

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Análise molecular de grupos sanguíneos na Fundação
Hemominas para a identificação de variantes raras**

ORIENTADA: Amanda Assis Muniz

ORIENTADOR: Dr. Eduardo Martin Tarazona Santos

COORIENTADORA: Dra. Maria Clara Fernandes da Silva Malta

BELO HORIZONTE

Setembro – 2019

AMANDA ASSIS MUNIZ

**Análise molecular de grupos sanguíneos na Fundação Hemominas
para a identificação de variantes raras**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Eduardo Martin Tarazona Santos

Coorientadora: Dra. Maria Clara Fernandes da Silva Malta

BELO HORIZONTE

Setembro – 2019

043 Muniz, Amanda Assis.

Análise molecular de grupos sanguíneos na Fundação Hemominas para a identificação de variantes raras [manuscrito] / Amanda Assis Muniz. - 2019.
79 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Eduardo Martin Tarazona Santos. Coorientadora: Dra. Maria Clara Fernandes da Silva Malta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Grupos sanguíneos. 3. Fenótipo. 4. Ancestralidade. I. Tarazona Santos, Eduardo Martín. II. Silva, Maria Clara Fernandes da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



"Análise molecular de grupos sanguíneos na Fundação Hemominas para a identificação de variantes raras "

Amanda Assis Muniz

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Maria Clara Fernandes da Silva Malta - Coorientadora
Fundação Hemominas

Maria Raquel Santos Carvalho
UFMG

Luciana Cayres Schmidt
Fundação Hemominas

Belo Horizonte, 13 de setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria tornado realidade sem as contribuições de várias pessoas e instituições. Eu nunca conseguirei agradecer a todos com a sua devida proporção, mas sigo tentando expressar, com minhas mais simples palavras, o quanto cada um foi importante para a realização desta etapa.

Inicialmente, gostaria de agradecer a minha coorientadora, Maria Clara F. Silva Malta, por todo tempo de dedicação, incentivo, confiança, paciência e ensinamentos. Sendo uma das pessoas que mais contribuíram para que eu pudesse percorrer este trajeto.

Ao meu orientador, Eduardo M. Tarazona Santos, que mesmo com sua intensa rotina aceitou me orientar.

À Fundação Hemominas que forneceu condições para que o meu trabalho fosse desenvolvido.

A equipe da Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas, em especial Luciana C. Schmidt, Mariana M. Godin, Marta A. B. Chagas e Ingrid B. Jobski por toda colaboração prestada.

Aos amigos do laboratório de pesquisa da Fundação Hemominas pelas inúmeras trocas de conhecimentos, conselhos, apoio e risadas. Tornando essa caminhada menos árdua.

À Isabela A. Ferraz e ao Adão R. Silva pela ajuda e comprometimento com a pesquisa durante todo o tempo em que estavam presentes.

À Fabiana Piassi por ceder gentilmente amostras controle para a padronização da técnica de genotipagem para o alelo *DO*HY*.

À Universidade Federal de Minas Gerais e o seu corpo docente que proporcionaram conhecimentos para a minha formação.

Aos companheiros do Programa de Pós-Graduação em Genética que tive a oportunidade de conhecer e que sempre estavam dispostos a ajudar.

As instituições que contribuíram no financiamento do trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Aos meus pais, Célia M. A. Muniz e Djalma T. Muniz, que não pouparam esforços para que eu pudesse ter uma continuidade nos estudos, sempre me proporcionando força, incentivo e um amor incondicional.

Ao meu irmão, Alisson A. Muniz, pelos conselhos preciosos, cumplicidade e encorajamento nos momentos difíceis.

Ao Wenderson S. Silva pelo companheirismo, compreensão e alegria com que compartilhou comigo durante todo o percurso.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e que mesmo não citados merecem meus agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Antígenos eritrocitários e sistemas de grupos sanguíneos	16
1.2 Importância clínica dos antígenos de grupos sanguíneos	17
1.3 Sistemas de grupos sanguíneos abordados neste estudo	18
1.3.1 <i>Sistemas Sanguíneos Diego (010)</i>	19
1.3.2 <i>Sistema Sanguíneo Dombrock (014)</i>	19
1.3.3 <i>Sistema Sanguíneo Vel (034)</i>	19
1.3.4 <i>Sistema Sanguíneo Gerbich (020)</i>	20
1.3.5 <i>Sistema Sanguíneo Duffy (008)</i>	20
1.4 Fenótipos eritrocitários raros	21
1.5 Desafios e estratégias na medicina transfusional para compatibilizar indivíduos com fenótipos raros	22
1.6 Programas de sangue raro	23
2 JUSTIFICATIVA.....	26
3 OBJETIVO	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 População e amostras.....	29
4.2 Purificação de DNA	32
4.3 Preparo de amostras de DNA agrupadas	32

4.4	Análises moleculares	33
4.4.1	Genotipagem de alelos dos sistemas Diego (DI^*A e DI^*B) e Dombrock (DO^*HY) por PCR/RFLP.....	33
4.4.2	Genotipagem dos alelos (DI^*A e DI^*B) do sistema Diego por PCR em Tempo Real	35
4.4.3	Genotipagem do alelo DO^*HY do sistema Dombrock por PCR em Tempo Real	37
4.4.4	Análise molecular do sistema Vel.....	39
4.4.5	Análise molecular do sistema Gerbich.....	40
4.4.6	Análise molecular do sistema Duffy.....	40
4.5	Análise estatística	42
4.6	Avaliação da demanda e da disponibilidade de hemocomponentes com fenótipos raros em Minas Gerais.....	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Demanda e disponibilidade de hemocomponentes com fenótipos raros	43
5.2	Genotipagem para os alelos DI^*A e DI^*B em amostras individuais	43
5.3	Genotipagem para o alelo DO^*HY em amostras individuais.....	45
5.4	Genotipagem dos alelos DI^*A/DI^*B e DO^*HY em amostras agrupadas.....	47
5.5	Frequência dos alelos DI^*A , DI^*B e DO^*HY em Minas Gerais.....	49
5.6	Análise molecular de indivíduos fenotipados como Di(a+) na Fundação Hemominas	49
5.7	Ancestralidade genômica e autodeclarada e genótipos DI^*A e DI^*B e DO^*HY	51
5.8	Resolução de casos complexos envolvendo fenótipos raros.....	53
5.8.1	Caso 1.....	54
5.8.2	Caso 2.....	55
5.8.3	Caso 3.....	56
5.8.4	Caso 4.....	57
5.8.5	Caso 5.....	60
5.8.6	Caso 6.....	63
5.8.7	Caso 7.....	64

6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	72
8	REFERÊNCIAS	73
9	PERSPECTIVAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Unidades regionais da Fundação Hemominas.....	31
Figura 2 - Discriminação alélica obtida através da técnica PCR em Tempo Real para análise dos alelos <i>DI*A</i> e <i>DI*B</i> do sistema Diego com a nova técnica (protocolo 2), para amostras individuais.....	44
Figura 3 - Resultados da genotipagem por PCR em Tempo Real para o alelo <i>DI*A</i> e <i>DI*B</i> do sistema Diego utilizando o protocolo 2 descrito neste estudo, para amostras individuais	44
Figura 4 - Discriminação alélica obtida através da técnica PCR em Tempo Real para análise do alelo <i>DO*HY</i> do sistema Dombrock com a nova técnica (protocolo 2), para amostras individuais.....	46
Figura 5 - Resultados da genotipagem por PCR em Tempo Real para o alelo <i>DO*HY</i> do sistema Dombrock utilizando o protocolo 2 descrito neste estudo, para amostras individuais.	47
Figura 6 - Resultados da genotipagem por PCR em Tempo Real em amostras agrupadas para os alelos <i>DI*A</i> e <i>DI*B</i> do sistema Diego (A) e <i>DO*HY</i> do sistema Dombrock (B) em pools de cinco amostras.....	48
Figura 7 - Proporções de ancestralidade genômica individual africana, europeia e ameríndia em doadores de sangue de acordo com raça/cor autodeclarada (A) e os genótipos <i>DI*A/DI*B</i> (B) e <i>DO*HY</i> (C).	53
Figura 8 - Gel de agarose 1% para análise do caso 1.....	54
Figura 9 - Gel de agarose 1% para análise do caso 2.....	55
Figura 10 - Resultado do Gel de poliacrilamida 8% para análise do caso 3	56
Figura 11- Resultado do gel de agarose 2% para análise do caso 4.....	57
Figura 12 - Resultado do gel de agarose 2% para análise de familiares do caso 4.....	58
Figura 13 - Resultado dos géis de agarose a 2% para análise do caso 5	61
Figura 14 - Resultados de PCR em Tempo Real para análise do caso 6.....	63
Figura 15 - Resultados de PCR em Tempo Real para análise do caso 7.....	64
Figura 16 - Resultados de PCR em Tempo Real para análise de familiares referentes ao caso 7.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de primers para análise molecular dos alelos dos sistemas Diego (PCR-RFLP), Dombrock (PCR-RFLP), Vel (PCR-RFLP), Gerbich (PCR-Alelo específico e GAP-PCR), e Duffy (PCR-RFLP).....	35
Tabela 2 - Sequência de primers e sondas utilizados para a genotipagem de alelos do sistema Diego e Dombrock por PCR em tempo real.	39
Tabela 3 – Comparações das frequências dos alelos <i>DI*A/DI*B</i> e <i>DO*HY</i> em Minas Gerais com outras populações brasileiras e mundiais.	50
Tabela 4 - Frequência alélica de doadores para o sistema Diego (<i>DI*A</i> e <i>DI*B</i>) e Dombrock (<i>DO*HY</i>) em relação a cor autodeclarada.	52

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACB	Afrodscendentes Caribenhos de Barbados
ASW	Americanos afrodescendentes no Sudoeste dos Estados Unidos
BEB	Grupo étnico Bengali de Bangladesh
C	Citosina
CA	Califórnia
CDX	Chineses Dai de Xishuangbanna, China
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEU	Residentes de Utah com Ancestrais da Europa Setentrional e Ocidental
CHB	Chineses Han de Pequim, China
CHS	Chineses Han do Sul, China
CIH	Central de Imuno-hematologia
CLM	Colombianos de Medellin, Colômbia
Ct	Cycle threshold
DARC	Duffy Antigen/Receptor for Chemokines
DHPN	Doença hemolítica perinatal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ESN	Grupo étnico Esan na Nigéria
FH	Fundação Hemominas
FIN	Finlandeses, Finlândia
G	Guanina
GBR	Britânicos da Inglaterra e da Escócia
GIH	Grupo étnico indiano Gujarati vivendo em Houston, Texas

GSH	Coordenação Geral do Sangue e Hemoderivados
GYPC	Glycophorin C
GWD	Indivíduos de Gâmbia
HBH	Hemocentro de Belo Horizonte
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e estatística
IBGRL	Laboratório Internacional de Referência de Grupos Sanguíneos
IBS	População Ibérica na Espanha
IRDP	Painel Internacional de Doadores Raros
ISBT	Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea
ITU	Grupo étnico Telugu indiano vivendo no Reino Unido
JPT	Japoneses de Tóquio, Japão
KHV	Grupo étnico Kinh da cidade de Ho Chi Minh, Vietnã
LWK	Grupo étnico Luhya de Webuye, Quênia
mM	Milimolar
MSL	Mende, Serra Leoa
MXL	Descendentes de mexicanos vivendo em Los Angeles, Estados Unidos
ng	Nanograma
nM	NanoMolar
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEL	Peruanos de Lima, Peru
pg	Picograma
PJL	Indianos de Punjabi de Lahore, vivendo no Paquistão
PUR	Porto-riquenhos de Porto Rico
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
SLC4A1	Solute Carrier Family 4 (Anion Exchanger), Member 1

SMIM1	Small Integral Membrane Protein 1
STU	Grupo étnico Tamil do Sri Lanka, vivendo no Reino Unido
SSP-PCR	Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction
T	Timina
TSI	Toscana, Itália
U	Unidade
WHO	Organização Mundial da Saúde
YRI	Grupo étnico Ioruba de Ibadan, Nigéria
μL	Microlitro

RESUMO

A compatibilização dos antígenos eritrocitários entre doadores e receptores nas transfusões sanguíneas é importante, uma vez que evita a aloimunização e reduz o risco de reações pós transfusionais. Garantir hemocomponentes para indivíduos com fenótipos eritrocitários raros pode ser um desafio, pois há dificuldade tanto na caracterização do paciente quanto na identificação de doadores compatíveis. Este estudo teve como objetivo disponibilizar para a Fundação Hemominas (FH), único banco de sangue público de Minas Gerais, ferramentas baseadas em biologia molecular para auxiliar na caracterização de doadores e pacientes com fenótipos eritrocitários raros. Em relação à triagem de doadores, foram desenvolvidos métodos baseados na PCR em tempo real para a genotipagem dos alelos *DO*HY* (sistema Dombrock) e *DI*A/DI*B* (Sistema Diego) em amostras individuais ou agrupadas (pools de cinco amostras). Os métodos desenvolvidos mostraram-se sensíveis e reprodutíveis. A genotipagem de 457 amostras de doadores de sangue demonstrou que as frequências dos alelos *DI*A* e *DO*HY* em Minas Gerais (1,09% e 1,53%, respectivamente) são tão baixas quanto as observadas em outras regiões brasileiras. A genotipagem *DI*A/DI*B* também foi realizada para 58 doadores fenotipados como Di^a+ pela Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas (CIH-FH) e todos foram *DI*A/DI*B*, confirmando a dificuldade em obter doadores Di(a+b-) em nossa população. Dados de raça/cor autodeclaradas dos doadores de sangue foram obtidos do banco de dados da FH para avaliar a utilidade de sua aplicação na triagem de doadores raros. Não foram observadas diferenças significativas nas frequências dos alelos *DI*A*, *DI*B* e *DO*HY*, comparando os grupos autodeclarados brancos em relação aos pretos e pardos. Ampla variação dos percentuais de ancestralidade genômica africana e europeia foi observada em indivíduos de diferentes genótipos, bem como dos diferentes grupos de raça/cor autodeclarada. O único indivíduo com genótipo raro *DO*HY/DO*HY* incluído neste estudo foi autodeclarado branco e apresentou ancestralidade genômica 43,5% africana e 46,3% europeia, ainda que esse alelo seja característico de populações africanas. Desta forma, embora tanto a raça/cor autodeclaradas quanto certos alelos de grupo sanguíneo estejam associados à ancestralidade, o uso de critérios étnico-raciais para auxiliar na triagem de doadores raros em populações altamente miscigenadas pode ser desafiador. Em relação aos pacientes, análises moleculares de alelos dos sistemas Gerbich, Diego, Vel e Duffy foram padronizadas de acordo com protocolos disponibilizados na literatura e aplicados da resolução de casos nos quais havia suspeita de aloimunização contra antígenos de alta frequência. Foram analisados sete pacientes sendo que para quatro deles foi confirmada a aloimunização associada a um fenótipo raro. Os resultados obtidos foram úteis na elucidação desses casos. Desta forma, podemos concluir que os resultados obtidos no presente estudo são de grande utilidade, podendo ser aplicados para a melhoria da segurança transfusional em Minas Gerais. Os testes desenvolvidos no presente estudo serão disponibilizados para implementação na CIH-FH, onde poderão ser aplicados para a triagem e confirmação de fenótipos raros em doadores e receptores de hemocomponentes.

PALAVRAS-CHAVE: Sistema de grupos sanguíneos; Diego; Dombrock; Gerbich; Vel; Duffy; Fenótipo raro; Genotipagem; Aloimunização; Ancestralidade.

ABSTRACT

Compatibility of red blood cell (RBC) between donors and patients is important to reduce the risk of post-transfusion hemolytic reactions. Ensuring hemocomponents for individuals with rare erythrocyte phenotypes can be challenging, since it is difficult to characterize patients and identify compatible donors. This study aimed to implement on Fundação Hemominas (FH), the only public blood bank of Minas Gerais, molecular biology methods to assist in the characterization of donors and patients with rare RBC phenotypes. Regarding donor screening, methods based on real-time PCR were developed for genotyping of the *DO*HY* (Dombrock system) and *DI*A/DI*B* (Diego System) alleles in individual samples or in pools of five samples. Sensitive and reproducible methods were developed. The genotyping of 457 blood donors showed that the frequencies of the *DI*A* and *DO*HY* alleles in Minas Gerais (1.09% and 1.53%, respectively) are as low as those observed in other Brazilian regions. *DI*A/DI*B* genotyping was also performed for 58 blood donors phenotyped as Di^a+. All these donors presented the genotype *DI*A/DI*B*, confirming the difficulty in obtaining Di(a+b-) donors in our population. Self-reported race/skin color data from blood donors were obtained from the FH database to assess its applicability in the screening rare donors. No significant differences were observed in the frequencies of the *DI*A*, *DI*B* and *DO*HY*, comparing the self-declared white donors with those black and brown. Wide variation in percentages of African and European genomic ancestry was observed in individuals of different genotypes or self-declared race/color groups. The only individual with a rare *DO*HY/DO*HY* genotype included in this study was self-declared white and had 43.5% African and 46.3% European genomic ancestry, although this allele is characteristic of African populations. Thus, while both self-reported race/color and certain blood group alleles are associated with ancestry, the use of ethnic-racial criteria to assist in screening rare donors in highly mixed populations can be challenging. For patients, molecular analyzes of the Gerbich, Diego, Vel and Duffy blood group systems were standardized and applied to the resolution of cases in which alloimmunization against high frequency RBC antigens was suspected. Seven patients were analyzed, and in four of them alloimmunization associated with a rare phenotype was confirmed. The results obtained were useful in elucidating these cases. Thus, we can conclude that the results obtained in this study are very useful and can be applied to improve transfusion safety in Minas Gerais. The tests developed in this study will be available for implementation at the Immunohematology Laboratory of the Fundação Hemominas, where they may be applied for screening and confirmation of rare RBC phenotypes in blood donor and recipient, in order to increase transfusion safety.

KEYWORDS: Blood group system; Diego; Dombrock; Gerbich; Vel; Duffy; Rare phenotype; Genotyping; Alloimmunization; Ancestry.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antígenos eritrocitários e sistemas de grupos sanguíneos

A membrana do eritrócito é composta predominantemente por lipídeos, proteínas e carboidratos (COVAS, LANGHI JÚNIOR e BORDIN, 2007). Sua superfície externa contém antígenos de grupos sanguíneos, que podem ser proteínas, glicoproteínas ou carboidratos, os quais podem estar ligados em glicoproteínas ou glicolipídeos. Estes antígenos são estruturas herdadas geneticamente e são polimórficos. Grande parte das variantes genéticas associadas a antígenos de grupos sanguíneos são decorrentes de uma ou mais substituição de nucleotídeo único, porém outros mecanismos podem proporcionar a geração de polimorfismos de grupos sanguíneos, como a deleção do gene, deleção ou inserção de um ou mais nucleotídeos e recombinação intergênica. Uma grande parte desses antígenos está agrupada em sistemas sanguíneos (HARMENING, 2015).

Os sistemas de grupos sanguíneos, de acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), são constituídos de um ou mais antígenos controlados em um único locus gênico ou por dois ou mais loci intimamente ligados. Quando os antígenos não se enquadram nas especificações de um sistema, mas possuem relação sorológica, bioquímica ou genética, eles são alocados em coleções. Há antígenos, entretanto, que não compreendem parâmetros para ser implantado em sistemas ou coleções. Estes antígenos são situados em séries contendo antígenos de baixa frequência (série 700) ou alta frequência (série 901) (DANIELS *et al.*, 2004).

O primeiro sistema de grupo sanguíneo descrito, sistema ABO, foi descoberto em 1901 por Karl Landsteiner (SIMON *et al.*, 2016). A partir de então, uma série de outros sistemas foram descritos e ainda hoje, após passar um pouco mais de um século da descoberta do sistema ABO, outros sistemas ainda estão sendo elucidados. Atualmente são formalmente registrados 38 sistemas de grupos sanguíneos e mais de 360 antígenos de grupos sanguíneos (STORRY *et al.*, 2016; ISBT, 2019).

As frequências alélicas de polimorfismos associados a antígenos de grupos sanguíneos variam entre as populações mundiais, isto é, um polimorfismo de alta prevalência notificado em uma determinada região pode não ter frequência elevada em outras localidades. O alelo *FY*BES* (*FY*01N.01*, de acordo com a ISBT) do sistema de grupos sanguíneos Duffy, é um exemplo dessa situação. A frequência desse alelo é muito alta na África Subsaariana podendo ser alcançado a fixação em algumas regiões. Entretanto, este cenário não é visto no

âmbito mundial, uma vez que alelo *FY*BES* pode exibir uma baixa frequência em populações europeias e asiáticas, sendo considerado raro em diversas regiões (HOWES *et al.*, 2011).

As variações nas frequências dos antígenos de grupos sanguíneos nas populações mundiais têm sido atribuídas a diferentes fatores evolutivos. Estudos indicam que alguns polimorfismos de antígenos eritrocitários podem ter evoluído em respostas a uma pressão seletiva de determinadas doenças. No caso do alelo *FY*BES*, por exemplo, a alta frequência em populações africanas é atribuída a um efeito de vantagem de sobrevivência para a malária, uma vez que indivíduos homocigotos para esse alelo são significativamente menos propensos a sofrer infecção pelo *Plasmodium vivax* (ROWE, OPI e WILLIAMS, 2009). Outros fatores evolutivos como deriva genética, efeito fundador e migrações também contribuíram para moldar os padrões de frequências dos antígenos eritrocitários (DEWAN, 2015).

1.2 Importância clínica dos antígenos de grupos sanguíneos

Desde o século XV, há vários registros de transfusões sanguíneas na história. No entanto, nem todas essas transfusões foram bem-sucedidas, uma vez que vários fatores importantes para essa técnica precisavam ser elucidados. Com a descrição do sistema ABO, no começo do século XX, houve o início do entendimento sobre a singularidade dos tipos sanguíneos e sobre a compatibilidade sanguínea, o que contribuiu significativamente para o avanço da segurança transfusional (HARMENING, 2015).

Anticorpos anti-eritrocitários podem ser produzidos devido a uma exposição prévia de antígenos não próprios, via transfusões, transplantes e gravidez, ou podem ser gerados naturalmente, como no caso de anticorpos do sistema ABO. Quando há formação de anticorpos em indivíduo devido à exposição a antígenos não-próprios, diz-se que ele está aloimunizado (MINTZ, 2010).

A frequência da aloimunização em transfusões sanguíneas é variada. Isso dependerá do antígeno em questão (imunogenicidade do antígeno), da discrepância fenotípica entre doador e receptor, de fatores genéticos e adquiridos do receptor, da patologia do paciente, bem como da quantidade e frequência das transfusões (PACCAPELO, 2017).

