; Cartron, Jp; Ansart-Pirenne, H. Molecular background of D(C)(e) haplotypes within the white population. *Transfusion*; 200242:627-33.

48. Noizat-Pirenne, F.; Mouro, I.; Le Penneç, P.Y. et al. Two new alleles of the *RHCE* gene in Black individuals: the *RHce* allele *ceMO* and the *RHcE* allele *cEMI*. *Br J Haematol.*2001;113:672-9.
49. Mouro, I.; Colin, Y.; Sistonen, P.; Le Penneç, P.E.; Cartron, J.P.; Le Van Kim, C. Molecular Basis of the RhCW (Rh8) and RhCX (Rh9) blood group specificities. *Blood.*1995;86(3):1196-201.
50. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, Akesso IE, Avent ND, Daniels GL. The Fy^x phenotype is associated with a missense mutation in the Fy^b predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol.*1998;103:1184-91.
51. Baleotti Jr W, Rios M, Reid ME, Fabron Jr A, Pellegrino Jr J, Saad STO, Castilho L. A novel DI*A allele without the band 3-Memphis mutation in Amazonian Indians. *Vox Sanguinis.*2003;84:326-30.
52. Ambruso DR, Githens JH, Alcorn R, Dixon DJ, Brown LJ, Vaughn WM, Hays T. Experience with donors matched for minor blood group antigens in patients with sickle cell anemia who are receiving chronic transfusion therapy. *Transfusion.* 1987;27:94-8.
53. Tahhan HR, Holbrook CT, Braddy LR, Brewer LD, Christie JD. Antigen-matched donor blood in the transfusion management of patients with sickle cell disease. *Transfusion.* 1994;34:562-69.

APÊNDICE

9.0 APÊNDICE

DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease

K. R. Ribeiro, M. H. Guarnieri, D. C. da Costa, F. F. Costa, J. Pellegrino Jr, L. Castilho

Hemocentro Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

Vox Sanguinis

Background Blood samples from patients with sickle cell disease (SCD) present to transfusion service with numerous antibodies, making the searching for compatible red blood cells (RBC) a challenge. To overcome this problem we developed an effective strategy to meet needs of supplying RBC-compatible units to SCD patients using DNA arrays.

Methods We selected DNA samples from 144 SCD patients with multiple (receiving > 5 units) transfusions previously phenotyped for ABO, Rh(D, C, c, E, e), K1, Fy^a and Jk^a. We also selected DNA samples from 948 Brazilian blood donors whose ABO/RhD phenotype matched that of the patients. All samples were analysed by DNA array analysis (HEA Beadchip™, Bioarray Solutions) to determine polymorphisms associated with antigen expression for 11 blood group systems (Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Dombrock, Lutheran, Landsteiner-Wiener, Diego, Colton, Scianna); and one mutation associated with haemoglobinopathies.

Results Based on genotype results we were able to predict phenotype-compatible donors needed in order to provide compatible units to this group of patients. Based on their ABO/Rh phenotype we were able to find in this pool of donors compatible units for 134 SCD patients.

Conclusion Blood group genotyping by DNA array contributes to the management of transfusions in SCD patients by facilitating the transfusion support with antigen-matched blood. It has the potential to improve the life of thousands of SCD-transfused patients by reducing mortality due to transfusion reactions and immunization.

Key words: immunohematology, molecular biology, transfusion complications-non infectious, sickle cell disease patients, DNA array, blood group genotyping

Received: 7 January 2009,
revised 11 March 2009,
accepted 12 March 2009

Introduction

Patients with sickle cell disease (SCD) require multiple transfusions with red blood cell (RBC) components, which exposes them to numerous, possible foreign antigens, and potentially

causes them to produce an antibody or antibodies to the antigens they lack. Once a clinically significant antibody is produced, units of RBCs that lack the associate antigens should be transfused [1-7]. Programs to prevent alloimmunization to RBC antigens have been designed and implemented to provide antigen-matched RBC transfusions to patients with SCD particularly those who are alloimmunized and/or 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 C, c, E and e to providing extended phenotype-matched RBCs for C, c, E, e, K, S, Fy^a

Correspondence: Lilian Castilho, Hemocentro, Unicamp, Rua Carlos Chagas, 480, Caixa Postal 6198, CEP 13081-970 Barão Geraldo, Campinas, São Paulo, Brazil

E-mail: castilho@unicamp.br

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant no. 06/02573-4 (LC) and 05/55787-9 (KRR).

and Jk^a [12–15] prior to transfusion aiming both to prevent the alloimmunization to these RBC antigens, and as part of the antibody identification process. Independent of the protocol used, it is important that the RBC units can be readily available in order to supply the SCD patient's transfusion need [12].

