

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

ADÃO ROGERIO DA SILVA

**PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM DE ALELOS DOS
SISTEMAS DE GRUPO SANGUÍNEO DIEGO, DOMBROCK E DUFFY
POR PRC EM TEMPO REAL NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

Belo Horizonte

2018

ADÃO ROGERIO DA SILVA

**PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM DE ALELOS DOS SISTEMAS DE
GRUPO SANGUÍNEO DIEGO, DOMBROCK E DUFFY POR PRC EM TEMPO
REAL NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luci Maria Sant' Ana Dusse

Coorientadora: Dr^a. Maria Clara Fernandes da Silva
Malta

Belo Horizonte - MG
2018

S587p Silva, Adão Rogerio da.
Padronização da genotipagem de alelos dos sistemas de grupo sanguíneo Diego, Dombrock e Duffy por PRC em tempo real na Fundação Hemominas / Adão Rogerio da Silva. – 2018.

78 f. : il.

Orientadora: Luci Maria Sant' Ana Dusse.

Coorientadora: Maria Clara Fernandes da Silva Malta.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Grupos sanguíneos – Teses. 2. Sangue – Transfusão – Teses. 3. Genotipagem – Teses. 4. Bancos de Sangue – Teses. I. Dusse, Luci Maria Sant' Ana. II. Malta, Maria Clara Fernandes da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.65



FOLHA DE APROVAÇÃO

PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM DE ALELOS DOS SISTEMAS DE GRUPO SANGUÍNEO DIEGO, DOMBROCK E DUFFY POR PRC EM TEMPO REAL NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS

ADÃO ROGERIO DA SILVA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 15 de março de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Lucí Maria Sant Ana Dusse - Orientadora
UFMG


Prof. Maria Clara Fernandes da Silva Malta
Fundação Hemorriminas


Prof. Luciana Cayres Schmidt
Fundação Hemorriminas


Prof. Fabiana Chagas Carmargo Pias
UFMG

Belo Horizonte, 15 de março de 2018.

Agradecimento

Primeiramente agradeço ao Grande Deus que foi, é e para sempre será a luz a me guiar por estes caminhos, e a Nossa Senhora pelo zelo do cuidado em todos os momentos de desânimo.

Agradeço aos meus pais pelo dom da vida, por me apoiarem na caminhada, agradeço aos meus irmãos e irmãs, e a todos os professores, dos que tive na infância até os que ainda hoje compartilham comigo de seu conhecimento.

Agradeço às minhas orientadoras Maria Clara Fernandes e Luci Maria Sant' Ana Dusse, e à companheira dos incansáveis experimentos; Amanda Muniz. Sem dúvidas eu não conseguiria chegar até aqui sem a ajuda de vocês.

Agradeço a todos os meus colegas dos laboratórios: NAT, Pesquisa e Imunohematologia da Fundação Hemominas, pela paciência e companheirismo.

Um agradecimento especialmente às Bioquímicas; Mariana Martins Godin e Michele Teodoro Alves pelo apoio desde o momento de inscrição na seleção do mestrado!

Agradeço à Doutora Fabiana Chagas Camargos e à Central de Imunohematologia da Fundação Hemominas pelas amostras cedidas para controle das padronizações.

Agradeço à Fundação Hemominas por me abrir às portas, me receber com a acolhida generosa de sempre.

Agradeço às agencias de fomento, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos, meu muito obrigado!

*“Meu pai montava a cavalo, ia para o campo
Minha mãe ficava sentada cosendo
Meu irmão pequeno dormia
Eu sozinho menino entre mangueiras
lia a história de Robinson Crusóé,
comprida história que não acaba mais.”*

Carlos Drumond de Andrade

*Aos doadores de sangue, minha admiração pela
generosidade.*

Resumo

A fenotipagem de antígenos dos sistemas considerados de maior importância clínica como ABO, Rh e Kell é rotineiramente realizada em bancos de sangue. Entretanto, na última década tem sido relatados casos de reações transfusionais hemolíticas envolvendo anticorpos de outros sistemas que nem sempre estão incluídos na rotina pré-transfusional dos bancos de sangue, incluindo o Diego e o Dombrock. A pesquisa desses sistemas é difícil, uma vez que a obtenção dos anticorpos para a caracterização dos respectivos antígenos é complexa e os reagentes comerciais geralmente não estão disponíveis. Sendo assim, as técnicas de biologia molecular tornam-se uma ferramenta valiosa, pois permitem a inferência do fenótipo a partir da análise genética. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo padronizar reações baseadas na técnica de PCR em tempo real para a genotipagem de variantes dos sistemas de grupos sanguíneos Duffy (*FY*A*, *FY*B* e *FY*BES*), Diego (*DI*A* e *DI*B*) e Dombrock (*HY*). Os resultados obtidos indicaram a ocorrência de completa concordância entre os resultados obtidos por PCR-RFLP (técnicas já descritas na literatura) e as técnicas padronizadas nesse estudo. Os testes de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) para as técnicas padronizadas também apresentaram resultados satisfatórios considerando que se trata de testes qualitativos, sendo que os valores médios dos coeficientes de variação para os *cycle threshold* não ultrapassaram 5,6%. Os resultados dos testes de avaliação da sensibilidade analítica das técnicas padronizadas indicaram que o limite mínimo de detecção das técnicas padronizadas é compatível com as concentrações de DNA usualmente empregadas em laboratórios de biologia molecular sendo notada amplificação em concentrações de 1ng para os alelos *DI*A* e *DI*B*, e em 100pg para os alelos *HY* e *DO*. Desta forma, admite-se que as técnicas padronizadas apresentam potencial para utilização na rotina de bancos de sangue, podendo ser úteis na triagem de portadores de fenótipos de grupos sanguíneos, incluindo as variantes raras.