Nas transfusões sanguíneas, anticorpos anti-eritrocitários podem levar à lise ou depuração das hemácias transfundidas, sendo esse processo conhecido como reação transfusional hemolítica. As reações transfusionais hemolíticas podem ser classificadas de acordo com o momento da sua ocorrência após a transfusão. Quando o início das reações

ocorre dentro de 24 horas, podem ser classificadas como reações pós transfusionais hemolíticas agudas, sendo geralmente associadas à hemólise intravascular. Quando o início dos sintomas ocorre após 24 horas, podem ser consideradas reações transfusionais hemolíticas tardias, estando geralmente associadas à hemólise extravascular. Na hemólise intravascular, a hemoglobina e outros conteúdos de hemácias são liberados no interior dos vasos sanguíneos, o que pode ocasionar dor lombar intensa, febre, hipotensão, náuseas, dispneia, sensação de morte iminente, insuficiência renal e danos a outros órgãos. Na hemólise extravascular, as hemácias são removidas da circulação, ocasionando uma queda de hemoglobina, contribuindo assim para a morbidade. Em casos extremos, as reações transfusionais hemolíticas podem levar à morte (MURPHY, PAMPHILON e HEDDLE, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Outra consequência da produção de anticorpos anti-eritrocitários é a doença hemolítica perinatal (DHPN). Esta doença ocorre quando a mãe possui no plasma anticorpos da classe IgG, que correspondem a antígenos eritrocitários do feto. Estes anticorpos podem atravessar a placenta e ligar as hemácias fetais, causando sua destruição. Esta hemólise pode ocasionar graus diferentes de anemia fetal, levando, em casos extremos, a um aborto. Após o parto, os recém-nascidos afetados podem desenvolver icterícia e risco de danos neurológicos (NORFOLK, 2013).

A taxa de ocorrência da produção de anticorpos em receptores de transfusão de hemocomponentes são maiores em comparação à gravidez. Isto ocorre principalmente porque as mães estão expostas a pequenos volumes de células fetais e porque a exposição se dá apenas para antígenos do feto provenientes de origem paterna (URBANIACK, 2002).

1.3 Sistemas de grupos sanguíneos abordados neste estudo

O presente estudo abordou antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos Diego, Dombrock, Vel, Gerbich e Duffy. Os sistemas Diego e Dombrock foram incluídos devido à demanda na rede hemoterápica pública de Minas Gerais pelo desenvolvimento de estratégias para a busca de doadores com fenótipos raros relacionados prioritariamente a esses sistemas.

Os demais sistemas foram incluídos devido à demanda da Central de Imunohematologia da Fundação Hemominas pela implementação de técnicas de biologia molecular para auxiliar na resolução de casos complexos em imunohematologia, relativos a pacientes aloimunizados para antígenos raros desses sistemas.

Segue abaixo uma breve descrição dos antígenos e sistemas incluídos.

1.3.1 Sistemas Sanguíneos Diego (010)

O Sistema Diego possui 22 antígenos, sendo que o par de antígenos antitético Di^a (baixa frequência) e Di^b (alta frequência) são de grande importância clínica, pois estão envolvidos em reações pós transfusionais hemolíticas e na doença hemolítica perinatal. Esses antígenos estão relacionados respectivamente aos alelos DI^*A e DI^*B (rs2285644), os quais diferem pela troca da base nitrogenada citosina por timina na posição 2561 do gene *SLC4A1*, resultando na troca de um aminoácido na posição 854 da proteína Banda 3. O fenótipo $Di(a+b-)$, associado ao alelo DI^*A em homozigose é raro na maioria das populações, sendo reportado em maior frequência em população com descendência asiática e ameríndia (BRUCE *et al.*, 1994; POOLE, 1999; ISBT, 2019).

1.3.2 Sistema Sanguíneo Dombrock (014)

O sistema Dombrock possui 10 antígenos, os quais são transportados na glicoproteína Dombrock (ISBT, 2019). O antígeno DO^*HY (Holley) é um dos que compõe esse sistema. Esse antígeno apresenta frequência alta em todas as populações mundiais, porém a sua ausência é relatada em populações com ancestralidade africana. O alelo DO^*HY (rs28362797), que em homozigose está associado ao fenótipo Hy negativo, é derivado da substituição de uma glicina por uma valina na posição 108 no gene *DO (ARTC4)* (BARRETT *et al.*, 1996). A presença de anticorpos anti-Hy é considerada rara, mas está associado a reações hemolíticas pós-transfusionais (BEATTIE & CASTILLO, 1975; REID *et al.*, 2005).

1.3.3 Sistema Sanguíneo Vel (034)

O gene *SMIM1* codifica o antígeno do sistema de grupos sanguíneos Vel. Indivíduos que apresentam o fenótipo raro Vel negativo são em sua maioria homozigotos para uma deleção de 17 nucleotídeos neste gene (alelo $SMIM1^*64_{-}80 del$). Esses indivíduos podem desenvolver anticorpos anti-Vel os quais estão relacionados a reações transfusionais hemolíticas agudas ou tardias graves (BALLIF *et al.*, 2013).

1.3.4 Sistema Sanguíneo Gerbich (020)

O gene *GYPC* codifica as glicoforinas C e D que expressam os 11 antígenos conhecidos do sistema do grupo sanguíneo Gerbich (ISBT, 2019). Três deleções em regiões do gene *GYPC* são responsáveis pela ausência de antígenos de alta frequência, resultando em fenótipos raros. Indivíduos com fenótipo raro Yus (GE -2,3,4) possuem deleção na região do éxon 2 que corresponde a ausência do antígeno Ge2, enquanto indivíduos com fenótipo raro Gerbich (GE -2,-3,4) possuem deleção no éxon 3 que levam à ausência dos antígenos Ge2 e Ge3 (alguns indivíduos do fenótipo Gerbich produzem anti-Ge3 sem anti-Ge2). Tanto o fenótipo Yus quanto o Gerbich apresentam subcategorias, baseadas na região onde ocorre a deleção. Desta forma, temos os alelos Yus01, Yus02, Yus03 e Yus04, assim como os Gerbich01, Gerbich02 e Gerbich03 (Gourri *et al.*, 2017). No entanto, a importância da definição desses subtipos para a prática transfusional não é bem compreendida. Já os indivíduos com fenótipo Leach (GE -2, -3, -4) apresentam deleção nos exons 3 e 4, que ocasiona a ausência dos antígenos Ge2, Ge3 e Ge4. Os anticorpos associados à falta desses antígenos de alta frequência estão relacionados a reações hemolíticas pós transfusionais e doença hemolítica do recém-nascido (GOURRI *et al.*, 2017).

1.3.5 Sistema Sanguíneo Duffy (008)

A glicoproteína Duffy, também chamada DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines) é responsável por carrear os cinco antígenos do sistema Duffy que são nomeados como Fy^a, Fy^b, Fy³, Fy⁵, Fy⁶. Os antígenos antitéticos Fy^a e Fy^b são os mais importantes deste sistema e estão envolvidos em reações hemolíticas pós transfusionais e na doença hemolítica perinatal, e são relacionados aos alelos *FY*A* e *FY*B*, respectivamente. Os alelos *FY*A* e *FY*B* são gerados por um SNP que resulta na substituição de uma guanina para uma adenina na posição 125 (rs12075). Os indivíduos homocigotos para o alelo *FY*A* possuem o fenótipo Fy(a+b-), os homocigotos para o alelo *FY*B* possuem o fenótipo Fy(a-b+) e os heterocigotos para esses alelos possuem o fenótipo Fy(a+b+).

O fenótipo Fy(a-b-) está mais frequentemente associado à mutação pontual -33 T>C (rs2814778), que ocorre na região promotora do gene (GATA-box) resultando na presença do alelo *FY*BES* (*FY*01N.01*). Este polimorfismo impede a ligação do fator de transcrição eritróide GATA 1 à região promotora, o que impede a expressão da glicoproteína Duffy nas hemácias, mas não em outros tecidos. Indivíduos com este background genético, embora

sejam Fy(a-b-), geralmente podem receber transfusão de sangue contendo o antígeno Fy^b sem risco de aloimunização. Este fenótipo é comum em populações de origem africana (MALLINSON *et al.*, 1995; CHAUDHURI *et al.*, 1995; PEIPER *et al.*, 1995; RIOS *et al.*, 2000; SANCHES, 2011).

Embora o fenótipo Fy(a-b-) esteja mais frequentemente associado ao polimorfismo rs2814778, outras variantes também podem ocasionar ausência de expressão dos antígenos Fy^a ou Fy^b (RIOS *et al.*, 2000). Nesses casos, os indivíduos podem desenvolver anticorpos anti-Fy^a, anti-Fy^b, anti-Fy3, anti-Fy5, ou mesmo uma mistura dessas especificidades.

1.4 Fenótipos eritrocitários raros

A definição de sangue raro difere entre os bancos de sangue de diferentes países e regiões. Um indivíduo portador de um fenótipo eritrocitário raro em uma região pode não ser classificado de tal forma em outra. Por mais que não haja um consenso sobre o conceito, muitos países têm classificado indivíduos portadores de sangue raro em duas categorias (REESINK *et al.*, 2008).

[1] Indivíduos que possuem ausência de um determinado antígeno de alta frequência na população. Os serviços de hemoterapia da maioria dos países consideram como fenótipo raro aquele cuja frequência é de 1 para cada 1.000 indivíduos ou menos. Entretanto, existe uma variação considerável, sendo que alguns países adotam critérios menos rigorosos, como 1:100 na Holanda, 1:250 na França e 1:100 a 1:1.000 no Japão.

[2] Indivíduos negativos para múltiplos antígenos comuns, com frequência que varia entre 1:200 a 1:1.000.

Devido a diferenças nas frequências dos antígenos eritrocitários entre populações, certas regiões têm um potencial maior em fornecer doadores com determinados fenótipos raros (WOODFIELD, 2002). Em alguns grupos indígenas da América do Sul, por exemplo, 40% da população possuem o antígeno Di^a, enquanto em outras populações o antígeno é extremamente raro ou nunca foi observado (SIMON *et al.*, 2016). Desta forma, essas populações têm maior potencial para fornecer hemocomponentes com o fenótipo raro Di(a+b-). Outros exemplos podem ser citados como o caso da Índia, que possui um número maior de pessoas com o fenótipo Bombay; Papua Nova Guiné, onde mais de 20% da população pode ser Gerbich negativo; e a Nova Zelândia, que tem fornecido hemocomponentes Jk(a-b-) para outras regiões do mundo (WOODFIELD, 2002).

Desta forma, é importante que cada região conheça o perfil antigênico de sua população, estabelecendo critérios para doadores com fenótipos raros. Esse conhecimento é imprescindível para que se possam traçar estratégias de triagem e de fidelização dos doadores, bem como o manejo do estoque de hemocomponentes.

1.5 Desafios e estratégias na medicina transfusional para compatibilizar indivíduos com fenótipos raros

Garantir hemocomponentes adequados para indivíduos com fenótipos raros, sobretudo aqueles portadores de anticorpos contra antígenos de alta prevalência na população, pode ser um grande desafio. A falta de unidades compatíveis disponíveis, a falta de experiência dos profissionais em relação ao atendimento desses indivíduos e o fornecimento deste material em tempo hábil e de boa qualidade, podem dificultar o processo para uma correta transfusão destes pacientes (PACCAPELO, 2017).

O desafio inicia na caracterização do paciente que necessita do sangue raro. Esses pacientes geralmente são aloimunizados, apresentando anticorpos com múltiplas especificidades e/ou anticorpos voltados contra antígenos de alta frequência. A identificação desses anticorpos pode requerer o uso de técnicas especializadas, disponíveis apenas em laboratórios de referência, bem como de hemácias e soros raros, que muitas vezes não estão comercialmente disponíveis. Para a resolução de casos complexos envolvendo fenótipos raros, os serviços de hemoterapia utilizam como ferramentas complementares, hemácias e soros de origem humana, ou seja, provenientes de outros pacientes ou doadores de sangue previamente caracterizados, sendo tais materiais geralmente mantidos criopreservados em pequenas alíquotas (CHAGAS *et al.*, 2017). A caracterização incorreta ou insuficiente desses materiais biológicos pode acarretar em erros na identificação de anticorpos irregulares, comprometendo a segurança do paciente.

A elucidação das bases genéticas de fenótipos eritrocitários raros tem permitido o emprego de técnicas de biologia molecular na elucidação de casos complexos em imunohematologia, bem como na melhor caracterização de hemácias e soros raros usados nos testes de identificação de anticorpos voltados contra antígenos de alta frequência.

Uma vez alcançada a correta caracterização do paciente, o desafio persiste com a dificuldade de se obter hemocomponentes compatíveis. Uma maneira de garantir o suprimento de sangue com variantes raras é a identificação de novos doadores com fenótipo

incomum. Apesar das dificuldades, existem várias maneiras por meio das quais doadores com fenótipos incomuns podem ser identificados.

A identificação de doadores de sangue raros é geralmente realizada por fenotipagem, que é dificultada pela escassez de anticorpos comerciais, ou por técnicas baseadas em DNA (JUNGBAUER, 2009). Métodos moleculares para análise de grupos sanguíneos, incluindo técnicas de baixo, médio e alto rendimento, coexistem em diferentes centros em todo o mundo e foram continuamente desenvolvidos e melhorados. No entanto, ainda existe a necessidade de técnicas de fácil execução para identificação de doadores raros, que forneçam resultados rápidos e precisos, e que possam atender às necessidades de laboratórios com diferentes níveis de complexidade e acesso a recursos. A sensibilidade dos métodos de genotipagem atualmente disponíveis tem permitido a avaliação de amostras agrupadas (HE *et al.*, 2013; DEZAN *et al.*, 2016; WAGNER *et al.*, 2018). A genotipagem de amostras agrupadas pode permitir a avaliação de um maior número de amostras para encontrar doadores de sangue raros, economizando tempo e recursos.

Dentre as estratégias mais empregadas pelos bancos de sangue destaca-se a realização de programas de tipagem sorológica ou molecular em larga escala para antígenos clinicamente significativos; a análise de fenótipos raros em áreas geográficas e populações específicas; a identificação de doadores portadores de anticorpos contra antígenos de alta prevalência em teste de triagem de rotina; o convite de paciente com variantes raras, após recuperação, para se tornarem doadores de sangue; bem como recrutamento de membros da família de portadores de variantes raras (PACCAPELO, 2017).

Considerando a marcante diferença de frequência entre populações de certos tipos sanguíneos, alguns hemocentros no mundo consideram a etnia um fator interessante na triagem de doadores raros (ST-LOUIS *et al.*, 2013; REVELLI *et al.*, 2014; NANCE *et al.*, 2016; GOLDMAN E CROIX, 2016; VANHONSEBROUCK E NAJDOVSKI, 2016). No entanto, em populações altamente miscigenadas, como a brasileira, a atribuição de indivíduos a grupos étnicos pode apresentar uma maior complexidade.

Uma vez identificados os doadores raros, os hemocentros precisam investir na conscientização e fidelização dos mesmos.

1.6 Programas de sangue raro

Para atender à demanda transfusional de pacientes com fenótipos raros, vários hemocentros no mundo contam com programas específicos. Tais programas são baseados

no emprego de diferentes estratégias para a triagem de doadores com os fenótipos de interesse visando a disponibilização de hemocomponentes compatíveis para os pacientes que necessitam.

Nesses programas, quando doadores raros são identificados, os mesmos são registrados e geralmente são informados sobre a sua especificidade para que, quando houver necessidade, estejam acessíveis e dispostos a realizar a doação. Alguns hemocentros possuem estruturas para manter bolsas de sangue raro congeladas, para que possam ser utilizadas posteriormente. Além disso, eventualmente, em situações em que requisições de hemocomponentes com fenótipos raros não podem ser atendidas com base em buscas nacionais, os hemocentros podem buscar os hemocomponentes em outros países através da colaboração internacional (KAUR e JAIN, 2012).

A consolidação da colaboração internacional para intercâmbio de hemocomponentes com fenótipos raros teve início em meados da década de 60, quando foi criado o Painel Internacional de Doadores Raros (IRDP) da Organização Mundial da Saúde (WHO). Esse painel foi estabelecido por recomendação da Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (ISBT) e é atualmente administrado pelo Laboratório Internacional de Referência de Grupos Sanguíneos (IBGRL), em Bristol, Inglaterra, sendo utilizado em casos de urgência para localizar e intercambiar unidades raras entre países. No início de sua criação o painel continha 300 doadores oriundos de 10 países, e atualmente, ele possui mais de 8000 doadores negativos para antígenos de alta incidência proveniente de 27 países, além de informações sobre estoques de unidades de bancos de sangue congelados em todo o mundo (NANCE *et al.*, 2016).

Embora o Brasil participe de iniciativas internacionais para intercâmbio de hemocomponentes raros, há uma grande dificuldade na importação de unidades raras através de registros internacionais, porque os procedimentos alfandegários brasileiros são restritivos e burocráticos (CASTILHO, 2016). Por isso, as colaborações entre os programas brasileiros regionais e locais são tão importantes no atendimento às demandas de pacientes com fenótipo raro em nosso país.

No Brasil, a iniciativa para implantação de um programa nacional de doadores raros se deu em 2014 com a criação de um comitê técnico pelo Ministério da Saúde, por meio da Coordenação Geral do Sangue e Hemoderivados (GSH). A implantação no Brasil do Cadastro Nacional de Doadores Raros é de extrema importância, pois a população brasileira possui um alto grau de miscigenação, o que acarreta em uma grande variedade de antígenos eritrocitários. Em decorrência dessa diversidade, a demanda pelos mais variados tipos sanguíneos raros pode ocorrer (CASTILHO, 2016). Compreender possíveis impactos dessa

miscigenação na triagem de doadores raros é também um aspecto relevante na busca de estratégias para a implementação desse tipo de iniciativa.

O papel principal do programa nacional brasileiro é compilar a informação sobre doadores raros identificados nos hemocentros brasileiros e tornar essas informações disponíveis quando necessário (CASTILHO, 2016). Desta forma, é imprescindível que os hemocentros brasileiros desenvolvam estratégias para aprimorarem seus programas regionais e locais de doadores raros.

A Fundação Hemominas, único banco de sangue público de Minas Gerais, atende cerca de 300.000 doadores de sangue por ano, produzindo mais de 700.000 hemocomponentes. A Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas (CIH) realiza a fenotipagem eritrocitária estendida de doadores desde 1991 e conta com um banco de dados de mais de 100.000 doadores de sangue fenotipados para os antígenos eritrocitários mais relevantes na prática transfusional, o qual inclui portadores de fenótipos raros. Apesar disso, o atendimento a pacientes que necessitam de transfusão e apresentam anticorpos contra antígenos de alta frequência ainda é um desafio, já que nem sempre os hemocomponentes compatíveis estão disponíveis.

Desta forma, é necessário buscar o aperfeiçoamento contínuo das estratégias para identificar e fidelizar doadores com fenótipos raros em Minas Gerais. Paralelamente, é preciso também avançar na implantação de técnicas que auxiliem tanto na caracterização de hemácias e soros raros não comerciais que integram o repositório da CIH que são utilizados na caracterização de pacientes, quanto na elucidação dos casos complexos de pacientes aloimunizados que necessitam de transfusão.

2 JUSTIFICATIVA

A compatibilização dos antígenos eritrocitários entre doadores e receptores de hemocomponentes é muito importante, pois evita a aloimunização e reduz a ocorrência das reações pós-transfusionais hemolíticas. A Fundação Hemominas é a responsável pela organização do sistema hemoterápico público em Minas Gerais e atende a 97% das transfusões no estado, sempre atentando para que os hemocomponentes sejam utilizados de forma apropriada e segura. Entretanto, o atendimento a pacientes com fenótipos raros que necessitam de transfusão e apresentam anticorpos contra antígenos de alta frequência ainda é um desafio.

A identificação de pacientes e doadores com tipos sanguíneos raros é frequentemente realizada pelo método de fenotipagem. No entanto, muitas vezes, os reagentes necessários para a fenotipagem são de difícil obtenção ou não estão disponíveis para a comercialização. Outro fator limitante da fenotipagem é o fato de que seus resultados podem ser inconclusivos para paciente com histórico de transfusão recente ou portadores de anemia hemolítica autoimune.

Os avanços dos conhecimentos sobre a base molecular dos fenótipos eritrocitários raros têm possibilitado a utilização de técnicas de genotipagem para superar as limitações da fenotipagem. A utilização de protocolos já existentes ou a elaboração de novas metodologias baseada em biologia molecular ajudam na correta caracterização dos indivíduos, pois o fenótipo pode ser inferido a partir do genótipo analisado, e isto pode ser utilizado para promover a compatibilização entre doador e receptor nas transfusões de hemocomponentes.

Desenvolver e avaliar estratégias de triagem que possibilitam a identificação de doadores com fenótipos raros é de extrema importância, pois permite uma melhor abordagem na busca de hemocomponentes compatíveis. A elaboração de procedimentos que possibilitam a análise de um grande número de amostra, como a genotipagem de amostras agrupadas (em pool), apresenta potencial para a identificação de doadores com fenótipo eritrocitário raro, uma vez que é preciso triar um grande número de indivíduos para a identificação de um único doador com o fenótipo de interesse.

As frequências alélicas de polimorfismos associados a antígenos de grupos sanguíneos variam entre as populações mundiais. O intenso processo de migração que ocorre no Brasil desde a sua colonização contribui para que a população brasileira tenha um elevado percentual de miscigenação. Isto faz com que haja uma variação nas frequências de diversos antígenos eritrocitários na população podendo ocasionar em uma variedade de tipos

sanguíneos raros. Conhecer os possíveis impactos desta miscigenação no perfil antigênico da população é de grande relevância, pois permite o direcionamento nos esforços para elaboração de estratégias para a busca de doadores raros.

O presente estudo tem a proposta de conhecer a demanda no sistema hemoterápico de Minas Gerais para hemocomponentes com fenótipos raros, e buscar estratégias para a caracterização de doadores e pacientes com fenótipos eritrocitários raros, bem como avaliar o impacto da ancestralidade genômica e da aplicação da raça/cor autodeclarada na triagem de doadores raros.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Disponibilizar para a Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas ferramentas baseadas em biologia molecular que possam auxiliar na identificação e caracterização de doadores e pacientes com fenótipos eritrocitários raros.

3.2 Objetivos específicos

1- Descrever a demanda e a disponibilidade de sangue raro, relacionado à ausência de antígenos de alta frequência, na rede hemoterápica pública de Minas Gerais.

2- Disponibilizar para a Fundação Hemominas testes de biologia molecular para identificação de fenótipos eritrocitários raros em pacientes e doadores de sangue utilizando amostras individuais e agrupadas.