Accurate phenotyping of SCD patients is often complicated by either the presence of transfused donor RBCs in the recipient's circulation, by positive direct antiglobulin tests, or by the lack of available direct agglutinating antibodies. In addition, the screening for minor blood group antigens in blood donors is limited due to the lack of sufficient volumes of appropriate antibodies, labour-intensive haemagglutination testing and data entry. As a result, most donor centres screen only a selected cohort of donors and maintain a limited inventory.

The molecular basis of many blood group antigens has been determined and DNA analysis for minor blood group typing is playing a support role in transfusion medicine, especially to provide antigen-matched blood for chronically transfused patients [13–17].

However, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), allele-specific (AS)-PCR and real-time PCR for genomic typing are all labour intensive and each sample has to undergo multiple assays. As a result, DNA microchips have been used successfully in these situations to provide a fast procedure and an automated analysis of a large number of blood group polymorphisms and have the potential not only to increase the inventory of antigen-negative blood but also to facilitate the matching RBC components to the recipient's blood type and change daily practice of transfusion medicine [18–24].

We report here the use of a bead array technology to provide a means to precisely match donor blood to the antigen-negative type of multitransfused patients with sickle cell disease by large-scale testing of random Brazilian blood donors.

Materials and methods

Patients

We studied DNA samples from 144 SCD patients (homozygous for haemoglobin S) with multiple transfusions, previously phenotyped for ABO, Rh(D, C, c, E, e), K1, Fy^a and Jk^a who agreed to participate in this study by signing an institutional review board (IRB)-approved informed consent. All the patients had received five or more units of red cells within the previous 6 months.

Donors

We selected DNA samples from 948 Brazilian blood donors, according to the ABO/RhD phenotype from the patients, who

agreed to participate in this study by signing an IRB-approved informed consent.

Control group

We tested DNA samples from 100 normal blood donors of African ethnicity who had been previously phenotyped for Rh(D, C/c, E/e), Kell (K/k), Kidd (Jk^a/Jk^b), Duffy (Fy^a/Fy^b), MNS (M/N, S/s), and Diego (Di^a/Di^b) as control for our procedure. This control group was representative of the ethnic background of the patients.

Agglutination tests: Phenotypes were determined by haemagglutination in gel cards (Diamed AG, Morat, Switzerland) using two different commercial sources of antisera (Immucor, Norcross, GA; Diamed AG).

DNA preparation

The genomic DNA was extracted from 200 µl aliquots of whole blood by a manual spin column separation (QIAmp, Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the instructions of the manufacturer and eluted into 100 µl of buffer. The DNA concentration of each sample was determined by measurement of optical density at 260 and 280 nm, and an aliquot of 8 µl, containing ~10 ng of gDNA, was transferred to the PCR.

BeadChip DNA analysis

The DNA array analysis was performed by using the Human Erythrocyte Antigen BeadChip ('HEA') containing probes directed to polymorphic sites in *RHCE*, *FY* (including *FY-GATA* and *FY265*), *DO* (including *HY* and *JO*), *CO*, *DI*, *SC*, *GYP A*, *GYP B* (including markers permitting the identification of U-negative and U-variant types), *LU*, *KEL*, *JK*, *LW* and one mutation associated with haemoglobinopathies (HgbS) (BioArray Solutions, Warren, NJ, USA) for all controls, donors and patient samples. The HEA BeadChip assay was performed in accordance with a previously described protocol [22,23] and is briefly described below.

An aliquot of 8 µl of gDNA was added to a proprietary master mix to produce a 25-µl multiplexed PCR amplification reaction which was performed (using a GeneAmp 9700 thermal cycler, ABI, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in a 'single-tube' format, using a set of primers designed to generate a set of amplicons containing the designated polymorphic sites of interest. The single-strand amplicons produced by post-amplification processing were combined with elongation mixture (Bioarray Solutions) and were placed onto each BeadChip carrier. After barcode scanning image was taken automatically from each chip. The software combined the assay image with the pre-existing bead information and generated results as bar graphs and allele assignment. A phenotype report was generated

automatically by BeadChip analysis software with Web-based software (wHEA) and data were analysed.

Results

Controls

We found 100% concordance with phenotype results for RH, KEL, MNS, JK, FY and DI and the HEA BeadChip assay results in the control group.