PALAVRAS-CHAVE: Sistemas de grupos sanguíneos. Genotipagem. PRC em tempo real. Sistema Diego. Sistema Dombrock. Sistema Duffy

Abstract

The determination of red blood cell antigens for the most relevant blood group systems like ABO, Rh, and Kell is commonly performed in blood banks. However, in the last decade, cases of hemolytic transfusion reactions caused by antibodies related to blood group antigens not routinely evaluated in pre-transfusion tests have been reported. These reports include systems like Diego e Dombrock. The determination of antigens and antibodies related to these systems is hampered by the paucity of appropriate reagents for serologic typing. Thus, molecular biology techniques become a valuable tool in immunohematology laboratories, since they allow inference of the phenotype from the genetic analysis. The present study aimed to standardize the genotyping of variants of the Duffy (*FY*A*, *FY*B* and *FY*BES*), Diego (*DI*A* and *DI*B*) and Dombrock (*HY*) blood group systems using real-time PCR. Results indicate that there was complete agreement between the results of PCR-RFLP (techniques described in the literature) and the real time PCR assays standardized in this study. The reproducibility and repeatability of the tests was measured by calculation of the coefficient of variation for cycle threshold from triplicate samples. The mean values of the coefficients of variation did not exceed 5.6%. The limit of detection was found to be 1 ng of DNA per reaction for *DI*A/DI*B* and 100 pg for *HY*. These limits are compatible with the DNA concentrations usually employed in molecular biology laboratories. These results demonstrate that the standardized techniques present potential for routine use in blood banks and may be useful in screening of blood donors with rare phenotypes.

KEY WORDS: Blood group systems, genotyping, real-time PRC, Diego system, Dombrock system, Duffy system

Lista de figuras

Figura 1- Frequências globais dos alelos Duffy.....	41
Figura 2- Cycle thresholds (Cts) da PCR em tempo real para genotipagem dos alelos <i>DI*A/DI*B</i> do sistema Diego.....	58
Figura 3- Resultados de genotipagem por PCR em Tempo Real para os alelos <i>DI*A</i> e <i>DI*B</i> do sistema Diego – Discriminação alélica.....	59
Figura 4- Cycle thresholds (Cts) da PCR em tempo real para genotipagem do alelo <i>HY</i> do sistema Dombrock.....	61
Figura 5- Resultados de genotipagem por PCR em Tempo Real para o alelo <i>HY</i> do sistema Dombrock – Discriminação alélica.....	62
Figura 6- Cycle thresholds (Cts) da PCR em tempo real para genotipagem dos alelos <i>FY*A</i> e <i>FY*B</i> do sistema Duffy.....	64
Figura 7- Resultados de genotipagem por PCR em Tempo Real para os alelos <i>FY*A</i> e <i>FY*B</i> do sistema Duffy – Discriminação alélica.....	65
Figura 8- Cycle thresholds (Cts) da PCR em tempo real para genotipagem do alelo <i>FY*BES</i> do sistema Duffy.....	66
Figura 9- Resultados de genotipagem por PCR em Tempo Real para os alelos <i>FY*B</i> e <i>FY*BES</i> do sistema Duffy – Discriminação alélica.....	66

Lista de tabelas

Tabela 1. Alelo pesquisado, sequências de primers e enzima de restrição utilizados para a genotipagem de alelos dos sistemas Diego e Dombrock e Duffy.....	50
Tabela 2. Sequências de <i>primers</i> e sondas desenhados para a genotipagem dos alelos dos sistemas Diego, Dombrock e Duffy.....	53
Tabela 3. Avaliação do limite mínimo de detecção dos alelos <i>DI*A</i> e <i>DI*B</i> na PCR em Tempo Real.....	60
Tabela 4. Avaliação do limite mínimo de detecção dos alelos <i>HY</i> e <i>DO</i> na PCR em Tempo Real.....	63

Abreviaturas, siglas e símbolos

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*)

DHPN - Doença Hemolítica Perinatal

ISBT - International Society of Blood Transfusion

AABB - Associação Americana de Bancos de Sangue (*American Association of Blood Banks*)

CGSH - Coordenação Geral do Sangue e Hemoderivados

IgG - Imunoglobulina G

AE1 - *anion exchanger1*

SLC4A1 - *Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger, Member 1*

ART4 - *ADP-ribosyltransferase 4*

C - Citosina

T - Timina

G - Guanina

A - Adenina

Kb - Kilobase

kD - Kilodalton

mRNA - ácido ribonucléico mensageiro

IL-8 - Interleucina 8

DARC - *Duffy antigen/receptor for chemokines*

PCR - Polymerase Chain Reaction

SSP-PCR - PCR alelo-específica

PCR-RFLP - reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*)

Real-time PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

CIH - Central de Imunohematologia da Fundação Hemominas

LISS - Solução de baixa força iônica (*Low Ionic Strength Solution*)