3- Avaliar a frequência de alelos raros dos sistemas Diego (*DI*A*) e Dombrock (*DO*HY*) em doadores de sangue de Minas Gerais.

4- Avaliar o impacto da ancestralidade genômica e da aplicação da raça/cor autodeclarada na triagem de doadores raros utilizando como modelo os alelos *DO*HY* (Sistema Dombrock) e *DI*A* (Sistema Diego).

5- Aplicar testes de biologia molecular para auxiliar na elucidação de casos complexos em imuno-hematologia de pacientes, envolvendo fenótipos raros.

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi executado no laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas, localizado no Hemocentro de Belo Horizonte (HBH), com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) mediante ao cadastro na base nacional e unificada de registros de pesquisas envolvendo seres humanos (Plataforma Brasil) (números de aprovação CAAE 43237415.8.0000.5118 e CAAE 99318818.0.0000.5118).

As amostras biológicas manipuladas no estudo não ocasionaram nenhum incômodo extra ou prejuízo ao doador ou paciente, visto que o material de estudo foi coletado no ato da doação de sangue em doadores ou exames de rotina em pacientes.

A oferta e a demanda de sangue raro, relacionada à ausência de antígenos de alta frequência, foram descritas para a rede hemoterápica pública de Minas Gerais. As informações referem-se aos últimos 5 anos.

Novas técnicas de genotipagem por PCR em tempo real para alelos *DI*A* e *DI*B* do sistema Diego e *DO*HY* do sistema Dombrock foram desenvolvidas visando o aperfeiçoamento das técnicas que haviam sido previamente padronizadas na Fundação Hemominas (SILVA, 2018). Essas técnicas foram utilizadas para estimar a frequência dos alelos *DI*A*, *DI*B* e *DO*HY* em doadores de sangue de Minas Gerais.

A genotipagem desses alelos foi utilizada como modelo para avaliar a viabilidade do uso da PCR em tempo real em amostras agrupadas para triar doadores raros na Fundação Hemominas, bem como para avaliar a utilidade da aplicação da raça/cor autodeclarada de doadores de sangue na triagem de doadores raros na população de Minas Gerais.

Paralelamente, técnicas moleculares foram padronizadas e aplicadas na resolução de casos complexos em imuno-hematologia envolvendo pacientes com suspeita de aloimunização contra antígenos de alta frequência. Tais casos envolviam anticorpos dos sistemas Gerbich, Vel, Duffy e Diego.

4.1 População e amostras

Doadores de sangue

Amostras de 57 doadores de sangue com genótipos *DI*A/DI*B* conhecidos foram utilizadas na padronização da nova técnica de genotipagem dos alelos de *DI*A* e *DI*B* do

sistema Diego por PCR em tempo real, sendo 30 amostras DI^*B/DI^*B , 25 DI^*A/DI^*B e 2 DI^*A/DI^*A . Além disso, amostras de 47 doadores de sangue com o genótipo conhecido para o alelo DO^*HY foram utilizadas na padronização da nova técnica de genotipagem do alelo DO^*HY do sistema Dombrock por PCR em tempo real, sendo 30 DO/DO , 15 DO/DO^*HY e 2 DO^*HY/DO^*HY , sendo que DO foi usado para indicar o alelo selvagem, ou seja, associado à presença do antígeno Hy.

As técnicas padronizadas foram utilizadas para genotipar 175 doadores de sangue da Fundação Hemominas. Adicionalmente, 282 doadores foram genotipados utilizando as técnicas previamente descritas por Silva em 2018. Desta forma, um total de 457 doadores de diferentes Unidades da Fundação Hemominas (FH) foram genotipadas para pesquisar a frequência dos alelos DI^*A e DI^*B do sistema Diego e DO^*HY do sistema Dombrock em Minas Gerais. Essas amostras eram originárias de biorrepositórios de estudos anteriores e foram coletadas nas seguintes Unidades: Uberlândia, Uberaba, São João del Rei, Ponte Nova, Patos de Minas, Montes Claros, Manhuaçu, Juiz de Fora, Ituitaba, Governador Valadares, Divinópolis, Diamantina e Belo Horizonte (Figura 1).

Dados de raça/cor autodeclaradas dos doadores foram obtidos a partir do banco de dados da FH. Esses dados seguiram o padrão do Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE), no qual o indivíduo pode escolher dentre as opções de raça/cor: preta, parda, branca, indígena ou amarela. Além disso, para 282 doadores a estimativa de ancestralidade genômica individual estava disponível. Essa estimativa havia sido obtida em um estudo prévio (SILVA-MALTA, 2010) com base em dados de genotipagem de 54 marcadores informativos de ancestralidade, utilizando o método de agrupamento bayesiano desenvolvido por PRITCHARD (2000) e implementado no software STRUCTURE v2.2.3 (HUBISZ *et al.*, 2009; PRITCHARD, STEPHENS e DONNELLY, 2000).

Para a padronização da genotipagem em amostras agrupadas, foram utilizados pools de cinco amostras selecionadas. Para o sistema Diego foram utilizados 10 pools contendo cinco amostras DI^*B/DI^*B e 10 pools contendo quatro amostras DI^*B/DI^*B e uma amostra DI^*A/DI^*B . Para o alelo DO^*HY foram utilizados 10 pools contendo cinco amostras negativas para esse alelo (DO/DO) e 10 pools contendo 4 amostras selvagens, ou seja, com ausência do alelo DO^*HY e uma amostras em heterozigota (DO^*HY/DO).

Além disso, testes de repetitividade foram realizados por meio da avaliação, em triplicata, de 6 pools para cada sistema (3 pools com presença e 3 pools com ausência dos alelos raros de interesse).

Por fim, amostras de 58 doadores de sangue previamente fenotipados como Di(a+) pela CIH, utilizando o método de aglutinação em coluna (gel-teste) e soro humano não comercial foram genotipadas para buscar doadores raros com fenótipo raro Di(a+b-).

Figura 1- Unidades regionais da Fundação Hemominas. Unidades localizadas em Uberlândia, Uberaba, São João del Rei, Ponte Nova, Patos de Minas, Montes Claros, Manhuaçu, Juiz de Fora, Ituiutaba, Governador Valadares, Divinópolis, Diamantina e Belo Horizonte tiveram amostras incluídas neste estudo.



Fonte: Fundação Hemominas

Pacientes

Amostras de sete pacientes com suspeita de anticorpos irregulares contra antígenos de alta frequência nos testes realizados pela CIH foram avaliadas. Familiares desses pacientes também foram avaliados, quando disponíveis, para auxiliar na busca de doadores compatíveis.

4.2 Purificação de DNA

O procedimento para a purificação de DNA genômico foi realizado através da utilização do kit PURE LINK GENOMIC DNA (INVITROGEN), seguindo orientações do fabricante, conforme abaixo descrito.

Um total de 200µL de *Buffy Coat* da amostra a ser estudada foi colocada em um microtubo de 1,5 mL ao qual foram adicionados 20µL de solução de Proteinase K previamente reconstituída e 20µL de RNase. A mistura obtida foi homogeneizada e incubada por 2 minutos em temperatura ambiente. Logo após, uma quantidade de 200µL de tampão de lise (*PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer*) foi acrescida na solução, a qual foi homogeneizada e incubada por 15 minutos a 55°C no banho seco. Após esta etapa, foram adicionados 200µL de Etanol 100% na solução e o tubo foi agitado em vórtex até a obtenção de uma mistura homogênea. O lisado obtido foi transferido para uma coluna (*PureLink® Spin Column*) e centrifugado a 10.000 x g por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado e a coluna de centrifugação foi posta em um novo tubo coletor (*PureLink® Collection tube*). Um volume de 500 µl de Tampão de Lavagem 1 preparado com etanol foi adicionado à coluna, a qual foi centrifugada a 10.000xg por 1 minuto a temperatura ambiente. Após a eliminação do produto contido no tubo coletor, foram adicionados 500µL de tampão de lavagem 2 preparado com etanol à coluna, a qual foi centrifugada a 14.000xg por 3 minutos à temperatura ambiente. Depois da centrifugação, a coluna foi alocada em um microtubo estéril de 1,5 ml, e 50µL de tampão de eluição (*PureLink® Genomic Elution Buffer*) foram a ela adicionados. Após incubação em temperatura ambiente por 1 minuto, foi realizada a centrifugação a 14.000xg por 3 minutos à temperatura ambiente. O DNA purificado permaneceu no microtubo e a coluna foi descartada.

O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare) e diluído em água deionizada até obter a concentração de 50ng/µL. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da utilização.

4.3 Preparo de amostras de DNA agrupadas

Para a genotipagem em amostras agrupadas, 10µL de DNA genômico (50ng/µL) de cinco amostras foram transferidos para um tubo limpo, constituindo assim um pool de cinco

doadores. Os pools de amostras foram utilizados na padronização da genotipagem dos alelos *DI*A/DI*B* e *DO*HY* por PCR em tempo real em amostras agrupadas.

4.4 Análises moleculares

4.4.1 Genotipagem de alelos dos sistemas Diego (*DI*A* e *DI*B*) e Dombrock (*DO*HY*) por PCR/RFLP

A técnica de PCR/RFLP foi utilizada para análise das amostras controle empregadas na etapa de padronização e validação da genotipagem dos alelos *DI*A/DI*B* e *DO*HY*. Este procedimento foi realizado visando a comparação dos resultados obtidos com a PCR em tempo real.

Além disso, a PCR/RFLP também foi empregada para confirmação dos resultados da genotipagem por PCR em tempo real, no caso da identificação de doadores portando alelos raros (*DO*HY* ou *DI*A*).

Em todas as reações foram utilizados controles com genótipos previamente conhecidos. Com a concordância das amostras controles, os resultados das demais amostras eram aceitos.

Genotipagem dos alelos *DI*A* e *DI*B* do sistema Diego por PCR/RFLP

O protocolo utilizado para a genotipagem dos alelos *DI*A* e *DI*B* do sistema Diego por PCR-RFLP foi descrito por Baleotti *et al.* (2003) e adaptado.

A reação continha um volume final de 20µL por amostra, sendo constituída por 100ng de DNA genômico, Tampão de PCR fornecido no kit (1x), 1,5mM de MgCl₂, 100nM de cada um dos primers (sequências mostradas na Tabela 1), 200µM de dNTPs e 0,8U de GoTaq Hot Start Polymerase (Promega). O modelo do termociclador utilizado foi o Veriti® ThermalCycler (AppliedBiosystems), com a programação de termociclagem estabelecida por: fase inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com a fase de extensão final de 72°C por 10 minutos.

O produto obtido no procedimento anterior foi submetido à fase de restrição, na qual foram utilizados, para cada amostra, 8µL do produto de PCR, CutSmart Buffer 1x e 10U da

Enzima *MSP I* (New England BioLabs), totalizando um volume de 25µL. Esta mistura foi incubada por 37°C para restrição e por 30 minutos.

Os produtos de restrição foram submetidos ao procedimento de eletroforese em gel de agarose 2% e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo. Como resultado da ação da enzima, amostras com genótipo *DI*A/DI*A* apresentam um fragmento (149pb), amostras *DI*A/DI*B* apresentam três fragmentos (149, 79 e 70pb) e amostras *DI*B/DI*B*, dois fragmentos (79 e 70pb).

Genotipagem do alelo *DO*HY* do sistema Dombrock por PCR/RFLP

Para a realização da técnica de genotipagem por PCR/RFLP do Alelo *DO*HY* do sistema Dombrock, foi seguido o método previamente descrito por Piassi (2010) e adaptado.

A reação continha um volume final de 20µL por amostra, sendo composta por 100ng de DNA genômico, Tampão para PCR fornecido no kit (1x), 3,5mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 0,8 U de GoTaq Hot Start Polymerase (Promega) e 100 nM de cada um dos primers. As sequências dos primers encontram-se na Tabela 1. O termociclador utilizado foi do modelo Veriti® ThermalCycler (AppliedBiosystems), com a programação de termociclagem estabelecida por: fase inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 20 segundos, 58°C por 20 segundos e 72°C por 10 segundos, com a fase de extensão final de 72°C por 10 min.

O produto obtido foi submetido à fase de restrição, no qual se utilizou, para cada amostra, 10µL do produto de PCR, Anza 1X Buffer e 10U da Enzima de restrição *Anza 118 BseDI* (ThermoFisher, USA), gerando um volume total de 20µL. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C para restrição e, em seguida, por mais 20 minutos a 80°C para inativação da enzima.

Os produtos da fase de restrição foram submetidos ao procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e visualizados sob luz ultra-violeta após coloração com brometo de etídeo. Devido ao resultado da ação da enzima, amostras homocigotas para o alelo *DO*HY* (SNP323T) apresentam dois fragmentos de 212 e 8pb, amostras que não possuem o alelo *DO*HY* geram três fragmentos de tamanhos 120, 92 e 8pb, enquanto amostras heterocigotas apresentam os fragmentos de 212, 120, 92 e 8pb.

Tabela 1 - Sequências de primers para análise molecular dos alelos dos sistemas Diego (PCR-RFLP), Dombrock (PCR-RFLP), Vel (PCR-RFLP), Gerbich (PCR-Alelo específico e GAP-PCR), e Duffy (PCR-RFLP)

Sistema	Alelo	Primers
Diego	<i>DI*A/DI*B</i>	EX18S: 5'-TGGCGCATGCACTTATTCAC-3' EXTOR: 5'-TTCCTGAAGATGAGCGGCAG-3'
Dombrock	<i>DO*HY/DO</i>	DoX2F: 5'-TCAGTACCAAGGCTGTAGCA-3' Do378R: 5'-AGTAAAGTCAGAATGAACATTGCTGCACAAT-3'
Vel		LOC388588-3: 5'-CTGGAGTGTGCTGGAAGGA -3' LOC388588-5: 5'-AGAGAGGAGGCTGTAGCTG-3'
Gerbich		GYPC-i1-124F: 5' GGTGCACCACACTGTCTC -3' GYPC-e2+24R: 5' AGTATGCATTGTGGTGGAGGC-3' GYPC-i2-3059F: 5' CCTTGCTTTGAACCTGAGCCAC-3' GYPC-i2-2528R: 5'AGAGGGGTGGGGAAGTACAGTGTAAG-3' GYPC-e3+151F: 5' GGATGGCAGAATGGAGACCT-3' GYPC-i3+148R: 5' TTTACCCAGGGCTAGACTCC-3' GYPC-i2-2526F: 5' TGACCCCTCCTGAGCAGCCTT-3' GYPC-i3-675R: 5'CATACCCAGGACTGAACCTCGT-3'
Duffy	<i>FYBES/FYB</i> <i>FY*A/FY*B</i>	FYN1 5'-CAAGGCCAGTGACCCCCATA-3' FYN2 5'-CATGGCACCGTTTGGTTCAG-3' FYAB1 5'-TCCCCCTCAACTGAGAACTC-3' FYAB2 5'-AAGGCTGAGCCATACCAGAC-3'

Fonte: Baleotti *et al.*(2003), Piassi (2010), Ballif *et al.*(2013), Gourri *et al.* (2017) e Rios *et al.* (2000).

4.4.2 Genotipagem dos alelos (*DI*A* e *DI*B*) do sistema Diego por PCR em Tempo Real

A genotipagem dos alelos *DI*A* e *DI*B* por PCR em tempo real foi realizada por dois protocolos. O primeiro protocolo foi recentemente desenvolvido na Fundação Hemominas e descrito por Silva (2018).

Embora este protocolo (Protocolo 1) apresentasse reações sensíveis e reprodutíveis para amostras individuais, havia a necessidade de aperfeiçoamento do método visando sua aplicação à genotipagem de amostras agrupadas.

Desta forma um novo protocolo foi padronizado no presente estudo (Protocolo 2).

Protocolo 1 – alelos *DI*A/DI*B*

O Protocolo 1 foi descrito por Silva (2018). Nesse protocolo foi utilizada uma reação com volume final de 20 µL contendo o reagente TaqMan Genotyping Master Mix (Thermo Fisher) 1X, com 200nM dos primers DIAB-RT-F e DIAB-RT-R, 200nM da sonda DI-PA2-FAM, 100nM da sonda DI-PB-VIC e 100ng de DNA genômico. O equipamento empregado para a PCR em Tempo Real foi o ABI 7500 Fast (AppliedBiosystems, Foster City, CA), com o programa de termociclagem constituído de: fase inicial a 60°C por 1 minuto, 95°C durante 10 minutos, seguida por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 64°C por 60 segundos, com a fase de extensão final de 60°C por 60 segundos. As sequências dos primers e sondas são apresentados na Tabela 2.

Este protocolo foi padronizado para a avaliação de amostras individuais.

Protocolo 2 - alelos *DI*A/DI*B* (novo protocolo)

Um segundo protocolo foi desenvolvido no presente estudo a partir de uma modificação do protocolo anterior. Para isto a sonda utilizada para identificação do alelo *DI*A* foi redesenhada e uma nova reação foi padronizada. Neste protocolo foi utilizado o reagente Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Thermo Fisher) com 160nM dos primers DIAB-RT-F e DIAB-RT-R, 80nM das sondas DI-PA5-FAM e DI-PB-VIC, 500nM de ROX Reference Dye, 4mM de MgCl₂ e 100ng de DNA genômico (de uma amostra individual ou de um pool de 5 amostras), gerando um volume final de 25µL. O equipamento utilizado para a PCR em Tempo Real foi o ABI 7500 Fast (AppliedBiosystems, Foster City, CA), com o programa de termociclagem constituído de: fase inicial a 60°C por 1 minuto, 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 64°C por 60 segundos, com a fase de extensão final de 60°C por 60 segundos. Sequências dos primers e sondas são apresentadas na tabela 2.

A avaliação desta nova técnica foi realizada por meio dos testes de concordância, precisão e sensibilidade analítica.

O teste de concordância foi realizado por meio da comparação dos resultados do novo método de genotipagem por PCR em tempo real com a técnica de PCR/RFLP convencional já descrita em literatura (BALEOTTI *et al.*, 2003). Para esta etapa foram utilizadas 57 amostras, sendo 30 amostras *DI*B/DI*B*, 25 *DI*A/DI*B* e 2 *DI*A/DI*A*.

O teste de precisão foi realizado por meio da análise dos valores de coeficiente de variação para os *Cycle threshold* (*Ct*) das curvas de amplificação de amostras genotipadas em triplicada sob o mesmo momento de experimento (teste intra-ensaio) e em momentos diferentes (teste inter-ensaio), ou seja, analisando a repetitividade e reprodutibilidade. Foram utilizadas nesta etapa cinco amostras *DI*A/DI*B*, cinco amostras *DI*B/DI*B* e uma *DI*A/DI*A*.

O teste de sensibilidade analítica foi realizado através de uma avaliação do limite mínimo de detecção, identificado por meio de uma diluição seriada do DNA genômico. Para isto foram feitas diluições em série (1:10) do DNA genômico purificado de uma amostra heterozigota *DI*A/DI*B*. As concentrações de DNA avaliadas foram de 100ng a 1pg de DNA. Esses testes foram realizados em duplicata.

Este protocolo pode ser utilizado tanto para amostras individuais quanto para amostras agrupadas.

4.4.3 Genotipagem do alelo *DO*HY* do sistema Dombrock por PCR em Tempo Real

A genotipagem do alelo *DO*HY* por PCR em tempo real foi realizada por dois protocolos. O primeiro protocolo foi recentemente desenvolvido na Fundação Hemominas e descrito por Silva (2018). Assim como descrito para a genotipagem do sistema Diego, embora a técnica previamente desenvolvida (Protocolo 1) fosse adequada para a genotipagem de amostras individuais, não era aplicável à avaliação de amostras agrupadas. Assim, um novo protocolo foi desenvolvido, a partir da modificação do protocolo anterior (Protocolo 2 – alelo *DO*HY*).

Protocolo 1 - alelo *DO*HY*

Este protocolo foi desenvolvido por Silva, 2018. Neste protocolo foram utilizados 100ng de DNA genômico, em uma reação com volume final de 20µL contendo o reagente Taqman Genotyping Master Mix Kit (1x), 250nM dos primers *DOHY-RT-F* e *DOHY-RT-R*, 400nM da sonda *DOHY-P1-FAM* e 100nM da sonda *DOHY-P2-VIC*, gerando um volume final de 20µL. As sequências dos primers e sondas se encontram na Tabela 2. O procedimento foi realizado no equipamento ABI 7500 Fast (AppliedBiosystems, Foster City, CA), com a programação: fase inicial a 60°C por 1 minuto, 95°C por 10 minutos, seguida por 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 62°C por 60 segundos e a fase de extensão final a 60°C por 60 segundos.

Este protocolo foi padronizado para a avaliação de amostras individuais.

Protocolo 2 - alelo *DO*HY* (novo protocolo)

Um segundo protocolo foi desenvolvido a partir da modificação do protocolo anterior. Neste novo protocolo foi utilizado o reagente Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Thermo Fisher) com 160nM dos primers DOHY-F e DOHY-R, 80nM das sondas DOHY-P1 e DOHY-P2, 500nM de ROX Reference Dye, 6mM de MgCl₂ e 100ng de DNA genômico (de uma amostra individual ou de um pool de cinco amostras), gerando um volume final de 25µL. O equipamento utilizado para a PCR em Tempo Real foi o ABI 7500 Fast (AppliedBiosystems, Foster City, CA). O procedimento da termociclagem para este protocolo foi o mesmo citado anteriormente no protocolo 1 do alelo *DO*HY*.

O teste de concordância foi realizado por meio da comparação dos resultados do novo método de genotipagem por PCR em tempo real com a técnica de PCR/RFLP convencional já descrita em literatura (PIASSI, 2010). Para esta etapa foram utilizadas 47 amostras, sendo 30 amostras homozigotas para o alelo selvagem, 15 amostras heterozigotas para o alelo *DO*HY* e duas amostras homozigotas raras *DO*HY/DO*HY*.

Teste analisando a repetitividade e reprodutibilidade foram realizados através da observação dos valores de coeficiente de variação para os *Cycle threshold (Ct)* das curvas de amplificação de amostras genotipadas em triplicada sob o mesmo momento de experimento (teste intra-ensaio) e em momentos diferentes (teste inter-ensaio) de cinco amostras homozigotas para o alelo selvagem (*DO/DO*), três amostras heterozigotas para o alelo (*DO/DO*HY*) e uma amostras homozigota *DO*HY/DO*HY*.

O teste de sensibilidade analítica foi realizado através de uma avaliação do limite mínimo de detecção, identificado por meio de uma diluição seriada do DNA genômico. Para isto foram feitas diluições em série (1:10) do DNA genômico purificado de uma amostra heterozigota *DO*HY/DO*. As concentrações de DNA avaliadas foram de 100ng a 1pg de DNA. Esses testes foram realizados em duplicata.

