

FABIANA CHAGAS CAMARGOS PIASSI

**ANÁLISE GENOTÍPICA DO SISTEMA DE GRUPO
SANGUÍNEO DOMBROCK EM DOADORES DE SANGUE DO
ESTADO DE MINAS GERAIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE – 2010

FABIANA CHAGAS CAMARGOS PIASSI

**ANÁLISE GENOTÍPICA DO SISTEMA DE GRUPO
SANGUÍNEO DOMBROCK EM DOADORES DE SANGUE DO
ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de concentração Propedêutica Complementar - da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia.

ORIENTADORA: Dra. Silvana Maria Elói Santos

CO-ORIENTADORA: Dra. Lílian Maria de Castilho

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE – 2010

P581a Piassi, Fabiana Chagas Camargos.
Análise genotípica do sistema de grupo sanguíneo Dombrock em doadores de sangue do estado de Minas Gerais [manuscrito]. / Fabiana Chagas Camargos Piassi. - - Belo Horizonte: 2010.
64f.: il.
Orientadora: Silvana Maria Elói Santos.
Co-Orientadora: Lillian Maria de Castilho.
Área de concentração: Patologia Geral.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Antígenos. 2. Genótipo. 3. Reação em Cadeia de Polimerase. 4. Doadores de Sangue. 5. Alelos. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Santos, Silvana Maria Elói. II. Castilho, lillian Maria de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WH 440

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Professor Ronaldo Tadêu Pena

VICE-REITORA: Professora Heloisa Maria Murgel Starling

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Professora Elizabeth R. da Silva

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Professor Francisco José Penna

VICE-DIRETOR: Professor Tarcizo Afonso Nunes

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

COORDENADOR: Professor Wagner Luiz Tafuri

SUB-COORDENADOR: Professor Giovanni Dantas Cassali

MEMBROS DO COLEGIADO

Professor Anílton César Vasconcelos

Professor Edilberto Nogueira Mendes

Professora Helenice Gobbi

Professor Marcelo Vidigal Caliar

Professor Wagner Luiz Tafuri

Enio Ferreira (representante discente titular)

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas, sob orientação da Doutora Silvana Maria Elói Santos¹ e co-orientação da Doutora Lílian Maria de Castilho².

¹Departamento de Propedêutica Complementar - Faculdade de Medicina - UFMG.

² Laboratório de Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos - Unicamp.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Professora **Dra. Silvana Maria Elói Santos**, a quem dedico este trabalho, pela sua confiança e por ter sido mais que uma mentora intelectual, mas uma incentivadora na minha carreira profissional.

À minha co-orientadora, Professora **Dra. Lílian Maria de Castilho**, por ter me introduzido no universo da biologia molecular aplicada à Imuno-hematologia.

Ao **Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas**, seus funcionários, alunos e estagiários, por terem compartilhado comigo as dificuldades e as vitórias do dia a dia.

À **Dra. Marina Lobato**, gerente do Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas, pela sua voluntariosa e incondicional disposição em colaborar.

Às alunas de iniciação científica, **Débora Moura da Cunha e Fabiana Resende**, pelo trabalho técnico executado, fundamentais para a conclusão desse projeto.

À **Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho**, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis ao longo desse trabalho.

Agradeço à FAMEMA, na pessoa do Professor **Dr. Wilson Baleotti** e do biomédico Rodrigo Suzuki, pelo apoio técnico e generosidade com que me receberam.

Ao **meu esposo**, pela presença constante em todos os momentos de minha vida.

Aos **meus pais e irmãos**, pelo apoio incondicional que dispensam a tudo que faço.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO	1
JUSTIFICATIVA	
1. Os sistemas de grupos sanguíneos na prática transfusional	2
2. Métodos moleculares aplicados em Imuno-hematologia	
2.1 Métodos sorológicos	6
2.2 Métodos moleculares	6
3. Sangues raros	7
4. O sistema de grupo sanguíneo Dombrock	
4.1 Características dos antígenos	11
4.2 Importância clínica	14
4.3 O gene <i>DO</i>	15
4.4 Métodos moleculares para genotipagem Dombrock	18
4.5 Os alelos <i>DO</i> variantes	20
4.6 A prevalência dos alelos <i>DO</i>	22
OBJETIVOS	24
SUJEITOS E MÉTODOS	
A. SUJEITOS	25
B. MÉTODOS	
1. Extração DNA	26
2. Genotipagem Dombrock por PCR-RFLP	26
2.1 Genotipagem <i>DOA/DOB</i>	29
2.2 Genotipagem <i>HY</i>	30
2.3 Genotipagem <i>JO</i>	31
2.4 Genotipagem <i>HY1, DOA-WL, DOB-WL</i>	32
3. Análise estatística	33
RESULTADOS	
1. Análise genotípica do sistema Dombrock	34
2. Frequência dos alelos <i>JO</i> e <i>HY</i>	36
3. Correlação entre a presença dos alelos <i>HY</i> e <i>JO</i> e autodenominação de cor da pele	38
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	52
ANEXO II – CARTAS DE APROVAÇÃO DOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA	54
ANEXO III – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO E DECLARAÇÃO DO PERIÓDICO	56
ANEXO IV – ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO E DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO	69

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1	Unidades da Fundação Hemominas por Macrorregião da SES-MG.	9
Figura 2	Posições dos antígenos Do ^a , Do ^b , Hy e Jo(a) na glicoproteína Do	12
Figura 3	Características do gene <i>DO</i>	15
Figura 4	Apresentação esquemática do gene <i>DO</i>	17
Figura 5	Freqüência dos genótipos Dombrock em diferentes populações	22
Figura 6	Genotipagem <i>DOA/DOB</i> por PCR-RFLP (793 A>G)	29
Figura 7	Genotipagem <i>HY</i> por PCR-RFLP (323 G>T)	30
Figura 8	Genotipagem <i>JO</i> por PCR-RFLP (350 C>T)	31
Figura 9	Genotipagem SNP 898	32
Gráfico 1	Freqüência dos alelos <i>DO</i> no estado de Minas Gerais	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistemas de Grupos Sanguíneos reconhecidos pela ISBT	3
Tabela 2	Principais anticorpos relacionados com reações transfusionais hemolíticas	5
Tabela 3	Expressão dos antígenos Dombrock nos diferentes fenótipos	13
Tabela 4	Bases moleculares do fenótipo nulo do sistema Dombrock	17
Tabela 5	Polimorfismos de única base no DNA do gene <i>DO</i>	21
Tabela 6	Seqüência dos <i>primers</i> , temperaturas de anelamento, tamanho dos produtos, enzimas de restrição e fragmentos	28
Tabela 7	Freqüência dos genótipos Dombrock em Minas Gerais	36
Tabela 8	Freqüência dos alelos <i>HY</i> e <i>JO</i> em Minas Gerais e São Paulo	37
Tabela 9	Distribuição dos alelos <i>DO</i> nos genótipos Dombrock	38
Tabela 10	Autodenominação de cor da pele nos doadores com o alelo <i>JO</i>	38
Tabela 11	Autodenominação de cor da pele nos doadores com o alelo <i>HY</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIGLA	DESCRITOR
A	Adenina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
C	Citosina
DO	Gene Dombrock
DHPN	Doença hemolítica perinatal
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	2'-deoxinucleosídeo 5'-trifosfato
dATP	2'-deoxiadenina 5'-trifosfato
dTTP	2'-deoxitimina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitosina 5'-trifosfato
dGTP	2'-deoxiguanina 5'-trifosfato
EDTA	Acido etileno diamino tetracético
G	Guanina
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
Gy(a-)	Fenótipo Gregory negativo
gDNA	DNA genômico
HPN	Hemoglobinúria Paroxística Noturna
Hy-	Fenótipo Holley negativo
Ile	Isoleucina
ISBT	Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue
Jo(a-)	Fenótipo Joseph negativo
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MG	Minas Gerais
mRNA	RNA mensageiro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ng	nanograma
NT	Não testado
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (cont.)

SIGLA	DESCRITOR
PCR-RFLP	PCR com análise dos fragmentos após enzimas de restrição
Phe	Fenilalanina
Do	Proteína Dombrock
RNA	Ácido ribonucléico
SP	São Paulo
Ser	Serina
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
T	Timina
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Thr	Treonina
TAD	Teste direto da antiglobulina humana
Val	Valina

RESUMO

Introdução e objetivo: O sistema de grupo sanguíneo Dombrock tem importância na prática transfusional, pois são relatadas reações transfusionais hemolíticas relacionadas aos seus anticorpos. Os métodos moleculares têm possibilitado a investigação genotípica de doadores de sangue em larga escala, especialmente quando soros não estão disponíveis para a realização da fenotipagem pela técnica de hemaglutinação. A genotipagem do sistema Dombrock em diferentes populações têm demonstrado a grande variabilidade do gene *DO* e polimorfismos de base única (SNPs) têm sido associados aos seus diferentes alelos. Alelos variantes foram encontrados em diferentes estudos: *DO*B-SH* (378C/624C/793G) e *DO*A-HA* (378T/624T/793A) em uma miscelânea de amostras de Nova Iorque; *DO*A-WL* (793A/898G/323G), *DO*B-WL* (793G/898G/323G) e *DO*A-SH* (378C/624C/793A) em doadores de sangue brasileiros do estado de São Paulo e os alelos *DO*B-SH-Q149K* e *DO*B-I175N* em tribos africanas. Considerando as variações do gene *DO* e a miscigenação da população brasileira, o objetivo do estudo foi avaliar a frequência dos alelos *DO* em doadores de sangue no estado de Minas Gerais e identificar possíveis diferenças regionais dentro do território brasileiro. **Métodos:** A frequência dos alelos *DO* foi determinada a partir da genotipagem de 270 doadores de sangue do Hemocentro de Belo Horizonte, através da técnica de reação em cadeia da polimerase, seguida da digestão por enzimas de restrição (PCR-RFLP) e análise dos fragmentos resultantes após eletroforese em gel de agarose. Os seguintes polimorfismos foram pesquisados: 323G/T (*HY*), 350C/T (*JO*), 793 A/G (*DO*A/DO*B*) e 898C/G (*HY*1*, *DO*A-WL* e *DO*B-WL*). As prevalências dos alelos *HY* e *JO*, relacionados aos fenótipos raros Hy- e Jo(a-), foram comparadas com as descritas previamente em doadores de sangue do estado de São Paulo usando teste estatístico Qui-quadrado. Como análise complementar, os portadores dos alelos *HY* e *JO* foram classificados em brancos, negros e pardos, conforme a autodenominação de cor da pele informada no momento do cadastro a fim de avaliar uma possível correlação entre essa variável e a presença desses alelos nesses grupos de indivíduos. **Resultados:** A análise do gene *DO* no estado de Minas Gerais identificou os alelos *DO*A-WL* e *DO*B-WL*, recentemente descritos em doadores de sangue do estado de São Paulo. Além disso, a frequência encontrada do alelo *HY* (2,41%) foi estatisticamente maior ($p < 0,001$) que a descrita em São Paulo (0,7%). Também, contrariamente ao encontrado entre paulistas, a frequência do alelo *HY* foi superior à do alelo *JO* (1,48%), incluindo um caso em homozigose. A autodenominação de cor da pele parda foi determinante na identificação apenas do alelo *HY*. **Conclusões:** A análise genotípica do sistema Dombrock em doadores de sangue do estado de Minas Gerais confirmou a heterogeneidade do gene *DO* na população brasileira e a necessidade de estudos regionais para a identificação de doadores raros dentro desse amplo território. Apesar da correlação estatística entre os indivíduos pardos e o alelo *HY*, a autodenominação de cor da pele não prediz o grau de ancestralidade africana em populações miscigenadas, não devendo, portanto, ser aplicada como variável no rastreamento do fenótipo raro Hy- entre brasileiros.

Palavras-chave: Genotipagem, Dombrock, PCR/RFLP, Grupo sanguíneo

ABSTRACT

Background: Data concerning the frequency of major blood group antigens of importance in transfusion medicine is essential to the development of rare red blood banks. Molecular approaches have enabled the detection of blood donors on a large scale when sera are not available for serological tests. The Dombrock system blood group is important in transfusion practice since hemolytic transfusion reactions related to its antibodies are reported. Moreover, the phenotypes: Gy(a-), Hy- and Jo(a-), originally describe in blacks, are considered rare by the International Society of Blood Transfusion. Dombrock blood group system genotyping has demonstrated various rearrangements of the *DO* gene in different populations. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been associated with different alleles. New variant alleles had been identified in New York (*DO*B-SH* and *DO*A-HA*), in Africa (*DO*B-SH-Q149K* and *DO* B-I175N*) and in Brazil (*DO*A-WL* and *DO*B-WL*) and this considerable genetic diversity highlights the importance of regional research protocols for this blood group system. In Brazil previous studies conducted in São Paulo state showed higher prevalence of *JO* allele compared to *HY*. However due the high heterogeneity of Brazilian population, differences inside the country would be expected. **Methods:** The frequency of *DO* alleles in a southeast state of Brazil, Minas Gerais, was determined from the genotyping of 270 blood donors, by polymerase chain reaction and analysis of polymorphisms from the fragments resulting from digestion by restriction enzymes (PCR-RFLP) for the identification of the following SNPs: 323G/T (*HY*), 350C/T (*JO*), 793 (*DO*A/DO* B*) and 898C/G (*HY*1/HY*2*, *DO*A-WL* e and *DO*B-WL*). The prevalence of these alleles was compared with the donors described in the state of Sao Paulo. Donors with the *HY* and *JO* alleles were classified as white, black or brown according to the self-reported skin color at registration in order to evaluate a possible correlation between this variable and the presence of these alleles. **Results:** The *HY* allele frequency was approximately twice (2.41%) the *JO* allele (1.48%) and this prevalence of *HY* allele was statistically significantly higher ($p < 0,001$) than the frequency in São Paulo (0,7%). In our study, we detected a homozygous state for *HY*. As well, the alleles *DO*A-WL* and *DO*B-WL*, recently described in São Paulo blood donors, were also founded in the state of Minas Gerais. The self-designation of skin color was related only to in *HY* allele. **Conclusions:** Our data confirm the diversity of Brazilian population and the different frequencies in *DO* alleles depending on the region studied. For the purpose of identification the Hy negative phenotype, this population could be the target in a screening. Despite the statistical correlation between the allele *HY* and the brown color skin, this information not predict the degree of African ancestry in admixed population and should not be applied as a variable in screening Hy- phenotype in Brazil.

Key words: Genotyping, Dombrock, PCR/RFLP, blood group

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O sangue sempre esteve relacionado à vida de alguma maneira, seja na crença da aquisição de poderes e virtudes, quando usado sob diferentes formas, ou como terapêutica de rejuvenescimento e restituição da saúde. Embora não seja possível precisar com exatidão os pioneiros na realização de transfusões homem a homem, acidentes envolvendo experiências com sangues de animais tiveram conseqüências freqüentemente nefastas (PACHECO, 2003).

A era científica da transfusão de sangue teve início somente com a descoberta do grupo sanguíneo ABO por Karl Landsteiner em 1901, conferindo ao procedimento uma segurança até então impossível. Outro marco na história da medicina transfusional foi a utilização de anticoagulantes do sangue e de dextrose como fonte energética. Esses recursos permitiram a conservação do sangue por períodos mais prolongados e sua estocagem, permitindo sua ampla utilização durante a Primeira Guerra Mundial. A possibilidade de armazenamento e manutenção de estoques para atendimentos emergenciais contribuiu para a difusão da prática transfusional. Surgiram então, a partir desse período, as primeiras organizações ligadas à transfusão de sangue no mundo e o início da publicação de trabalhos científicos que buscavam melhorar a eficácia e a segurança dos processos hemoterápicos (PACHECO, 2003).

No campo da Imuno-hematologia houve uma extraordinária expansão. Enquanto a descoberta do grupo sanguíneo ABO pode ser considerada um achado ocasional, a identificação dos sistemas seguintes (MN, P1 e LW) foi o resultado de uma busca experimental deliberada. Outros sistemas foram reconhecidos a partir das implicações clínicas dos seus anticorpos, seja a doença hemolítica do recém nascido (anti-D, anti-K e anti-Jk^a) ou estímulos imunes provocados por transfusões de sangue (anti-c, anti-e, anti-Fy^a) (DANIELS, 2010).

JUSTIFICATIVA

1. Os sistemas de grupos sanguíneos na prática transfusional

Desde a descoberta do grupo sanguíneo ABO por Karl Landsteiner em 1901, 308 antígenos já foram reconhecidos pelo Comitê para Terminologia de Antígenos Eritrocitários da Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (ISBT) (**Tabela 1**). Deste total, 270 antígenos estão agrupados em trinta sistemas de grupos sanguíneos e os demais são reunidos em coleções (DANIELS, 2010).

A série 700 engloba antígenos de baixa frequência, cuja ocorrência é inferior a 1% na maioria das populações estudadas. Na série 901 estão reunidos os antígenos que ocorrem em mais de 90% das populações (REID, 2004).

Embora alguns dos antígenos de grupos sanguíneos sejam identificados por testes diretos, a maioria dos sistemas somente foi reconhecida após a descrição do teste indireto de antiglobulina por Coombs e colaboradores em 1943 (DANIELS, 2010).