µL - Microlitro

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

pb - Pares de base

UV - Ultravioleta

Ct - *Cycle Threshold*

CV - coeficientes de variação

ng - nanograma

pg -picograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1 Fenótipos eritrocitários raros.....	29
2.2 Sistema de grupo sanguíneo Diego	30
2.2.1 Importância clínica do sistema Diego.....	31
2.2.2 Aspectos moleculares do sistema Diego	32
2.2.3 Frequência dos antígenos do sistema Diego	32
2.3 Sistema de grupo sanguíneo Dombrock	33
2.3.1 Importância clínica do sistema Dombrock	34
2.3.2 Aspectos moleculares do sistema Dombrock.....	35
2.3.3 Frequência dos antígenos Dombrock.....	36
2.4. Sistema de grupos sanguíneos Duffy.....	37
2.4.1 Importância clínica do sistema Duffy	37
2.4.2 Aspectos moleculares do sistema Duffy	38
2.4.3 Frequência dos antígenos Duffy	39
2.5 Uso da PCR em tempo real para a genotipagem de grupos sanguíneos	43
3. OBJETIVO.....	45
4 METODOLOGIA	47
4.1 População e amostras	47
4.2 Fenotipagem eritrocitária.....	47
4.2.1 Fenotipagem Fy ^a e Fy ^b	47
4.2.2 Fenotipagem Di ^a	48
4.3 Testes moleculares.....	48
4.3.1 Purificação de DNA	48
4.3.2 Genotipagem por PCR-RFLP	49
4.3.2.1 Genotipagem dos alelos FY*B e FY*A do Sistema Duffy por PCR-RFLP	49
4.3.2.2 Genotipagem do alelo FY*BES do sistema Duffy por PCR-RFLP.....	50
4.3.2.3 Genotipagem dos alelos DI*A e DI*B do Sistema Diego por PCR-RFLP	51
4.3.2.4 Genotipagem do alelo HY do sistema Dombrock por PCR-RFLP	52
4.3.3 Genotipagem por PCR em Tempo Real	52
4.3.3.1 Genotipagem FY*B e FY*A por PCR em Tempo Real	52
4.3.3.2 Genotipagem FY*BES por PCR em Tempo Real	53

4.3.3.3 Genotipagem DI^*A e DI^*B por PCR em Tempo Real	54
4.3.3.4 Genotipagem do alelo HY por PCR em Tempo Real	54
4.3.4 Avaliação das técnicas padronizadas	55
5. RESULTADOS	57
5.1 Padronização da genotipagem dos alelos DI^*A e DI^*B do sistema Diego por PCR em Tempo Real.....	57
5.2 Padronização da análise do sistema Dombrock por PCR em Tempo Real	60
5.3 Padronização da análise do sistema Duffy por PCR em Tempo Real	63
6. DISCUSSÃO.....	69
7. CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXO1	85
ANEXO 2	86
ANEXO 3	87
ANEXO 4	88

1 INTRODUÇÃO

A ciência da transfusão sanguínea teve início com a descoberta do sistema de grupos sanguíneo ABO por Karl Landsteiner em 1901, a qual resultou em aumento significativo da segurança do procedimento transfusional. Até então este procedimento era considerado de alto risco devido à ocorrência de reações adversas decorrentes da incompatibilidade entre doadores e receptores. A partir de então, as primeiras instituições voltadas à transfusão sanguínea foram criadas e houve um empenho maior no desenvolvimento de pesquisas científicas voltadas à área de Hemoterapia (PACHECO, 2003).

A identificação dos antígenos eritrocitários, bem como a descoberta da sua relevância nos processos transfusionais e na doença hemolítica perinatal (DHPN), ou seja, quando há incompatibilidade materno-fetal, é considerada um dos mais importantes avanços na área da medicina no século XX (GIANGRANDE, 2000). Além dessa aplicação clínica, os grupos sanguíneos humanos configuram-se como tema de grande interesse também por sua relevância em áreas como bioquímica, genética, imunologia, antropologia, transplantes de órgãos, evolução, dentre outras (CARTRON; COLLIN, 2001).

Na membrana eritrocitária estão localizadas diferentes estruturas como carboidratos, lipídeos, proteínas e glicoproteínas, as quais interagem constantemente para manutenção do funcionamento dinâmico da célula. Essas moléculas na superfície externa da membrana dos eritrócitos são as estruturas antigênicas que dão origem aos sistemas de grupos sanguíneos (MURADOR et al., 2007).

Os fenótipos eritrocitários podem ser caracterizados pela presença ou ausência de antígenos na membrana dos eritrócitos, os quais apresentam características polimórficas claramente definidas. Os polimorfismos dos grupos sanguíneos têm sua origem, principalmente, como consequência de mutações de ponto, sobretudo alterações de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism; SNP*). Entretanto, outros eventos genéticos estão associados às alterações dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos, como as deleções, as inserções e as conversões gênicas (DANIELS, 2005).

Quando o indivíduo é exposto a eritrócitos não próprios, os quais possuem um fenótipo diferente, por meio de transfusões sanguíneas, gestação, transplante de órgãos ou tecidos, pode ocorrer um processo denominado aloimunização eritrocitária. A aloimunização é caracterizada por uma resposta do sistema imunológico do receptor a esses antígenos estranhos ocasionando a produção de anticorpos específicos. Essa resposta depende além da exposição ao antígeno, de outros fatores como grau imunogênico, concentração do antígeno,

bem como da predisposição genética do receptor. As principais consequências da aloimunização são as reações pós-transfusionais hemolíticas e o aumento do risco da DHPN (ZIPURSKY et al., 1963; POOLE; DANIELS 2007).