Este protocolo pode ser utilizado tanto para amostras individuais quanto para amostras agrupadas.

Tabela 2 - Sequência de primers e sondas utilizados para a genotipagem de alelos do sistema Diego e Dombrock por PCR em tempo real.

Sistema	Primers e sondas	Sequências (5' - 3')
Diego	DIAB-F	5'-AAGACCTGGCGCATGCA-3'
	DIAB-R	5'-GCGGCACAGTGAGGATGAG-3'
	DI-PA2	5'-FAM-AAGTCCACGCTGGC-3'
	DI-PA5*	5'-FAM-TGAAGTCCACGCTGGC-3'
	DI-PB	5'-VIC-TGAAGTCCACGCCGG-3'
Dombrock	DOHY-F	5'-AAAAGACATAGAAGCCCAGAAGAATT-3'
	DOHY-R	5'-CAGCGTGTGTGGTAGTCATGTTC-3'
	DOHY-P1	5'-FAM-TGGCTTAACCAAGTAA-3'
	DOHY-P2	5'-VIC-TTAACCAAGGAAAAGTTCTA-3'

Fonte: Silva (2018).* Sonda DI-PA5 desenhada para o presente estudo.

4.4.4 Análise molecular do sistema Vel

A análise molecular do sistema Vel foi realizada por meio do método de PCR/RFLP descrito por Ballif e colaboradores (2013). Nesta reação foram utilizados 100ng de DNA genômico, 0,8U de GoTaq Hot Start Polymerase (Promega), 1x colorless GoTaq Flexi buffer, 3,5 mM de MgCl₂, 200 nM de primers e 200 µM de dNTPs, totalizando um volume de 20 µL por amostras. As sequências dos primers são mostradas na Tabela 1. O termociclador utilizado foi do modelo Veriti® ThermalCycler (AppliedBiosystems), com a programação de termociclagem: fase inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos e 58°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos, com a fase de extensão final de 72°C por 3 minutos.

Na fase de restrição foram utilizados 5µL do produto de PCR, NEBuffer 1X e 15U da enzima Sty1, totalizando um volume final de 20µL por amostra. A reação foi incubada a 37°C por 20 minutos e inativada a 65°C por 20 minutos.

O produto de restrição foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% a 90 volts por 3 horas e visualizado sob luz ultravioleta após coloração em brometo de etídeo.

4.4.5 Análise molecular do sistema Gerbich

Para a análise molecular de variantes do sistema Gerbich foi empregado o método de descrito por Gourri *et al.* (2017), baseado em PCR alelo-específica e Gap-PCR. O método de Gap-PCR utiliza primers projetados para flanquear uma deleção conhecida. Estes primers são apenas capazes de gerar um produto de PCR se a deleção aproximar as sequencias flanqueadoras (LAM *et al.*, 2013). Embora o método de Gourri *et al.* (2017) propusesse a realização de 15 reações de PCR para discriminar os subtipos de variante (Yus1, Yus2, Yus3, Yus4, Gerbich1, Gerbich2 e Gerbich3), optamos por selecionar apenas 4 reações que são suficientes para discriminação das variantes em duas classes: Yus (GE-2, 3, 4) e Gerbich (GE -2, -3, 4): PCRs 3, 4, 6 e 13 (GOURRI *et al.*, 2017).

Neste método foi utilizado o reagente QIAGEN Multiplex PCR Master (1X), 800nM de cada primers e 100 ng de DNA genômico, resultando um volume total de 25µL por amostra. As sequências dos primers estão descritas na Tabela 1. O termociclador utilizado foi do modelo Veriti® ThermalCycler (AppliedBiosystems), com a programação de: fase inicial a 95°C por 15 minutos, seguida de 5 ciclos a 94°C por 20 segundos e 70°C por 60 segundos, 10 ciclos a 94°C por 20 segundos, 65°C por 60 segundos, 72°C por 45 segundos além de mais 20 ciclos a 94°C por 20 segundos, 61°C por 50 segundos, 72°C por 45 segundos, com a fase de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos foram submetidos ao procedimento de eletroforese em gel de agarose 2% e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo.

4.4.6 Análise molecular do sistema Duffy

Para análise do sistema Duffy, foram utilizados protocolos para avaliação dos alelos *FY*A*, *FY*B* e *FY*BES* descritos por Rios e colaboradores em 2000 (RIOS *et al.*, 2000) e adaptados.

Análise dos alelos *FY*B* e *FY*A* por PCR/RFLP

A genotipagem *FY*B/FY*A* foi realizada por meio de reação contendo 100ng de DNA genômico, 1x colorless GoTaq Flexi buffer, 1,5mM de MgCl₂, 100nM de cada primer (descritos na tabela 1), 200 µM de dNTP, 0,8U de GoTaq Hot Start Polymerase (Promega), gerando um

volume final de 20µL. O termociclador utilizado foi do modelo Veriti® Thermal Cycler (AppliedBiosystems), com a programação de: fase inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com a fase de extensão final de 72°C por 10 min.

Para a fase de restrição foram utilizados 8µL do produto de PCR, 1 x FastDigest Buffer, e 1 µL da Enzima BstI (BshNI) Fast-Digest (ThermoFisher), gerando o volume final de 25µL por amostra. A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos e inativada a 65°C por 20 minutos. O produto de restrição foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com um protocolo de corrida de 80 volts por 90 minutos e visualizado sob luz ultravioleta após coloração em brometo de etídeo. Para o genótipo *FY*A/FY*A* são esperados três fragmentos (210, 96 e 86 pb), para *FY*A/FY*B*, quatro fragmentos (306, 210, 96 e 86pb), e para *FYB/FYB*, dois fragmentos (306 e 86pb).

Análise do alelo *FY*BES* por PCR/RFLP

Para este ensaio foram utilizados 100ng de DNA genômico, 1x colorless GoTaq Flexi buffer, 1,5mM de MgCl₂, 100nM de cada primer (descritos na tabela 1), 200 µM de dNTP, 0,8U de GoTaq Hot Start Polymerase (Promega), resultando em uma reação com um volume de 20µL. O termociclador utilizado foi do modelo Veriti® Thermal Cycler (AppliedBiosystems), com a seguinte programação: fase inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com a fase de extensão final de 72°C por 10 min.

Na fase de restrição foram utilizados 5µL do produto de PCR, 1 x Reaction Buffer B3 e 15U da Enzima StyI (Jena Bioscience) gerando o volume final de 25µL por amostra. A solução foi incubada a 37°C por 20 minutos e inativada a 65°C por 20 minutos. O produto de restrição foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com um protocolo de corrida de 80 volts por 90 minutos e visualizado sob luz ultravioleta após coloração em brometo de etídeo. Para o genótipo *FYB/FYB* são esperados dois fragmentos (108 e 81pb), para *FYB/FYBES* quatro fragmentos (108, 81, 61 e 20pb) e para *FYBES/FYBES* três fragmentos (108, 61 e 20pb) (RIOS, CHAUDHURI, *et al.*, 2000).

4.5 Análise estatística

As frequências observadas dos alelos *DI*A* e *DI*B* do sistema *Diego* e alelo *DO*HY* do sistema *Dombrock* em Minas Gerais foram comparadas com as outras populações brasileiras e mundiais utilizando o teste exato de Fisher, adotando o nível de significância de 5%. A Correção de Bonferroni para comparações múltiplas foi utilizada.

4.6 Avaliação da demanda e da disponibilidade de hemocomponentes com fenótipos raros em Minas Gerais

A avaliação da demanda e da disponibilidade de hemocomponentes com fenótipos raros relacionados à fenótipos negativos para antígenos de alta frequência em Minas Gerais foi realizada por meio de contato direto com a Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas (CIH). Para isto, foram realizadas entrevistas com os especialistas e consultas nos registros do setor.

5 RESULTADOS

5.1 Demanda e disponibilidade de hemocomponentes com fenótipos raros

Através de entrevistas com especialista da CIH e consultas internas dos registros, foi possível elaborar um levantamento acerca da demanda e da disponibilidade de hemocomponentes com fenótipos raros na rede hemoterápica pública de Minas Gerais nos últimos 5 anos.

Demanda

Foi observada a demanda na FH para os seguintes fenótipos raros: Hy-, Rh Null, Bombay, Gerbich (Ge -2), Di(a+b-), U-, Vel-, K null, PP1Pk-.

Disponibilidade

A lista de doadores informada pela CIH da Fundação Hemominas ao Cadastro Nacional de Doadores Raros até 2018 foi: U- (5 doadores), U variante (5 doadores), Rh Null (1 doador), Hy- (3 doadores), Gerbich (Ge -2) (1 doador). Outros doadores identificados, mas ainda não informados ao Cadastro Nacional não foram incluídos nesse estudo.

5.2 Genotipagem para os alelos *DI*A* e *DI*B* em amostras individuais

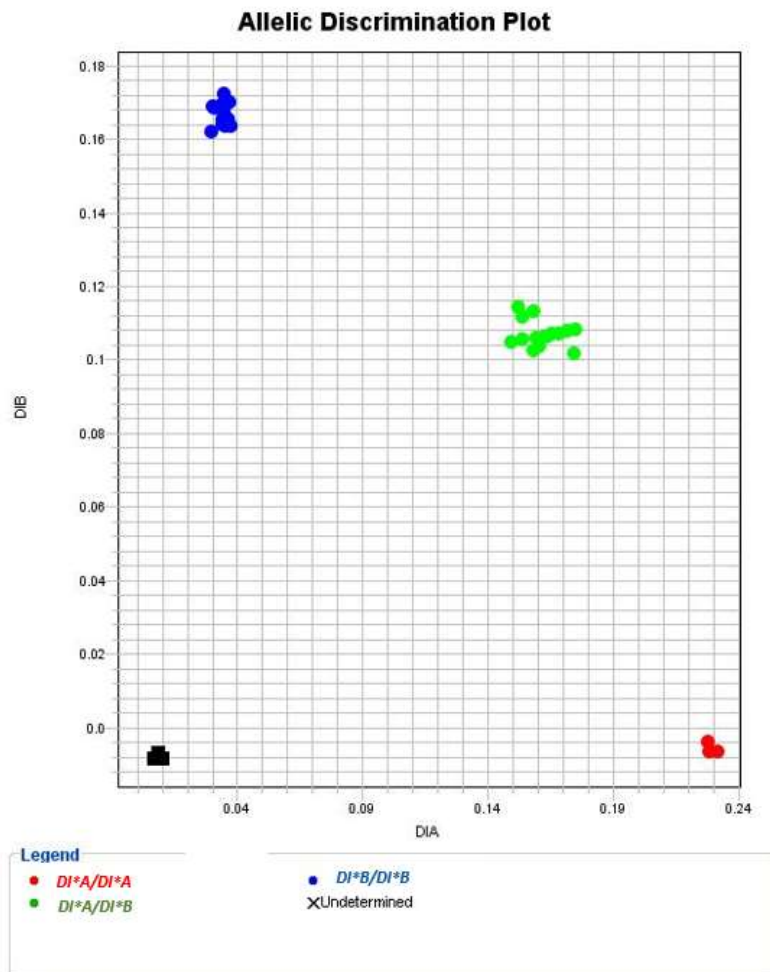
Uma técnica de genotipagem por PCR em tempo real para alelos *DI*A* e *DI*B* foi padronizada visando sua aplicação na análise tanto de amostras individuais quanto em pools.

Para amostras individuais, comparando os resultados do novo método com a técnica de PCR/RFLP descrita na literatura, houve 100% de concordância. Os coeficientes médios de variação para o *Ct* nos testes intra-ensaio foram de 0,59% para *DI*A*, 0,29% para *DI*B*. Para os testes inter-ensaio, os coeficientes médios de variação foram de 0,69% para *DI*A*, 1,59% para *DI*B*.

O teste permitiu que o programa gerasse automaticamente a discriminação alélica das amostras genotipadas, como mostrado na Figura 2.

A Figura 3, por sua vez, mostra os padrões de amplificação para amostras de diferentes genótipos.

Figura 2- Discriminação alélica obtida através da técnica PCR em Tempo Real para análise dos alelos *DI*A* e *DI*B* do sistema Diego com a nova técnica (protocolo 2), para amostras individuais.

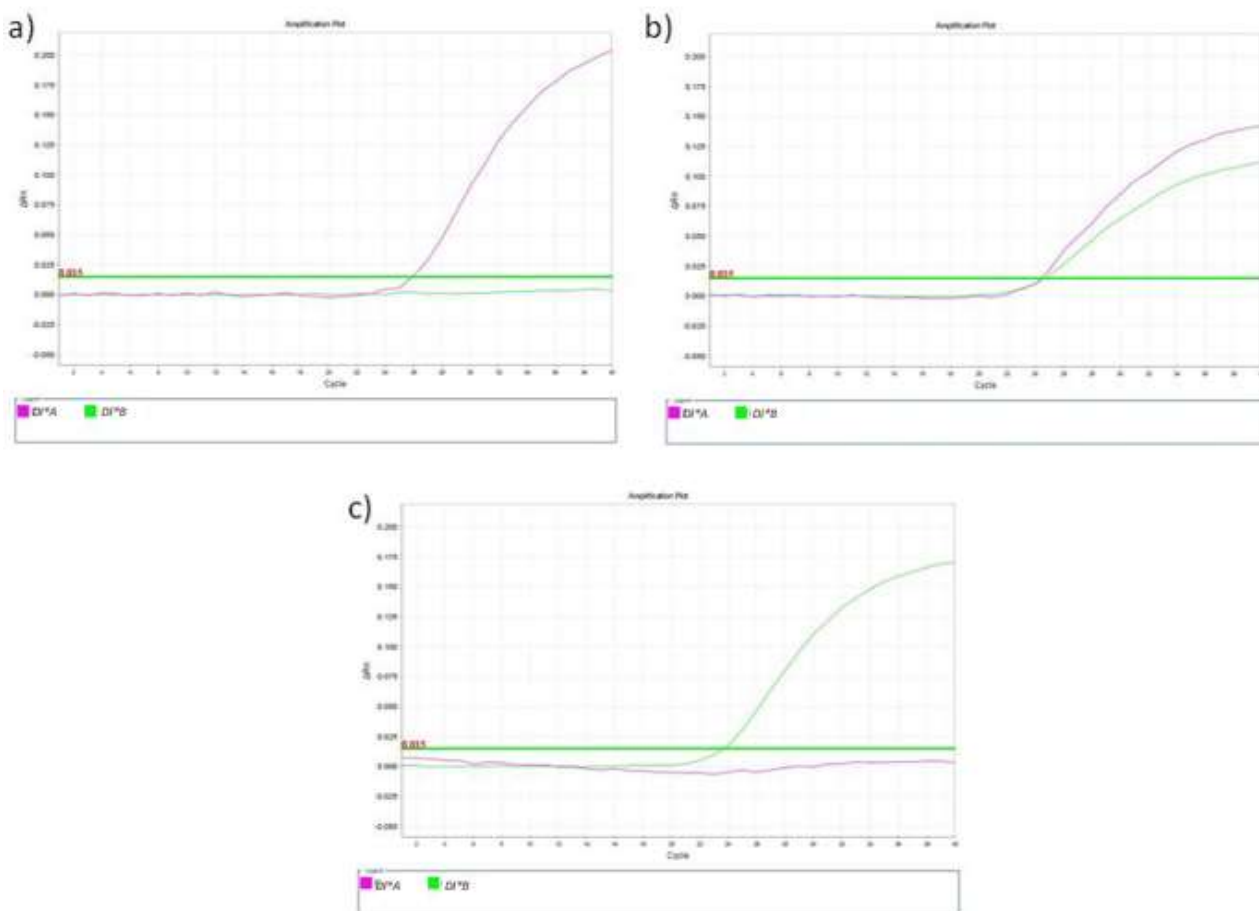


Fonte: Autoria própria (2019).

O limite mínimo de detecção, identificado por meio de uma diluição seriada do DNA genômico de amostras em duplicata, foi de 100pg de DNA genômico para o alelo *DI*A* e 10pg para o alelo *DI*B*.

Figura 3 - Resultados da genotipagem por PCR em Tempo Real para o alelo *DI*A* e *DI*B* do sistema Diego utilizando o protocolo 2 descrito neste estudo, para amostras individuais – Curvas de amplificação. A curva de amplificação na cor fúcsia corresponde amplificação do alelo *DI*A*, a representada em verde corresponde a amplificação do alelo *DI*B*. a) Amostra

homozigota apresentado o genótipo DI^*A/DI^*A . b) Amostra heterozigota apresentado o genótipo DI^*A/DI^*B . c) Amostra homozigota apresentado o genótipo DI^*B/DI^*B .



Fonte: Autoria própria (2019).

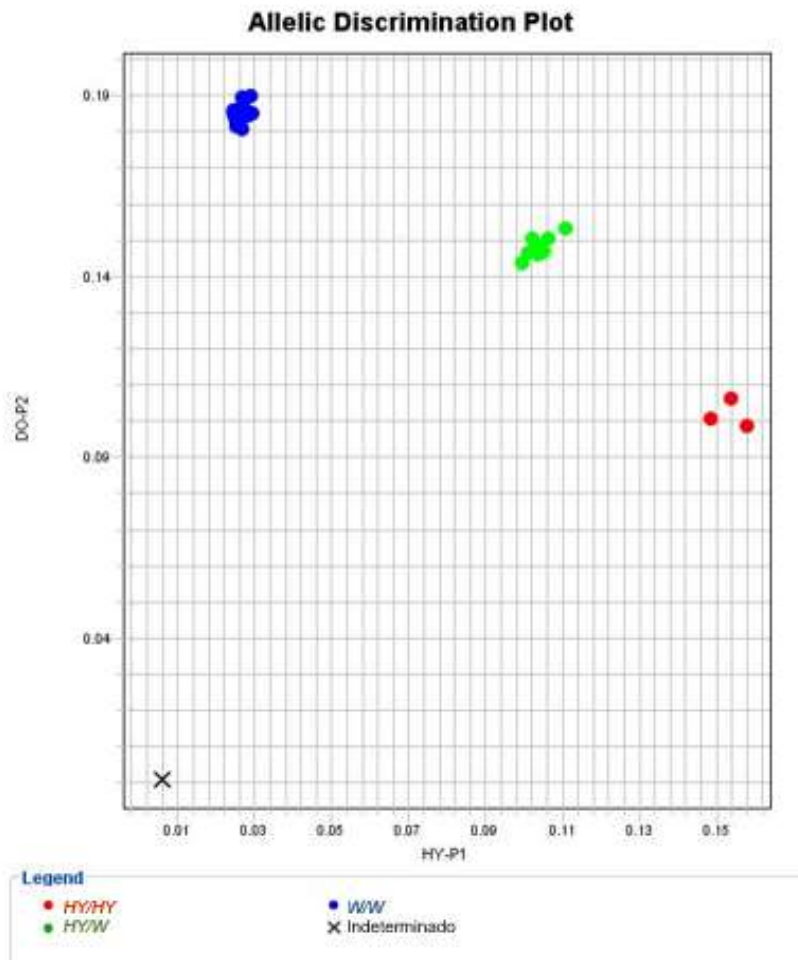
5.3 Genotipagem para o alelo DO^*HY em amostras individuais

Um novo protocolo para PCR em tempo real para alelo DO^*HY foi padronizado visando sua aplicação na análise tanto de amostras individuais quanto em pools.

Para amostras individuais, comparando os resultados do novo método com a técnica de PCR/RFLP descrita na literatura, houve 100% de concordância. Os coeficientes médios de variação para os Ct na genotipagem do alelo DO^*HY foram de 0,42% nos testes intra-ensaio e 0,69% nos testes inter-ensaio.

O ensaio padronizado permitiu que o programa gerasse automaticamente a discriminação alélica das amostras genotipadas, como mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Discriminação alélica obtida através da técnica PCR em Tempo Real para análise do alelo DO^*HY do sistema Dombrock com a nova técnica (protocolo 2), para amostras individuais. HY: alelo DO^*HY , W: alelo selvagem (DO).

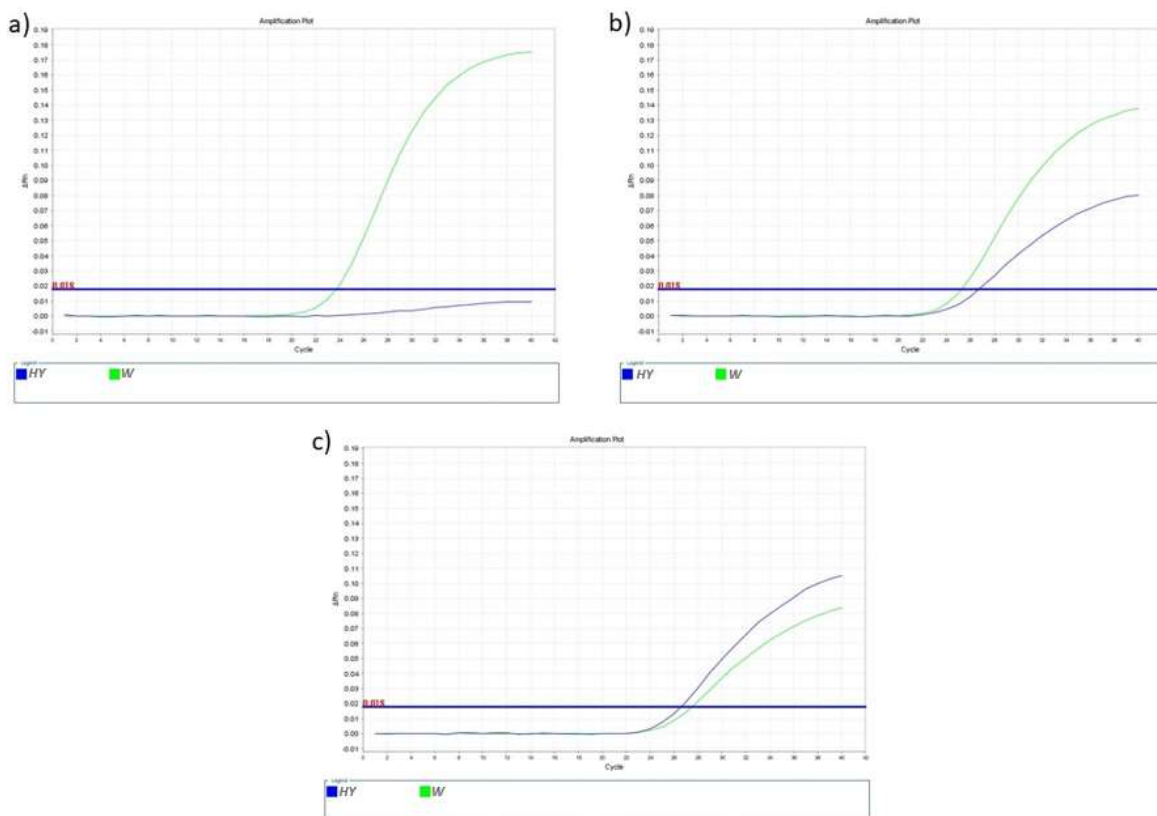


Fonte: Autoria própria (2019).