Tabela 1: Sistemas de Grupos Sanguíneos reconhecidos pela ISBT*

Nº. ISBT	Nome do sistema	Símbolo
1	ABO	ABO
2	MNS	MNS
3	P	P1
4	Rh	RH
5	Lutheran	LU
6	Kell	KEL
7	Lewis	LE
8	Duffy	FY
9	Kidd	JK
10	Diego	DI
11	Yt	YT
12	Xg	XG
13	Scianna	SC
14	Dombrock	DO
15	Colton	CO
16	Landsteiner-Wiener	LW
17	Chido/Rodgers	CH/RG
18	H	H
19	Kx	XK
20	Gerbich	GE
21	Cromer	CROM
22	Knops	KN
23	Indian	IN
24	Ok	OK
25	Raph	RAPH
26	John Milton Hagen	JMH
27	I	I
28	Globoside	GLOB
29	Gill	GIL
30	Rh-associated glycoprotein	RHAG

* **Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue**

JUSTIFICATIVA

A classificação em sistemas de grupos sanguíneos é estabelecida a partir da expressão na superfície eritrocitária de determinantes antigênicos, controlados por um único locus gênico ou por dois ou mais genes homólogos com pouca ou nenhuma recombinação entre eles. Os antígenos são estruturas polimórficas, definidas sorologicamente por um anticorpo complementar. Estão localizados em proteínas, glicoproteínas ou glicolípides inseridas na superfície externa da membrana eritrocitária e exercem função estrutural (polipeptídeo Rh), enzimática (glicoproteína Kell), de transporte (proteína Kidd), de receptores de membrana (glicoproteína Duffy) ou controle do complemento (STORRY, 2004).

Hemácias contendo uma partícula antigênica específica podem induzir uma resposta imune em indivíduos que não expressam tal determinante. A aloimunização pode ocorrer por via transfusional ou gestacional. Alguns anticorpos de grupos sanguíneos têm a capacidade de provocar hemólise em quando em contato com os antígenos correspondentes, sejam nas incompatibilidades transfusionais ou materno-fetais. O mecanismo fisiopatológico da lise eritrocitária começa com formação do complexo antígeno-anticorpo, seguida da ativação completa ou incompleta das proteínas do complemento. (POOLE, 2007).

As reações transfusionais hemolíticas podem ser classificadas em imediatas ou tardias, dependendo do tempo decorrido entre a transfusão e o início dos efeitos adversos. Nas reações imediatas, há ativação completa das proteínas do complemento e as hemácias são destruídas dentro do próprio vaso sanguíneo, durante ou logo após a transfusão. Nas reações tardias, a lise é extravascular, com ativação incompleta do sistema do complemento, com a retirada gradativa das hemácias da circulação pelo sistema monocítico-macrofágico do fígado e baço e conseqüente redução na sobrevivência dessas células (POOLE, 2007).

Os sistemas ABO, Rh, Kell, Kidd e Duffy são os mais importantes na prática transfusional (REID, 2004). A especificidade dos anticorpos que mais frequentemente estão relacionados com reações transfusionais hemolíticas está descrita na **Tabela 2**.

Tabela 2: Principais anticorpos relacionados com reações transfusionais hemolíticas

SISTEMAS	ANTICORPOS	REAÇÃO TRANSFUSIONAL
ABO	anti-A	Nenhuma a severa/ imediata ou tardia
	anti-B	Nenhuma a severa/ imediata ou tardia
Rh	anti-D	Discreta a severa/ imediata ou tardia
	anti-C	Discreta a severa/ imediata ou tardia
	anti-E	Discreta a moderada/ imediata ou tardia
	anti-c	Discreta a severa/ imediata ou tardia
	anti-e	Discreta a moderada/ tardia
Kell	anti-K	Discreta a severa/ tardia
Kidd	anti-Jk ^a	Nenhuma a severa/ imediata ou tardia
	anti-Jk ^b	Nenhuma a severa/ imediata ou tardia
Duffy	anti-Fy ^a	Discreta a severa/ imediata ou tardia
	anti-Fy ^b	Discreta a severa/ imediata (rara)/ tardia

Fonte: REID, 2004

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC 153/2004), que determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos brasileiros: “Se a pesquisa de anticorpos irregulares demonstrar a presença de anticorpos clinicamente significativos, a transfusão deve ser feita com unidades que não contenham os antígenos correspondentes.” Na prática transfusional, a possibilidade de se encontrar hemácias negativas, compatíveis com anticorpos identificados nos testes pré-transfusionais, irá depender da frequência com que os antígenos correspondentes estão ausentes na população pesquisada.

Embora alguns antígenos sejam encontrados apenas ocasionalmente, outros podem estar presentes em mais de 90% dos indivíduos. Em caso de aloimunização, a identificação de doadores de sangue negativos para antígenos de alta frequência populacional pode ser um desafio na prática imuno-hematológica.

2. Métodos laboratoriais aplicados em Imuno-hematologia

2.1 Métodos sorológicos

A hemaglutinação é o método tradicional de identificação dos antígenos e anticorpos eritrocitários. Além de simples e de baixo custo, tem sensibilidade e especificidade adequadas para a maioria dos contextos clínicos, quando realizado de forma correta. Porém, essa técnica possui algumas limitações, dentre elas a sua difícil interpretação em pacientes recentemente transfundidos ou cujas hemácias estejam revestidas por imunoglobulinas, além da reduzida disponibilidade de soros considerados raros para os testes de fenotipagem (REID, 2003b).

Durante noventa anos, a hemaglutinação foi o método utilizado para prever o genótipo de um indivíduo. Hoje, com os métodos moleculares, é possível inferir o fenótipo a partir da análise do DNA (DANIELS, 2010).

2.2 Métodos moleculares

O emprego das técnicas moleculares em Imuno-hematologia não somente reduz o consumo de soros raros, habitualmente escassos, como permite a inferência dos fenótipos nos casos em que os métodos sorológicos não podem ser aplicados. A detecção de genes que codificam antígenos de baixa expressão, a determinação da zigosidade, particularmente do gene *RHD*, e a tipagem de hemácias empregadas na produção de painéis de identificação de anticorpos são outras importantes aplicações dos métodos moleculares (REID, 2007).

A clonagem dos genes de grupos sanguíneos tem permitido a compreensão dos sistemas e de seus determinantes antigênicos. Enquanto a maior parte dos antígenos de grupo sanguíneo está associada a polimorfismos de uma única base no DNA, em outros casos, como os fenótipos nulos, as bases moleculares podem ser complexas, definidas por diferentes eventos genéticos que podem resultar em total ausência de expressão fenotípica (REID, 2003b).

A análise do DNA pode também ser empregada no rastreamento, em larga escala, de doadores de sangue negativos para antígenos raramente expressos (REID, 2007).

Ensaio simultâneos de um grande número de polimorfismos em uma única amostra têm sido utilizados a partir de tecnologias avançadas de *microchips*. Assim, é possível alcançar a compatibilidade precisa entre doadores e receptores, cronicamente submetidos à terapêutica transfusional, melhorando o suporte hemoterápico desses pacientes (HASHMI, 2007). Porém, essa não é ainda uma realidade na rotina da maioria dos bancos de sangue, incluindo os brasileiros.

3. Sangues Raros

Os fenótipos raros são caracterizados pela ausência de um único antígeno de alta frequência populacional ou de um grupo de antígenos agrupados em um único sistema de grupo sanguíneo ou em diferentes sistemas, cujas frequências individuais encontram-se equilibradas nas populações. Diferentes pontos de corte têm sido propostos para definir um fenótipo raro: 4/1000 (França), 1/200 (Nova Iorque), 1/400 (Cruz Vermelha Americana), 1/1000 para fenótipos incomuns ou 1/5000 entre os muitos raros (AABB) (PEYRARD, 2008).

Indivíduos com fenótipos raros podem desenvolver anticorpos especificamente contra os antígenos ausentes que os caracterizam, após exposição por via transfusional ou gestacional. A variação encontrada nas frequências desses fenótipos raros entre diferentes regiões geográficas e etnias evidencia a necessidade de painéis internacionais de doadores raros (PEYRARD, 2008).

Programas para cadastro de doadores raros têm sido criados na tentativa de atender às necessidades transfusionais de receptores aloimunizados por antígenos de alta frequência populacional ou daqueles cuja associação de múltiplos anticorpos resulte em uma combinação fenotípica rara. Em 1998, foi criado o Programa Americano de Doadores Raros, mantido pela Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB) e pela Cruz Vermelha Americana.

JUSTIFICATIVA

Em 2004, estavam registrados mais de 34.000 doadores raros ativos no banco de dados (FLICKINGER, 2004).

Em 1965, a Sociedade Internacional de Transfusão (ISBT) estabeleceu seu primeiro painel de doadores raros. Em 1986 foi criado o *Working Party on Rare Blood Donors*, cujo objetivo era a elaboração de protocolos relacionados ao uso, testagem e transporte de sangues raros, além da associação com o Laboratório Internacional de Grupos Sanguíneos Raros da Organização Mundial de Saúde (WHO) na identificação desses fenótipos. Outros países como França, Alemanha, Reino Unido, Japão, Austrália e África do Sul criaram programas nacionais de doadores raros que subsidiam o desenvolvimento de bancos de sangues raros (WOODFIELD *et al.*, 2004).

No Brasil, não há um programa nacional de doadores raros sob a Coordenação Nacional, mas são registradas iniciativas isoladas de instituições como a Fundação Pró-Sangue, que possui um cadastro de doadores raros e o Hospital Sírio-Libanês, que possui infra-estrutura para a criopreservação de hemácias.

Em Minas Gerais, será aberto o CETEBIO (Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais), coordenado pela Fundação Hemominas, que deverá ser o maior centro de tecidos biológicos da América Latina e que contará com um Banco de Sangues Raros. Isso permitirá o congelamento e fornecimento de hemácias raras para fins transfusionais, especialmente para pacientes politransfundidos, como os portadores de hemoglobinopatias.

A Fundação Hemominas é responsável pelo atendimento hemoterápico de mais de 90% do estado de Minas Gerais (**Figura 1**). O Hemocentro de Belo Horizonte, localizado na capital, é a maior unidade da hemorrede com número de transfusões anuais próximo dos cem mil hemocomponentes. Além da hemoterapia, a Fundação Hemominas atua na área de hematologia, sendo referência no atendimento a pacientes portadores de coagulopatias e hemoglobinopatias. Dentre as patologias atendidas, a anemia falciforme é uma das doenças hereditárias mais comuns no Brasil, sendo a transfusão de sangue um recurso eficaz na profilaxia e tratamento das suas complicações. Sob regimes crônicos de transfusão, as chances de aloimunização por múltiplos antígenos são maiores, o que contribui para reduzir a disponibilidade de sangue compatível no futuro.

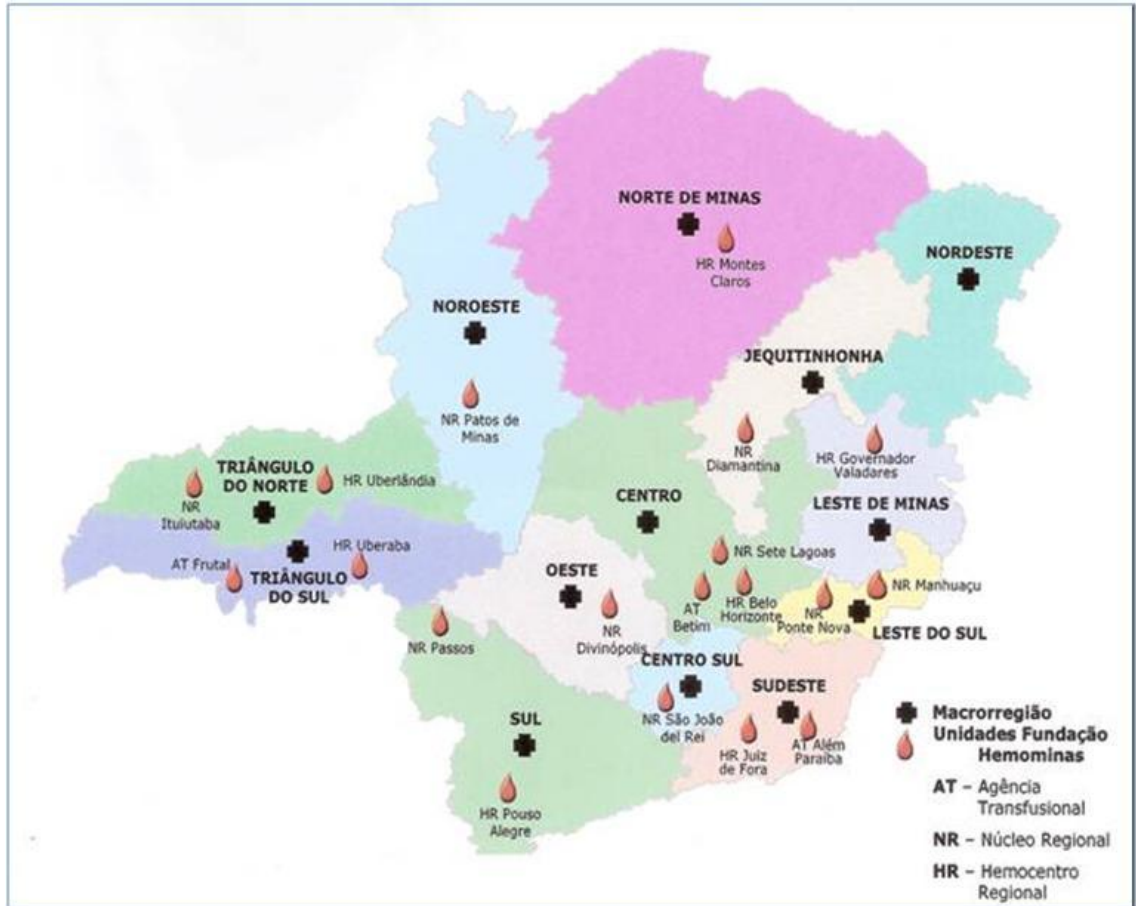


Figura 1: Unidades da Fundação Hemominas por Macrorregião da SES-MG.

Fonte: Fundação Hemominas.

Entre os pacientes com hemoglobinopatias, politransfundidos, atendidos pelo Hemocentro de Belo Horizonte, a taxa de aloimunização está em torno de 10%. Nesse grupo de pacientes, os anticorpos dirigidos contra os antígenos D, C, E, e, K são os mais frequentemente encontrados e as hemácias selecionadas para transfusão devem ser, no mínimo, compatíveis com esse perfil (MURAO, 2005).

A pesquisa dos principais antígenos do sistema Rh (C, c, E, e) e Kell (K, k) é feita de forma rotineira e automatizada no equipamento Beckman Coulter PK pelo Laboratório de Imuno-Hematologia da Fundação Hemominas em todos os doadores com mais de seis doações.

JUSTIFICATIVA

A fenotipagem estendida para os demais antígenos de importância transfusional é realizada por hemaglutinação nas amostras de doadores com mais de 10 doações registradas na instituição.

Transfusões de sangue realizadas entre indivíduos do mesmo grupo racial podem reduzir as taxas de aloimunizações e, conseqüentemente, a necessidade de sangues raros. Exemplo desse direcionamento são os programas de doadores de sangue com descendência africana para pacientes com anemia falciforme nos Estados Unidos. Por outro lado, os efeitos migratórios e a miscigenação das populações podem dificultar a identificação de doadores raros (WOODFIELD *et al.*, 2004).

O avanço das técnicas de criopreservação e o emprego dos testes moleculares na triagem em larga escala de doadores de sangue têm criado um universo promissor na disponibilização de sangues raros. Nesse contexto, dados sobre a prevalência dos principais antígenos de grupo sanguíneo dentro de determinada região geográfica têm aplicação direta na manutenção de estoques raros.

4. O sistema de grupo sanguíneo Dombrock

4.1 Características dos antígenos

O sistema de grupo sanguíneo Dombrock (ISBT 014) foi descrito em 1965, após a identificação do anticorpo dirigido contra o antígeno Do^a no soro de uma paciente de sobrenome Dombrock (SWANSON *et al.*, 1965). O anticorpo contra seu par antitético, Do^b, foi identificado 8 anos mais tarde, caracterizando três possibilidades de fenótipos: Do(a+b-), Do(a+b+) e Do(a-b+) (MOLTHAN, 1973). Somente em 1985, o sistema Dombrock foi reconhecido pela ISBT (LEWIS *et al.*, 1985).

Os antígenos de alta prevalência, Gy^a (Gregory), Hy (Holley) e Jo^a (Joseph), (JENSEN, 1972; SCHMIDT, 1967; SWANSON, 1967) foram incluídos no sistema Dombrock na década de 90 (DANIELS *et al.*, 1995), após a constatação de que eles estão localizados na mesma glicoproteína (SPRING, 1991; SPRING, 1994) e que são fenotipicamente relacionados (BANKS, 1995).

Observou-se inicialmente que indivíduos caucasianos com fenótipo Gy(a-) não expressam o antígeno Hy, enquanto negros de descendência africana com fenótipo Hy- têm fraca expressão do antígeno Gy^a (MOULDS *et al.*, 1975). Posteriormente, detectou-se que o antígeno Jo^a está fracamente expresso ou ausente em hemácias com fenótipo Gy(a-) ou Hy- (BROWN, 1985; WEAVER, 1984).

A proximidade entre os aminoácidos relacionados com a expressão dos antígenos Hy (resíduo 108) e Jo^a (resíduo 117) pode explicar o motivo pelo qual hemácias com fenótipo Hy- não expressam o antígeno Jo^a e porque hemácias Jo(a-) têm fraca expressão do antígeno Hy (**Figura 2**). A fraca expressão dos antígenos Gy^a e Do^b em hemácias Hy- e do antígeno Do^a em hemácias com fenótipo Jo(a-) ainda não é compreendida (REID, 2003a).