De acordo com a Sociedade Internacional de Transusão Sanguínea (ISBT) atualmente são conhecidos 340 antígenos eritrocitários dentre os quais, 308 distribuídos em 36 sistemas, (STORRY et al., 2016). Os sistemas sanguíneos considerados de maior importância clínica são o ABO, Rh, MNS, Kell, Duffy e Kidd (ROSSE et al., 1990; KLEIN; ANSTEE, 2005; POOLE; DANIELS et al., 2007). Por isso, a fenotipagem de antígenos desses sistemas é rotineiramente realizada em bancos de sangue. Entretanto, na última década foram relatados diversos casos de reações transfusionais hemolíticas envolvendo anticorpos de outros sistemas, incluindo Diego e Dombrock (BAUMGARTEN et al., 2006; FIGUEROA, 2013). A falta de anticorpos comerciais e de painéis de hemácias contendo células fenotipadas para esses sistemas dificulta a identificação de anticorpos voltados contra seus antígenos e a busca de doadores compatíveis. Nesses casos as técnicas de biologia molecular tornam-se uma ferramenta valiosa.

A utilização da biologia molecular na rotina dos laboratórios de Imunohematologia tem se tornado essencial para garantir a segurança e eficácia transfusional de pacientes politransfundidos. Isso pode ser claramente observado nos casos em que as técnicas moleculares são utilizadas como ferramentas auxiliares devido a limitações de metodologias rotineiras como a hemaglutinação. Especialmente nos casos da fenotipagem de pacientes com histórico de transfusão recente (menos de quatro meses), onde é possível verificar hemácias do doador na circulação do receptor, bem como nos casos de pacientes com auto-anticorpos, a utilização de técnicas moleculares assume grande importância (REID et al., 2000). Além disso, a genotipagem de grupos sanguíneos também é de fundamental importância para a triagem de portadores de fenótipos raros, possibilitando a inferência do fenótipo a partir da análise genética, considerando a escassez dos anticorpos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fenótipos eritrocitários raros

Considera-se como um sangue com fenótipo raro, aquele em que há ausência de um antígeno eritrocitário de elevada prevalência na população ou ausência de vários antígenos dentro de um mesmo sistema de grupo sanguíneo ou, ainda, em diferentes sistemas, cujas frequências individuais encontram-se equilibradas nas populações (PEYRARD et al., 2008).

Não há consenso internacional para definição de um ponto de corte para o que é considerado fenótipo raro. Entretanto alguns países estabeleceram valores de corte para caracterizar esses fenótipos. Na França, considera-se raro o fenótipo apresentando frequência menor que 4/1000; em Nova Iorque, frequência menor que 1/200 e a Cruz Vermelha Americana, frequência inferior à 1/400. Já a Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB) define como fenótipos raros aqueles com frequência inferior a 1/5.000, como fenótipos incomuns aqueles com frequência inferior a 1/1.000 e como de difícil manejo os com frequência inferior a 1/100 na população (PEYRARD et al., 2008). Alguns exemplos de fenótipos raros são: Ko (K null), Lu(a-b-), Jk(a-b-), Bombay, Di(a+b-), Hy- e Rh^{null}, dentre outros (HUSTINX, 2014).

As frequências de fenótipos eritrocitários variam muito entre diferentes regiões geográficas e etnias. Desta forma, determinados fenótipos podem ser muito raros em uma população e menos em outras. Um exemplo é o fenótipo Fy(a-b-), caracterizado pela ausência da expressão dos antígenos Fy^a e Fy^b do sistema Duffy nos eritrócitos. Esse fenótipo, embora seja raro nas populações europeias, é comum em populações com ancestralidade africana (HOWES et al., 2011). Desta forma, é evidente a necessidade de se estabelecer painéis internacionais de doadores raros, de forma que os países possam intercambiar hemocomponentes e atender às demandas existentes (PEYRARD et al., 2008). Sabe-se que pacientes com fenótipos raros podem desenvolver anticorpos especificamente contra os antígenos ausentes que os caracterizam, após exposição por via transfusional ou gestacional. A confirmação da presença de um fenótipo raro ou identificação do anticorpo correspondente não é considerada tarefa fácil e, na maioria das vezes, exige certo tempo e utilização de reagentes raros de origem humana e não comercializados, como soros ou hemácias raros, e técnicas moleculares. Em alguns casos a especificidade de um anticorpo dirigido contra um antígeno de elevada frequência pode permanecer indeterminada devido à dificuldade de obter hemácias ou soros raros para elucidação do caso (PEYRARD et al., 2008; HUSTINX, 2014).

Mediante a necessidade de uma unidade de hemácias com fenótipo raro, pode-se recorrer a um banco de sangue raro, que poderá fornecer hemocomponentes congelados, caso estejam disponíveis, ou ainda requisitar doadores já cadastrados. Os membros da família de pacientes com fenótipos raros constituem também uma possível fonte de doadores (AABB, 2011).

No Brasil existe um cadastro nacional de Sangue Raro, disponibilizado pela Coordenação Geral do Sangue e Hemoderivados (CGSH). Esse cadastro é alimentado pelos diferentes bancos de sangue do Brasil e é operacionalizado pelo Hemocentro da Unicamp. A CGSH, ao receber uma solicitação de consulta ao Cadastro, encaminha para o Hemocentro da UNICAMP, que fica responsável por verificar no banco de dados se existe no Brasil algum hemocentro que possua doador cadastrado com fenótipo compatível. Após a identificação do doador, o mesmo é convocado para doação e a bolsa é transportada até o serviço de hemoterapia que dá suporte ao serviço de saúde em que o paciente recebe a transfusão.

Os hemocentros brasileiros precisam desenvolver estratégias para a triagem de doadores raros para que haja contínua inserção de doadores cadastrados no Cadastro Nacional de Sangue Raro. Só assim haverá doadores em número suficiente para atender à demanda existente no nosso país. Entretanto, atualmente poucos hemocentros contam com testes padronizados para avaliar fenótipos raros.