O limite mínimo de detecção, identificado por meio de uma diluição seriada do DNA genômico de amostras em duplicata, foi de 100pg de DNA genômico para o alelo DO^*HY .

A Figura 5 mostra os padrões de amplificação para amostras de diferentes genótipos.

Figura 5 - Resultados da genotipagem por PCR em Tempo Real para o alelo DO^*HY do sistema Dombrock utilizando o protocolo 2 descrito neste estudo, para amostras individuais. A curva de amplificação na cor verde corresponde amplificação do alelo selvagem, a representada em azul corresponde a amplificação do alelo DO^*HY . HY: alelo DO^*HY , W: alelo selvagem (DO). a) Amostra homocigota selvagem. b) Amostra heterocigota. c) Amostra homocigota para o alelo DO^*HY .



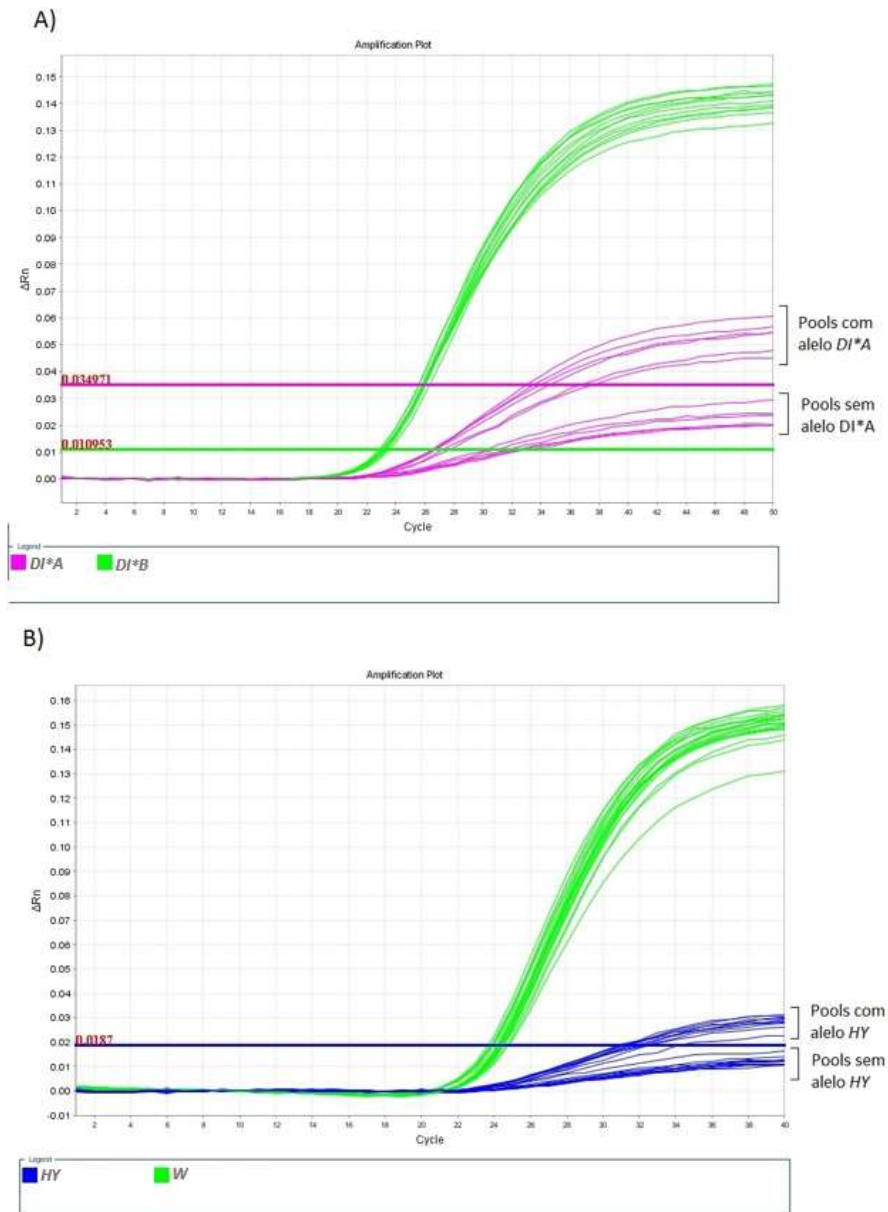
Fonte: Autoria própria (2019).

5.4 Genotipagem dos alelos DI^*A/DI^*B e DO^*HY em amostras agrupadas

A genotipagem dos alelos DI^*A/DI^*B e DO^*HY em amostras agrupadas foi padronizada com sucesso. Total concordância foi observada na genotipagem desses alelos utilizando amostras individuais ou agrupada em pools de cinco amostras, conforme demonstrado na Figura 6.

Além disso, as genotipagens em pool apresentaram resultados concordantes na avaliação em triplicada.

Figura 6 - Resultados da genotipagem por PCR em Tempo Real em amostras agrupadas para os alelos *DI*A* e *DI*B* do sistema Diego (A) e *DO*HY* do sistema Dombrock (B) em pools de cinco amostras - Curvas de amplificação. Na figura A, em verde está representado a curva de amplificação do alelo *DI*B* e em fúcsia o alelo *DI*A* e na figura B, em verde está representado a curva de amplificação do alelo do tipo selvagem e em azul o alelo *DO*HY*.



Fonte: Autoria própria (2019).

5.5 Frequência dos alelos *DI*A*, *DI*B* e *DO*HY* em Minas Gerais

As frequências dos alelos *DI*A*, *DI*B* e *DO*HY* foram obtidas a partir da genotipagem de 457 doadores (Tabela 3), sendo 282 amostras foram genotipadas com a metodologia descrita por Silva *et al.* (2018) e 175 amostras com os protocolos descritos neste estudo.

Os resultados revelaram que 10/457 (2,19%) doadores apresentaram o genótipo *DI*A/DI*B*, que indica uma frequência alélica de 1,02% para *DI*A*. Indivíduos homocigotos *DI*A/DI*A* não foram observados. Diferenças significativas foram observadas comparando as frequências desses alelos em Minas Gerais em relação a algumas populações nativas americanas ou ao grupo de brasileiros descendentes de japoneses (Tabela 3), o que está de acordo com estudos anteriores que relataram a frequência diferenciada de *DI*A* em populações ameríndias e asiáticas.

Um total de 12/457 (2,63%) doadores apresentaram o genótipo *DO*HY/DO* e um doador apresentou o genótipo homocigoto *DO*HY/DO*HY* (0,22%) que está associado ao raro fenótipo raro Hy-, o que indica uma frequência alélica de 1,53% para *DO*HY*. O indivíduo homocigoto mencionado foi identificado no trabalho de Silva (2018), durante a padronização da genotipagem *DO*HY* (protocolo 1) e integrou um dos biorrepositórios usados neste trabalho. Diferenças significativas foram observadas comparando as frequências do alelo *DO*HY* em Minas Gerais em relação a populações africanas, o que está em concordância com a origem deste alelo (Tabela 3).

5.6 Análise molecular de indivíduos fenotipados como Di(a+) na Fundação Hemominas

A Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas realiza a fenotipagem para o antígeno Di^a através da metodologia de hemaglutinação em coluna (gel-teste) utilizando soro humano não comercial. Para avaliar a ocorrência do fenótipo raro Di(a+b-) entre esses doadores, 58 amostras de indivíduos previamente fenotipados como Di(a+) foram genotipadas por PCR em Tempo Real para avaliar a presença de doadores com o genótipo *DI*A/DI*A*, associado ao fenótipo raro Di(a+b-). No entanto, todas as amostras avaliadas apresentaram o genótipo heterocigoto *DI*A/DI*B*.

Tabela 3 – Comparações das frequências dos alelos *DI*A/DI*B* e *DO*HY* em Minas Gerais com outras populações brasileiras e mundiais.

	Populações do projeto 1000 Genomas						Populações brasileiras						
	Alelos						Alelos						
	<i>DO*HY</i>			<i>DI*A/DI*B</i>			<i>DO*HY</i>			<i>DI*A/DI*B</i>			
	G	T	p	C	T	P	G	T	p	C	T	p	
Africanas							Populações urbanas						
ACB	174	18	0.0001	192	0	0.2255	Minas Gerais*	900	14		904	10	
ASW	115	7	0.0075	121	1	1.0000	Minas Gerais ¹	527	13	0.2347	-	-	-
ESN	190	8	0.0417	198	0	0.2241	Brasil/ PCR ²	571	5	0.3458	-	-	-
GWD	213	13	0.0007	226	0	0.2256	Brasil/BeadChip ²	322	2	0.2643	-	-	-
LWK	185	13	0.0002	198	0	0.2241	São Paulo ³	599	11	0.6856	597	13	0.1325
MSL	166	4	0.5077	170	0	0.3773	São Paulo ⁴	791	9	0.5319	790	10	0.8239
YRI	198	18	< 0.0001	216	0	0.2236	Santa Catarina ⁵	-	-	-	725	21	0.0108
Americanos misturados							Paraná ⁶	-	-	-	491	11	0.1116
CLM	186	2	1.000	181	7	0.0159	Brasil ⁷	-	-	-	8495	157	0.1422
MXL	127	1	1.000	122	6	0.0086	Marília ⁸	-	-	-	183	3	0.4700
PEL	170	0	0.1444	152	18	< 0.0001	Afro-descendentes ⁸	-	-	-	167	1	1.0000
PUR	206	2	0.7500	203	5	0.1724	Nipo-descendentes ⁸	-	-	-	132	10	< 0.001
Leste asiático							Ribeirão Preto ⁹	-	-	-	760	24	0.0049
CDX	186	0	0.1449	183	3	0.4700	Ribeirão Preto, Asia ⁹	-	-	-	95	1	1.0000
CHB	206	0	0.0863	200	6	0.0942	Ribeirão Preto, Brancos ⁹	-	-	-	27	1	0.2837
CHS	210	0	0.0857	204	6	0.0960	Populações indígenas						
JPT	208	0	0.0860	200	8	0.0097	Parakanãs ⁸	-	-	-	60	80	< 0.001
KHV	198	0	0.1491	195	3	0.7125	Parakanã ⁹	-	-	-	23	25	< 0.001
Europeus							Urubu Kapoor ⁹	-	-	-	19	1	0.2129
CEU	198	0	0.1491	198	0	0.2241	Cinta Larga ⁹	-	-	-	11	5	< 0.001
FIN	198	0	0.1491	198	0	0.2241	Suruí ⁹	-	-	-	20	0	1.0000
GBR	182	0	0.1442	182	0	0.3838							
IBS	214	0	0.0853	214	0	0.2234							
TSI	214	0	0.0853	214	0	0.2234							
Sul Asiático													
BEB	172	0	0.1441	170	2	1.000							
GIH	206	0	0.0863	206	0	0.2232							
ITU	204	0	0.0867	204	0	0.2233							
PJL	192	0	0.1466	192	0	0.2255							
STU	204	0	0.0867	204	0	0.2233							

* Presente estudo. Populações do projeto 1000 genomas - ACB: Afrodescendentes caribenhos de Barbados; ASW: Americanos Afrodescendentes no Sudeste dos EUA; ESN: Grupo étnico Esan da Nigéria; GWD: Indivíduos das divisões ocidentais na Gâmbia; LWK: Grupo étnico Luhya de Webuye, Quênia; MSL: Mende, Serra Leoa; YRI: Grupo étnico Ioruba de Ibadan, Nigéria; CLM: colombianos de Medellín, Colômbia; MXL: Descendentes de mexicano vivendo em Los Angeles EUA; PEL: Peruanos de Lima, Peru; PUR: porto-riquenhos de Porto Rico; CDX: Chineses Dai de Xishuangbanna, China; CHB: Chineses Han em Pequim, China; CHS: Chineses Han do Sul, China; JPT: japoneses de Tóquio, Japão; KHV: Grupo étnico Kinh da cidade de Ho Chi Minh, Vietnã; CEU: Residentes de Utah com Ancestrais da Europa Setentrional e Ocidental; FIN: Finlândia; GBR: britânicos na Inglaterra e na Escócia; IBS: População Ibérica da Espanha; TSI: Toscana, Itália; BEB: Grupo étnico bengali de Bangladesh; GIH: Grupo étnico indiano Gujarati, vivendo em Houston, Texas; ITU: Grupo étnico indiano Telugu vivendo no Reino Unido; PJL: Indianos Punjabi de Lahore, Paquistão; STU: Grupo étnico Tamil do Sri Lanka, vivendo no Reino Unido.

Os valores de p representam o resultado do teste exato de Fisher que compara a frequência da população mencionada com a frequência da população do presente estudo. Valores significativos encontram-se destacados em negrito. As letras G e T na coluna do alelo *DO*HY* representam as bases nitrogenadas Guanina e Timina, respectivamente. As letras C e T na coluna dos alelos *DI*A/DI*B* representam as bases nitrogenada citosina e timina, respectivamente. Fonte: 1000 Genomes Project (2015),* Presente estudo (2019) ¹ Piassi *et al.* (2010), ² Baleotti *et al.* (2006), ³ Latini *et al.* (2014), ⁴ Bianchi *et al.* (2016), ⁵ Costa *et al.* (2016), ⁶ Zacarias *et al.* (2016), ⁷ Novaretti *et al.* (2010), ⁸ Baleotti (2003), ⁹ Cozac (2004).

5.7 Ancestralidade genômica e autodeclarada e genótipos *DI*A* e *DI*B* e *DO*HY*

Os doadores genotipados para os alelos *DI*A/DI*B* e *DO*HY* (n=457) foram agrupados de acordo com a raça/cor autodeclarada, conforme apresentado na Tabela 4. Não foram observadas diferenças significativas nas frequências dos alelos *DI*A* e *DI*B* ($p=0,199$) e *DO*HY* ($p= 1,00$), comparando os grupos de raça/cor autodeclarados “branco” e “preto+pardo” (Tabela 4).

Em relação à ancestralidade genômica individual, foi observada ampla variação dos percentuais de ancestralidade africana e europeia nos indivíduos de diferentes genótipos (Figura 7). É interessante ressaltar que o único indivíduo com fenótipo raro *DO*HY/DO*HY* incluído neste estudo é autodeclarado branco e apresenta distribuição equilibrada de ancestralidades africana (43,5%) e europeia (46,3%) (Figura 7-C, indivíduo representado por um ponto verde), ainda que esse alelo seja característico de populações africanas (Tabela 3).

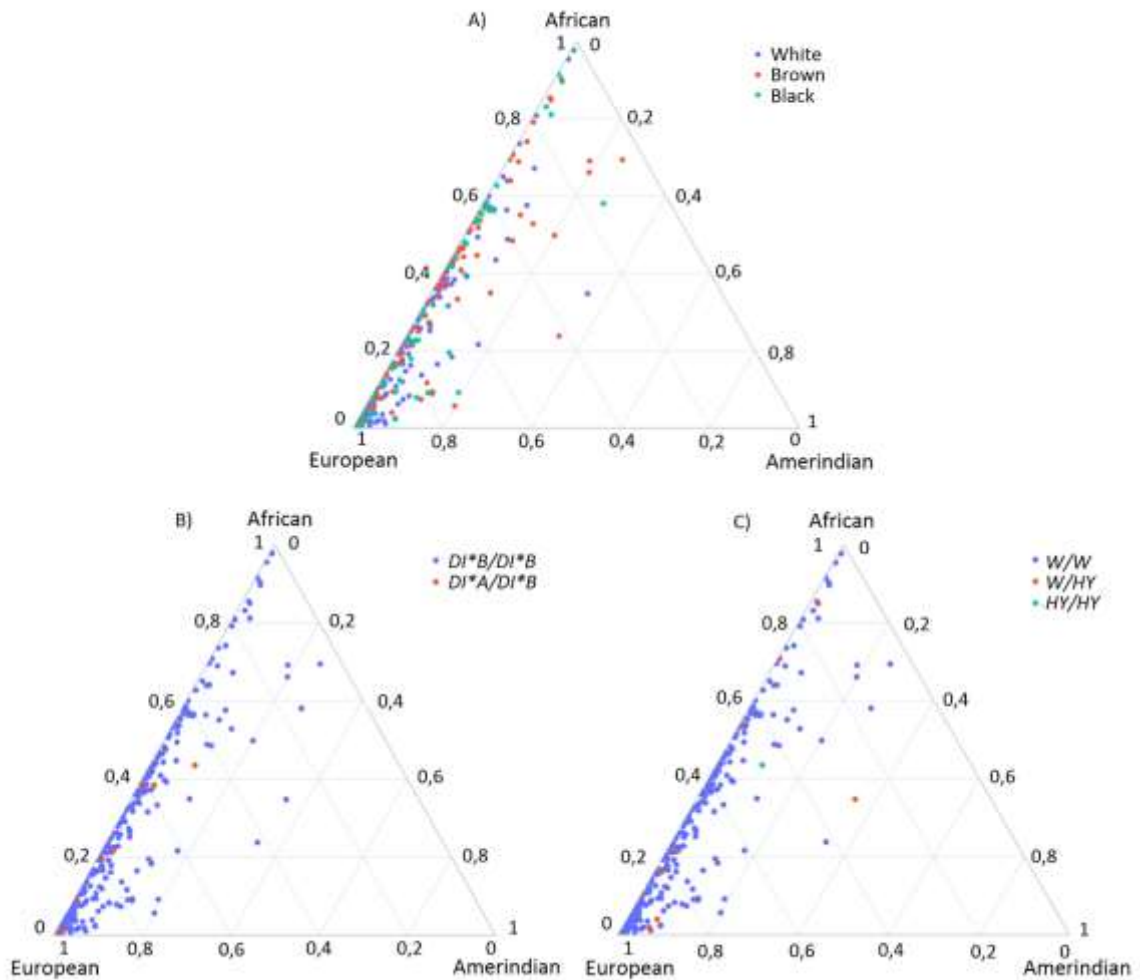
Além disso, observamos ampla variação de ancestralidade genômica dentre dos grupos classificados por raça/cor autodeclarada (Figura 7-A). A média da ancestralidade africana foi de 34,0% para pretos, 32,9% para pardos e 20,1% para brancos.

Tabela 4 - Frequência alélica de doadores para o sistema Diego (*DI*A* e *DI*B*) e Dombrock (*DO*HY*) em relação a cor autodeclarada.

	Cor/raça autodeclarada									
	Amarela		Branca		Parda		Preta		Total	
Sistema Diego										
Genótipo	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>DI*B/DI*B</i>	2	100	200	96.62	149	99.33	96	97.96	447	97.81
<i>DI*A/DI*B</i>	0	0	7	3.38	1	0.67	2	2.04	10	2.19
<i>DI*A/DI*A</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	2		207		150		98		457	100
Alelo	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>DI*A</i>	0	0	7	1.69	1	0.33	2	1.02	10	1.09
<i>DI*B</i>	4	100	407	98.31	299	99.67	194	98.98	904	98.91
Total	4		414		300		196		914	100
Sistema Dombrock										
Genótipo	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>DO/DO</i>	2	100	202	97.58	142	94.67	98	100.00	444	97.16
<i>DO/DO*HY</i>	0	0	4	1.93	8	5.33	0	0.00	12	2.63
<i>DO*HY/DO*HY</i>	0	0	1	0.48	0	0.00	0	0.00	1	0.22
Total	2		207		150		98		457	
Alelo	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>DO</i>	4	100	408	98.55	292	97.33	196	100	900	98.47
<i>DO*HY</i>	0	0	6	1.45	8	2.67	0	0	14	1.53
Total	4		414		300		196		914	100

Fonte: Autoria própria.

Figura 7 - Proporções de ancestralidade genômica individual africana, europeia e ameríndia em doadores de sangue de acordo com raça/cor autodeclarada (A) e os genótipos DI^*A/DI^*B (B) e DO^*HY (C). Figura gerada utilizando o programa Plotly Chart Studio (<https://plot.ly/create/#/>).



Fonte: Autoria própria.

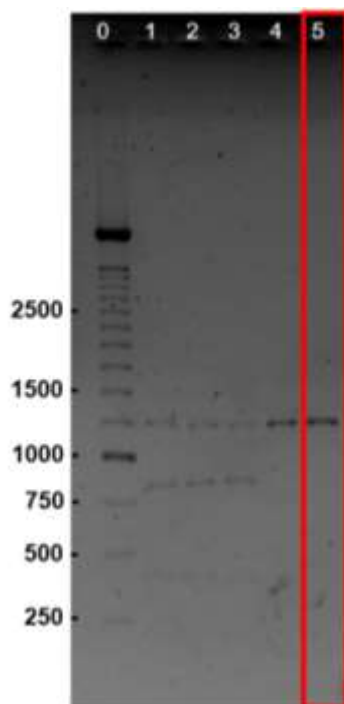
5.8 Resolução de casos complexos envolvendo fenótipos raros

A partir de outubro de 2018 foi iniciada a análise de pacientes com suspeita de fenótipo raro. No período do estudo, sete pacientes foram encaminhados pela CIH com informações a respeito dos testes realizados. A partir dessas informações, foi realizada revisão da literatura para buscar as bases genéticas do fenótipo sob suspeita e de testes moleculares descritos para sua confirmação. Abaixo é apresentada uma breve descrição dos resultados obtidos com análises desses casos.

5.8.1 Caso 1

Paciente do sexo feminino, com suspeita de possuir anticorpo anti-Vel. Foi realizada PCR/RFLP descrita por Ballif *et al.*, (2013). A paciente era homozigota para o alelo *SMIM1*64_80 del* (Fenótipo inferido: Vel-), confirmando a suspeita de anti-Vel (Figura 8).

Figura 8 - Gel de agarose 1% para análise do caso 1. Indivíduos que possuem a deleção de 17 nt no *SMIM1* não apresentam o sítio de restrição para a enzima Styl. Canaletas indicam (0) padrão de peso molecular 250pb, (1 a 3) amostras controle selvagens, (4) amostra controle Vel-, (5) amostra da paciente analisada (demarcada em vermelho). Os fragmentos esperados são 1200, 800 e 400 pb. O fragmento de 1200 pb indica a presença do alelo *SMIM1*64_80*, enquanto os fragmentos 800 e 400pb indicam a presença do alelo selvagem.