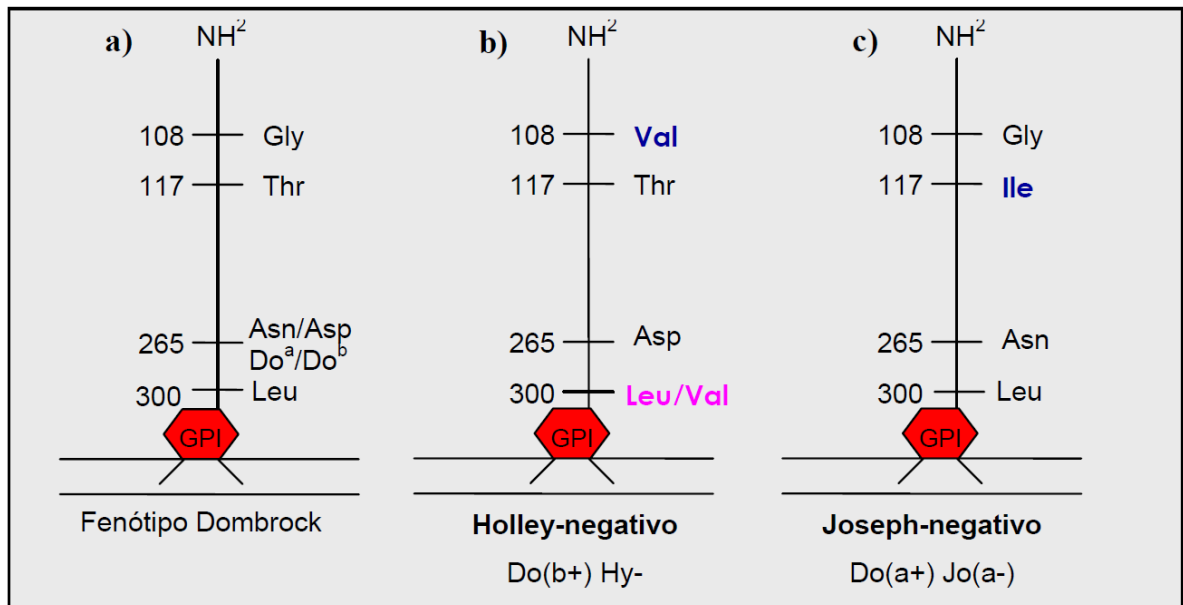


Figura 2: Posições dos antígenos na glicoproteína Do

Fonte: REID, 2005

Recentemente, o sexto antígeno, DOYA, foi identificado e sua ausência está relacionada à perda de reatividade do antígeno Do^a e ao enfraquecimento dos antígenos de alta prevalência (MAYER *et al.*, 2010).

Indivíduos com fenótipo Gy (a-) ou Do_{nulo} não possuem nenhum dos antígenos Dombrock expressos na membrana eritrocitária. A descoberta sorológica dos fenótipos nulos, através da identificação de anticorpos dirigidos contra antígenos de alta frequência populacional, tem sido importante na detecção, por meio de análises moleculares, de alterações genéticas que de outra forma não seriam reveladas (REID, 2003b).

O padrão de expressão dos antígenos Dombrock nos diferentes fenótipos encontra-se demonstrada na **Tabela 3**.

Tabela 3: Expressão dos antígenos Dombrock nos diferentes fenótipos

FENÓTIPOS	ANTÍGENOS DOMBROCK					
	Do ^a	Do ^b	Gy ^a	Hy	Jo ^a	DOYA
Do (a+b-)	+	0	+	+	+	+
Do (a+b+)	+	+	+	+	+	+
Do (a-b+)	0	+	+	+	+	+
Gy(a-)	0	0	0	0	0	0
Hy-	0	Fraco	Fraco	0	0/Fraco	Fraco
Jo(a-)	Fraco	0/Fraco	+	Fraco	0	+/Fraco
DOYA -	0	0	+/Fraco	Fraco	Fraco	0

Legenda: 0 ausência de expressão; + expresso; Fraco fracamente expresso; +/Fraco expresso ou fracamente expresso; 0/Fraco ausência de expressão ou fracamente expresso.

Fonte: REID, 2005

Estudo realizado por Telen *et al.* em pacientes com Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN), uma doença hematológica adquirida associada à perda total ou parcial das proteínas ancoradas à glicosilfosfatidilinositol (GPI), demonstrou que vários antígenos de grupo sanguíneo de alta frequência populacional, como Cartwright (Yt^a/Yt^b), John Milton Hagen (JMH) e Dombrock (Do^a, Do^b, Hy, Gy^a) estão ausentes ou são fracamente expressos nesses indivíduos. Isso indica que esses antígenos estão provavelmente localizados em proteínas de membrana ligada à GPI e que a sua identificação pode tornar possível o estudo dos polimorfismos dessas proteínas, fornecendo indícios do seu funcionamento. (TELEN *et al.*, 1990).

Mais tarde, demonstrou-se que a glicoproteína Dombrock é composta de 314 aminoácidos e está ligada à membrana eritrocitária através de uma molécula de GPI. Análises moleculares concluíram que a proteína pertence à família das ADP-ribosiltransferases (GUBIN *et al.*, 2000), porém nenhuma atividade enzimática foi demonstrada até o momento (REID, 2005).

4.2 Importância clínica

Embora, com exceção do Gy(a), os antígenos Dombrock sejam pouco imunogênicos, os anticorpos produzidos após estímulo transfusional ou gestacional estão relacionados com reações transfusionais hemolíticas, imediatas e tardias. (BAUMGARTEN *et al.*, 2006; HALVERSON *et al.*, 1994; KRUSKALL *et al.*, 1986; MOHENG, 1985; SHIREY *et al.*, 1998; STRUPP, 1998). Apesar de não se conhecer exatamente a habilidade desses anticorpos em causar reações transfusionais, sinais ou sintomas de hemólise estão ausentes quando hemácias compatíveis são selecionadas para transfusão (BAUMGARTEN *et al.*, 2006; SHIREY *et al.*, 1998; STRUPP, 1998).

Os anticorpos do sistema Dombrock são geralmente imunoglobulinas da classe G e reagem melhor em métodos que incluam a fase antiglobulínica. Além da fraca reatividade nos testes imunohematológicos e da rápida deterioração *in vitro*, esses anticorpos estão presentes frequentemente em associação com outros aloanticorpos (BAUMGARTEN *et al.*, 2006; HALVERSON, *et al.*, 1994, STRUPP, 1998).

Dentre os anticorpos dirigidos contra os antígenos de alta freqüência populacional, Jo^a e Hy, dois casos de anti-Jo^a foram descritos em indivíduos negros. (JENSEN, 1972). O anticorpo anti-Hy foi primeiramente identificado por **Schmidt *et al.***, em uma mulher negra durante o parto (SCHMIDT, 1967). Em 1973, três anticorpos anti-Hy foram encontrados, sendo todos em indivíduos negros (MOULDS, 1975). Em 1984, os dois anticorpos, anti-Hy e anti-Jo^a, foram identificados simultaneamente em uma mulher negra com história de aborto de repetição (WEAVER, 1984). Recentemente, um estudo de genotipagem Dombrock em tribos africanas concluiu que há maior probabilidade de identificação dos fenótipos raros Hy- e Jo(a-) nas populações de origem negra em virtude da alta prevalência dos alelos relacionados a esses fenótipos (CHAPEL *et al.*, 2009).

Pacientes com histórico de transfusões crônicas, especialmente os portadores de hemoglobinopatias, são mais susceptíveis à aloimunização. A fraca reatividade sorológica, associada à presença de outros anticorpos imunes, comuns nesse grupo de receptores, dificulta a detecção dos anticorpos Dombrock nos testes pré-transfusionais.

JUSTIFICATIVA

A aparente inespecificidade encontrada na hemaglutinação pode sugerir a presença de outros grupos de anticorpos, clinicamente menos importantes, como aqueles dirigidos contra antígenos leucocitários humanos (HLA), de baixo título e alta avidéz (HTLA) ou mesmo auto-anticorpos (STRUPP, 1998, HALVERSON *et al.*, 1994).

A real incidência das reações transfusionais causadas por anticorpos do sistema Dombrock não é conhecida, já que as hemácias revestidas por esses anticorpos podem ser rapidamente retiradas da circulação, não sendo detectadas pelo teste direto da antiglobulina humana (TAD) na investigação pós-transfusional. O anticorpo, se presente, pode não se desligar da superfície das hemácias após os métodos de eluição, impedindo a comprovação da sua especificidade (REID, 2005). Embora alguns neonatos apresentem TAD positivo, não há relatos de DHPN (REID, 2003a).

A utilização de testes moleculares pode ajudar na resolução de casos suspeitos de reação transfusional por anticorpos do sistema Dombrock, ao identificar o genótipo *DO* do receptor, podendo também ser aplicado na seleção das hemácias a serem utilizadas nos painéis de identificação de anticorpos. (HULT *et al.*, 2005).

4.3 O gene *DO*

A clonagem e seqüenciamento do gene *DO* (Figura 3) permitiram a análise dos seus polimorfismos.

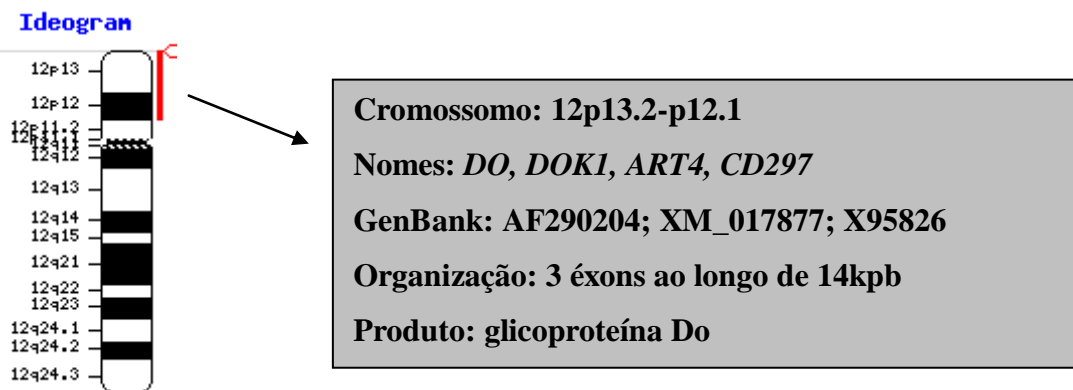


Figura 3: Características do gene *DO*

JUSTIFICATIVA

Polimorfismos em bases únicas no DNA, chamados SNPs, foram associados aos seis diferentes antígenos desse sistema: Do^a, e seu par antitético Do^b, os de alta frequência Hy, Jo^a e Gy^a (BANKS, 1995; MOLTHAN, 1973; MOULDS *et al.*, 1975) e o último antígeno identificado, DOYA (MAYER *et al.*, 2010).

Os pares antitéticos *DO*A/DO*B* divergem em três nucleotídeos nas posições 378C>T, 624T>C e 793A>G no éxon 2 do gene *DO*. Os dois primeiros polimorfismos são silenciosos ao nível da proteína, enquanto o SNP 793 A>G codifica a troca dos aminoácidos asparagina por ácido aspártico na posição 265 da proteína, caracterizando os respectivos antígenos Do^a e Do^b (GUBIN *et al.*, 2000). O alelo *JO*, que codifica o fenótipo Jo(a-), está associado à troca de 2 nucleotídeos no éxon 2 do gene, SNP 350 C >T, que altera o aminoácido treonina por leucina na posição 117 da proteína e o SNP silencioso 378 C>T (RIOS *et al.*, 2002a). O alelo *JO* possui invariavelmente o polimorfismo 793 A, caracterizando o fenótipo Do (a+b). Logo, todo fenótipo Jo(a-) expressa o antígeno Do^a (**Tabela 3**).

O fenótipo Hy- é determinado pelo SNP 323 G>T, que substitui o aminoácido glicina por valina na posição 108 da cadeia polipeptídica Do e pelo SNP silencioso 378 T>C (**Figura 4**). Esse alelo pode ser de dois tipos, *HY*1* e *HY*2*, dependendo do nucleotídeo na posição 898C>G, que substitui o aminoácido leucina por valina na posição 300 da proteína (RIOS *et al.*, 2002a). A presença do polimorfismo 793G no alelo *HY* explica porque as hemácias com fenótipo Hy- são Do (a-b+) e sempre expressam antígeno Do^b (**Tabela 3**).

O SNP 547T>C está associado à ausência do antígeno DOYA e é responsável pela substituição do aminoácido tirosina por aspartato na posição 183 da proteína, o que altera sua conformação estrutural e acarreta perda na expressão do antígeno Do^a (MAYER *et al.*, 2010).

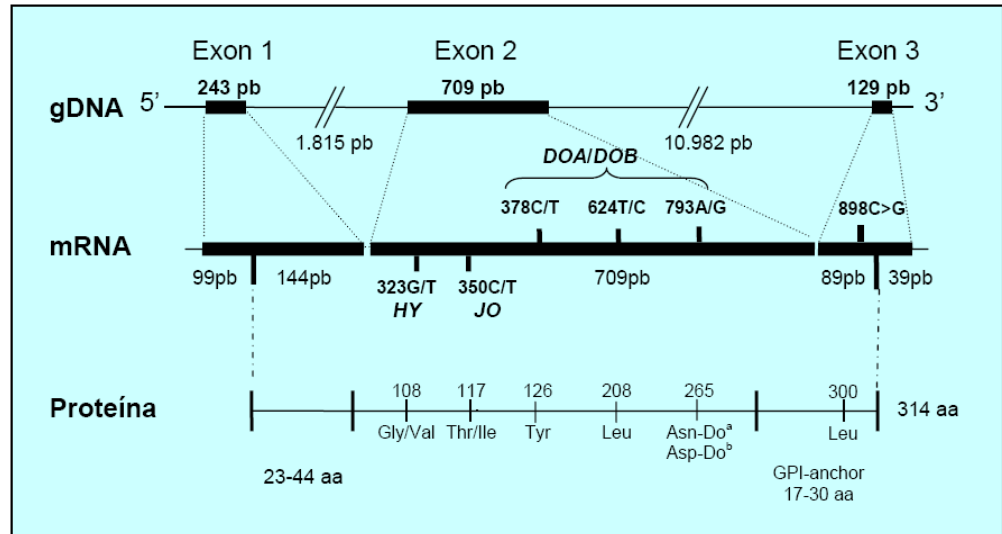


Figura 4: Apresentação esquemática do gene *DO*

Fonte: Baleotti, 2006 (a)

Mutações no gene *DO* podem suprimir a expressão dos seus produtos, caracterizando os fenótipos nulos (RIOS, 2002b). Até o momento, cinco alterações moleculares foram correlacionadas a fenótipos nulos do sistema Dombrock (**Tabela 4**).

Tabela 4: Bases moleculares do fenótipo nulo do sistema Dombrock

Bases moleculares	Mecanismos	Referências bibliográficas
Mutação A/G no receptor de <i>splice</i> do intron 1	Exon 2 do alelo DOB não é transcrito	Rios <i>et al.</i> , 2001(b)
Mutação T/C no doador de <i>splice</i> do intron 1	Exon 2 do alelo DOB não é transcrito	Rios <i>et al.</i> , 2002(b)
SNP 442 C/T no exon 3	Parada prematura da transcrição	Rios <i>et al.</i> , 2002(b)
Deleção 343-350 no exon 2	Parada prematura da transcrição	Lucien <i>et al.</i> , 2002
SNP 185 t/c no exon 2	Substituição Phe62Ser	Westhoff <i>et al.</i> , 2007

As três primeiras mutações encontradas eram no alelo *DO*B*, enquanto no fenótipo descrito por **Lucien et al.** estava o alelo *DO*A*. As mutações nos sítios de *splice* alteram a proteína Do ou a inativam. Em caso de tradução, o ponto de ligação à GPI é perdido e a proteína não é expressa. O estudo dessas mutações pode esclarecer a função da proteína Do ligada à GPI em humanos (RIOS *et al.*, 2001b). No último polimorfismo descrito, a troca de aminoácidos é responsável pela interrupção de cadeias aromáticas que levam à perda da estabilidade da proteína.

4.4 Métodos moleculares para genotipagem Dombrock

Devido à escassez de soros monoespecíficos de boa qualidade, a identificação fenotípica do sistema Dombrock por métodos sorológicos é de difícil realização, sendo a genotipagem uma ferramenta em ascensão (MacFARLAN *et al.*, 2006, RIOS, *et al.* 2001a; STORRY *et al.*, 2003).

Inúmeros ensaios moleculares têm sido usados na identificação de polimorfismos de grupo sanguíneo, incluindo os do sistema Dombrock. A tecnologia mais recentemente empregada é a do *microchip*, que permite a investigação de vários SNPs simultaneamente através de sondas de oligonucleotídeos marcados com fluorocromos e aderidos à uma superfície sólida. A análise molecular por *microchip* é realizada através de uma única reação de PCR-*multiplex* seguida de uma reação de “alongamento” (extensão) de cada produto gerado pela PCR, após hibridização com seu alelo específico, em um sistema chamado *bead arrays*. O espectro de cor gerado pela hibridização de seqüências de DNA complementar na amostra é detectado e interpretado por um sistema automatizado (HASHMI, 2007).

Ensaio moleculares por PCR-RFLP foram desenvolvidos baseados no conceito de que a mutação pesquisada pode estar associada à presença ou ausência de sítios de restrição enzimática. Essa metodologia permite a amplificação simultânea de ambos os alelos com um único par de *primers* e a diferenciação é feita através dos tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão enzimática dos produtos da PCR, visualizados após eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida.

JUSTIFICATIVA

A identificação dos polimorfismos relacionados aos antígenos Do^a e Do^b foram primeiramente descritos após o sequenciamento das regiões de codificação do gene *DO* em amostras definidas sorologicamente como Do(a+b-) e Do(a-b+). Os três SNPs identificados foram concordantes com todas as amostras testadas e as bases moleculares do polimorfismo *DO**A/*DO**B foi determinada (GUBIN *et al.*, 2000).