Diante da necessidade do desenvolvimento de estratégias para a caracterização de fenótipos raros em Minas Gerais, a Fundação Hemominas tem buscado a implementação de testes baseados em biologia molecular para genotipagem de variantes associadas a esses fenótipos. Esses testes podem ser úteis para auxiliar na identificação de anticorpos irregulares em pacientes aloimunizados e na triagem de doadores raros para atendimento à demanda de hemocomponentes.

2.2 Sistema de grupo sanguíneo Diego

Em 1953 foi relatada a presença de um anticorpo, até então desconhecido, no soro de uma gestante na Venezuela que apresentava um quadro de Doença Hemolítica Perinatal (DHPN). O caso clínico foi correlacionado com a presença do anticorpo detectado, e este foi nomeado como anti-Di^a, tendo o sistema de grupo sanguíneo recebido o nome de Diego em homenagem à paciente (LAYRISSE et al., 1953).

Anos mais tarde, em 1967, Thompson e colaboradores identificaram um segundo anticorpo pertencente ao sistema Diego, que foi chamado de anti-Di^b, no soro de duas

mexicanas múltíparas de origem ameríndia, que haviam recebido transfusão prévia. Este fato possibilitou a identificação do antígeno Di^b , reconhecido como antitético do Di^a . Desde então, já foram reconhecidos e adicionados mais 20 antígenos ao sistema Diego totalizando 22 antígenos: Wr^a , Wr^b , Wd^a , Rb^a , WARR, ELO, Wu, Bp^a , MO^a , Hg^a , Vg^a , Sw^a , BOW, NFLD, Jn^a , KREP, Tr^a , Fr^a , SW1 e DISK (COZAC, 2004). Dentre esses antígenos, três pares são antígenos antitéticos, sendo eles Di^a e Di^b , Wr^a e Wr^b , Wu e DISK. O sistema Diego é reconhecido e numerado pela ISBT como o de número 010 (ZELINSKI et al., 2000; STORRY et al., 2011).

2.2.1 Importância clínica do sistema Diego

Nem todos os antígenos presentes no sistema Diego são capazes de desencadear reações transfusionais ou DHPN. Considera-se que os anticorpos anti- Di^a , anti- Di^b , anti- Wra , anti-ELO e anti-DISK são os únicos associados a reações graves (FIGUEROA, 2013).

Os antígenos de maior importância clínica do sistema Diego são o par de antígenos antitéticos Di^a e Di^b . Estes dois antígenos podem resultar na formação dos anticorpos anti- Di^a e anti- Di^b , e com tais anticorpos é possível classificar quatro fenótipos diferentes: $Di(a-b+)$, $Di(a+b+)$ e $Di(a+b-)$, $Di(a-b-)$ (THOMPSON et al., 1967; RIBEIRO et al., 2000).

Indivíduos que apresentam o antígeno de alta frequência Di^b e não apresentam o antígeno considerado de baixa frequência Di^a apresentam o fenótipo $Di(a-b+)$. Se esse indivíduo receber uma transfusão sanguínea com hemocomponentes positivos para o antígeno Di^a , ele poderá produzir anticorpos anti- Di^a . O mesmo pode ocorrer com um indivíduo que apresenta o fenótipo $Di(a+b-)$, caso receba uma transfusão com hemocomponentes positivos para o antígeno Di^b , sendo que nesse caso o paciente poderá desenvolver anticorpo com especificidade anti- Di^b . O manejo de pacientes aloimunizados que apresentam anticorpos com especificidade anti- Di^b e necessitam de transfusão é desafiador, uma vez que doadores com o fenótipo $Di(a+b-)$ são raros na maioria das populações. Além disso, os reagentes para fenotipagem dos antígenos do sistema Diego são de difícil obtenção (DE LIMA et al. 1982)

Anticorpos anti- Di^a e anti- Di^b são da classe IgG e podem ocasionar reações pós-transfusionais hemolíticas moderadas a graves, existindo relatos de anticorpos anti- Di^a capazes de ativar o complemento e ocasionar reações hemolíticas graves, imediatas ou tardias (FIGUEROA, 2013). Além disso, é comum o aparecimento desses anticorpos nos casos de incompatibilidade materno fetal, onde a criança pode apresentar um quadro de DHPN potencialmente grave (DE LIMA et al. 1982, OH et al., 2008).

2.2.2 Aspectos moleculares do sistema Diego

Os antígenos do sistema Diego são carregados pela proteína Banda-3, ou *anion exchanger1* (AE1), responsável pela troca de ânions nos eritrócitos. Sabe-se que AE1 é a maior proteína expressa nas células eritroides, sendo encontrada apenas nos eritrócitos e rins e que sua ausência é incompatível com a vida. Além de carrear os antígenos do Sistema Diego, a Banda-3 é considerada a proteína mais abundante nos eritrócitos e pode compor até 25% do peso total dessa célula, justificando sua importância no dinamismo eritroide (POOLE, 1999).

Estudos moleculares apontam que o gene *SLC4A1* (*Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger, Member 1*) presente no cromossomo 17, mais especificamente na região 17q21.31, é o responsável pela expressão da glicoproteína Banda-3 na membrana dos eritrócitos. Esse gene é composto de 20 exons e 19 introns (POOLE, 1999).

Várias mutações já foram descritas no gene *SLC4A1*. Essas mutações podem resultar em anormalidades da membrana eritrocitária tais como ovalocitose e esferocitose hereditárias ou alterações renais. Outras alterações nesse gene resultam em antígenos de grupos sanguíneos do sistema Diego (BOOTH et al., 1977).