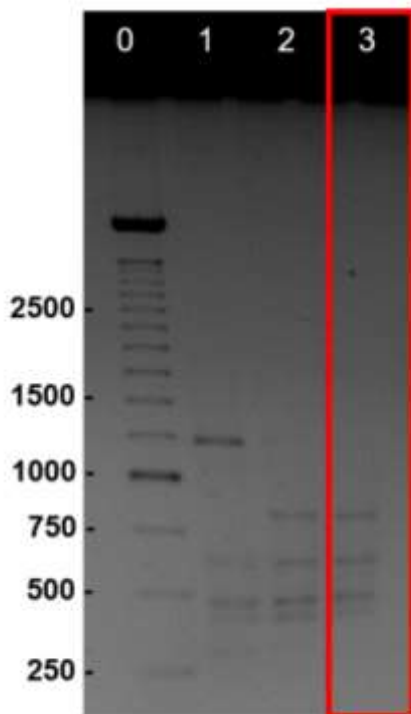


Fonte: Autoria própria

5.8.2 Caso 2

Paciente do sexo feminino, com suspeita de anticorpo anti-Vel. Foi realizada PCR/RFLP descrita por Ballif *et al.*, 2013. A paciente não apresentou o alelo *SMIM1*64_80 del* (Fenótipo inferido: Vel+), descartando a suspeita de anti-Vel (Figura 9).

Figura 9 - Gel de agarose 1% para análise do caso 2. Canaletas (0) Padrão de peso molecular 250pb, (1) amostras controle Vel-, (2) amostra controle Vel+, (3) amostra da paciente analisada (demarcada em vermelho). Os fragmentos esperados são de 1200, 800 e 400pb. O fragmento de 1200 pb indica a presença do alelo *SMIM1 * 64_80*, enquanto os fragmentos 800 e 400pb indicam a presença do alelo selvagem

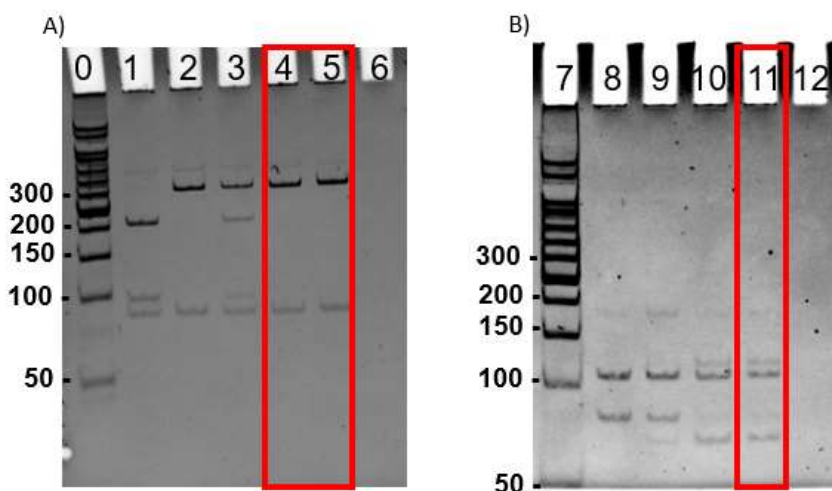


Fonte: Autoria própria

5.8.3 Caso 3

Paciente do sexo feminino, com suspeita de anti-Fy3. Foram realizadas as PCR/RFLP descritas por Rios *et al.*, 2000. Os resultados indicaram que a paciente era *FY*B/FY*B* e homocigota para a variante -33 T>C que impede que Fy^b seja expresso nas hemácias (Figura 10). Pacientes com este genótipo geralmente não desenvolvem anticorpo anti-Fy3. No entanto há raros casos descritos na literatura de pacientes nesta situação, sendo um deles sequenciado sem que outra alteração no gene fosse encontrada, o que sugere que diferenças conformacionais nas glicoproteínas expressas nos tecidos eritróides e não eritróides possam estar relacionadas a esses casos raros de aloimunização (FOLK, 2017; WENT *et al.*, 2009). Em caso de necessidade de transfusão, o paciente poderá receber hemocomponentes Fy(a-b-). Para fins acadêmicos, deverá ser investigada a presença de outras alterações genéticas que impedem a expressão dos antígenos do sistema Duffy.

Figura 10 - Resultado do Gel de poliacrilamida 8% para análise do caso 3. A- Análise dos alelos *FY*A* e *FY*B*. As canaletas revelam (0) o padrão de peso molecular 50pb, (1) amostra controle *FY*A/FY*A*, (2) amostra controle *FY*B/FY*B*, (3) amostra controle *FY*A/FY*B*, (4 e 5) amostra da paciente estudada em duplicata (demarcadas em vermelho) e (6) controle negativo (água). Os fragmentos 210, 96 e 86 pb, indicam a presença do alelo *FY*A*, enquanto a presença dos fragmentos de 306 e 86 pb indicam a presença do alelo *FY*B*. B- Análise do alelo *FY*BES*(-33 T>C). Canaletas indicam (7) o padrão de peso molecular 50pb, (8) amostra controle homocigota controle selvagem, (9) amostra heterocigota controle, (10) amostra controle homocigota para a variante -33 T>C, (11) amostra da paciente estudada (demarcada em vermelho), e (12) amostra controle negativo (água). Os fragmentos 108 e 81 pb indicam a presença do alelo selvagem, enquanto os fragmentos de 108, 61 e 20pb, sendo o último não possível de ser visualizado no gel de poliacrilamida, indicam a presença do alelo *FY*BES* (-33 T>C).

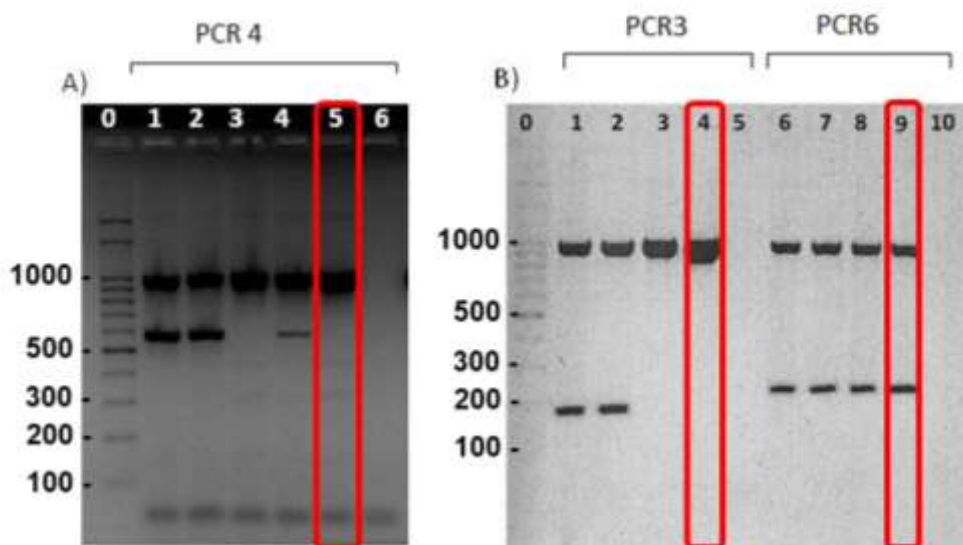


Fonte: Autoria própria

5.8.4 Caso 4

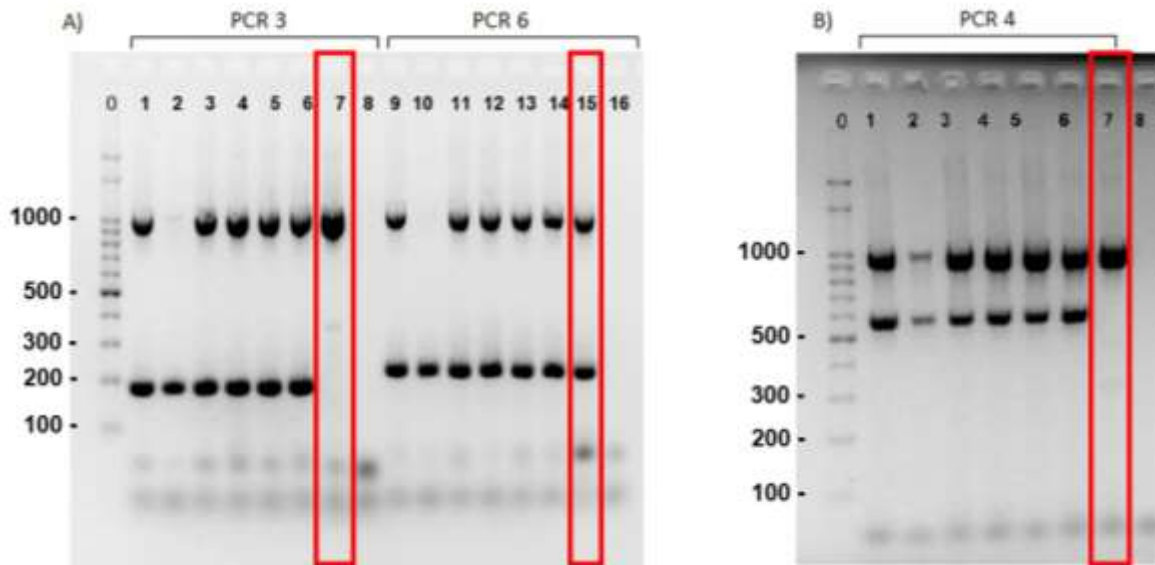
Paciente do sexo masculino, com fenótipo Ge-2 (teste realizado com soro humano não comercial) e suspeita de anticorpo anti-Gerbich. Foram realizadas as PCR 3, 4 e 6 descritas por Gourri *et al.*, 2017. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a matriz descrita no Quadro 1. Os resultados sugeriram um padrão de deleção compatível com a variante *YUS* (GE-2,3,4), confirmando a suspeita de aloimunização (Figura 11). Sete irmãos do paciente foram avaliados dos quais um também apresentou um padrão de deleção compatível com a variante *YUS* (Figura 12). No caso desse paciente e de seu irmão combinações dos subtipos da variante *YUS* (*Yus01*, *Yus02*, *Yus03* e *Yus04*) são possíveis, conforme pode ser visto no quadro 01, sendo que para todas essas combinações é esperado o fenótipo *Yus* (GE-2,3,4).

Figura 11- Resultado do gel de agarose 2% para análise do caso 4. A) As canaletas de 1 a 6 representam a PCR 4, sendo (0) padrão molecular 100pb, (1-2) amostras selvagens, (3) amostra controle *YUS/YUS*, (4) amostra paciente do caso 5 (ver a seguir) (5) amostra do paciente do caso 4 (demarcada em vermelho) e (6) controle negativo. B) As canaletas 1 a 5 são referentes a PCR 3, sendo (0) padrão molecular 100pb, (1-2) amostras selvagens, (3) amostra controle *YUS/YUS*, (4) amostra do paciente do caso 4 (demarcada em vermelho) e (5) controle negativo. As canaletas 6 a 10 são referentes à PCR 6, sendo (6-7) amostras selvagens, (8) amostra *YUS/YUS*, (9) amostra do paciente do caso 4 (demarcada em vermelho) e (10) controle negativo. As PCRs 3, 4 e 6 resultam em fragmentos de 185, 579 e 223pb, respectivamente. Em cada reação, o fragmento de 1000 pb refere-se à amplificação do controle interno da reação (GH1).



Fonte: Autoria própria

Figura 12 - Resultado do gel de agarose 2% para análise de familiares do caso 4. A) As canaletas de 1 a 8 representam a PCR 3, sendo (0) padrão de peso molecular 100 pb, (1 a 7) os irmãos do paciente em análise e (8) controle negativo (água). A canaletas de 9 a 16 representam a PCR 6 sendo (9 a 15) os irmãos do paciente aloimunizado e (16) controle negativo (água). B) As canaletas de 1 a 8 representam a PCR 4, sendo (0) padrão de peso molecular 100 pb, (1 a 7) os irmãos do paciente aloimunizado e (8) controle negativo (água). As PCRs 3, 4 e 6 resultam em fragmentos de 185, 579 e 223pb, respectivamente. Em cada reação, o fragmento de 1000 pb refere-se à amplificação do controle interno da reação (GH1). Os resultados demarcados em vermelho representam um único irmão que apresentou o mesmo padrão de amplificação do paciente do caso 4.



Fonte: Autoria própria

Quadro 1 - Matriz para interpretação dos resultados das PCR 3, 4, 6 e 13 elaborada a partir da adaptação da matriz proposta por Gourri *et al.* (2017). Destacados na cor laranja estão os possíveis genótipos que o paciente do caso 4 e um de seus irmãos podem apresentar, levando-se em consideração os padrões de amplificação observados nas PCR 3, 4 e 6 (a PCR 13 não foi realizada para a análise desse caso).

Genótipos		Resultado da PCR				Subtipo		Resultado da PCR			
		3	4	6	13			3	4	6	13
<i>wild-type</i>	<i>wild-type</i>	+	+	+	—	<i>Yus02</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	+	+
<i>wild-type</i>	<i>Yus01</i>	+	+	+	—	<i>Yus02</i>	<i>Gerbich02</i>	+	—	+	—
<i>wild-type</i>	<i>Yus02</i>	+	+	+	—	<i>Yus02</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	+	—
<i>wild-type</i>	<i>Yus03</i>	+	+	+	—	<i>Yus03</i>	<i>Yus03</i>	—	—	+	—
<i>wild-type</i>	<i>Yus04</i>	+	+	+	—	<i>Yus03</i>	<i>Yus04</i>	—	—	+	—
<i>wild-type</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	+	+	<i>Yus03</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	+	+
<i>wild-type</i>	<i>Gerbich02</i>	+	+	+	—	<i>Yus03</i>	<i>Gerbich02</i>	+	—	+	—
<i>wild-type</i>	<i>Gerbich03</i>	+	+	+	—	<i>Yus03</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	+	—
<i>Yus01</i>	<i>Yus01</i>	—	—	+	—	<i>Yus04</i>	<i>Yus04</i>	—	—	+	—
<i>Yus01</i>	<i>Yus02</i>	—	—	+	—	<i>Yus04</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	+	+
<i>Yus01</i>	<i>Yus03</i>	—	—	+	—	<i>Yus04</i>	<i>Gerbich02</i>	+	—	+	—
<i>Yus01</i>	<i>Yus04</i>	—	—	+	—	<i>Yus04</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	+	—
<i>Yus01</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	+	+	<i>Gerbich01</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	—	+
<i>Yus01</i>	<i>Gerbich02</i>	+	—	+	—	<i>Gerbich01</i>	<i>Gerbich02</i>	+	+	—	+
<i>Yus01</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	+	—	<i>Gerbich01</i>	<i>Gerbich03</i>	+	+	—	+
<i>Yus02</i>	<i>Yus02</i>	—	—	+	—	<i>Gerbich02</i>	<i>Gerbich02</i>	+	—	—	—
<i>Yus02</i>	<i>Yus03</i>	—	—	+	—	<i>Gerbich02</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	—	—
<i>Yus02</i>	<i>Yus04</i>	—	—	+	—	<i>Gerbich03</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	—	—

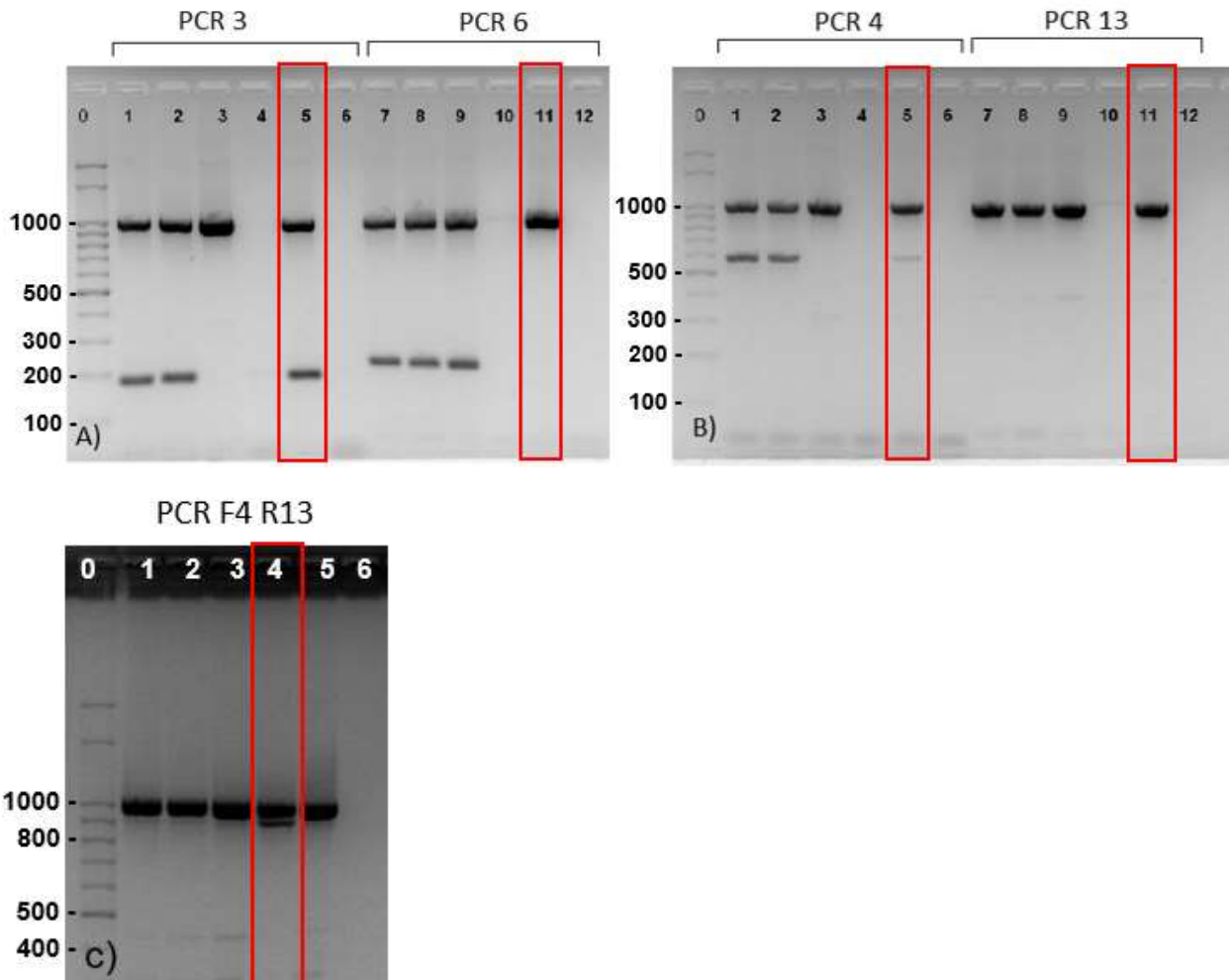
Fonte: Gourri *et al.* (2017)

5.8.5 Caso 5

Paciente do sexo feminino com a suspeita de anticorpo anti-Gerbich. Foram realizadas as PCR 3, 4, 6 e 13 descritas por Gourri *et al.* (2017). A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com o Quadro 1. Os resultados sugeriram um padrão de deleção compatível com a variante Gerbich 1 (Ge-2,-3,4) em homozigose, ou em heterozigose com Gerbich 2 ou Gerbich 3, reforçando a suspeita de aloimunização (Figura 13). No entanto, a amostra será sequenciada para verificar motivo da não amplificação na PCR específica para esta variante (PCR 13).

Uma reação adicional foi realizada utilizando primer F (forward) da PCR 4 e primer R (reverse) da PCR 13. De acordo com os estudos realizados nas sequências disponíveis para as variantes do sistema Gerbich, uma amplificação nesta reação só seria possível para amostras apresentando deleção semelhante à descrita para as variantes Gerbich 1 ou 2. Desta forma, o resultado positivo observado, reforça a hipótese de que trata-se de um paciente com este tipo de base genética.

Figura 13 - Resultado dos géis de agarose a 2% para análise do caso 5. A) As canaletas 1 a 6 mostram os resultados da PCR 3: (0) padrão de peso molecular 100 pb, (1 e 2) amostras controle selvagem, (3) Amostra controle YUS/YUS, (5) amostra da paciente analisada e (6) amostra controle negativo (água). As canaletas 7 a 12 mostram os resultados da PCR 6: (7 e 8) amostras controle selvagem, (9) amostra controle YUS/YUS, (11) amostra da paciente analisada e (12) amostra controle negativo (água). B) As canaletas 1 a 6 mostram os resultados da PCR 4: (0) padrão de peso molecular 100 pb, (1 e 2) amostras controle selvagem, (3) Amostra controle YUS/YUS, (5) amostra da paciente analisada e (6) amostra controle negativo. As canaletas 7 a 12 mostram os resultados da PCR 13: (7 e 8) amostras controle selvagem, (9) amostra controle YUS/YUS, (11) amostra da paciente analisada e (12) amostra controle negativo (água). C) Resultado da PCR utilizando primer *Foward* da PCR 4 e primer *Reverse* da PCR 13: (0) padrão de peso molecular 100 pb, (1 e 2) amostras controle selvagem, (3) Amostra controle YUS/YUS, (4) amostra da paciente estudada, (5) amostra controle GE-2 e (6) amostra controle negativo. Os resultados demarcados em vermelho são referentes da paciente do caso 5. As PCRs 3, 4, 6 e 13 resultam em um fragmento de 185, 579, 223 e 389pb, respectivamente. Em cada reação, o fragmento de 1000 pb refere-se à amplificação do controle interno da reação (GH1).



Fonte: Autoria própria

Quadro 2 - Matriz para interpretação dos resultados das PCR 3, 4, 6 e 13 elaborada a partir da adaptação da matriz proposta por Gourri *et al.* (2017). Os genótipos sombreados na cor laranja são os possíveis para o caso 5, considerando os padrões de amplificação das PCR 4, 5 e 6.