Baseado nesse conhecimento, dois métodos de PCR-RFLP foram desenvolvidos para dois desses polimorfismos nas posições 624 e 793 do gene e os resultados demonstraram a capacidade de distinção dos alelos *DO**A/*DO**B por ambos os testes. O uso de um único par de iniciadores e o padrão distinto de bandas obtido com os sítios de restrição das enzimas *MnI* e *Eam* 1105 I, respectivamente, foram as principais vantagens alcançadas com esse método (RIOS *et al.*, 2001a). Posteriormente, identificou-se que o alelo *DO**B possuía na posição 793 um sítio de restrição para a enzima *Bse* RI, disponível comercialmente, que estava ausente no seu par *DO**A (VEGE, 2002). No ensaio com a *Eam* 1105 I, foram introduzidas mudanças em ambos os iniciadores a fim de obter padrão distinto entre os alelos.

Mutações nas posições 323, 350 e 898 foram identificadas por seqüenciamento e ensaios por PCR-RFLP foram desenvolvidos com as enzimas *Bsa* JI, *Xcm* I e *Bsm* AI para identificação dos alelos *HY*, *JO* e o variante *HY**2, respectivamente (RIOS, 2002a).

O primeiro estudo de genotipagem Dombrock usando método de reação em cadeia da polimerase com seqüências específicas de iniciadores (PCR-SSP) foi empregado por **Wu *et al.***, para a análise da freqüência dos alelos *DO**A e *DO**B em doadores de sangue chineses. A validação do método foi feita por seqüenciamento de amostras randomicamente selecionadas e os resultados demonstraram, além da sua acurácia, a vantagem de não exigir passos adicionais, como os testes com restrição enzimática (WU, 2001).

Outros métodos, como PCR em tempo real e *microchip* já foram empregados na genotipagem Dombrock (ARAÚJO, 2003; HASHMI *et al.*, 2005). No estudo de viabilidade do método de *microchip* na análise de polimorfismos de grupo sanguíneo, dois novos alelos Dombrock foram descobertos, *DO**A-HA e *DO**B-SH, em amostras de diversos grupos étnicos (HASHMI *et al.*, 2005).

No Brasil, os estudos de genotipagem Dombrock com doadores de sangue do estado de São Paulo foram feitos usando PCR-RFLP e a tecnologia do *microchip* (BALEOTTI *et al*, 2006b).

4.5 Os alelos *DO* variantes

Novos alelos *DO* têm sido revelados a partir de diferentes combinações de nucleotídeos nas posições 323, 350, 378, 624, 793 e 898 do gene *DO* e de novos SNPs identificados por seqüenciamento (**Tabela 5**). Dentre os alelos variantes, dois deles foram inicialmente descritos a partir da análise de um painel de diferentes etnias, incluindo uma miscelânea de amostras proveniente da cidade de Nova Iorque: *DO*B-SH* (378C, 624C, 793G) e *DO*A-HA* (378T, 624T, 793A) (HASHMI, *et al*. 2005)

O estudo brasileiro conduzido por **Baleotti *et al***. em doadores de sangue do estado de São Paulo identificou os alelos *DO*B-SH* e *DO*A-HA*, além de mais três variantes do gene *DO* e concluiu que o SNP 898 C>G não está associado apenas ao alelo *HY*, mas caracteriza um rearranjo do alelo *DO*B*, denominado *DO*B-WL* (BALEOTTI *et al*., 2006b). O alelo variante *DO*A-SH*, também descrito inicialmente entre brasileiros, apresenta o SNP silencioso 624, associado à base molecular do alelo *DO*A* (378C e 793A). Em seguida, o mesmo polimorfismo 898 C>G foi encontrado associado ao alelo *DO*A*, designado *DO*A-WL* (BALEOTTI, 2009).

Recentemente, dois novos SNPs, 524T>A e 445C>A foram identificados em africanos a partir da técnica de seqüenciamento, caracterizando os respectivos alelos variantes: *DO*B-I175N* e *DO*B-SH-Q149K*. Apesar da mudança de aminoácidos induzida por esses SNPs, a estrutura tridimensional da proteína é pouco afetada.

Considerando a variabilidade do gene *DO*, novos alelos podem ser identificados a partir de polimorfismos ainda não descritos, identificados a partir da investigações conduzidas em diferentes populações.

Tabela 5: Polimorfismos de única base no gene *DO*

Alelos	Nucleotídeo (aminoácido)								Referências Bibliográficas
	323(108)	350(117)	378*(126)	445(149)	524(175)	624*(208)	793(265)	898(300)	
<i>DOA</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	C	T (Ile)	T	A (Asn)	C	Rios <i>et al</i> , 2001
<i>DOB</i>	G (Gly)	C (Thr)	T	C	T (Ile)	C	G (Asp)	C	Rios <i>et al</i> , 2001
<i>JO</i>	G (Gly)	T (Ile)	T	C	T (Ile)	C	A (Asn)	C	Rios <i>et al</i> , 2001
<i>HY1**</i>	T (Ile)	C (Thr)	C	C	T (Ile)	G	G	G (Val)	Rios <i>et al.</i> , 2001
<i>HY2</i>	T (Ile)	C (Thr)	C	C	T (Ile)	C	G (Asp)	C	Rios <i>et al</i> , 2001
<i>DOA-WL**</i>	G (Gly)	C (Thr)	NT	NT	NT	NT	A (Asn)	G (Val)	Baleotti <i>et al</i> ,2009
<i>DOB-WL**</i>	G (Gly)	C (Thr)	T	C (Gln)	T (Ile)	C	G (Asp)	G (Val)	Baleotti <i>et al</i> ,2006
<i>DOA-SH**</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	C (Gln)	T (Ile)	C	A (Asn)	NT	Baleotti <i>et al</i> ,2006
<i>DOB-SH**</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	C (Gln)	T (Ile)	C	G (Asp)	C (Leu)	Hashmi <i>et al</i> , 2005
<i>DOA-HA**</i>	G (Gly)	C (Thr)	T	C (Gln)	T (Ile)	T	A (Asn)	C (Leu)	Hashmi <i>et al</i> , 2006
<i>DOB-SH-Q149K**</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	A (Lys)	T (Ile)	C	G (Asp)	C (Leu)	Chapel <i>et al</i> , 2009
<i>DOB-I175N**</i>	G (Gly)	C (Thr)	T	C (Gln)	A (Asn)	C	G (Asp)	C (Leu)	Chapel <i>et al</i> , 2010

* SNPs silenciosos que não alteram a expressão da proteína Do

** Alelos variantes

NT: Não testado

4.6 A prevalência dos alelos DO

Poucos dados relativos à frequência dos antígenos Dombrock são disponíveis devido à escassez de soros adequados para fenotipagem. Inicialmente, apenas a frequência dos fenótipos Do(a+b+), Do(a-b+) e Do(a+b-) pôde ser estabelecida a partir de investigações com soro original anti-Do^a. (CHANDANAYINGYONG, 1967; NAKAJMA, 1979; POLESKY, 1966). A maior frequência do antígeno Do^a em caucasianos (0,64), negros (0,55) e índios americanos (0,57), quando comparada com estudos feitos em tailandenses (0,13) e japoneses (0,18) sugere origens populacionais diversas (NAKAJMA, 1980).

O desenvolvimento das técnicas moleculares tem permitido determinar a prevalência dos alelos DO em diferentes populações e identificar alelos variantes (ARAUJO *et al.*, 2003; BALEOTTI *et al.*, 2006b; HASHMI *et al.*, 2005; WU G-G *et al.*, 2001) (Figura 5).

Amostras	Judeus	Chineses	Israelenses	Tailandeses	Novaiorquinos	Brasileiros		Portugueses	Chineses
	Asquenazi					Marília	Campinas		
Alelos	%	%	%	%	%	%	%	%	%
DOA/DOA	13.1	0	11.2	2	11.0	10.07	11.73	20	1.0
DOA/DOA-HA	1.4	1.7	5.3	0	1.8	NT	0.62	NT	NT
DOA/DOB	30.4	12.1	42.6	14	21.5	27.08	40.74	46	18.5
DOA/DOB-WL	NT	NT	NT	NT	NT	12.50	NT	NT	NT
DOA-SH/DOB	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.62	NT	NT
DOA/DOB-SH	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.62	NT	NT
DOA-HA/DOB	2.9	6.9	5.3	11	2.8	NT	1.85	NT	NT
JO/JO	0	0	0	0	1.8	0	0	NT	NT
JO/DOA	0	0	0	0	2.3	0.35	1.23	NT	NT
JO/DOB	0	0	0	0	1.4	2.43	1.85	NT	NT
HY/JO	0	0	0	0	0.9	0	0	NT	NT
HY/HY	0	0	0	0	1.4	0	0	NT	NT
HY/DOA	0	0	0.5	0	0.5	0.69	0.62	NT	NT
HY/DOB	0	0	0	0	14.2	1.04	0.62	NT	NT
HY/DOB-SH	0	0	0	0	1.4	NT	NT	NT	NT
DOB/DOB	52.2	79.3	35.1	73	38.0	31.94	39.51	34	80.5
DOB/DOB-SH	0	0	0	0	0.5	NT	NT	NT	NT
DOB/DOB-WL	NT	NT	NT	NT	NT	13.54	NT	NT	NT
DOB-WL/DOB-WL	NT	NT	NT	NT	NT	0.35	NT	NT	NT
Referências	Hashmi et al, 2005					Balleotti et al, 2006		Araujo et al, 2005	Wu et al, 2001

Figura 5: Frequência dos genótipos Dombrock em diferentes populações

Fonte: Baleotti, 2006 (a).

JUSTIFICATIVA

As freqüências dos alelos antitéticos *DO**A e *DO**B em portugueses foi de 0,43 e 0,57, respectivamente, e diferente da encontrada em chineses: 0,1 para *DO**A e 0,9 para *DO**B. Nesses estudos, apenas o polimorfismo associado aos antígenos *Do*^a e *Do*^b foi investigado. (ARAUJO *et al.*, 2003; WU G-G *et al.*, 2001)

A inclusão dos SNPs silenciosos 378C>T e 624T>C dos alelos *DO**A e *DO**B e dos polimorfismos associados aos alelos *HY* (323G>T) e *JO* (SNP 350 C >T) nos estudos de freqüência tem demonstrado uma variabilidade nos resultados, quando considerada a presença dos alelos variantes. A comparação de freqüência entre as populações deve, portanto, considerar os SNPs pesquisados.

A análise realizada em doadores de sangue do estado de São Paulo, além de demonstrar a heterogeneidade do alelo *DO* na população brasileira com a descoberta dos alelos variantes *DO**B-WL, *DO**A-WL e *DO**A-SH, também detectou maior freqüência do alelo *JO* em relação ao *HY*, quando comparado com doadores da cidade de Nova Iorque. Esse resultado pode ser explicado por possíveis diferenças na origem dos africanos trazidos para as Américas do Norte e do Sul. (CASTILHO *et al.*, 2008)

Mais recentemente, a identificação do alelo *DO**B-WL entre africanos sugere uma associação com a população brasileira, provavelmente relacionada ao tráfico de escravos. Concluiu-se também que devido à alta freqüência dos alelos *HY* (7%) e *JO* (4%), a investigação dos SNPs 323G>T e 350C>T é necessária nos estudos de prevalência em africanos, considerando a possível existência de doadores raros, homocigotos para esses alelos (CHAPEL *et al.*, 2009).

A análise genotípica do sistema Dombrock em diferentes populações pode explicar as variações observadas na intensidade da expressão de alguns antígenos, quando presentes em determinados fenótipos, e esclarecer o perfil inesperado na produção de anticorpos (REID, 2005).

OBJETIVOS

Considerando:

- A importância clínica do sistema Dombrock, relacionada ao risco de reação transfusional por seus anticorpos;
- O número de alelos variantes do gene *DO*;
- A miscigenação brasileira;
- A implantação do Banco de Sangues Raros no estado de Minas Gerais;

OBJETIVO GERAL

Desenvolver o primeiro estudo sobre o sistema Dombrock no estado de Minas Gerais.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar a frequência dos diferentes alelos *DO* em doadores de sangue da maior unidade da Fundação Hemominas, através de genotipagem por PCR-RFLP.

SUJEITOS E MÉTODOS

A. SUJEITOS

Amostras de sangue venoso periférico, colhidas em EDTA, foram obtidas randomicamente de 270 doadores de sangue do Hemocentro de Belo Horizonte, após assinatura do Termo de Consentimento Informado e Esclarecido aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas e Universidade Federal de Minas Gerais (**ANEXO 1**). As amostras foram coletadas no momento da doação, entre agosto de 2008 e abril de 2009, e identificadas apenas pelo número do doador. Nenhum critério de seleção foi adotado na escolha dos participantes.

O tamanho amostral foi calculado considerando um nível de significância estatística e margem de erro de 5% e poder estatístico de 80% em relação à prevalência do alelo *DO*B-WL*, revelado pelo estudo brasileiro de **Baleotti et al.** (2006a) na população do estado de São Paulo.

Todos os doadores que possuíam o alelo *HY* ou *JO* na análise genotípica foram classificados em negros, brancos e pardos conforme a autodenominação de cor da pele informada no momento do cadastro. O objetivo dessa análise deve-se ao fato de ter sido encontrada uma frequência elevada dos alelos *HY* e *JO* entre africanos (CHAPEL *et al*, 2009), além dos anticorpos anti-Hy e anti-Jo(a-) terem sido identificados em indivíduos negros, indicando maior frequência dos fenótipos raros Hy- e Jo(a-) nessa população (SCHMIDT, 1967; JENSEN, 1972; WAVER, 1984).

B. MÉTODOS

1. Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído da camada leucocitária das amostras de sangue, a partir de uma alíquota de 300µl, obtida após a centrifugação da amostra por 10 minutos a 3000 *g*. O kit utilizado na extração do DNA, Ilustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit, foi obtido da GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK. As etapas da extração foram seguidas, conforme as recomendações do fabricante.

Para lise das hemácias, foram adicionados 20 µL de proteinase K do kit em tubos eppendorf de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 300 µL de *buffy coat* de cada amostra e 400 µL de tampão de lise. Após agitação vigorosa por 15 segundos usando vórtex, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos, com agitação vigorosa. Após breve centrifugação, as amostras foram transferidas para os tubos de colunas do kit.

Para ligação do DNA, as amostras foram centrifugadas por 90 segundos a 11.000 X *g* e o filtrado foi cuidadosamente desprezado. Para a lavagem, foram adicionados 500 µL de tampão, seguido de outra etapa de centrifugação e descarte de filtrado. A operação de secagem foi repetida, porém com maior tempo de centrifugação. Para eluição do DNA, foram usados 200 µL de solução de eluição pré-aquecida à 70°C com incubação por 60 segundos, seguida de uma etapa de centrifugação.

2. Genotipagem Dombrock por PCR-RFLP

Os segmentos do gene *DO* foram amplificados em termociclador (TC-412, Barloworld Scientific Techne, United Kingdom) usando três pares de *primers*, nas condições previamente descritas **Rios et al**, (2002a), com modificação na temperatura de anelamento do par de *primers* DoEx3F/DoEx3R.

Na reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados 100 ng de DNA, 2,0 pmol de cada primer, 200 M de cada dNTP, 3,5 µM de MgCl₂, 0,8 U enzima Taq DNA polimerase e tampão em um volume final de 20µL.

SUJEITOS E MÉTODOS

As reações eram submetidas a 35 ciclos de amplificação nas seguintes condições de temperatura: 94°C por 20 segundos, seguida de 20 segundos na temperatura de anelamento de cada para específico de *primer* e 72°C por 20 segundos.

A enzima Taq DNA polimerase, TrueStart™, utilizada nas reações de PCR, foi obtida da Fermentas Life Sciences®, Canadá. Os nucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP foram obtidos da Invitrogen®, Carlsbad, CA. A concentração de dNTPs de 4µM utilizada na reação de PCR foi obtida diluindo 10µL de cada nucleotídeo em 60 µL de água deionizada.

Os produtos da amplificação foram digeridos por endonucleases de restrição para identificação dos seguintes polimorfismos no gene *DO*: *Eam1105 I* para 793A/G (*DO*A/DO*B*), *BseDI* para 323G/T (*HY*), *XcmI* para 350C/T (*JO*) e *Alw26I* para 898C/G (*HY*1; DO*A-WL; DO*B-WL*).

As concentrações da enzima de restrição e as temperaturas de incubação seguiram as recomendações de cada fabricante. As enzimas de restrição *Eam1105 I*, *BseDI* e *Alw26I* foram obtidas da Fermentas Life Sciences® e a *XcmI* da New England Biolabs®.

Os fragmentos da digestão enzimática foram identificados por eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio, com tempo de corrida de 90 minutos a 80 volts e visualizados sob luz UV. A solução de agarose a 3% foi preparada dissolvendo 3 gramas de agarose UltraPure™, da Invitrogen®, em 100 mL de TAE 1X. A suspensão foi aquecida em forno de microondas por cinco minutos e após o resfriamento foi adicionada solução de brometo de etídio (10mg/mL).