Sabe-se que o polimorfismo responsável pelos alelos *DI*A* e *DI*B* (rs2285644), associados respectivamente aos antígenos Di^a e Di^b , corresponde à troca 2561C>T do gene *SLC4A1*, resultando na troca de um aminoácido na posição 854. No antígeno Di^b , existe uma prolina e no Di^a uma leucina na posição 854 (BRUCE et al., 1994). Os demais polimorfismos já descritos para esse sistema estão descritos no Anexo 1.

2.2.3 Frequência dos antígenos do sistema Diego

Dentre os antígenos descritos, pertencentes ao sistema Diego, Di^b , Wr^b e DISK, são considerados de alta frequência, enquanto os outros 19 são de baixa prevalência (FIGUEROA, 2013).

Uma considerável variação na frequência de antígenos do sistema Diego nas diferentes populações mundiais já foi relatada. O antígeno Di^b é encontrado em alta frequência em praticamente todas as populações já estudadas, o que torna raro o fenótipo $Di(b-)$. Já o antígeno Di^a , embora seja menos frequente em populações africanas e europeias, pode apresentar frequência relativamente elevada em algumas populações asiáticas e nativas americanas (GERSHOWITZ, 1959; POOLE, 1999; WEI et al., 2013).

Estudos populacionais realizados no contexto do “1000 Genome Project” indicam que o alelo associado ao antígeno Di^b apresenta frequência de 99,9% nas populações de origem africana, 100% nas de origem europeia, 98,8% nos ameríndias e 97,4% na população da Ásia oriental.

No Brasil, alguns estudos já foram realizados para avaliar a frequência de antígenos e alelos do sistema Diego. Esses estudos apontam para uma frequência relativamente alta do antígeno Di^a nas populações nativas americanas. A presença desse antígeno foi estimada em 36% dos indivíduos da tribo Carajás, 46% entre os Kaingagues e 75,7% na tribo Parakanã (BALEOTTI, 2002; JUNQUEIRA et al., 1956; LEVINE et al., 1956).

Já nas populações brasileiras urbanas, caracterizadas por níveis altos de miscigenação, a distribuição dos antígenos do sistema Diego é diferente. Baleotti em 2002, com o intuito de verificar a frequência dos antígenos Di^a e Di^b de 93 doadores de sangue da cidade de Marília, no interior de São Paulo (região sudeste do Brasil), constatou que 90 doadores (96,8%) possuíam o genótipo DI^*B/DI^*B , 3 (3,2%), o genótipo DI^*A/DI^*B e nenhum dos doadores foi caracterizado como DI^*A/DI^*A . Outro estudo, realizado em doadores de sangue de Ribeirão Preto-São Paulo reportou uma frequência de 6,1% para o genótipo DI^*A/DI^*B (COZAC, 2004). Recentemente um estudo em Santa Catarina (região sul do Brasil) revelou que dos 373 doadores analisados, 352 (94,4%) apresentaram o genótipo DI^*B/DI^*B , 21 (5,4%) o genótipo DI^*A/DI^*B e nenhum doador apresentou o genótipo DI^*A/DI^*A (COSTA et al., 2016). Estes estudos sugerem que na população urbana dos estados pesquisados a presença do alelo DI^*A em homozigose é rara. Em Minas Gerais as frequências dos alelos do sistema Diego ainda são desconhecidas.

2.3 Sistema de grupo sanguíneo Dombrock

O sistema de grupo sanguíneo Dombrock foi descrito em 1965, a partir de uma paciente com o sobrenome Dombrock, que apresentava o anticorpo anti- Do^a (SWANSON et al., 1965). Oito anos depois, foi descrito o antígeno Do^b , par antitético do antígeno Do^a (MOLTHAN et al., 1973).

Em 1985, a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) reconheceu o sistema de grupos sanguíneos Dombrock, que foi numerado como 014, seguindo a terminologia numérica da ISBT (LEWIS et al., 1985).

O sistema de grupo sanguíneo Dombrock é constituído por nove antígenos carregados pela glicoproteína Dombrock, a qual apresenta um total de 354 aminoácidos. São

reconhecidos pela ISBT como parte deste sistema os antígenos: Do^a, Do^b, Gy^a (Gregory), Hy (Holley), Jo^a (Joseph), DOYA, DOMR, DOLG, DOLC, sendo que Do^a e Do^b constituem o único par de antígenos antitéticos (ISBT, 2013).

A identificação dos anticorpos e a fenotipagem dos antígenos do Sistema Dombrock são consideradas um desafio para os mais qualificados imunohematologistas, uma vez que os antígenos podem ser fracamente expressos e os anticorpos fracamente reativos (RIOS et al., 2002). Além disso, o Sistema Dombrock é caracterizado pela interação entre fenótipos, uma vez que a presença ou ausência de determinados antígenos influencia na expressão de outros (REID et al., 2005). O antígeno DOYA, por exemplo, tem sua ausência relacionada à expressão fraca dos antígenos Hy, Gy e Jo^a (MAYER et al., 2010). Já é sabido também que a ausência do antígeno DOMR, está relacionada à fraca expressão dos antígenos Do^b, Gy^a, Hy, Jo^a, e DOYA (COSTA et al., 2010). Os eritrócitos Hy- parecem não expressar o antígeno Jo^a (ou o expressam muito fracamente), e eritrócitos Jo(a-) apresentam fraca expressão do antígeno Hy (REID et al., 2005). Além disso, uma resposta imune variada em pessoas com o mesmo fenótipo Dombrock tem sido observada (REID et al., 2005).