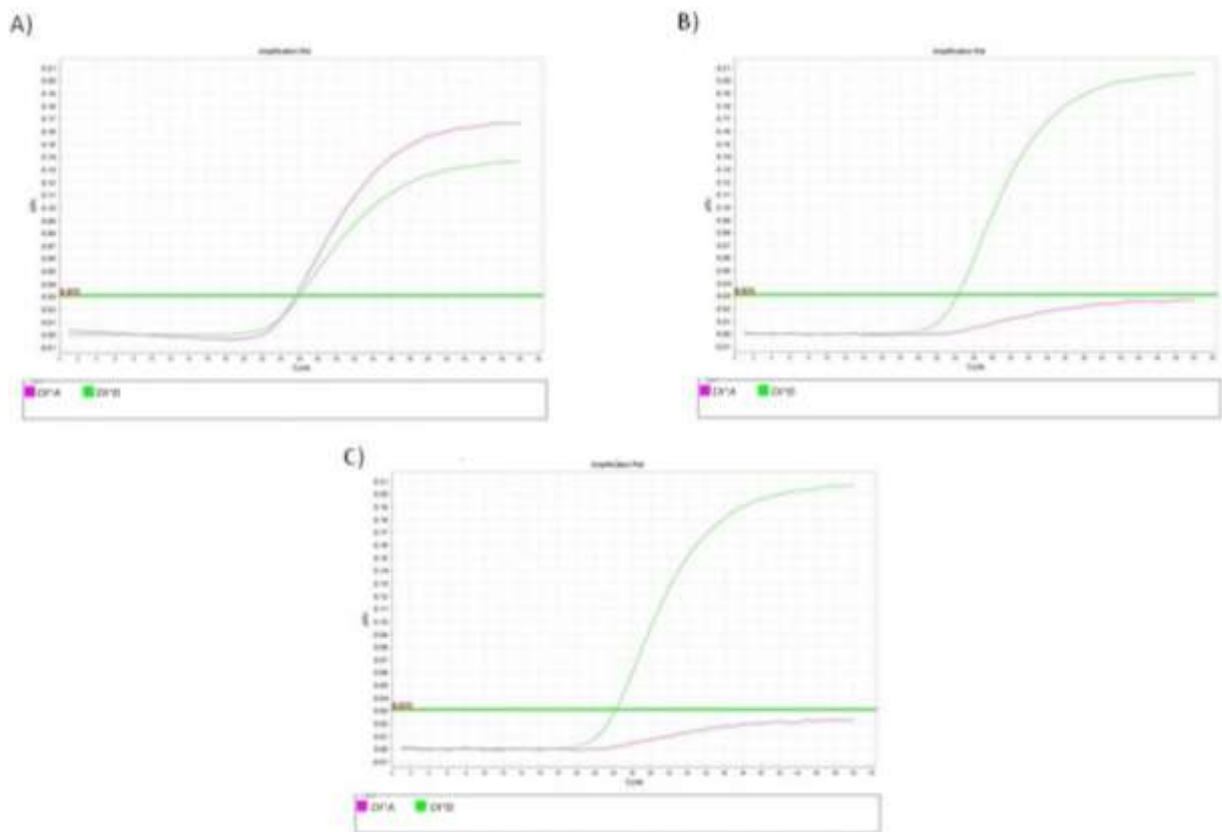
Subtipo		Resultado da PCR				Subtipo		Resultado da PCR			
		3	4	6	13			3	4	6	13
<i>wild-type</i>	<i>wild-type</i>	+	+	+	—	<i>Yus02</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	+	+
<i>wild-type</i>	<i>Yus01</i>	+	+	+	—	<i>Yus02</i>	<i>Gerbich02</i>	+	—	+	—
<i>wild-type</i>	<i>Yus02</i>	+	+	+	—	<i>Yus02</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	+	—
<i>wild-type</i>	<i>Yus03</i>	+	+	+	—	<i>Yus03</i>	<i>Yus03</i>	—	—	+	—
<i>wild-type</i>	<i>Yus04</i>	+	+	+	—	<i>Yus03</i>	<i>Yus04</i>	—	—	+	—
<i>wild-type</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	+	+	<i>Yus03</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	+	+
<i>wild-type</i>	<i>Gerbich02</i>	+	+	+	—	<i>Yus03</i>	<i>Gerbich02</i>	+	—	+	—
<i>wild-type</i>	<i>Gerbich03</i>	+	+	+	—	<i>Yus03</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	+	—
<i>Yus01</i>	<i>Yus01</i>	—	—	+	—	<i>Yus04</i>	<i>Yus04</i>	—	—	+	—
<i>Yus01</i>	<i>Yus02</i>	—	—	+	—	<i>Yus04</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	+	+
<i>Yus01</i>	<i>Yus03</i>	—	—	+	—	<i>Yus04</i>	<i>Gerbich02</i>	+	—	+	—
<i>Yus01</i>	<i>Yus04</i>	—	—	+	—	<i>Yus04</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	+	—
<i>Yus01</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	+	+	<i>Gerbich01</i>	<i>Gerbich01</i>	+	+	—	+
<i>Yus01</i>	<i>Gerbich02</i>	+	—	+	—	<i>Gerbich01</i>	<i>Gerbich02</i>	+	+	—	+
<i>Yus01</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	+	—	<i>Gerbich01</i>	<i>Gerbich03</i>	+	+	—	+
<i>Yus02</i>	<i>Yus02</i>	—	—	+	—	<i>Gerbich02</i>	<i>Gerbich02</i>	+	—	—	—
<i>Yus02</i>	<i>Yus03</i>	—	—	+	—	<i>Gerbich02</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	—	—
<i>Yus02</i>	<i>Yus04</i>	—	—	+	—	<i>Gerbich03</i>	<i>Gerbich03</i>	+	—	—	—

Fonte: Gourri *et al.* (2017)

5.8.6 Caso 6

Paciente do sexo feminino aloimunizada, com a suspeita de anticorpo anti-Di^b. Foi utilizada a técnica em PCR em Tempo Real descrita neste estudo para análise dos alelos *DI*A/DI*B* (protocolo 2). A paciente apresentou o genótipo *DI*B/DI*B*, excluindo o envolvimento de aloimunização anti-Di^b neste caso (Figura 14).

Figura 14 - Resultados de PCR em Tempo Real para análise do caso 6. Na figura está representada: (a) amostra controle da reação com o genótipo conhecido *DI*A/DI*B*, (b) amostra controle *DI*B/DI*B* e (c) amostra da paciente neste experimento. A amplificação do alelo *DI*A* está representada na cor fúcsia e do alelo *DI*B* está em verde.

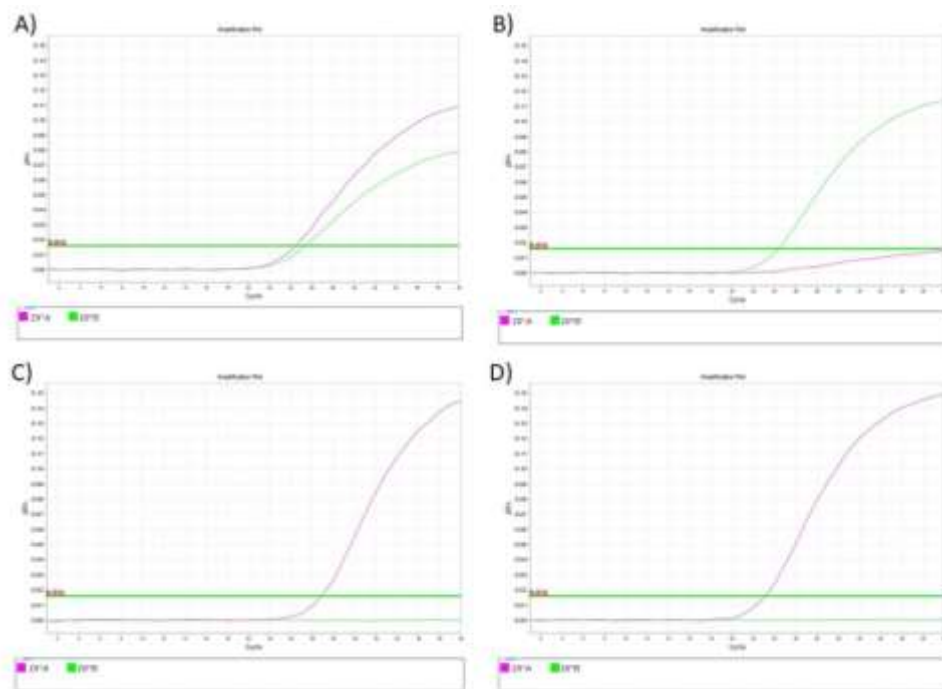


Fonte: Autoria própria

5.8.7 Caso 7

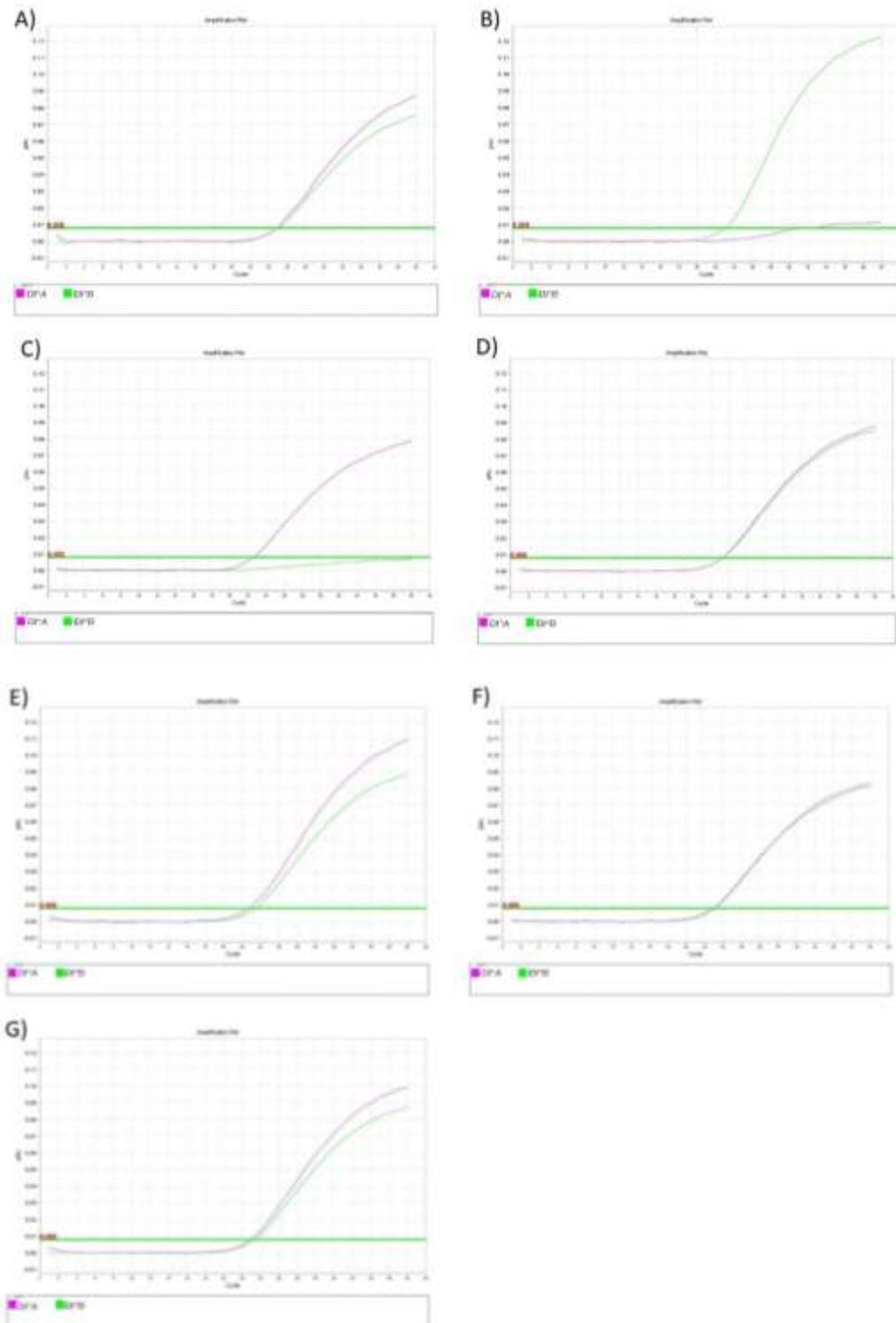
Paciente do sexo feminino aloimunizada, com a suspeita de possuir anticorpo anti-Di^b. Foi utilizada a técnica em PCR em Tempo Real descrita neste estudo para análise dos alelos *DI*A/DI*B*. O resultado indicou a ocorrência do genótipo *DI*A/DI*A*, associado ao fenótipo raro Di(a+b-), confirmando a suspeita de aloimunização anti-Di^b (Figura 15). Os irmãos da paciente foram convidados a fornecerem amostras visando a busca de doadores compatíveis. Todos os quatro irmãos avaliados eram heterozigotos *DI*A/DI*B* (Figura 16).

Figura 15 - Resultados de PCR em Tempo Real para análise do caso 7. Na figura estão apresentados os resultados das curvas de amplificação para a amostra controle *DI*A/DI*B* (a), amostra controle *DI*B/DI*B* (b), amostra controle *DI*A/DI*A* (c) e amostra da paciente (d). A curva de amplificação na cor fúcsia corresponde à amplificação do alelo *DI*A* e a representada na cor verde corresponde à amplificação do alelo *DI*B*.



Fonte: Autoria própria

Figura 16 - Resultados de PCR em Tempo Real para análise de familiares referentes ao caso 7. Na figura estão representadas (a) a amostra controle DI^*A/DI^*B , (b) a amostra controle DI^*B/DI^*B , (c) amostra controle DI^*A/DI^*A e (d-g) amostra dos irmãos da paciente referente ao caso 7. A curva de amplificação na cor fúcsia representa a amplificação do alelo DI^*A e em verde à amplificação do alelo DI^*B .



Fonte: Autoria própria

6 DISCUSSÃO

A caracterização adequada dos antígenos sanguíneos de pacientes portadores de fenótipos raros visando à compatibilização nas transfusões de hemocomponentes constitui um grande desafio para a medicina transfusional. A caracterização incorreta ou insuficiente desses indivíduos pode levar a transfusões incompatíveis, aumentando o risco de reações transfusionais. Quando a correta caracterização desses pacientes é alcançada, inicia-se outro grande desafio, que é encontrar doadores compatíveis.

Laboratórios de Imuno-hematologia geralmente empregam testes de hemaglutinação, nos quais são utilizados anticorpos específicos para identificação dos antígenos da superfície das hemácias (fenotipagem eritrocitária). Embora estes testes geralmente forneçam resultados satisfatórios, algumas limitações podem ser observadas. Nos casos de antígenos associados a fenótipos raros, muitas vezes os anticorpos necessários não são comercializados, estão disponíveis apenas em laboratórios de referência, ou mesmo podem apresentar baixa qualidade (PEYRARD, 2013).

Uma estratégia geralmente empregada para superar a falta de reagentes comerciais para determinação de fenótipos raros é a utilização de reagentes de origem humana (JUNGBAUER, 2009). Este procedimento é aceitável, sendo utilizado em laboratórios de imuno-hematologia de todo o mundo. No entanto, os reagentes de origem humana devem estar muito bem caracterizados, pois a utilização de antissoros caracterizados insuficientemente poderá levar a resultados incorretos colocando os pacientes em risco (DENOMME, 2013).

Com o avanço na Medicina transfusional, métodos alternativos têm sido desenvolvidos para auxiliar, sobretudo nas situações nas quais as técnicas sorológicas não podem ser aplicadas. Com o crescente conhecimento das bases genéticas dos antígenos eritrocitários tem tornado possível o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular as quais permitem a inferência de fenótipo de doadores e receptores de hemocomponentes a partir dos genótipos observados.

Diversas técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para a genotipagem de grupos sanguíneos, como PCR alelo-específica (SSP-PCR), PCR-RFLP, PCR em tempo real, microarranjos de DNA, espectrometria de massa e sequenciamento (MARTINS *et al.*, 2009; PEYRARD, 2013). Dentre essas técnicas, a PCR em Tempo Real tem se destacado em decorrência de sua execução fácil e rápida, alto potencial de automação e redução do risco de contaminação. Desta forma a PCR em tempo real tem sido cada vez mais utilizada na análise de grupos sanguíneos, incluindo aqueles relacionados a fenótipos raros (POLIN *et al.*,

2008; NOVARETTI *et al.*, 2010; DEZAN *et al.*, 2016). Além disso, a alta sensibilidade da técnica de PCR em tempo real tem possibilitado sua aplicação à genotipagem de amostras agrupadas (DEZAN *et al.*, 2016)

No presente estudo, foram padronizadas reações baseadas na técnica de PCR em tempo real para a genotipagem dos alelos *DI*A/DI*B* do sistema Diego e *DO*HY* do sistema Dombrock, a partir da modificação de protocolos previamente desenvolvidos na Fundação Hemominas. Os testes desenvolvidos podem ser úteis em bancos de sangue, visando a inferência dos fenótipos, uma vez que anticorpos anti-Di^a são escassos e anticorpos anti-Di^b e anti-Hy não estão comercialmente disponíveis.

Os resultados indicam que os ensaios padronizados são reprodutíveis, fáceis de executar e fornecem resultados satisfatórios mesmo em baixas concentrações de DNA (100 pg de DNA por reação para *DI*A* e *DO*HY* e 10 pg para *DI*B*), o que os tornam potencialmente úteis em situações em que o DNA alvo é escasso, como DNA fetal livre no plasma materno ou avaliação de amostras agrupadas.

Os baixos valores de Coeficiente de variação para os Cts observados (0,59% para *DI*A*, 0,29% para *DI*B* e 0,42% para *DO*HY* nos testes *intra-ensaio*; 0,69% para *DI*A*, 1,59% para *DI*B* e 0,69% para *DO*HY* nos testes *inter-ensaio*) indicam que os testes desenvolvidos apresentam boa precisão. Embora a avaliação dos coeficientes de variação em testes qualitativos não seja geralmente exigida, a avaliação deste aspecto pode ser útil nas padronizações de reação de PCR em tempo real, sobretudo quando a variação nos valores de Ct pode interferir na interpretação dos resultados. Além disso, embora não haja parâmetros de aceitação pré-definidos para os coeficientes de variação em testes qualitativos, destacamos que valores encontrados no presente estudo são semelhantes, ou mesmo inferiores aos descritos na literatura para outros testes similares (KOVANDA; POLJAK, 2011; COOK *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2017)

Resultados concordantes foram obtidos na avaliação de amostras individuais ou agrupadas em pools de cinco amostras. Desta forma, as técnicas padronizadas podem ser aplicadas tanto na triagem dos doadores em pool quanto na abertura dos pools que apresentarem amplificação para os alelos de interesse (no caso *DO*HY* e *DI*A*), visando a identificação dos doadores com fenótipo raro. Além disso, esses métodos também podem ser úteis na caracterização de receptores de hemocomponentes.

A genotipagem de amostras agrupadas é muito útil, pois proporciona economia de tempo e recursos, possibilitando assim a avaliação de um número maior de indivíduos. Este aspecto é bastante relevante na busca de doadores com fenótipos raros, pois é necessário

avaliar um grande número de indivíduos para a identificação de um único doador (WAGNER, 2018; HE, *et al.*, 2013).

No presente estudo, a PCR em tempo real foi utilizada para avaliar a frequência dos alelos DI^*A/DI^*B e DO^*HY nos doadores de sangue de Minas Gerais. Um total de 457 amostras foram avaliadas, tendo sido observadas frequência alélica de 1,09% para DI^*A e 1,53% para DO^*HY . Desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg não foi observado. Esses resultados confirmam as baixas frequências dos alelos DI^*A e DO^*HY no estado de Minas Gerais e reforçam a importância do desenvolvimento de estratégias que permitam a avaliação de um grande número de amostras, como a genotipagem de amostras agrupadas, para triagem de doadores com os fenótipos raros Di(a+b-) e Hy-.

A genotipagem DI^*A/DI^*B também foi realizada para um grupo de doadores de sangue identificados como Di(a+) em testes de fenotipagem estendida de rotina da Fundação Hemominas. O banco de dados da fundação Hemominas possui um total de 7.615 doadores que foram fenotipados para o antígeno Di^a através da metodologia de hemaglutinação utilizando soros não comerciais, provenientes de indivíduos aloimunizados previamente caracterizados. Dentre esses doadores, 214 (2,8%) apresentam o antígeno Di^a. Ao longo do presente estudo, à medida que estes doadores Di(a+) doavam sangue, suas amostras eram reservadas e analisadas, sendo possível obter 58 amostras. Essas amostras foram genotipadas e todas elas apresentaram o genótipo heterozigoto DI^*A/DI^*B , confirmando a dificuldade na obtenção dos hemocomponentes Di(a+b-) na população de Minas Gerais.

As frequências dos alelos DI^*A e DO^*HY observadas no presente estudo foram similares às previamente observadas em outras populações brasileiras urbanas (Tabela 3). Entretanto, diferenças significativas foram observadas para DI^*A em relação a grupos com ancestralidade ameríndia ou asiática, como as tribos indígenas brasileiras Parakanã e Cinta Larga (BALEOTTI *et al.*, 2003; COZAC, 2004), populações latino-americanas com expressiva contribuição ameríndia tais como mexicanos e peruanos (Projeto 1000 Genomas), ou brasileiros descendentes de japoneses. Em relação ao alelo DO^*HY , diferenças significativas de frequência foram observadas em comparação a populações africanas, tais como as de Gâmbia, Kênia e Nigéria (tabela 3). Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que os antígenos Di^a e Hy são característicos de populações ameríndias/asiáticas e africanas, respectivamente (BÉGAT *et al.*, 2015; NATHALANG *et al.*, 2016; 1000 Genomes Consortium, 2015).

Diversos programas de sangue raro no mundo consideram a ancestralidade ou etnia na seleção de doadores para triagem de fenótipos raros (ST-LOUIS *et al.*, 2013; REVELLI *et al.*, 2014; NANCE *et al.*, 2016; GOLDMAN AND CROIX, 2016; VANHONSEBROUCK e

NAJDOVSKI, 2016). Isto é feito porque certos fenótipos raros são característicos de determinadas populações ou regiões geográficas. No entanto, em populações altamente miscigenadas como a de Minas Gerais, a atribuição de indivíduos a grupos étnicos pode ser uma tarefa complexa. A população mineira é altamente heterogênea e miscigenada, apresentando inclusive variações regionais em relação aos padrões de miscigenação (SILVA-MALTA, 2010). Desta forma, espera-se encontrar em nosso estado uma grande variedade de fenótipos eritrocitários provenientes de diferentes populações parentais.

A utilidade da aplicação da raça/cor autodeclarada na triagem de doadores raros em nossa população foi avaliada por meio da comparação da frequência dos alelos DI^*A/DI^*B e DO^*HY entre doadores de sangue agrupados por raça/cor autodeclaradas. Comparando os doadores autodeclarados brancos com aqueles pretos e pardos, não houve diferença significativa na frequência dos alelos DO^*HY e DI^*A (Tabela 4).

Analisando a ancestralidade genômica, que estava disponível para um subgrupo de 282 doadores, observamos uma ampla variação dos percentuais de ancestralidade africana e europeia nos indivíduos de diferentes genótipos, bem como dentre os diferentes grupos de raça/cor autodeclarada (Figura 7). Foram observados percentuais de ancestralidade africana de 20,1% para o grupo de indivíduos autodeclarados brancos, 32,9% para os autodeclarados pardos e 34,0% para os autodeclarados pretos.