A seqüência dos *primers*, as condições de amplificação e produtos da PCR e o tamanho dos fragmentos de restrição estão descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6: Sequência dos *primers*, temperaturas de anelamento, tamanho dos produtos, enzimas de restrição e fragmentos

Primers	Temperatura anelamento	Produto	Enzima	Fragmentos de restrição	
DoABF 5'-CACTTTAATGCCTACACAGGGACCACCAGTCGA-3' DoABR 5'-ATGTGCTCAGGTTCCCAGTTGACCTCAACGACAAC-3'	62°C	257 pb	Eam1105I	230, 27 (DOA)	196, 34 (DOB)
DoX2F 5'-TCAGTACCAAGGCTGTAGCA-3' Do378R 5'-AGTAAAGTCAGAATGAACATTGCTGCACAAT-3'	58°C	220 pb	BseDI Xcml	120, 92, 8 (DO)	212, 8 (HY) 167, 53 (DO)
DoEx3F 5'-TCAATGGATAGATGAGGTAG-3' DoEx3R 5'-TGGTTTCAGCAGAAGTATGA-3'	52°C	291 pb	Alw26I	291 (HY1)	170, 121 (HY2)

2.1 Genotipagem *DO**A/*DO**B

A genotipagem *DO**A/*DO**B (SNP 793A/G) foi realizada através de amplificação de um segmento de 257pb do éxon 2 do gene *DO*, utilizando o par de *primers* DoABF/DoABR (Tabela 5). O produto obtido foi submetido à ação da enzima *Eam1105* que reconhece o sítio de clivagem 5'...GACNNN↓NNGTC...3'. Na presença do alelo *DO**A, a enzima reconhece apenas um ponto de clivagem, gerando dois fragmentos de 230 e 27pb. Quando o alelo *DO**B está presente, a enzima reconhece dois sítios de restrição, com três produtos de 196, 34 e 27pb. Os alelos foram reconhecidos a partir dos diferentes padrões de migração dos produtos de 230 e 196 pb na eletroforese em gel de agarose à 3% (Figura 6).

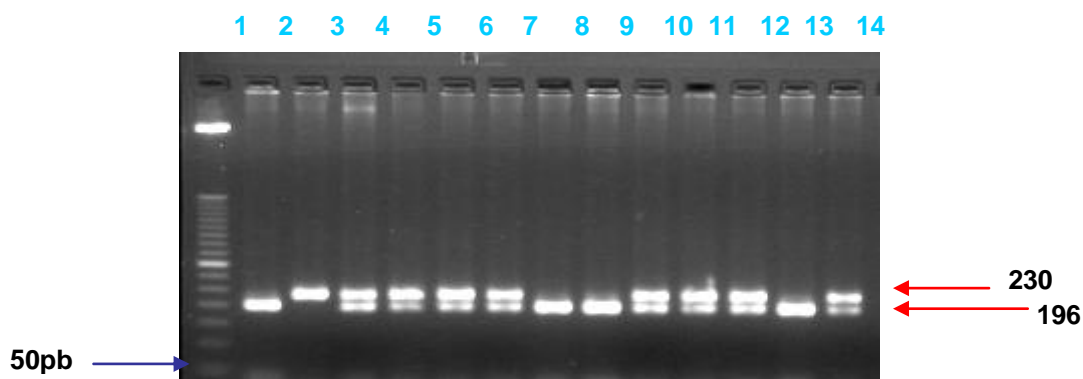


Figura 6: Genotipagem *DOA/*DO**B por PCR-RFLP (793 A>G):** Coluna 1: peso molecular 50pb. Colunas 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12 e 14 : amostras *DO**A/*DO**B. Colunas 2, 8, 9 e 13: amostras *DO**B/*DO**B. Coluna 3: amostra *DO**A/*DO**A.

2.2 Genotipagem Holley (HY)

A genotipagem *HY* (SNP 323G/T) foi realizada através de amplificação de um segmento de 220pb do éxon 2 do gene *DO*, utilizando o par de *primers* DoX2F/Do378R (Tabela 5). O produto obtido foi submetido à ação da enzima *BseDI* que reconhece o sítio de clivagem 5'...CCNN ↓ NNGG...3'. Na presença do alelo *HY* (SNP323T), a enzima reconhece apenas um sítio de clivagem, gerando dois fragmentos de 212 e 8pb. Quando o alelo *HY* está ausente (SNP323C), a enzima reconhece dois sítios de restrição, com três produtos de 120, 92 e 8pb. Apenas os fragmentos de 212, 120 e 92 pb foram observados na eletroforese em gel de agarose a 3% (Figura 7).

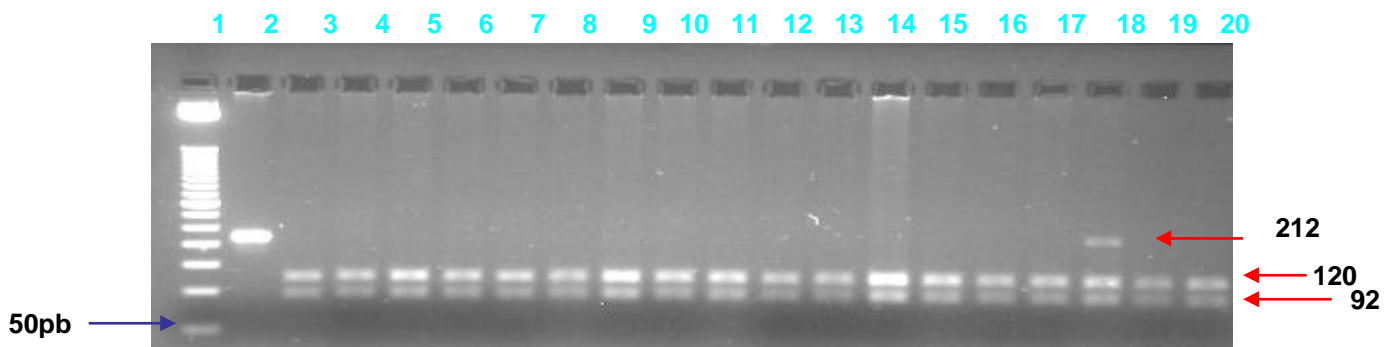


Figura 7: Genotipagem *HY* por PCR-RFLP (323 G>T): Coluna 1: peso molecular 50pb. Colunas 2 e 5: amostras *HY/DO*. Colunas 3 e 6: amostra *HY/HY* (repetição da mesma amostra). Coluna 4: controle negativo. Coluna 7: produto de PCR sem digestão.

2.3 Genotipagem Joseph (JO)

A genotipagem JO (SNP 350C/T) foi realizada através de amplificação de um segmento de 220pb do éxon 2 do gene DO, utilizando o par de *primers* DoX2F/Do378R (Tabela 5). O produto obtido foi submetido à ação da enzima *XcmI* que reconhece o sítio de clivagem 5'...CCA NNNNN↓NNNNTGG...3'. Na ausência do alelo JO (SNP350C), a enzima reconhece um sítio de clivagem, gerando dois fragmentos de 167 e 53pb. Quando o alelo JO está presente (SNP350T), o sítio de clivagem é abolido e o produto permanece com 220 pb. (Figura 8).

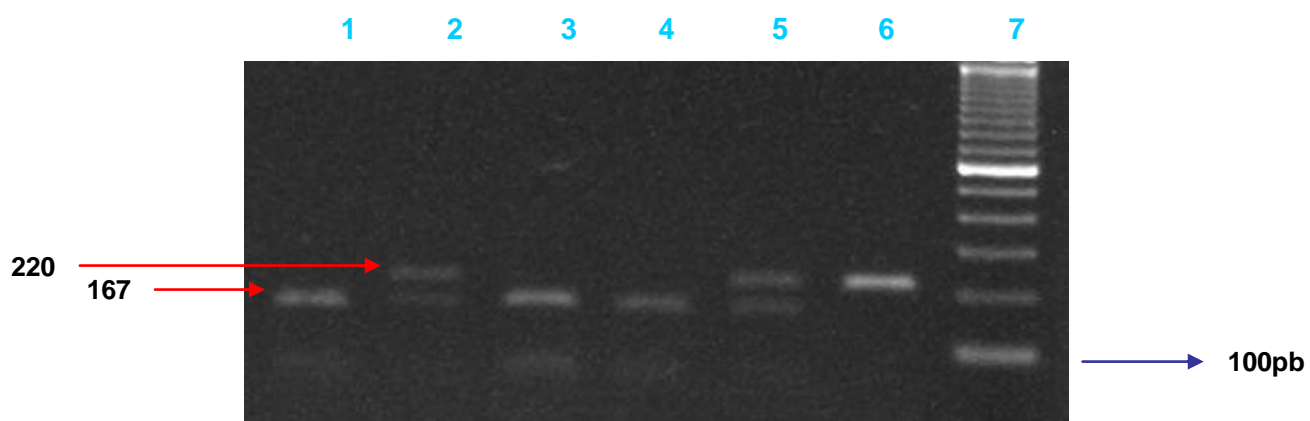


Figura 8: Genotipagem JO por PCR-RFLP (350 C>T): Colunas 1, 3 e 4: Amostra DO/DO. Colunas 2 e 5: amostra JO/DO. Coluna 6: produto de PCR. Coluna 7: peso molecular 100pb.

2.4 Genotipagem SNP 898

A genotipagem do SNP 898C>G (*HY*1*, *DO*A-WL* e *DO*B-WL*) foi realizada através de amplificação de um segmento de 291pb do éxon 3 do gene *DO*, utilizando o par de *primers* DoEx3F/Do3X3R (**Tabela 5**). O produto obtido foi submetido à ação da enzima *A/w26I* que reconhece o sítio de clivagem 5'...GTCTC(N)↓...3'. Na presença do SNP 898G, a enzima reconhece um sítio de clivagem, gerando dois fragmentos de 170 e 121pb, caracterizando os alelos *HY*1*, *DO*A-WL* ou *DO*B-WL*, em associação aos resultados obtidos na análise dos polimorfismos 793A>G e 323G>T. Quando o polimorfismo 898C está presente, o sítio de clivagem é abolido e o produto permanece com 291 pb (*HY*2*, *DO*A* ou *DO*B*). (**Figura 9**).

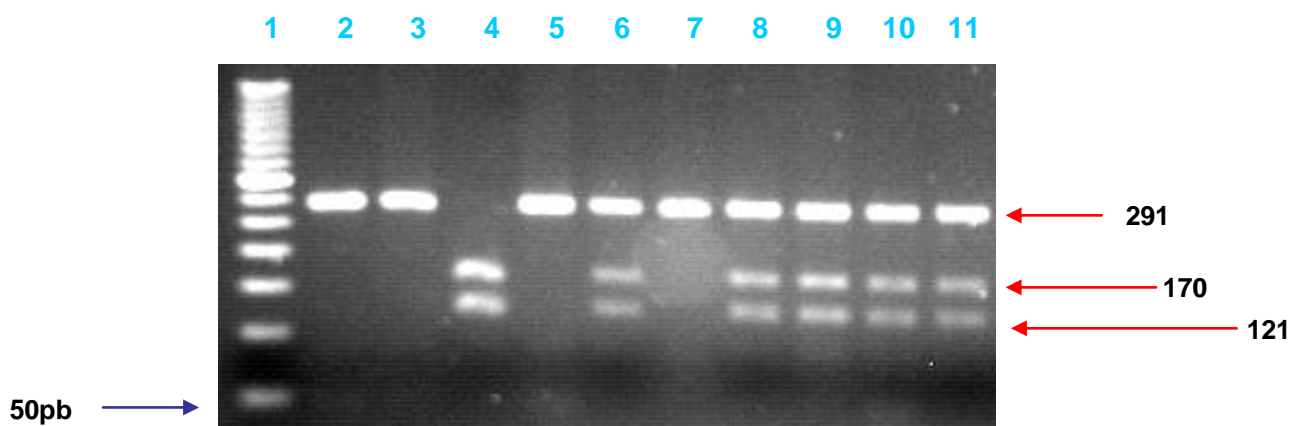


Figura 9: Genotipagem 898 C>G por PCR-RFLP: Coluna 1: peso molecular 50pb. Colunas 2, 3, 5 e 7: amostras 898C em ambos os alelos. Coluna 4: amostra 898G em ambos os alelos. Colunas 6, 8, 9, 10 e 11: amostras com os dois polimorfismos 898C e 898G em cada um dos alelos.

3. Análise Estatística

Para avaliar a significância estatística da diferença encontrada nas frequências dos alelos *HY* e *JO* entre os estados de Minas Gerais e de São Paulo foi utilizado o teste qui-quadrado para cada um desses dois alelos, separadamente.

O teste exato de Fisher foi empregado na análise da relação entre a presença dos alelos *HY* e *JO* e a autodenominação de cor de pele (branca, negra ou parda) informada pelos doadores de sangue que possuíam esses alelos.

A frequência dos demais alelos nas duas populações, *DO*A*, *DO*B*, *DO*A-WL* e *DO*B-WL* não foi comparada, já que os outros variantes *DO*B-SH*, *DO*A-HA* e *DO*A-SH* não foram investigados no estudo.

RESULTADOS

Dos 270 voluntários que participaram do estudo, 125 (46,3%) eram do sexo masculino e 145 (53,7%) eram do sexo feminino. Esse número de participantes representa aproximadamente 5% do total de doadores aptos atendidos pelo Hemocentro de Belo Horizonte mensalmente. Apesar de estar localizado na capital, 48,1% dos doadores eram oriundos da região metropolitana da cidade.

Considerando o tamanho estimado da casuística e a seleção randômica dos participantes, pode-se inferir que os resultados apresentados são representativos da população de doadores do estado de Minas Gerais.

1. Análise genotípica do sistema de grupo sanguíneo Dombrock

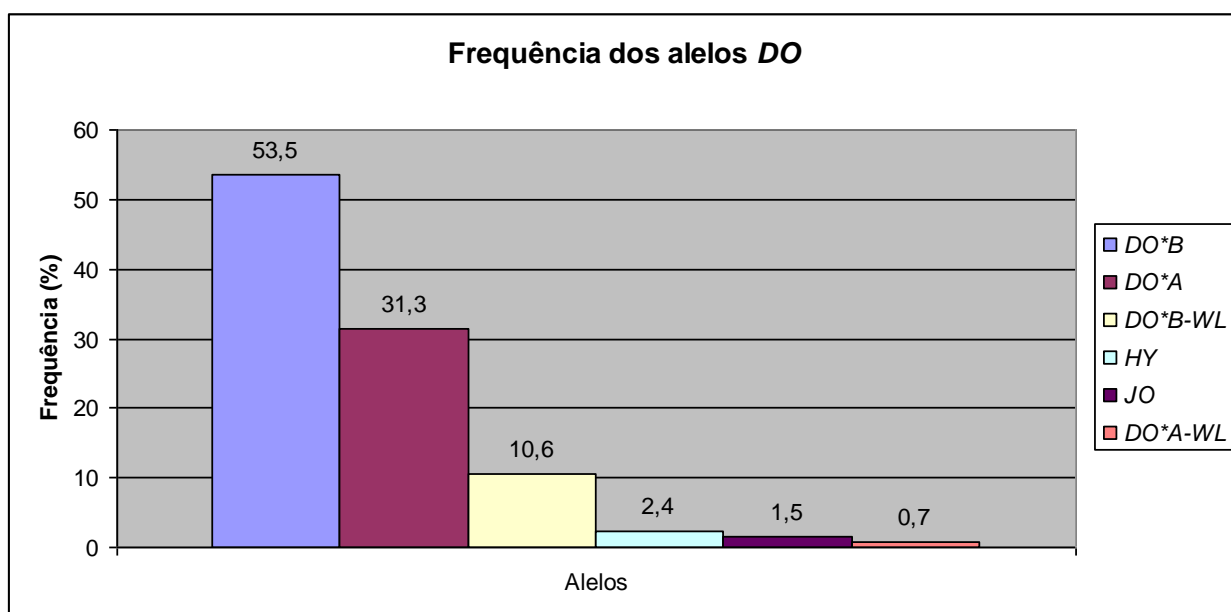
A análise genotípica do sistema de grupo sanguíneo Dombrock foi realizada por PCR-RFLP em 270 amostras de doadores do Hemocentro de Belo Horizonte.

Os genótipos foram definidos de acordo com a combinação dos seguintes polimorfismos:

- 793 A>G (alelos *DO*A/DO*B*)
- 323 G>T (alelo *HY*)
- 350 C>T (alelo *JO*)
- 898 C>G (alelos *HY*1*, *DO*A-WL* ou *DO*B-WL*).

Os resultados encontrados demonstram a variabilidade dos alelos Dombrock na população de Minas Gerais (**Gráfico 1**).

Gráfico 1: Freqüência dos alelos *DO* no estado de Minas Gerais



Nas amostras genotipadas como *DO**A/*DO**B em que o SNP 898G foi identificado (19 casos), não foi possível definir em qual desses dos dois alelos o polimorfismo estava presente. Esses doadores foram classificados como *DO**A/*DO**B-WL considerando à maior prevalência do alelo *DO**B-WL em relação ao *DO**A-WL encontrada por **Baleotti et al.** (2009). Nesse estudo brasileiro, que primeiro identificou o alelo *DO**A-WL, dos 556 alelos analisados, apenas 3 eram *DO**A-WL (0,5%) e 78 *DO**B-WL (14%). A análise desse resultado no presente estudo foi qualitativa, sendo considerada apenas a relevância desses alelos na população estudada. Os valores de frequência encontrados não foram usados para fins de comparação.

Os alelos variantes *DO**A-SH, *DO**B-SH, *DO**A-HA relacionados aos SNPs silenciosos 378C>T e 624T>C não foram contabilizados, já que esses polimorfismos não foram analisados nesse estudo. Portanto, não foi possível estabelecer uma comparação entre a frequência dos alelos *DO**A e *DO**B encontrada no estado de Minas Gerais com dados de outras regiões devido a não caracterização de todos os alelos variantes já descritos.

RESULTADOS

Das 270 amostras de DNA estudadas, 87 (32,22%) eram *DO*A/DO*B*, 80 (29,63%) *DO*B/DO*B*, 25 (9,26%) *DO*A/DO*A*, 3 (1,11%). Dos genótipos com os alelos variantes pesquisados: 32 (11,85%) *DO*B/DO*B-WL*, 19 (7,04%) *DO*A/DO*B-WL*, 4 (1,48%) *DO*A/DO*A-WL* e 3 (1,11%) *DO*B-WL/DO*B-WL* (Tabela 7).