2.3.1 Importância clínica do sistema Dombrock

Sabe-se que os anticorpos voltados contra antígenos do sistema Dombrock são da classe das imunoglobulinas IgG e detectar tais anticorpos é difícil, uma vez que esses são mais frequentes em indivíduos politransfundidos, que apresentam múltiplos anticorpos no plasma ou soro. Além disso, esses anticorpos, em geral, são fracamente reativos e se deterioram rapidamente *in vitro* (MOULDS et al., 1975).

Embora seja difícil demonstrar a capacidade de anticorpos contra antígenos do sistema Dombrock de causar reações hemolíticas pós-transfusionais, sabe-se que a compatibilização desses antígenos em indivíduos aloimunizados pode prevenir sinais e sintomas de hemólise (BAUMGARTEN et al., 2006; SHIREY et al., 1998; STRUPP et al., 1998).

Devido à complexidade na identificação de anticorpos contra antígenos do sistema Dombrock, acredita-se que o número de casos de reações transfusionais envolvendo esse sistema seja subestimado. Desta forma, não se sabe ao certo a incidência real de reações transfusionais envolvendo aloimunização contra antígenos do sistema Dombrock (REID et al., 2005).

Diversos estudos apontam o envolvimento de anticorpos anti-Do^a e Anti-Do^b em reações hemolíticas imediatas e tardias e evidências apontam para o envolvimento desses

anticorpos com a DHPN (BAUMGARTEN et al., 2006, LARRICQ et al., 2017). Já foram relatados casos dos anticorpos anti-Hy, anti-Gy^a e anti-Jo^a, causando reações transfusionais moderadas (BEATTIE; CASTILLO, 1975; MAK et al., 1995)

O primeiro caso de identificação de anticorpos anti-Hy, o anticorpo que reage contra o antígeno Hy (Holley), foi reportado em 1967 (SCHMIDT et al., 1967). Embora a presença de anticorpos anti-Hy seja considerada rara, esse anticorpo já foi associado à DHPN e à morte de fetos, em casos de gestações nas quais havia incompatibilidade materno-fetal para esse o antígeno (WEAVER et al., 1984, BRASCHLER et al., 2015).

2.3.2 Aspectos moleculares do sistema Dombrock

O gene *DO*, que também é conhecido como gene *ART4* (*ADP-ribosyltransferase 4*), está localizado no cromossomo 12, mais especificamente na região 12p13.2–p12.1. *ART4* é composto por três éxons, tem 14kb e é responsável pela codificação dos antígenos antitéticos Do^a e Do^b, além dos antígenos de alta frequência Gy^a, Hy, Jo^a, DOYA, DOMR, DOLG, DOLC (ISBT, 2013). A glicoproteína Dombrock, codificada por esse gene, é composta por 314 aminoácidos e possui peso molecular de 50kD (GUBIN et al., 2000).

Os alelos *DO*A* e *DO*B*, responsáveis pelos antígenos Do^a e Do^b, diferenciam entre si como resultado da alteração de um nucleotídeo (793A>G) no éxon 2 do gene *DO*, que resulta na substituição do aminoácido na posição 265. No antígeno Do^a, existe uma asparagina e no Do^b, um aspartato (GUBIN et al., 2000).

Para a variante *HY* há um SNP (323G>T) presente no éxon 2 no gene *DO*, o que resulta na substituição de uma glicina por uma valina na posição 108 (SCHMIDT et al., 1967). Indivíduos homozigotos para essa variante apresentam o fenótipo raro Hy-. Os demais polimorfismos já descritos para esse sistema estão descritos no Anexo 2.

Existe uma grande complexidade nas relações entre genótipos e fenótipos do sistema Dombrock. A proximidade física dos SNPs associados aos fenótipos raros Hy- e Jo(a-) pode explicar porque indivíduos Hy- são negativos para Jo^a ou expressam esse antígeno fracamente, e porque indivíduos Jo(a-) apresentam expressão fraca do antígeno Hy. Os aminoácidos associados a esses fenótipos são separados por apenas oito resíduos, o que está dentro do range de um determinante antigênico. Por outro lado, a expressão fraca de Do^b em eritrócitos Hy-, bem como a expressão fraca de Do^a em eritrócitos Jo(a-) têm sido atribuídas a alterações na conformação da proteína (REID et al., 2005). Outras interações entre fenótipos permanecem não elucidadas.

A realização de estudos baseados no sequenciamento do gene *ART4* tem revelado a ocorrência de polimorfismos adicionais relacionados ao sistema Dombrock, sendo que nem todos foram associados a alterações fenotípicas (HASHMI et al., 2005; CHAPEL-FERNANDES et al., 2009; BALEOTTI et al., 2011).

A complexidade fenotípica e genotípica do sistema Dombrock evidencia a necessidade de estudos adicionais sobre esse sistema, incluindo o aprofundamento da compreensão sobre as relações entre genótipos e fenótipos e a importância de cada antígeno nas reações transfusionais e na DHPN.

2.3.3 Frequência dos antígenos Dombrock

Segundo Henke (1980) os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Dombrock são considerados difíceis de serem estudados, uma vez que a diferenciação entre reações fracas e reações negativas não é tarefa fácil. A escassez de reagentes adequados para a fenotipagem justifica a carência de estudos sobre as frequências dos antígenos do sistema Dombrock. No entanto, o desenvolvimento de testes moleculares possibilitou o estudo de alelos desse sistema em diferentes populações.