É interessante destacar que, embora o alelo DO^*HY seja característica de populações africanas, o único indivíduo homozigoto para este alelo incluído neste estudo é autodeclarado branco, e possui, de acordo com a análise empregada, 43,5% de ancestralidade africana, 46,3 % de ancestralidade europeia e 10,2% de ancestralidade ameríndia.

A existência de considerável variação na ancestralidade genômica, mesmo dentro de grupos categorizados de acordo com autodeclaração de raça/cor já foi relatada por diferentes estudos. O estudo desenvolvido por Pena *et al.* (2010), no qual foram empregados o mesmo painel de marcadores e a mesma técnica de análise adotadas na estimativa de ancestralidade genômica do presente estudo, relatou variabilidade considerável na ancestralidade dentre de categorias de raça/cor em diferentes regiões brasileiras, sobretudo ente pretos e pardos. Para indivíduos autoclassificados como pretos, por exemplo, a ancestralidade europeia média variou de 29,3% em Santa Catarina a 53,9% na Bahia (PENA *et al.*, 2010).

Importantes estudos realizados na população brasileira, assim como em outras populações latino-americanas têm demonstrado que embora a ancestralidade genômica e a raça/cor autodeclarada estejam associadas (KEHDY *et al.*, 2015; RUIZ-LINARES *et al.*, 2014), fatores sociais e culturais podem afetar a percepção da etnia (RUIZ-LINARES *et al.*, 2014; LIMA-COSTA *et al.*, 2015). Além disso, fatores metodológicos tais como tamanho amostral,

seleção do painel de marcadores informativos de ancestralidade e estratégia de análise de dados podem influenciar nas estimativas de ancestralidade. Desta forma, a complexidade envolvendo a atribuição de indivíduos a grupos étnicos em populações altamente miscigenadas como a de Minas Gerais, bem como número de indivíduos analisados podem explicar os resultados observados no presente estudo.

Um estudo recente publicado por nosso grupo de pesquisa demonstrou a ocorrência, em Minas Gerais, de uma maior proporção de ancestralidade africana entre doadores com o genótipo *FY*BES*, o qual está associado ao fenótipo Fy(a-b-). Este resultado está em concordância com a origem majoritariamente africana desse polimorfismo. No entanto, analisando uma grande coorte de doadores de sangue (N = 33.195), o fenótipo Fy(a-b-), não foi mais comum entre os doadores que declararam-se pretos comparando com outras categorias de raça/cor autodeclaradas (MARTINS *et al.*, 2017). Estes dados, assim como os resultados do presente estudo, indicam a existência de maior complexidade na aplicação da raça/cor autodeclarada na triagem de doadores de sangue para fenótipos específicos em nossa população.

Considerando a necessidade da avaliação de fenótipos raros tanto em doadores quanto em receptores de hemocomponentes, o presente estudo também incluiu a avaliação de pacientes. Tais pacientes foram incluídos no estudo a partir da detecção da necessidade de aplicação de técnicas de biologia molecular para a resolução de casos complexos em imuno-hematologia envolvendo a suspeita de aloimunização relacionada a fenótipos raros (anticorpos contra antígenos de alta frequência).

Desta forma, no contexto do presente estudo, a análise dos pacientes foi solicitada pela Central de imuno-hematologia da FH, que encaminhou para o grupo de pesquisa as amostras de sangue dos pacientes juntamente com as informações acerca dos testes sorológicos realizados. No período do estudo sete casos foram analisados, sendo que para quatro deles foi confirmada a ocorrência de genótipos associados à ausência de antígenos de alta frequência, o que reforçou a suspeita de aloimunização relacionada a fenótipos raros. Tais casos envolviam anticorpos dos sistemas Gerbich, Duffy, Vel e Diego.

A correta caracterização desses pacientes possibilita evitar transfusões incompatíveis que podem ter efeitos adversos potencialmente sérios. Além disso, a conclusão dos casos pode minimizar a realização de diversos testes sorológicos complexos que além de apresentarem altos custos, sobrecarregam o laboratório, podendo resultar no atraso da liberação de resultados. Por fim, a exclusão da possibilidade de presença de anticorpos específicos voltados contra antígenos de alta frequência evita transfusões desnecessárias de

sangue raro, reservando tais hemocomponentes para aqueles pacientes que realmente necessitam.

É interessante ressaltar que a correta caracterização dos pacientes com anticorpos contra antígenos de alta frequência é importante para aumentar a segurança transfusional não só deles mesmos, já que os anticorpos identificados podem causar reações pós-transfusionais hemolíticas, mas também de outros indivíduos. Isto ocorre porque soros e hemácias raros advindos desses pacientes podem ser criopreservados em pequenas alíquotas na Central de Imuno-hematologia e utilizados posteriormente, como valiosas ferramentas laboratoriais úteis na realização de testes imuno-hematológicos visando caracterização de outros pacientes (CHAGAS *et al.*, 2017).

Desta forma, podemos concluir que os resultados obtidos no presente estudo são de grande utilidade, podendo ser aplicados para a melhoria da segurança transfusional em Minas Gerais. Os testes desenvolvidos serão disponibilizados para implementação na Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas, onde poderão ser aplicados para a triagem e confirmação de fenótipos raros em doadores e receptores de hemocomponentes.

7 CONCLUSÃO

- O presente estudo permitiu a descrição pela primeira vez, da demanda e da disponibilidade de sangue raro devido à ausência de antígenos de alta frequência na rede hemoterápica pública de Minas Gerais. O conhecimento da demanda não atendida pode ser útil no direcionamento dos esforços para a implementação de testes visando à triagem de doadores com fenótipos raros em nossa população.
- Testes de biologia molecular para identificação de fenótipos eritrocitários raros em doadores de sangue e pacientes foram padronizados com sucesso. Em relação à triagem de doadores com fenótipos raros, a PCR em tempo real usando amostras agrupadas mostrou-se um método promissor para selecionar doadores de sangue raros, tendo sido padronizada para a avaliação os alelos *DI*A/DI*B* do Sistema Diego e *DO*HY* do sistema Dombrock. Já em relação aos pacientes, análises moleculares de alelos dos sistemas Gerbich, Vel e foram padronizadas de acordo com protocolos disponibilizados na literatura. Todas as técnicas padronizadas serão disponibilizadas para implementação na Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas.
- A frequência dos alelos raros dos sistemas Diego (*DI*A*) e Dombrock (*DO*HY*) em doadores de sangue de Minas Gerais foi avaliada, tendo sido confirmada a baixa prevalência desses alelos em nossa população (1,09% para *DI*A* e 1,53% para *DO*HY*). Estas frequências foram semelhantes às das populações brasileiras urbanas previamente estudadas, o que reforça a necessidade do desenvolvimento de estratégias que permitam a análise de um grande número de amostras, como a genotipagem em pool, para a identificação de doadores raros homocigotos para esses alelos.
- A avaliação da aplicação da raça/cor autodeclarada na triagem de doadores raros em Minas Gerais, utilizando como modelo os alelos *DO*HY* e *DI*A*, revelou que embora tanto a raça/cor autodeclaradas quanto certos alelos de grupo sanguíneo estejam associados à ancestralidade, o uso de critérios étnico-raciais para auxiliar na triagem de doadores raros em populações altamente miscigenadas pode ser desafiador.
- Análises moleculares de alelos dos sistemas Gerbich, Diego, Vel e Duffy em receptores de hemocomponentes permitiram o fornecimento à Central de Imuno-hematologia de resultados úteis na resolução de casos complexos em imuno-hematologia. As análises permitiram confirmar ou excluir a presença de anticorpos contra antígenos de alta frequência, aumentando a segurança transfusional dos pacientes.

8 REFERÊNCIAS

- BALEOTTI JR, W. *et al.* Dombrock gene analysis in Brazilian people reveals novel alleles. **Vox Sanguinis**, v. 91, n.1, p. 81-87, 2006.
- BALEOTTI JR, W. *et al.* A novel *DI* A* allele without the band 3-Memphis mutation in Amazonian Indians. **Vox Sanguinis**, v. 84, n. 4, p. 326-330, 2003.
- BALLIF, B. A. *et al.* Disruption of SMIM1 causes the Vel- blood type. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 5, p. 751-761, 2013.
- BARRETT, V. J. *et al.* Anti-Holley detected in a primary immune response. **Immunohematology**, v. 12, n. 2, p. 62-65, 1996.
- BEATTIE, K. M.; CASTILLO, S. A case report of a hemolytic transfusion reaction caused by anti-Holley. **Transfusion**, v. 15, n. 5, p. 476-480, 1975.
- BÉGAT, C. *et al.* Revisiting the Diego Blood Group System in Amerindians: Evidence for Gene-Culture Comigration. **PLoS One**, v. 10, n. 7, 2015.
- BIANCHI, J. V. D. S. **Genotipagem de grupos sanguíneos por meio de microarranjos líquidos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.
- BRUCE, L. J. *et al.* Band 3 Memphis variant II. Altered stilbene disulfonate binding and the Diego (Dia) blood group antigen are associated with the human erythrocyte band 3 mutation Pro854-->Leu. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 16155-16158, 1994.
- CASTILHO, L. Rare donor program in Brazil. **Immunohematology**, v. 32, n. 1, p. 11-12, 2016.
- CHAGAS, M. A. B. *et al.* Effect of red blood cell preservation by droplet freezing with non-permeable cryoprotective agents in blood group antigen reactivity. **Transfusion Medicine**, v. 27, n. 2, p. 142-146, 2017.
- CHAUDHURI, A. *et al.* The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy- negative individuals. **Blood**, v. 85, p. 615-621, 1995.
- COOK, L. *et al.* Allele-Specific PCR for Determination of IL28B genotype. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n.12, p. 4144 – 4146, 2012.
- COSTA, D. C. *et al.* Frequencies of polymorphisms of the Rh, Kell, Kidd, Duffy and Diego systems of Santa Catarina, Southern Brazil. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 38, n. 3, p. 199-205, 2016.
- COVAS, D. T.; LANGHI JÚNIOR, M.; BORDIN, J. O. **Hemoterapia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2007.
- COZAC, A. P. C. N. **Estudo do polimorfismo do sistema sanguíneo Diego em populações de brancos, asiáticos, negros, índios e doadores de sangue da região de Ribeirão Preto**. Dissertação de mestrado- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2004.
- DANIELS, G. L. *et al.* Terminology for red cell surface antigens. ISBT Working Party Oslo Report. International Society of Blood Transfusion. **Vox Sanguinis**, v. 87, n. 4, p. 304–316, 2004.
- DENOMME, G. A. Prospects for the provision of genotyped blood for transfusion.. **British journal of haematology**., v. 163, n. 1, p. 3-9, 2013.

- DEWAN, G. Comparative frequency and allelic distribution of ABO and Rh (D) blood groups of major tribal communities of southern Bangladesh with general population and their determinants. **The Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 16, n. 2, p. 141-147, 2015.
- DEZAN, M. R. *et al.* High-throughput strategy for molecular identification of Vel– blood donors employing nucleic acids extracted from plasma pools used for viral nucleic acid test screening. **Transfusion**, v. 56, p. 1430-1434, 2016.
- FOLK, G. HAABB. **Thinking Outside the GATA Box**, 2017. Disponível em: http://www.haabb.org/images/05_Thinking_Outside_the_GATA_Box_Gina_Folk_.pdf. Acesso em: 31 jul. 2019.
- GOLDMAN, M.; ST CROIX,. Rare donor program: Canadian Blood Services. **IMMUNOHEMATOLOGY**, v. 32, n. 1, 2016.
- GOURRI, E. *et al.* Genetic background of the rare Yus and Gerbich blood group phenotypes: homologous regions of the GYPC gene contribute to deletion alleles. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 4, p. 630-640, 2017.
- HARMENING, D. M. **Técnicas Modernas Em Banco de Sangue e Transfusão**. 6ª. ed. Chicago: Thieme Revinter, 2015.
- HE, Y. L. *et al.* Multiplex polymerase chain reaction with DNA pooling: a cost-effective strategy of genotyping rare blood types. **Transfusion Medicine**, v. 23, n. 1, p. 42-47, 2013.
- HOWES, R. E. *et al.* The global distribution of the Duffy blood group. **Nature Communications**, v. 2, 2011.
- HUBISZ, M. J. *et al.* Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 5, p. 1322–1332, 2009.
- ISBT. **ISBT: International Society of Blood Transfusion**, 2019. Disponível em: <http://www.isbtweb.org/>. Acesso em: 13 ago. 2019.
- JUNGBAUER, C. Molecular bases and genotyping for rare blood types. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 36, p. 213-218, 2009.
- KAUR, R.; JAIN, A. Rare blood donor program in the country: Right time to start. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 6, n. 1, p. 1-2, 2012.
- KEHDY, F. S. G. *et al.* Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 28, p. 8696-8701, 2015.
- KOVANDA, A.; POLJAK, M. Real-time polymerase chain reaction assay based on high resolution melting analysis for the determination of the rs12979860 polymorphism involved in hepatitis C treatment response. **Journal of Virological Methods**, v.175, n.1, p.125-8, 2011.
- LAM, E. P.-T. *et al.* Clinical Applications of Molecular Technologies in Hematology. **Journal of Medical Diagnostic**, v. 2, n. 4, p. 1-6, 2013.
- LATINI, F. R. M. *et al.* A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles. **Blood Transfusion**, v. 12, p. 256, 2014.
- LIMA-COSTA, M. F. *et al.* Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). **Scientific reports**, v. 5, 2015.
- MALLINSON, G. *et al.* Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an

apparently healthy individual with the Fy(a – b–) phenotype. **British Journal of Haematology**, v. 90, n. 4, p. 823-829, 1995.

MARTINS, M. L. *et al.* Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 4, p. 252-9, 2009.

MARTINS, M. L. *et al.* Duffy blood group system: New genotyping method and distribution in a Brazilian extra-Amazonian population. **Molecular and cellular probes**, v. 35, p. 20-26, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual técnico de hemovigilância**. Brasília: Ministério da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa; 2003. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/MANUAL_TECNICO_HEMOVIGILANCIA_2003.pdf/ Acesso em: 31 de ago. de 2019

MINTZ, P. D. **Transfusion Therapy: Clinical Principles and Practice**. 3ª. ed. American Association of Blood Banks, 2010.

MURPHY, M. F.; PAMPHILON, D. H.; HEDDLE, N. M. **Practical Transfusion Medicine**. 4ª. ed. Wiley-Blackwell, 2013.

NANCE, S. *et al.* International rare donor panels: a review. **Vox Sanguinis**, v. 110, n. 3, p. 209–218, 2016.

NATHALANG, O. *et al.* Distribution of DI* A and DI* B allele frequencies and comparisons among Central Thai and Other populations. **PLoS one**, v. 11, n. 10, p. e0165134, 2016.

NORFOLK, D. **Handbook of Transfusion Medicine**. 5ª. ed., 2013.

NOVARETTI, M. C. *et al.* Application of real-time PCR and melting curve analysis in rapid Diego blood group genotyping. **Immunoematology**, v. 26, n. 2, p. 66-70, 2010.

PACCAPELO, C. Managing a rare donor programme: the immunohaematology laboratory perspective. **ISBT Science Series**, v. 13, n. 1, 2017.

PEIPER, S. C. *et al.* The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, p. 1311-1317, 1995.

PENA, S. D. J. *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2010.

PEYRARD, T. Use of genomics for decision-making in transfusion medicine: laboratory practice. **ISBT Science Series**, v. 8, p. 11-15, 2013.

PIASSI, F. C. C. **Análise genotípica do sistema de grupo sanguíneo dombrock em doadores de sangue do estado de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

POLIN, H. *et al.* Introduction of a real-time based blood group genotyping approach. **Vox Sanguinis**, v. 95, n. 2, p. 125-130, 2008.

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

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

REESINK, H. W. *et al.* Donors with a rare pheno (geno) type. **Vox Sanguinis**, v. 95, n. 3, p. 236-253, 2008.

- REID, M. E. Complexities of the Dombrock blood group system revealed. **Transfusion**, v. 45, n. S2, p. 92S-99S, 2005.
- REVELLI, N. *et al.* The Lombardy Rare Donor Programme. **Blood Transfusion**, v. 12, n. Suppl 1, p. s249-255, 2014.
- RIOS, M. *et al.* New genotypes in Fy(a- b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B. **British Journal of Haematology**, v. 108, n. 2, p. 448-454, 2000.
- ROWE, J. A.; OPI, D. H.; WILLIAMS, T. N. Blood groups and malaria: fresh insights into pathogenesis and. **Current Opinion in Hematology**, v. 16, n. 6, p. 480-487, 2009.
- RUIZ-LINARES, A. *et al.* Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. **PLoS genetics**, v. 10, n. 9, p. e1004572, 2014.
- SANCHEZ, B. A. M. **Caracterização do receptor DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines) e da resposta imune anti Duffy Binding Protein em indivíduos expostos ao Plasmodium vivax**. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, 2011.
- SILVA, A. R. D. **Padronização da genotipagem de alelos dos sistemas de grupos sanguíneos**, Dissertação (Mestrado Análises Clínicas e Toxicológicas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2018.
- SILVA-MALTA, M. C. F. D. **Padrões geográficos de ancestralidade genômica em Minas Gerais: o caso da doença falciforme**. Tese (Doutorado em Genética), Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo horizonte, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-95YF5R>.
- SIMON, T. L. *et al.* **Rossi's Principles of Transfusion Medicine**. 5ª. ed.: Wiley-Blackwell, 2016.
- ST-LOUIS, M. *et al.* Red blood cell antigen portrait of self-identified black donors in Quebec. **Transfusion Medicine**, v. 24, n. 2, p. 105-108, 2014.
- STORRY, J. R. *et al.* International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetics and terminology: report of the Seoul and London meetings. **ISBT Science Series**, v. 11, n. 2, p. 118-122, 2016.
- The 1000 Genomes Project. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v.526, p. 68-74. 2015.
- URBANIÁK, S. J. Alloimmunity to Human Red Blood Cell Antigens. **Vox Sanguinis** , v. 83, n. s1, p. 293-297, 2002.
- VANHONSEBROUCK, A.; NAJDOVSKI, T. Rare donor programs in Belgium. **Immunoematology**, v. 32, n. 1, p. 9-10, 2016.
- WAGNER, F. F. *et al.* Extended Donor Typing by Pooled Capillary Electrophoresis: Impact in a Routine Setting. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 225-237, 2018.
- WENT, R. *et al.* Anti-Fy3 in sickle cell disease: a difficult transfusion problem. **British Journal of Haematology**, v. 144, n. 4, p. 621-622, 2009.
- WOODFIELD, G. Rare Blood Donors: The Past and the Future. **Vox Sanguinis**, v. 83, n. s1, p. 95-97, 2002.

ZACARIAS, J. M. V. *et al.* Profile of Rh, Kell, Duffy, Kidd, and Diego blood group systems among blood donors in the Southwest region of the Paraná state, Southern Brazil. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 55, n. 3, p. 302–307, 2016.

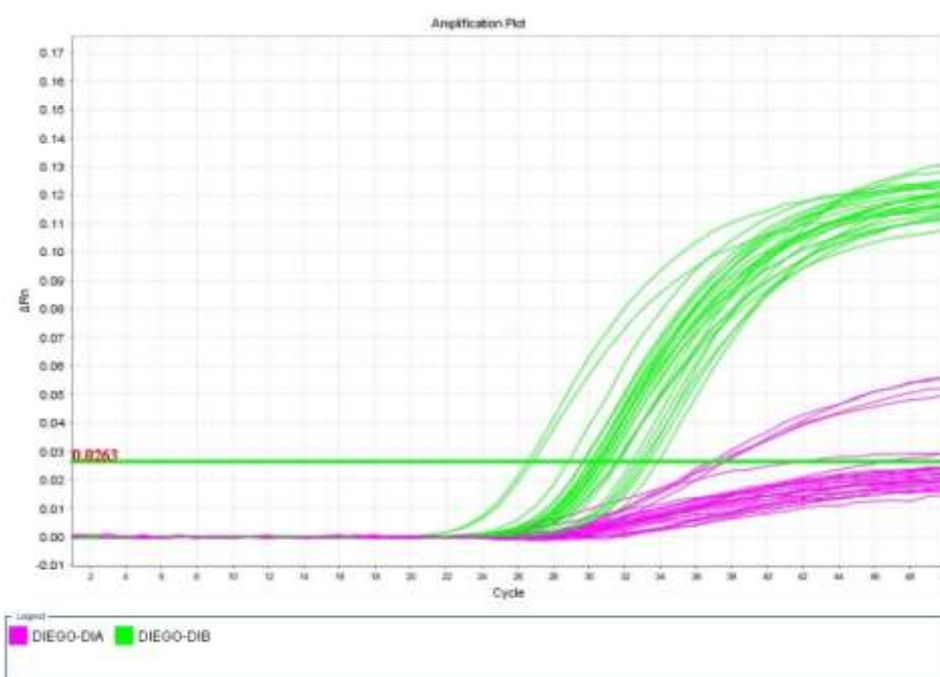
ZHENG, Z. *et al.* Simultaneous detection of 45 fusion genes in leukemia by dual-color fluorescence real-time PCR. **International journal of laboratory hematology**, v. 39, n. 2, p. 175-184, 2017.

9 PERSPECTIVAS

O presente estudo foi desenvolvido como parte de dois projetos de pesquisa em desenvolvimento na Fundação Hemominas: “Análise molecular de grupos sanguíneos em doadores de sangue para identificação de variantes raras” que tem como foco e desenvolvimento de testes para auxiliar na triagem de doadores de sangue com fenótipos raros e “Resolução de casos complexos em imuno-hematologia” que tem como objetivo principal contribuir na resolução de casos de pacientes aloimunizados com suspeita de anticorpos contra antígenos de alta frequência atendidos pela Central de Imuno-hematologia de FH.

Em relação à triagem de doadores em amostras agrupadas, estamos atualmente aperfeiçoando a técnica de genotipagem a partir de sangue seco em papel de filtro (FTA, Watchman). Esta estratégia busca reduzir os custos da triagem e tem apresentado resultados bastante promissores (Figura S1)

Figura S1 - Genotipagem de amostras agrupadas utilizando sangue total seco em papel filtro (FTA, Watchman) para análise dos alelos *DI*A/DI*B*.



Fonte: Autoria própria

Já em relação à análise de pacientes, a demanda constante pela resolução de casos complexos tem reforçado a necessidade da incorporação de novos testes à Central de Imuno-hematologia.

Com a continuidade desses projetos temos como perspectivas o desenvolvimento e o aprimoramento de testes de biologia molecular que sejam úteis no avanço técnico da Fundação Hemominas na área de Imuno-hematologia.