Tabela 7: Frequências dos genótipos Dombrock em Minas Gerais

Genótipos	Número de doadores	Frequência (%)
<i>DOA/DOB</i>	87	32,22
<i>DOB/DOB</i>	80	29,63
<i>DOB/DOB-WL</i>	32	11,85
<i>DOA/DOA</i>	25	9,26
<i>DOA/DOB-WL</i>	19	7,04
<i>HY1/DOA</i>	6	2,22
<i>JO/DOB</i>	5	1,85
<i>DOA/DOA-WL</i>	4	1,48
<i>DOB-WL/DOB-WL</i>	3	1,11
<i>HY1/DOB</i>	3	1,11
<i>JO/DOA</i>	3	1,11
<i>HY2/DOB</i>	2	0,74
<i>HY1/HY1</i>	1	0,38
Total	270	100

2. Frequência dos alelos JO e HY

O alelo *JO* foi encontrado apenas em heterozigose com os alelos *DO*B* e *DO*A* nas amostras testadas: 3 (1,11%) *JO/DO*A* e 5 (1,85%) *JO/DO*B*. O alelo *HY* foi encontrado em 12 amostras, sendo uma delas em homozigose e as demais em heterozigose com os alelos *DO*A* e *DO*B*: 6 (2,22%) *HY*1/DO*A*, 3 (1,11%) eram *HY*1/DO*B*, 2 (0,74%) *HY*2/DO*B* e 1 (0,37%) *HY*1/HY*1*.

RESULTADOS

Quando a prevalência dos alelos *JO* em doadores mineiros foi comparada com a encontrada por **Castilho et al.** (2008) no estado de São Paulo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p = 0,735$) após aplicação do teste qui-quadrado. Porém, para o alelo *HY*, houve uma diferença significativa ($p = 0,001$) entre as freqüências de 0,7% para o alelo *HY* no estado de São Paulo e de 2,4% em Minas Gerais (**Tabela 8**). Além disso, entre os doadores mineiros com o alelo *HY* foi identificado um caso raro de homozigose.

Tabela 8: Freqüência dos alelos *HY* e *JO* em Minas Gerais e São Paulo

Alelos	São Paulo	Minas Gerais
<i>HY</i>	0,7%	2,4% ($p=0,001$)
<i>JO</i>	1,7%	1,5% ($p=0,735$)
Total analisado	1774	540

Também, contrariamente ao encontrado por **Castilho et al** (2008), a freqüência do alelo *HY* foi maior que a do alelo *JO* no estado de Minas Gerais, considerando apenas o total desses dois alelos (**Tabela 9**). Nesse estudo brasileiro, 288 doadores de sangue foram randomicamente testados por PCR-RFLP e 599 pela metodologia do *microchip*. Porém, a prevalência do alelo *HY* entre mineiros é inferior à descrita entre doadores de sangue de Nova Iorque autodenominados afro-americanos (90%) (CASTILHO, 2008).

Tabela 9: Distribuição dos alelos *HY* e *JO* nos genótipos Dombrock

Genótipos	São Paulo	Minas Gerais
<i>HY/DO</i>	30%	52,5%
<i>HY/HY</i>	0	9,5%
<i>HY/JO</i>	0	0
<i>JO/DO</i>	70%	38%
Amostras	43	20

3. Correlação entre a presença dos alelos *HY* e *JO* e autodenominação de cor da pele

Dos 270 participantes, 45 se autodenominaram como pele negra, 134 como parda e 91 informaram a cor branca. Na análise estatística, o teste exato de Fisher não demonstrou diferença estatística significativa entre a presença do alelo *JO* e a autodenominação de cor da pele informada pelos participantes ($p = 0,203$) (Tabela 10).

Tabela 10: Autodenominação de cor da pele nos doadores com o alelo *JO*

Cor pele	Alelos		Total
	<i>JO</i> +	<i>JO</i> -	
pardos	3	131	134
negros	2	43	45
brancos	3	88	91
Total	8	262	270

RESULTADOS

Porém, o alelo *HY* esteve estatisticamente relacionado à autodeterminação de cor de pele parda ($p = 0,032$). Esse alelo ocorreu mais frequentemente entre os pardos (75%), sendo que a distribuição dessa cor de pele foi de apenas 48,4% entre os doadores sem o alelo *HY* (**Tabela 11**)

Tabela 11: Autodenominação de cor da pele nos doadores com o alelo *HY*

Cor pele	Alelos		Total
	<i>HY</i> +	<i>HY</i> -	
pardos	9	125	134
negros	3	42	45
brancos	0	91	91
Total	12	258	270

DISCUSSÃO

Na rotina transfusional, a compatibilidade entre doadores e receptores previne tanto o aparecimento de anticorpos imunes quanto quadros hemolíticos, quando esses anticorpos já estão presentes.

Pacientes cronicamente transfundidos, como os portadores de anemia falciforme, são os mais susceptíveis a essas complicações em função do número de transfusões recebidas. A compatibilidade sanguínea pode se tornar um difícil problema imuno-hematológico na medida em que novos aloanticorpos vão sendo formados.

A identificação de doadores de sangue é também um desafio quando os anticorpos no receptor são dirigidos contra antígenos altamente freqüentes nas populações. Nesses casos, a manutenção de estoque de sangues raros para esses fins específicos pode garantir o suporte transfusional adequado para esses pacientes.

O avanço nas técnicas moleculares tem permitido não somente a inferência dos fenótipos quando soros não estão disponíveis para técnicas rotineiras de hemaglutinação, como o rastreamento em grande escala de doadores negativos para antígenos comuns ou com perfil fenotípico raro a partir de um conjunto de antígenos.

A genotipagem do sistema Dombrock tem sido reveladora ao identificar polimorfismos no DNA que podem explicar a perda de expressão de alguns antígenos quando em determinadas associações fenotípicas. A variabilidade observada do gene *DO*, a partir de diferentes combinações de nucleotídeos, é responsável pela diversidade genotípica encontrada em diferentes populações.

Na genotipagem Dombrock de doadores de sangue de Minas Gerais, utilizou-se a técnica de PCR-RFLP. Outras técnicas moleculares como PCR em tempo real e *microchips* têm sido utilizadas na determinação dos genótipos *DO* (ARAUJO *et al*, 2003; RIOS, 2001a).

DISCUSSÃO

Na PCR-RFLP, a análise dos fragmentos de restrição exige equipamentos especiais para sua execução e os ensaios foram originalmente desenhados de forma que cada alelo apresente apenas um padrão de banda na eletroforese, evitando resultados falsos, decorrentes da digestão incompleta pela enzima de restrição.

A presença dos alelos variantes *DO*A-WL* e *DO*B-WL* em doadores de Minas Gerais reforçam a importância de se investigar o SNP 898C>G na análise genotípica do sistema Dombrock. Quando esse polimorfismo foi identificado no alelo *HY*, diferenciando *HY*1* de *HY*2*, uma expressão enfraquecida do antígeno Do^b foi concomitantemente detectada (RIOS, 2002a). Essa redução na expressão do antígeno Do^b não foi confirmada por citometria de fluxo com soro monoclonal anti- Do^b MIMA-123, quando o mesmo polimorfismo foi encontrado caracterizando o alelo *DO*B-WL* em doadores de sangue do estado de São Paulo (BALEOTTI *et al*, 2006a). Recentemente, detectou-se, também por citometria de fluxo, a redução na expressão do antígeno Do^b determinada pelo alelo *DO*B-WL* em africanos usando três diferentes clones de soros anti- Do^b (MIMA-52, MIMA-53 e MIMA-123) (CHAPEL *et al.*, 2009). Portanto, a presença do alelo *DO*B-WL* na população de Minas Gerais e a variabilidade do gene *DO* indicam que o impacto transfusional desse polimorfismo e o risco de aloimunização pelo antígeno Do^b entre mineiros deve ser definido fenotipicamente usando mais de um anticorpo monoclonal. O impacto desse polimorfismo na expressão do antígeno Do^b é controverso, por isso a análise fenotípica do alelo *DO*B-WL* deve ser investigada na população de doadores do estado de Minas Gerais.

A significativa diferença entre as frequências do alelo *HY* entre doadores de sangue dos estados de Minas Gerais e São Paulo, confirma a diversidade da população brasileira e a necessidade de estudos regionais na definição da prevalência dos antígenos Dombrock. O antígeno Hy está presente em mais de 99% dos negros e em 100% dos indivíduos na maioria das outras populações (REID, 2004). A ausência do antígeno Hy está ligada ao alelo *HY* e é uma condição rara. Pelo menos um caso de destruição eritrocitária pelo anticorpo anti-Hy já foi descrito, além de outras reações transfusionais moderadas relacionadas a esse anticorpo (BEATTIE, 1975; REID, 2005).

DISCUSSÃO

Assim como em africanos, a alta freqüência dos alelos *HY* no estado de Minas Gerais indica a probabilidade de estados homocigotos para esse alelo, tornando essa população de doadores alvo de investigação do fenótipo raro Hy-.

Nenhuma das três opções de cor da pele informadas esteve relacionada à presença do alelo *JO*, mas houve uma correlação estatística entre a cor parda e a presença do alelo *HY*. Essa variável não foi analisada anteriormente no primeiro estudo brasileiro sobre o sistema Dombrock desenvolvido por **Baleotti et al.** (2006a). Como os doadores foram randômicos, pressupõe-se que não há viés de seleção na amostragem.

Apesar dos fenótipos Hy- e Jo (a-) terem sido descritos em negros, não é possível inferir que a autodenominação de cor da pele informada pelo doador possa prever a presença do alelo *HY*, considerando que a correlação ocorreu com apenas um dos alelos.

A população brasileira é extremamente heterogênea, o que pode ser explicado pela miscigenação entre os escravos africanos, colonizadores europeus e autóctones indígenas. Quando marcadores moleculares são avaliados, a contribuição de cada um desses grupos na ancestralidade brasileira varia entre as diversas regiões do país (PENA *et al.*, 2009). Quando o território brasileiro é analisado na sua totalidade, a cor da pele se revela como um fraco preditor de ancestralidade africana, considerando a presença de marcadores genéticos (PARRA *et al.*, 2003). A heterogeneidade observada pode ter como causas a grande extensão territorial e os movimentos migratórios dentro do território brasileiro.

Apesar da correlação entre os negros e o alelo *HY*, a autodenominação de cor da pele não prediz o grau de ancestralidade africana do indivíduo, não devendo, portanto, ser aplicada como variável no rastreamento dos fenótipos raros Hy- nessa população.

O conhecimento da prevalência dos alelos *DO*A*, *DO*B*, *HY*1*, *HY*2*, *DO*A-WL*, *DO*B-WL* e *JO* em doadores de sangue da maior unidade da Fundação Hemominas pode contribuir para o desenvolvimento de bancos de hemácias raras, especialmente o integrado ao Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, que proverá atendimento aos pacientes politransfundidos ou com complicações imuno-hematológicas nesse estado.

DISCUSSÃO

Devido à miscigenação brasileira, a análise genotípica do sistema de grupo sanguíneo Dombrock em doadores de sangue do estado de Minas Gerais confirma a importância de estudos regionais na determinação das frequências dos antígenos desse sistema de grupo sanguíneo.

CONCLUSÕES

Considerando os objetivos do presente estudo, pode-se concluir que:

- 1- A realização da genotipagem Dombrock em doadores de sangue do estado de Minas Gerais permitiu determinar a frequência dos alelos *DO* em uma subpopulação brasileira.
- 2- Na população de Minas Gerais, a presença do alelo *HY* (60%) é maior que a do alelo *JO* (40%), considerando apenas o total desses dois alelos.
- 3- Devido a maior prevalência do alelo *HY* em Minas Gerais (2,4%) quando comparado ao estado de São Paulo (0,7%), o fenótipo raro Hy- tem maior probabilidade de ser encontrado entre os mineiros, incluindo o caso primeiramente identificado.
- 4- A análise por PCR-RFLP identificou os alelos variantes *DO*A-WL* e *DO*B-WL* e demonstra a necessidade da inclusão rotineira do SNP 898 C>G nos protocolos de genotipagem Dombrock.
- 5- O critério de autodenominação de cor de pele na identificação de doadores raros Hy- e Jo(a-) é um parâmetro que deve ser avaliado com cautela, pois além de subjetivo, não é possível correlacionar essa variável com a ancestralidade do indivíduo em populações miscigenadas.
- 6- Os resultados demonstram que devido à heterogeneidade da população brasileira, a frequência dos alelos *DO* pode variar entre diferentes regiões. Isso confirma a importância da realização de estudos regionais na determinação dos genótipos Dombrock dentro do território brasileiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ARAUJO F., PEREIRA C., MONTEIRO F., HENRIQUES I., MEIRELES E., LACERDA P., CUNHA-RIBEIR L.M. Genotyping Dombrock alleles in Portuguese blood donors by real-time PCR. **Transfusion**, Philadelphia, v.43, n.10, p.1495-1496, Oct. 2003.

BALEOTTI, W.Jr. Caracterização molecular do sistema de grupo sanguíneo Dombrock em uma população brasileira. 2006. [s.n.] Dissertação (Doutorado em Ciências Básicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006(a).

BALEOTTI W. Jr., RIOS M., REID M.E., HASHMI G., FABRON A. Jr., PELLEGRINO J., CASTILHO L. Dombrock gene analysis in Brazilian people reveals novel alleles. **Vox Sang**, Basel, v.91, n.1, p.81-87, July 2006(b).

BALEOTTI W., SUZUKI R.B., CASTILHO L. Donors Reveals a Novel Allele: The *DO*A-WL* (abstract). **Transfusion**, Philadelphia, v.49, n.s3, p.118A, Sept. 2009.

BANKS J.A., HEMMING N., POOLE J. Evidence that the Gy^a, Hy and Jo^a antigens belong to the Dombrock blood group system. **Vox Sang**, Basel, v.68, n.3, p.177-182, Apr. 1995.

BAUMGARTEN R., VAN GELDER W., VAN WINTERSHOVEN J., MAASKANT-VAN WIJK P.A., BECKERS E.A. Recurrent acute hemolytic transfusion reactions by antibodies against Do^a antigens, not detected by cross-matching. **Transfusion**, Philadelphia, v.46, n.2, p.244-249, Feb. 2006.

BEATTIE K.M., CASTILLO S. A case report of a hemolytic transfusion reaction caused by anti-Holley. **Transfusion**, Philadelphia, v.15, n.5, p.476-480, Sept.1975.

BROWN D. Reactivity of anti-Jo^a with Hy- red cells (abstract). **Transfusion**, Philadelphia, v.25, n.5, p.462, Sept. 1985.

¹ Baseada na NBR-6023 de agosto de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTILHO L., BALEOTTI W. JR., TOSSAS E., HUE-ROYE K., RIBEIRO K.R., LOMAS-FRANCIS C., CHARLES-PIERRE D., REID M.E. Molecular studies of *DO* alleles reveal that *JO* is more prevalent than *HY* in Brazil, whereas *HY* is more prevalent in New York. **Immunohematology**, Washington, v.24, n.4, p.135-137, Dec. 2008.

CHANDANAYINGYONG D., SASAKI T.T., GREENWALT T.J. Blood groups of the Thais. **Transfusion**, Philadelphia, v.7, n.4, p.269-276, July 1967.

CHAPEL-FERNANDES S., CALLEBAUT I., HALVERSON G.R., REID M.E., BAILLY P., CHIARONI J. Dombrock genotyping in native Congolese cohort reveals two novel alleles. **Transfusion**, Philadelphia, v.49, n.8, p.1661-1671, Aug. 2009.

DANIELS G.L., ANSTEE D.J., CARTRON J.P., DAHR W., ISSITT P.D., JORGENSEN J., KORNSTAD L., LEVENE C., LOMAS-FRANCIS C., LUBENKO A. Blood group terminology 1995. ISBT Working Party on terminology for red cell surface antigens. **Vox Sang**, Basel, v.69, n.3, p.265-279, Oct. 1995.

DANIELS G., REID, M., Blood groups: the past 50 years. **Transfusion**, Philadelphia, v.50, n.2, p.281-289, Feb 2010.

FLICKINGER C., PETRONE T., CHURCH A. Review: American Rare Donor Program. **Immunohematology**, Washington, v.20, n. 4, p.239-243, Dec. 2004.

GUBIN A.N., NJOROGE J.M., WOJDA U., PACK S.D., RIOS M., REID M.E., MILLER J.L. Identification of the Dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADPribosyltransferase gene family. **Blood: the journal of hematology**, New York, v.96, n.7, p.2621-2627, Oct. 2000.

HALVERSON G., SHANAHAN E., SANTIAGO I., MABILE R., THURRELL T., STRUPP A.M., WOLF C.F., SPRUELL P., MOULDS M.K. The first reported case of anti-Do^b causing an acute hemolytic transfusion reaction. **Vox Sang**, Basel, v.66, n.3, p.206-209, Apr. 1994.

HASHMI G., SHARIFF T., SEUL M., VISSAVAJJHALA P., HUE-ROYE K., CHARLES-PIERRE D., LOMAS-FRANCIS C., CHAUDHURI A., REID M. A flexible array format for large scale, rapid blood group DNA typing. **Transfusion**, Philadelphia, v.45, n.5, p.680-688, May 2005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HASHMI G. Red blood cell antigen phenotype by DNA analysis. **Transfusion**, Philadelphia, v.47, n.1S, p.60S-63S, July 2007.

HULT, A., HELLBERG, A., WESTER, E.S., OLAUSSON, P., STORRY, J.R., OLSSON, M.L. Blood group genotype analysis for the quality improvement of reagent test red blood cells. **Vox sang**, Basel, v.88, n.4, p.265-270, May 2005.

JENSEN L., SCOTT E.P., MARSH W.L., et al. Anti-Jo^a: an antibody defining a high-frequency erythrocyte antigen. **Transfusion**, Philadelphia, v.12, n.5, p.322-324, Sept. 1972.