Patients

Of the 144 SCD patients selected who received multiple transfusions of RBCs, 42 (29%) had alloantibodies. There were 67 alloantibodies, occurring alone or in combinations, detected among the 42 alloimmunized patients with SCD (Table 1). We found discrepancies between the previous phenotype and genotype-derived phenotype in 15 of those 42 alloimmunized SCD patients chronically transfused (Table 2). The genotypes on those patients were confirmed in DNA samples obtained from buccal epithelial cells and molecular testing indicated that mistyping by haemagglutination occurred in these 15 polytransfused SCD patients. Stored segments from blood units that had been recently transfused into those 15 alloimmunized recipients were phenotyped, confirming that the transfused red blood cells were the source of the discrepancy between genotype and phenotype. Four of those patients became immunized to the RhE antigen, 2 to RhC, 3 to Jk^a, 2 to S and Fy^a, 2 to E and Jk^a, 1 to K1 and S and 1 to E, K1 and Di^a antigens. They had been receiving transfusion more frequently than those who did not present discrepancies, and were the only ones who had received transfusion within the previous 3 months.

Table 1 Blood group alloantibodies detected in 42 of 144 patients with sickle cell disease who received multiple transfusions

Antibodies detected	Number of patients
Anti-E	9
Anti-K	7
Anti-C, -E	5
Anti-U	1
Anti-C, -e	1
Anti-C, -K, -Jk ^b	4
Anti-E, -Fy ^a , -Jk ^b , -S	1
Anti-E, -Jk ^a	5
Anti-E, -K, -Di ^a	2
Anti-K, -S	3
Anti-S, -Fy ^a	2
Anti-S, -Jk ^a	2
Total	42

Table 2 Phenotyping and genotyping discrepancies results found on samples from 15 patients with sickle cell disease

Genotype	Phenotype		
	RhEE	RhEe	Rhee
RHCE ^a E/e	2	0	1
RHCE ^a e/e	0	2	0
	RhCC	RhCc	Rhcc
RHCE ^a C/c	0	0	4
RHCE ^a c/c	0	1	0
Kidd system	Jk(a + b -)	Jk(a + b +)	Jk(a - b +)
JK ^a A/JK ^b B	0	0	1
JK ^a B/JK ^b B	0	3	0
Duffy system	Fy(a + b -)	Fy(a + b +)	Fy(a - b +)
FY ^a B/FY ^a B	1	0	0

Genotype frequencies on SCD patients and blood donors' DNA samples

The frequencies of SNPs namely AA (homozygous wild type), AB (heterozygous) and BB (homozygous alternate allele) observed in the two groups (SCD patients and blood donors) are shown in Table 3. No significant differences on genotype frequencies were observed between these two groups (patients and donors).

Predicted phenotypes and search of compatible units

Based on genotype results we were able to predict phenotype-compatible donors need in order to provide compatible units to this diverse group of SCD patients. We investigated matching for ABO, RH, Kell, FY, JK, Ss and DL. An electronic link (using a special software developed for searching of compatible units) between the blood donor and the patient need was established allowing an automatic identification of the most compatible blood available. Based on their ABO/Rh phenotypes, we were able to find in a pool of 948 donors compatible units for 134 of 144 (93%) SCD patients (Table 4).

Transfusion of phenotype-matched donor RBC units according to genotype results

After confirmation of the antigen-negativity by haemagglutination for RhD, C/c, E/e, K1/K2, Fy^a/Fy^b, Jk^a/Jk^b, Di^a and Ss antigens in the donor segments, 2 to 3 units of antigen-matched blood were transfused to the 134 SCD patients. Eleven of the 15 alloimmunized patients previously mistyped by haemagglutination benefit from receiving antigen-matched RBCs based on genotype as shown by better *in vivo* RBCs survival, as assessed by raises in haemoglobin levels

Table 3 Observed genotype frequencies in patients with sickle cell disease and blood donors

Genotype	C/c	E/e	FY*A/B	GATA	FY-265	DO*A/B	HY	JO*A	KEL*1/2
Patients <i>n</i> = 144									
AA	0.38	0.71	0.09	0.58	1	0.07	0.98	0.93	0
AB	0.46	0.25	0.43	0.28	0	0.48	0.02	0.07	0.03
BB	0.16	0.04	0.48	0.14	0	0.45	0	0	0.97
Donors <i>n</i> = 948									
AA	0.34	0.72	0.12	0.69	0.97	0.14	0.97	0.96	0
AB	0.49	0.26	0.48	0.25	0.03	0.45	0.03	0.04	0.05
BB	0.17	0.02	0.40	0.06	0	0.41	0	0	0.95