KRUSKALL M.S., GREENE M.J., STRYCHARZ D.M., GETMAN E.M., CAWLEY A. Acute hemolytic transfusion reaction due to anti Dombrock^a (Do^a). **Transfusion**, Philadelphia, v.26, n.6, p.545, Nov. 1986.

LEWIS M., ALLEN F.H.JR., ANSTEE D.J., BIRD G.W., BRODHEIM E., CONTRERAS M., CROOKSTON M., DAHR W., ENGELFRIET C.P., GILES C.M., et al. ISBT Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens: Munich report. **Vox Sang**, Basel, v.49, n.2, p.171-175, Aug. 1985.

LUCIEN N., CELTON J.L., Le PENNEC PY, CARTRON J.P., BAILLY P. Short deletion within the blood group Dombrock locus causing a Do(null) phenotype. **Blood: the journal of hematology**, New York, v.100, n.3, p.1063-1064, Aug. 2002.

MacFARLAN D., HUE-ROYE K., CARYER S., MOREAU D., BARRY J., MOULDS M.K., LOMAS-FRANCIS., REID M.E. Case report: DNA testing resolves unusual serologic results in the Dombrock system. **Immunohematology**, Washington, v.22, n.2, p.69-71, June 2006.

MAYER B., THORNTON N., YÜREK S., WYLIE D., HUE-ROYE K., POOLE J., BARTOLMÄS T., SALAMA A., LOMAS-FRANCIS C., VELLIQUETTE R.W., YAZDANBAKHS K., REID M.E. New antigen in the Dombrock blood group system, DOYA, ablates expression of Do^a and weakens expression of Hy, Joa, and Gya antigens. **Transfusion**, Philadelphia, v.50, n.6, p.1295-1302, Jun. 2010.

MOHENG M.C., MCCARTHY P., PIERCE S.R. Anti-Do^b implicated as the cause of a delayed hemolytic transfusion reaction. **Transfusion**, Philadelphia, v.25, n.1, p.44-46, Jan. 1985.

MOLTHAN L., CRAWFORD M.N., TIPPETT P. Enlargement of the Dombrock blood group system: the finding of anti-Do^b. **Vox Sang**, Basel, v.24, n.4, p.382-384, Apr.1973.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MOULDS J.J., POLESKY H.F., REID M., ELLISOR S.S. Observations on the Gy^a and Hy antigens antibodies that define them. **Transfusion**, Philadelphia, v.15, n.3, p.270-274, May 1975.

MURAO M., VIANA M.B. Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 38, n.5, p.675-682, June, 2005.

NAKAJIMA H., SKRADSKI K., MOULDS J.J. Do_a (Dombrock) blood group antigen in the Japanese. **Vox Sang**, Basel, v. 36, n. 2, p. 103-104, Feb. 1979.

NAKAJIMA H., MOULDS J.J. Do_a (Dombrock) blood group antigen in the Japanese: tests on further population and family samples. **Vox Sang**, Basel, v.38, n.5, p.294-296, May, 1980.

PACHECO, F. C. Crise e risco na história da transfusão de sangue. **Revista de Medicina Transfusional ABO**, Lisboa, n.16, p. 12-23, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ipsangue.org/04/IndicesABO/indice16.htm>> Acesso em 16 de Janeiro de 2010.

PARRA F.C., AMADO R.C., Lambertucci J.R., ROCHA J., ANTUNES C.M., PENA S.D.J. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100, n. 1, p. 177–182, Jan 2003.

PENA S.D.J., BASTOS- RODRIGUES L., PIMENTA J.R., BYDLOWSKI, S.P. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 42, n.10, p.870-876, Oct 2009.

PEYRARD, T., PHAM B.N., LE PENNEC P.Y., ROUGER P. Les phénotypes érythrocytaires rares: un enjeu de santé publique. The rare blood groups: A public health challenge. **Transfus Clin Biol**, Paris, v.15, n. 3, p.109–119, Jun 2008.

POLESKY HF, SWANSON JL. Studies on the distribution of the blood group antigen Do^a (Dombrock) and the characteristics of anti-Do^a. **Transfusion**, Philadelphia, v.6, n.4, p.294-296, July 1966.

POOLE J., DANIELS G., Blood group antibodies and their significance in Transfusion Medicine. **Transfus Med Rev**, Orlando, v. 21, n. 1, p.58-71, Jan. 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REID ME. The Dombrock blood group system: a review. **Transfusion**, Philadelphia, v.43, n.1, p.107-114, Jan. 2003 (a).

REID ME. Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. **Transfusion**, Philadelphia, v.43, n.12, p.1748-1757, Dec. 2003 (b).

REID ME.; LOMAS-FRANCIS C. **The blood group antigen: Facts Book**, 2nd ed. London: Elsevier, 2004.

REID ME. Complexities of the Dombrock blood group system revealed. **Transfusion**, Philadelphia, v.45, n.s2, p.92S-99S, Aug. 2005.

REID M.E. Overview of molecular methods in immunohematology. **Transfusion**, Philadelphia, v.47, n.1S, p.10S-16S, July 2007.

RIOS M., HUE-ROYE K., LEE A.H., CHIOFOLO J.T., MILLER J.L., REID M.E. DNA analysis for the Dombrock polymorphism. **Transfusion**, Philadelphia, v.4, n.9, p.1143-1146, Sept. 2001(a).

RIOS M., HUE-ROYE K., STORRY J.R., LEE T., MILLER J.L., REID M. Molecular basis of Dombrock null phenotype. **Transfusion**, Philadelphia, v.41, n.11, p.1405-1407, Nov. 2001(b).

RIOS M., HUE-ROYE K., OYEN R., MILLER J.L., REID M. Insights into the Holley – and Joseph – phenotypes. **Transfusion**, Philadelphia, v.42, n.1, p.52-58, Jan. 2002(a).

RIOS M., STORRY J.R., HUE-ROYE K., CHUNG A., REID M.E. Two new molecular bases for the Dombrock null phenotype. **Br J Haematol**, Oxford, v.117:765-767, 2002(b).

SCHIMIDT RP, FRANK S, BAUGH M. New antibodies to high incidence antigenic determinants (anti-So, anti-E1, anti-Hy and anti-Dp) (abstract). **Transfusion**, Philadelphia, v.7, n.5, p.386, Sept. 1967.

SHIREY R.S., BOYD J.S., KING K.E., CATUREGLI P.P., MONTGOMERY W.M. Jr., NESS P.M. Assessment of the clinical significance of anti-Do^b. **Transfusion**, Philadelphia, v.38, n.11-12, p.1026-1029, Nov. 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SPRING FA, REID ME. Evidence that the human blood group antigens Gy^a and Hy are carried on a novel glycosylphosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane glycoprotein. **Vox Sang**, Basel, v.60, n.2, p.53-59, Feb. 1991.

SPRING FA, REID ME, NICHOLSON G. Evidence for expression of the Jo^a blood group antigen on the Gy^a/Hy-active glycoprotein. **Vox Sang**, Basel, v.66, n.1, p.72-77, Jan.1994.

STORRY J.R., WESTHOFF C.M., CHARLES-PIERRE D., RIOS M., HUE- ROYE K., VEGE S., NANCE S., REID M.E. DNA analysis for donor screening of Dombrock blood group antigens. **Immunohematology**, Washington, v.19, n.3, p.73-76, Sept. 2003.

STORRY J.R. Review: the function of blood group-specific RBC membrane components. **Immunohematology**, Washington, v.20, n.4, p.206-216, Dec. 2004.

STRUPP A., CASH K., UEHLINGER J. Difficulties in identifying antibodies in the Dombrock blood group system in multiply alloimmunized patients. **Transfusion**, Philadelphia, v.38, n.11-12, p.1022-1025, Nov. 1998.

SWANSON J., POLESKY H.F., TIPPETT P., SANGER R. A "new" blood group antigen, Do^a (abstract). **Nature**, London, v.206, p.313, Apr. 1965.

SWANSON J., ZWEBER M., POLESKY H.F. A new public antigenic determinant Gy^a (Gregory). **Transfusion**, Philadelphia, v.7, n. 4, p.304-306, July 1967.

TELEN M.J., ROSSE W.F., PARKER C.J., MOULDS M.K., MOULDS J.J. Evidence that several high frequency human blood group antigens reside on phosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane proteins. **Blood: the journal of hematology**, New York, 1990; 75(7):1404-7.

VEGE S., NANCE S. Genotyping for the Dombrock DO1 and DO2 alleles by PCR-RFLP. **Transfusion**, Philadelphia, v.42, n. 9, p.110S, Sept. 2002.

WEAVER T., KAVITSKY D., CARTY L., et al. An association between the Jo^a and Hy phenotypes (abstract). **Transfusion**, Philadelphia, v.24, n.5, p.426, Sept.1984.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WESTHOFF C., VEGE S., YAZDANBAKHSH K., WYLIE D., RAZIB M., HUE-ROYE K., HALVERSON G., READ S., WHITEOAK E., NICKLE P., MAURER J., KAVITSKY D., NANCE S., REID M.E. A DOB allele encoding an amino acid substitution (Phe62Ser) resulting in a Dombrock null phenotype. **Transfusion**, Philadelphia, v.47, n.8, p.1356-1362, Aug. 2007.

WOODFIELD G., POOLE J., NANCE S.T., DANIELS G. A review of the ISBT rare blood donor program. **Immunohematology**, Washington, v.20, n.4, p.244-248, Dec. 2004.

WU G.G., JIN S.Z., DENG Z.H., ZHAO T.M. Polymerase chain reaction with sequence specific primers-based genotyping of the human Dombrock blood group DO1 and DO2 alleles and the DO gene frequencies in Chinese blood donors. **Vox Sang**, Basel, v.81, n. 1, p.49-51, Jan. 2001.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Análise molecular e fenotípica do sistema de grupo sanguíneo Dombrock na população de Belo Horizonte/MG”

A importância desta pesquisa está na possibilidade de se identificar doadores que tenham sangue compatível com o de pacientes que desenvolveram complicações imunológicas após terem recebido muitas transfusões de sangue;

O estudo será feito a partir de 5 ml de amostras do seu sangue, coletadas com material estéril por punção venosa, tendo o risco de formação de um hematoma no local de introdução da agulha. A fim de evitar essa complicação, seu sangue será coletado por pessoal treinado, durante sua doação, transfusão ou exames laboratoriais, quando possível;

No seu sangue serão feitos testes laboratoriais que incluem a análise do seu material genético (DNA) e das suas células vermelhas;

Os benefícios esperados com o estudo são os seguintes: melhor conhecimento sobre o tipo de grupo sanguíneo Dombrock na população de Belo Horizonte. Isso nos permitirá identificar quais pacientes precisam de sangue específico e selecionar quais doadores são compatíveis;

Sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo por meio de contato telefônico ou pessoalmente, através das pesquisadoras abaixo relacionadas;

A qualquer momento, a sua participação poderá ser interrompida através da retirada do seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo;

A sua identificação será feita pelo seu número de doador ou prontuário. As pesquisadoras responsáveis pelo estudo garantem a manutenção do sigilo e sua privacidade;

Os resultados deste trabalho serão divulgados nos diversos meios de comunicação voltados para o assunto, sem o fornecimento de nenhum dos seus dados;

Caso o material genético extraído do seu sangue ou as suas células vermelhas, contenham uma informação diferenciada para a pesquisa, você poderá ser convidado por carta ou telefone, a retornar para a coleta de nova amostra, sendo livre e espontânea a decisão sobre seu retorno;

Nenhum pagamento será feito pela utilização do seu material;

Dados que forem considerados relevantes para a pesquisa poderão ser obtidos em sua ficha cadastral ou prontuário médico;

ANEXO I

As amostras coletadas serão utilizadas exclusivamente para os fins propostos pela pesquisa e descartadas ao final do projeto.

Tendo eu ,sido convidado (a) a participar como voluntário (a) da pesquisa descrita e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO. Belo Horizonte, ____/____/____

Assinatura ou impressão datiloscópica
do(a) voluntário (a) ou responsável legal

Dra. Fabiana Chagas Camargos Piassi ou
Profª Drª Silvana Maria Santos Elói

Endereço do (a) participante-voluntário:

Cidade: _____ Telefones: _____ Bairro _____

Responsáveis pela pesquisa:

Dra. Fabiana Chagas Camargos Piassi (aluna de pós-graduação) e Profª Silvana Maria Santos Elói (orientadora do projeto)

Endereço da aluna de pós-graduação:

Centro de Hematologia e Hemoterapia do estado de Minas Gerais

Alameda Ezequiel Dias, 321, Santa Efigênia, Belo Horizonte-MG 30130-110 Fone:(31) 3248-4591/3248-4602

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se:

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas- Alameda Ezequiel Dias, 321, Santa Efigênia
Telefone: 3248- 4587 e-mail: pesquisa@hemominas.mg.gov.br ou COEP Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade administrativa II-2ºandar, Campus Pampulha Telefones34094592/34094027 e-mail: coep@prpq.ufmg.br



Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2008.

OFÍCIO Nº 01 / 2008
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Prezada Senhora Pesquisadora, Silvana Maria Elói Santos

Encaminhamos o parecer consubstanciado referente ao seu projeto de pesquisa "Análise molecular e fenotípica do sistema de grupo sanguíneo Dombrock na população de Belo Horizonte/MG", nº de registro 180. Seu projeto foi aprovado por nosso Comitê, e então, a partir deste momento, sua pesquisa pode ser desenvolvida no âmbito da Fundação Hemominas.

Desejamos boa sorte e sucesso em seu estudo.

Atenciosamente,

Marina Lobato Martins

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hemominas



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 100/08

Interessado(a): Profa. Silvana Maria Elói Santos
Departamento de Propedêutica Complementar
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de maio de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise molecular e fenotípica do sistema de grupo sanguíneo Dombrock na população de Belo Horizonte**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. T. Marques Amaral", is positioned above the printed name.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Article title: Dombrock Genotyping in Brazilian Blood Donors Reveals Different Regional Frequencies of *HY* and *JO* Alleles.

Authors: Fabiana Chagas Camargos Piassi^{1,2}, Lilian Maria de Castilho³, Wilson Baleotti Júnior⁴, Débora Moura da Cunha⁵, Rodrigo Buzinaro Suzuki⁴, Silvana Maria Eloi-Santos¹

Institutions:

¹Faculdade de Medicina – Universidade Federal Minas Gerais, Minas Gerais

²Hemocentro de Belo Horizonte – Fundação Hemominas, Minas Gerais

³Hemocentro Unicamp, Campinas, São Paulo

⁴Hemocentro, Faculdade de Medicina, Marília, São Paulo; Brazil

Keywords: Dombrock, Genotyping, PCR

Corresponding author:

Silvana Maria Elói Santos

Departamento de Propedêutica Complementar

Faculdade de Medicina - UFMG

Avenida Alfredo Balena 190

CEP 30.130.100

Belo Horizonte - MG - Brasil

Phone: 55 31 3409-9774/ Fax: 55 31 3409-9782

E-mail: silvana.eloi@oi.com.br

ABSTRACT

BACKGROUND: Dombrock blood group system genotyping has demonstrated various rearrangements of the *DO* gene and new variants alleles had been identified in Brazil (*DO**A-SH, *DO**A-WL and *DO**B-WL). Due the high heterogeneity of Brazilian population, differences inside the country would be expected during the investigation of *DO* genotypes, according to the region studied. **MATERIALS AND METHODS:** The frequency of *DO* alleles in Minas Gerais, a southeast state of Brazil, was determined from the genotyping of 270 blood donors by polymerase chain reaction and analysis of polymorphisms from the fragments resulting from digestion by restriction enzymes (PCR-RFLP) for the identification of the following single nucleotides polymorphisms: 323G/T (*HY*), 350C/T (*JO*), 793A/G (*DO**A/*DO**B) and 898C/G (*HY**1, *DOA*-WL* and *DO**B-WL). Also, the prevalence of rare *HY* and *JO* alleles was statistically compared with data from another Brazilian region. **RESULTS:** The *HY* allele frequency (62%) was almost twice that *JO* allele (38%) in Minas Gerais, considering only these two alleles. Also, the prevalence of *HY* (2.41%) allele was statistically higher ($p=0,001$) than the frequency of this same allele (1.48%) described in another Brazilian population and includes a rare homozygous donor, related to Hy- phenotype. As well, the alleles *DO**A-WL and *DO**B-WL, first identified in Brazilian population, were also founded in the state of Minas Gerais. **DISCUSSION:** Our data confirm the different frequencies in *DO* alleles depending on the Brazilian region studied. For the development of rare blood banks, Minas Gerais population could be the target in a screening strategy for the purpose of identification the Hy- phenotype.

INTRODUCTION

The Dombrock blood group system (ISBT 014) was first described in 1965 and since then several studies have revealed its complexity¹. The analysis of gene polymorphisms has been possible after cloning and sequencing of gene *DO*² (GenBank accession number; AF 290204) and the genotyping is nowadays an important tool to predict the phenotypes Dombrock. The DNA analysis can explain some observed variations in reaction strength during serologic characterization of different phenotypes and the unusual antibodies production.¹

Single nucleotide polymorphisms (SNP) in DNA were correlated with seven different antigens of this system: Do^a, Do^b, Hy, Jo^a, Gy^a, DOYA and DOMR.³⁻⁶ Do antigens are carried on a 47- to 58-kDa glycoprotein, which is attached to the RBC membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) linkage². Individuals with null phenotype or Gy-(a) have no Dombrock antigens expressed in the red blood cell membrane and at least five molecular alterations have been described.⁷⁻¹⁰

Several authors have emphasized the importance of regional studies in Dombrock genotypes identification due to the high variability of alleles, as shown in Table I. In Brazil, three new alleles had already been identified: *DO*B-WL* (898C>G), *DO*A-SH* (624T>C) and *DO*A-WL* (898C>G).^{11,12} Also, molecular studies of *DO* alleles revealed that *JO* is more prevalent than *HY* in Brazil when compared to New York¹³.

TABLE I: List of Dombrock alleles and their polymorphisms

Alleles	Nucleotide (amino acid)								References
	323 (108)	350 (117)	378* (126)	445 (149)	524 (175)	624* (208)	793 (265)	898 (300)	
DOA	G (Gly)	C (Thr)	C	C	T (Ile)	T	A (Asn)	C	Gubin <i>et al</i> , 2000
DOB	G (Gly)	C (Thr)	T	C	T (Ile)	C	G (Asp)	C	Gubin <i>et al</i> , 2000
JO	G (Gly)	T (Ile)	T	C	T (Ile)	C	A (Asn)	C	Rios <i>et al</i> , 2002(a)
HY1†	T (Ile)	C (Thr)	C	C	T (Ile)	G	G	G (Val)	Rios <i>et al</i> , 2002(a)
HY2	T (Ile)	C (Thr)	C	C	T (Ile)	C	G (Asp)	C	Rios <i>et al</i> , 2002(a)
DOA-WL†	G (Gly)	C (Thr)	NT	NT	NT	NT	A (Asn)	G (Val)	Baleotti <i>et al</i> , 2009
DOB-WL†	G (Gly)	C (Thr)	T	C (Gln)	T (Ile)	C	G (Asp)	G (Val)	Baleotti <i>et al</i> , 2006
DOA-SH†	G (Gly)	C (Thr)	C	C (Gln)	T (Ile)	C	A (Asn)	NT	Baleotti <i>et al</i> , 2006
DOB-SH†	G (Gly)	C (Thr)	C	C (Gln)	T (Ile)	C	G (Asp)	C (Leu)	Hashmi <i>et al</i> , 2005
DOA-HA†	G (Gly)	C (Thr)	T	C (Gln)	T (Ile)	T	A (Asn)	C (Leu)	Hashmi <i>et al</i> , 2005
DOB-SH-									
Q149K†	G (Gly)	C (Thr)	C	A (Lys)	T (Ile)	C	G (Asp)	C (Leu)	Chapel <i>et al</i> , 2009
DOB-I175N†	G (Gly)	C (Thr)	T	C (Gln)	A (Asn)	C	G (Asp)	C (Leu)	Chapel <i>et al</i> , 2009

* Silent SNP

† variant alleles

NT: No tested

The SNP 898G on alleles *DO*B-WL* and *DO*A-WL* in the heterogeneous Brazilian population demonstrates that this polymorphism is not restricted to one racial group. Until then, this polymorphism was identified only in association with SNP 323T in the *HY*1* variant allele, and it was described as a mutation apparently restricted to black African individuals.¹⁴

This diversity was also founded in Africans tribes¹⁵ after identification of variants alleles *DO*B-SH-Q149K* (445C>A) and *DO*B-I175N* (524T>A), with altered nucleotides in different positions of protein until then described. Previously, two other variants alleles had been identified in a cohort with various ethnic groups samples, including a miscellaneous of blood donors from New York: *DO*B-SH* (624T>C) and *DO*A-HA* (378C>T).¹⁶

Considering the Brazilian miscegenation and the variability of the gene *DO*, the present work aims to determine the frequency of Dombrock genotypes in blood donors from Minas Gerais state from the combination of the following alleles: *DO*A* (SNP 793A), *DO*B* (SNP 793G), *DO*A-WL* (SNP 793A, 898G), *DO*B-WL* (SNP 793G, 898G), *HY*1* (SNP 323T, 898G), *HY*2* (SNP 323T, 898C) and *JO* (SNP 350T). Also, the frequencies of *HY* and *JO* alleles, related to rare Hy- and Jo(a-) phenotypes, are compared to other Brazilian population analysis, in order to identify regional differences in prevalence of these alleles that could guide the search for rare blood donors.

MATERIALS AND METHODS

Samples of peripheral venous blood were collected in EDTA from 270 randomly selected blood donors from Blood Center of Belo Horizonte, capital of Minas Gerais, after Informed Consent previously approved by Institutional Review Board.

The sample size was calculated assuming a significance level of 5% and 80% power in relation to the prevalence of allele *DO*B-WL*, identified in Brazilian population.¹¹

Genomic DNA was extracted from the leukocyte layer of blood samples, using kit *GE Healthcare* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer. The segments of the gene were amplified in temociclador (CT-412, Barloworld Scientific Techne, United Kingdom) using three pairs of primers previously described¹³ in the following conditions: 95°C for 5 minutes, 94°C for 20 seconds, 62°C (for nt 793) or 58°C (for nt 323 and 350) or 55°C (for nt 898) for 20 seconds, 72°C for 20 seconds for 35 cycles and then 72°C for 10 minutes. In polymerase chain reaction were used 100 ng DNA, 2.0 pmol of each primer, 200 M of each dNTP, 3.5 mM MgCl₂, 0.8 U Taq DNA polymerase and buffer in a final volume of 20µl. The amplification products were digested by restriction endonucleases to identify the following gene polymorphisms: Eam1105 I (Fermentas) for 793A/G (*DO*A/DO*B*), BseDI (Fermentas) for 323G/T (*HY*), XcmI (Biolab) for 350C/T (*JO*) and Alw26I (Fermentas) for 898C/G (*HY*2*, *DO*A-WL* and *DO*B-WL*). The concentrations of restriction enzymes and the incubation temperatures followed the recommendations of the manufacturers. The fragments of the enzymatic digestion were identified after electrophoresis in agarose gel at 3%, stained with ethidium bromide and revealed by ultraviolet light. The sequence of primers, the amplification products and size of restriction fragments are described in Table II.

TABLE II: Primers used for polymerase chain reaction and the products sizes after enzymatic restriction

Primer	Sequence 5' to 3'	Uncut size	Restriction Fragments size (pb)	
DoABF	5'-CACTTTAATGCCTACACAGGGACCACCAGTCGA-3'	257 pb	230, 27	196, 34
DoABR	5'ATGTGCTCAGGTTCCCAGTTGACCTCAACGACAAC-3' (annealing temperature 62°C)		(DO*A)	(DO*B)
DoX2F	5'-TCAGTACCAAGGCTGTAGCA-3'	220 pb	120, 92, 8	212, 8
Do378R	5'-AGTAAAGTCAGAATGAACATTGCTGCACAAT-3' (annealing temperature 58°C)		(Wild type) 167, 53	(Variant) 220
DoEx3F	5'-TCAATGGATAGATGAGGTAG-3'	291 pb	291	170, 121
DoEx3R	5'-TGGTTTCAGCAGAAGTATGA-3' (annealing temperature 55°C)		(Wild type)	(Variant)

The statistical significance between the frequencies of alleles *HY* e *JO* in Minas Gerais and in the other Brazilian population analysis was established using the chi-square test for each of these two alleles.

RESULTS

The results of genotyping Dombrock in blood donors from state of Minas Gerais are demonstrated in Table III.

TABLE III: Results of Dombrock genotyping

Genotype	Nucleotide				Total (%)
	323	350	793	898	
<i>DOA/DOB</i>	G/G	C/C	A/G	C/C	87(32,22)
<i>DOB/DOB</i>	G/G	C/C	G/G	C/C	80(29,63)
<i>DOA/DOA</i>	G/G	C/C	A/A	C/C	25 (9,26)
<i>DOB/DOB-WL</i>	G/G	C/C	G/G	C/G	32 (11,85)
<i>DOA/DOA-WL</i>	A/A	C/C	G/G	C/G	4 (1,48)
<i>DOB-WL/DOB-WL</i>	G/G	C/C	G/G	G/G	3 (1,11)
<i>DOA/DOB-WL (or DOA-WL/DOB)</i>	G/G	C/C	A/G	C/G	19 (7,04)
<i>HY1/DOA</i>	T/G	C/C	G/A	G/C	6 (2,22)
<i>JO/DOB</i>	G/G	T/C	A/G	C/C	5 (1,85)
<i>JO/DOA</i>	G/G	T/C	A/A	C/C	3 (1,11)
<i>HY1/DOB</i>	T/G	C/C	G/G	G/C	3(1,11)
<i>HY2/DOB</i>	T/G	C/C	G/G	C/C	2 (0,74)
<i>HY1/HY1</i>	T/T	C/C	G/G	G/G	1 (0,38)
Total					270

The variants alleles *DO*A-WL* and *DO*B-WL* had already been described in Brazilian population in the proportion of 0.5% and 14%, respectively.¹² In our population, the frequency of variants alleles *DO*A-WL* and *DO*B-WL* was approximately 1.48% and 14.01%, respectively. Nevertheless, in 19 samples (7.04%) it was not possible to differentiate the genotypes *DO*A/DO*B-WL* or *DO*B/DO*A-WL*, since the SNP 898G was associated with only one of these alleles.

The allele *JO* was founded only in heterozygous with alleles *DO*B* and *DO*A*, differently from the allele *HY*, that was founded in homozygous *HY*1/HY*1* in one sample.

When the frequency of *HY* allele in donors from Minas Gerais (2.4%) was compared to the prevalence previously reported in Brazilian population (0.7%)¹³, the difference was significantly higher ($p=0.001$). Moreover, a rare case of homozygous for *HY* allele was identified.

Considering the *JO* allele, no statistically significant difference ($p=0.735$) is observed among our data (1,5%) and the other Brazilian study (1,7%).¹³

Different to the data in the same study¹³, that reported *JO* is about twice as frequent as *HY*, in Minas Gerais state the *HY* allele frequency was higher (62%) than the *JO* allele (38%), considering only the total of these two alleles.

DISCUSSION

Advances in molecular techniques have allowed a better understanding of the Dombrock blood group system and the inference of their phenotypes, since monoclonal antibodies are not available for routine hemagglutination technique. Using this methodology it was possible reveals three novels *DO* alleles in Brazilian population.^{11,12}

This is the first report of regional difference on frequencies of *DO* alleles between Brazilian blood donors, which confirms the necessity of local studies in high heterogeneity populations.

The Hy is a high frequency antigen and its absence, associated with the presence of the *HY* allele, is a rare condition.¹⁴ At least one case of active hemolysis by the anti-Hy was described¹⁷.

Among the subjects with allele *HY*, the presence of a homozygous status reinforces the importance of analyzing the SNP 323G/T to identify Hy negative blood donors in Minas Gerais population.

As well, the presence of variants alleles *DO*A-WL* and *DO*B-WL* in donors from Minas Gerais justify the inclusion of SNP 898C/G in the genotyping protocols for this population.

These data point out the relevance of using particular protocols of *DO* genotyping, established from local population studies, to identify related rare phenotypes for the development of rare blood banks.

REFERENCES

- 1) Reid ME. Complexities of the Dombrock blood group system revealed. *Transfusion* 2005; **45**: 92S-9S.
- 2) Gubin AN, Njoroge JM, Wojda U, et al. Identification of the Dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP ribosyltransferase gene family. *Blood* 2000; **96**: 2621-7.
- 3) Lewis M, Allen FHJ, Anstee DJ, et al. ISBT working party on terminology for red cell surface antigens: Munich report. *Vox Sang* 1985; **49**: 171-5.
- 4) Banks JA, Hemming N, Poole J. Evidence that the Gy^a, Hy and Jo^a antigens belong to the Dombrock blood group system. *Vox Sang* 1995; **68**:177-82.
- 5) Mayer B, Thornton N, Yürek S, et al. New antigen in the Dombrock blood group system, DOYA ablates expression of Do^a and weakens expression of Hy, Jo^a, and Gy^a antigens. *Transfusion* 2010; **50**:1295-302.

- 6) Baleotti WJ, Suzuki RB, Polotto M, et al. A PCR-based strategy for Dombrock screening in Brazilian blood donors reveals a novel allele: the *DO**A-WL. *J Clin Lab Anal.* 2011; **25**: 79-82.
- 7) Rios M, Hue-Roye K, Storry JR, et al. Molecular basis of Dombrock null phenotype. *Transfusion* 2001; **41**:1405-7.
- 8) Rios M, Storry JR, Hue-Roye K, et al. Two new molecular bases for the Dombrock null phenotype. *Br J Haematol* 2002 (b);**117**: 765-7.
- 9) Lucien N, Celton JL, LE Pennec PY, et al. Short deletion within the blood group Dombrock locus causing a Do(null) phenotype. *Blood* 2002; **100**:1063-4.
- 10) Westhoff C, Vege S, Yazdanbakhsh K, et al. A *DOB* allele encoding an amino acid substitution (Phe62Ser) resulting in a Dombrock null phenotype. *Transfusion* 2007; **47**:1356-62.
- 11) Baleotti WJ, Rios M, Reid ME, et al. Dombrock gene analysis in Brazilian people reveals novel alleles. *Vox Sang* 2006; **91**: 81-7.
- 12) Baleotti WJ, Suzuki RB, Polotto M, et al. A PCR- based strategy for Dombrock screening in Brazilian blood reveals a novel allele: the *DO**A-WL. *J Clin Lab Anal* 2011; **25**: 79-82.
- 13) Castilho L, Baleotti WJ, Tossas E, et al. Molecular studies of *DO* alleles reveal that *JO* is more prevalent than *HY* in Brazil, whereas *HY* is more prevalent in New York. *Immunohematology* 2008; **24**:135-7.
- 14) Rios M, Hue-Roye K, Oyen R, et al. Insights into the Holley – and Joseph – phenotypes. *Transfusion* 2002 (a);**42**: 52-8.

- 15) Chapel-Fernandes S, Callebaut I, Halverson GR, et al. Dombrock genotyping in native Congolese cohort reveals two novel alleles. *Transfusion* 2009; **49**:1661-71.
- 16) Hashmi G, Shariff T, Seul M, et al. A flexible array format for large scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* 2005; **45**: 680-8.
- 17) Beattie KM, Castillo S. A Case Report of a Hemolytic Transfusion Reaction Caused by Anti-Holley. *Transfusion* 1975;**15**: 476-80.

To:
Editorial Office Blood Transfusion
Via Desiderio 21
2031 Milano
Italy
FAX: +39/02/23.95.16.21
EMAIL: luisa.stea@bloodtransfusion.it

Title of manuscript

Dombrock Genotyping in Brazilian Blood Donors Reveals Different Regional Frequencies of HY and JO Alleles.

Authors

Piassi Fabiana, Castilho Lilian, Baleotti Wilson, Cunha Debora, Suzuki Rodrigo, Santos Silvana

Article number **170-11**

Authorship Declaration, Copyright Release and Conflict of Interest Disclosure

(This letter, signed by the Author who submits a paper for publication,
must be faxed or sent by email to the Editorial Office of Blood Transfusion.

The Author is responsible that all other Authors agree to its submission and to its content)

Authorship

The undersigned Author states that all the Authors have read the manuscript and they agree on its content. The Article is an original work, has not been published before and is not being considered for publication elsewhere in its final form, either in printed or electronic form.

Copyright

In consideration of Blood Transfusion taking action in reviewing and editing this submission, the undersigned Author, on behalf of all the Authors, hereby transfers, assigns, or otherwise conveys all Copyright ownership to SIMTI Servizi srl, in the event that this will be published in Blood Transfusion. The Author declares that this work does not infringe upon any common law or statutory Copyright of any type whatsoever, and that the material does not contain matter in violation of any right of privacy, or otherwise contrary to law.

If any part of the manuscript text, table or image is covered by copyright owned by another entity, the Authors must obtain written copyright permission from the copyright holder for reproduction in Blood Transfusion.

The Author declares that the Article contains no violation of any existing copyright or other third party right or any material of an obscene, indecent, libellous or otherwise unlawful nature.

The Authors will indemnify and keep indemnified the Editors, Blood Transfusion and SIMTI Servizi against all claims and expenses (including legal costs and expenses) arising from any breach of copyright.

Financial Disclosure

The Author declares that all the Authors have no affiliation with or financial involvement in any organisation or entity with a direct financial interest in the subject matter discussed in the submitted paper.

Date 12/12/11

Signature Fabiana Piassi



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30130-100
Fone: (31) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg.z@medicina.ufmg.br



Justina dos Santos
 CONFERE COMO ORIGINAL
 Centro de Pós-Graduação

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **FABIANA CHAGAS CAMARGOS PIASSI**, nº de registro 2008652631. Às quatorze horas do **dia vinte e cinco do mês de fevereiro de dois mil e dez**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“ANALISE GENOTÍPICA DO SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO DOMBROCK EM DOADORES DE SANGUE DO ESTADO DE MINAS GERAIS.”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Propedêutica Complementar. Abrindo a sessão, a Presidente da comissão, Profa. Silvana Maria Elói Santos/Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Silvana Maria Elói Santos/Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Marina Lobato Martins	Instituição: HEMOMINAS	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Sandra Guerra Xavier	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada Aprovada.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2010.

Profa. Silvana Maria Elói Santos/Orientadora Silvana Maria Elói Santos

Profa. Marina Lobato Martins Marina Lobato Martins

Profa. Sandra Guerra Xavier Sandra Guerra Xavier

Prof. Wagner Luiz Tafuri/Coordenador Wagner Luiz Tafuri

Obs. Este documento não terá validade sem a assinatura e Carimbo do Coordenador

Prof. Wagner Luiz Tafuri
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina/UFMG



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Silvana Maria Elói Santos, Marina Lobato Martins, Sandra Guerra Xavier, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“ANALISE GENOTÍPICA DO SISTEMA DE GRUPO SANGÜINEO DOMBROCK EM DOADORES DE SANGUE DO ESTADO DE MINAS GERAIS.”**, apresentada pela mestranda **FABIANA CHAGAS CAMARGOS PIASSI** para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 25 de fevereiro de 2010.


Profª. Silvana Maria Elói Santos
Orientadora


Profª. Marina Lobato Martins


Profª. Sandra Guerra Xavier