Genotype	JK*A/B	GYPA	GYPB	GYPB'S 'Silence'	LU*A/B	DI*A/B	CO*A/B	SC*1/2	LW*A/B
Patients <i>n</i> = 144									
AA	0.33	0.31	0.07	0.98	0	0	0.98	0.98	0.99
AB	0.48	0.50	0.39	0.02	0.04	0	0.02	0.02	0.01
BB	0.19	0.19	0.54	0	0.96	1	0	0	0
Donors <i>n</i> = 948									
AA	0.28	0.30	0.09	0.99	0	0	0.97	0.98	0.99
AB	0.52	0.52	0.38	0.01	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
BB	0.20	0.18	0.53	0	0.95	0.96	0	0	0

Table 4 Genotype-derived phenotypes of compatible donors to patients with sickle cell disease (SCD)

ABO/Rh phenotype	Predicted phenotype of compatible donor	SCD patients	Blood donors
O R ₀ r	Fy(a-), Do(a-), S-, K-, Jk(b-)	12	37
O R ₀ r	Fy(a-), S-, K-, Jk(b-)	21	53
O R ₀ r	Fy(a-), Do(a-), K-	12	28
B R ₀ r	S-, K-, Jk(a-)	6	13
O R ₂ r	S-, K-, Jk(b-)	10	24
B R ₂ r	Do(a-), K-	5	12
O R ₁ r	Do(a-), s-, K-, Jk(b-)	2	11
O R ₁ r	Do(a-), K-, Jk(b-)	21	34
A R ₁ r	S-, K-	16	37
O R ₁ R ₂	Do(a-), s-, K-, Jk(b-)	3	8
O R ₁ R ₂	S-, K-, Jk(b-)	21	32
O rr	K-, Do(a-)	5	12
O R ₂ R ₂	K-, s-, Jk(a-)	1	0
O R ₂ R ₂	K-, S-, Jk(a-)	3	0
O R ₂ R ₂	K-, s-, Jk(a-)	2	0
O R ₀ r	K-, Fy(a-), S-s-	1	0
O rr	K-, Fy(a-), Jk(a-), S-	3	0
Total		144	301/948

Bold: The 10 patients we did not find compatible units.

and diminished frequency of transfusions. The transfusion timeline before genotyping was about 1 week, and after extended genotyping matched it changed to 30 to 45 days.

Discussion

The serious consequences of alloimmunization have led some SCD treatment centres to pre-select blood of donors with closely matched RBC antigens for transfusion into sickle cell recipients [5-7]. The success of this task depends on the ability to accurately type polytransfused patients and to supply the SCD patient's transfusion need. The relevance of genotype determination of blood groups for the management of multiple transfused patients with diseases such as SCD and β -thalassaemia has been demonstrated [13,14] by allowing the determination of the true blood group genotype, and by assisting in the identification of suspected alloantibodies and the selection of antigen-negative RBCs for transfusion.

Microarray technology can contribute to the management of transfusions in SCD patients by allowing a more accurate selection of donor units to prevent alloimmunization, ensure the best match and transfusion safety. The possibility to use an automated DNA extraction method and the ability to test the patients and a large number of donors simultaneously

for several antigens, together with computer analysis and interpretation of data [23,24], makes it feasible to easily increase the inventory of donors to the SCD patients and to facilitate the matching of RBC components to the recipient's blood type.

Our data show that BeadChips can be used to find RBC compatible units to patients with SCD by selecting blood donors according to the ABO/Rh phenotype from the patients establishing an electronic link between the blood donor and the patient need. Although the patients were diverse and each one needed a different phenotype, we were able to find compatible units for 134 of 144 SCD patients, matching for ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd, Ss, Dombrock and Diego. As part of the matching strategy we considered group O donors for all patients and there were a sufficient number of antigen-negative components on hand to meet the needs of those 134 patients after serological confirmation.

Because ANVISA (Brazilian regulatory agency) requires that all testing be completed using licensed reagents and test methods prior to labelling a unit of blood we are still required to confirm the results with serology but even with this double testing, molecular testing saves staff time and money.

The 10 patients we did not find compatible units in this donor pool had unusual phenotype combinations or rare phenotypes, like R2R2, R2R2 and S-s-U. In theory and according to the gene frequencies found in Brazilians, for those 10 patients we would have to be tested 2000 donors to be able to match all of them. The 11 alloimmunized patients who benefit from receiving antigen-matched RBCs based on genotype as shown by better *in vivo* RBCs survival, as assessed by raises in haemoglobin levels and diminished frequency of transfusions, presented discrepancies between phenotype and genotype on Rh, Duffy and Kidd and were previously mistyped by haemagglutination.

Our results demonstrate that the DNA array technology can identify blood group genotypes for SCD patients and is useful to readily identify compatible donors for those patients. This routine DNA analysis of donors and recipients would allow the selection of donors for given recipients on the basis of the respective antigen repertoires. We can use the information obtained by molecular methods to identify donors who may meet the special requirements, and serological tests are performed only on those samples. The provision of antigen-negative blood forms the basis for safe blood transfusion by minimizing the risk of adverse transfusion reactions and alloimmunization.

This technology also opens the opportunity to extend DNA typing to other antigens and variants found in SCD patients as: partial D and e-variants, especially unusual Rh phenotypes such as hr^B and h-, antigens such as V/VS, DAK and Js^a difficult to analyse serologically because suitable reagents are not available, they are not on screening cells and not represented in antibody identification panels. However, for

effective application of genotyping to such patients, it is important that suitably genotyped donors are available. Our data strongly suggest that genotyping a large cohort of regular blood donors at a blood bank is sufficient to provide compatible blood for these patients.

The implementation of automated platforms allows all donors to be genotyped, expanding the blood donor extended antigen database and the reduction of extended phenotype testing. With this additional tool, more donors presenting with rare and uncommon antigens are discovered, which improves the likelihood that patients requiring frequent transfusions will be provided with antigen-specific blood.

As a word of caution, we should emphasize that the interpretation of genotyping results must take into account the potential of contamination of PCR-based amplification assays and the observation that the presence of a particular genotype does not guarantee expression of this antigen on the RBC membrane. The predicted antigen state should ideally be confirmed by haemagglutination.

In conclusion, blood group genotyping by DNA array contributes to the management of transfusions in SCD patients by facilitating the transfusion support with antigen-matched blood. It has the potential to replace the routine blood group phenotyping and improve the life of thousands of SCD transfused patients by reducing mortality due to transfusion reactions and immunization.

Acknowledgements

We thank Ghazala Hashmi, Michael Seul and Jim Danehy from BAS for their technical support.

References

- 1 Davies SC, McWilliam AC, Hewitt PE, Devenish A, Brozovic M: Red cell alloimmunization in sickle cell disease. *Br J Haematol* 1986; 63:241-245
- 2 Reisner EG, Kostyu DD, Philips G, Walker C, Dawson DV: Alloantibody response in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens* 1986; 30:161-166
- 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; 148:2485-2489
- 4 Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR: Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. *Blood*, 1990; 76:1431-1437
- 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; 322:1617-1621
- 6 Giblett ER: A critique of the theoretical hazard of inter-vs-intra-racial transfusion. *Transfusion* 1961; 1:233-238
- 7 Orlina AR, Sosler SD, Koshy M: Problems of chronic transfusion in sickle cell disease. *J Clin Apheresis* 1991; 6:233-240
- 8 Tahhan RH, Holbrook LR, Braddy LR, Brewer LD, Christie JD: Antigen-matched donor blood in the transfusion management

- of patients with sickle cell disease. *Transfusion* 1994; 34:562-569
- 9 Ambruso DR, Githens JH, Alcorn R, Dixon DJ, Brown LJ, Vaughn WM, Hays T: Experience with donors matched for minor blood group antigens in patients with sickle cell anemia who are receiving chronic transfusion therapy. *Transfusion* 1987; 1987:94-98
 - 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; 42:683-690
 - 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; 43:103-106
 - 12 Flickinger C: In search of red blood cells for alloimmunized patients with sickle cell disease. *Immunohematology* 2006; 22:136-142
 - 13 Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino J Jr, Alberto FL, Saad STO, Costa FF: DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion* 2002; 42:232-238
 - 14 Castilho L, Rios M, Pellegrino J Jr, Saad STO, Costa FF: Blood group genotyping facilitates transfusion of β -thalassemia patients. *J Clin Lab Anal* 2002; 16:216-220
 - 15 Legler TJ, Eber SW, Lakomek M *et al.* Application of *RHD* and *RHCE* genotyping for correct blood group determination in chronically transfused patients. *Transfusion* 1999; 39:852-855
 - 16 Reid ME, Rios M, Powell VI *et al.* DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000; 40:48-53
 - 17 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
 - 18 Avent ND: Large scale blood group genotyping. *Transfus Clin Biol* 2007; 14:10-15
 - 19 Beiboer SHW, Wieringa-Jelsma T, Maaskant-von Wijk PA, Van der Schoot CE, Van Zwielen 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; 45:667-679
 - 20 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; 45:654-659
 - 21 Denomme GA, Van Oene M: High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion*, 2005; 45:660-666
 - 22 Hashmi G, Shariff T, Seul M *et al.* A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* 2005; 45:680-688
 - 23 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; 47:736-747
 - 24 Avent ND: Large scale blood group genotyping-clinical implications. *Br J Haematol* 2009; 144:3-13