Estudos indicam que a frequência dos alelos do sistema Dombrock varia em diferentes populações mundiais. A frequência do alelo *DO*A* foi estimada em 42% em populações do norte da Europa, 33% na América do norte, 12% no Japão e 7% na Tailândia. Já alelo *DO*B* é mais frequente do que o alelo *DO*A* em todas as populações estudadas (GUBIN et al., 2000).

Os demais antígenos do sistema Dombrock são considerados de alta incidência, com frequências previstas em mais de 99% em quase todas as populações estudadas. O antígeno Hy, por exemplo, apresenta frequência de 99% na população africana e de 100% de quase todas as outras populações, o que leva o fenótipo Hy- a ser considerado raro (SCHMIDT et al., 1967). Estudos apontam que o genótipo *HY/HY*, não é encontrado entre judeus, asiáticos e israelenses. Em Nova York estima-se que a frequência do alelo *HY* seja de 1,4% (HASHMI et al., 2005). No Brasil, já foi demonstrado que existe maior prevalência de indivíduos portadores do alelo *HY* em Minas Gerais (2,4%) quando comparado a outras populações, como a de São Paulo onde essa frequência não ultrapassa 1% (BALLEOTI et al., 2002; PIASSI et al., 2013). A frequência diferenciada deste alelo na população de Minas Gerais justifica traçar estratégias para identificar doadores com o fenótipo Hy- nessa população.

2.4. Sistema de grupos sanguíneos Duffy

O sistema de grupo sanguíneo Duffy foi descrito em 1950, durante a investigação de uma reação transfusional hemolítica em um paciente hemofílico que havia recebido múltiplas transfusões (CUTBUSH et al., 1950).

O soro do paciente continha anticorpos irregulares e as reações eram incomuns às dos sistemas de grupos sanguíneos até então conhecidos. Os anticorpos foram denominados anti-Fy^a e o sistema de grupo sanguíneo, Duffy, em homenagem ao paciente que tinha esse nome. No ano seguinte foi detectada a presença de outro anticorpo com características semelhantes, que foi denominado anti-Fy^b. Desde então, a glicoproteína Duffy, também conhecida como DARC (*Duffy antigen receptor for chemokines*), tem atraído o interesse em diversas áreas do conhecimento como antropologia, genética e malariologia (HOWES et al., 2011).

A glicoproteína Duffy é responsável por carrear os antígenos antitéticos Fy^a e Fy^b, assim como os antígenos Fy³, Fy⁴, Fy⁵ e Fy⁶, e é expressa na superfície dos eritrócitos. Evidências apontam para a presença do mRNA Duffy na medula óssea, baço, coração, músculo esquelético, fígado fetal e no endotélio de vários tecidos (LANGHI JR et al., 2004).

Segundo Sanger e colaboradores (1955), utilizando anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b é possível identificar os três principais fenótipos eritrocitários do sistema Duffy, sendo eles: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+). Um quarto fenótipo, Fy(a-b-) é caracterizado pela ausência de expressão dos antígenos Fy^a e Fy^b nos eritrócitos e é comum em populações de origem africana.

2.4.1 Importância clínica do sistema Duffy

O conhecimento crescente sobre as bases genéticas do sistema Duffy proporcionou o desenvolvimento de estudos funcionais que evidenciaram o papel da glicoproteína portadora de antígenos desse sistema como receptora de quimiocinas, na instalação de parasitos no hospedeiro e na regulação em processos patológicos.

Há evidências de que a Interleucina 8 (IL-8) é uma quimiocina ligante da proteína DARC. Quando ligada à DARC, a IL-8 deixa de exercer suas atividades de atração e ativação de neutrófilos, alterando possíveis reações inflamatórias (LAKEN VAN DER et al., 1998).

Está bem estabelecido o papel da glicoproteína Duffy como receptora para o *Plasmodium vivax* e *Plasmodium knowlesi*, na forma de merozoíta, estágio evolutivo no qual há invasão de hemácias e início do ciclo hematogênico desses protozoários. Sabe-se que a

capacidade de invasão das hemácias está associada às mais variadas manifestações da malária em humanos e em outros animais, e que indivíduos que apresentam fenótipo Fy(a-b-) são resistentes à essa doença (MILLER et al., 1976; JENS et al., 2005).

Sabe-se ainda que existe relação entre a glicoproteína Duffy e a rejeição ao transplante renal. A diminuição da função renal após o transplante foi associada ao fenótipo Fy(a-b-) devido à ausência da proteína DARC e, conseqüentemente, a menor atenuação dos efeitos inflamatórios (AKALIN; NEYLAN, 2003). Além disso, a ausência de DARC nos eritrócitos é associada à redução no número de neutrófilos (REICH et al., 2009). Klein e Anstee (2005) associaram o polimorfismo Duffy à susceptibilidade ou resistência a doenças.

Do ponto de vista transfusional, os antígenos Fy^a e Fy^b são os mais importantes do sistema Duffy. Esses antígenos estão presentes desde o nascimento e já foram detectados em embriões com seis a sete semanas de gestação (TOIVANEN; HIRVONEN, 1973; MENY, 2010)

O anticorpo anti-Fy^a já foi descrito como causador de reações hemolíticas imediatas e tardias e de vários casos de DHPN moderada ou até mesmo fatais. Há também relatos do envolvimento de anticorpos anti-Fy^b em reação transfusional hemolítica fatal, reação transfusional tardia, DHPN e anemia hemolítica autoimune (DANIELS et al., 2002).

Com relação a anticorpos contra outros antígenos do sistema Duffy, sabe-se que o anti-Fy³ pode causar reações transfusionais moderadas e DHPN, e o anti-Fy⁵, reação transfusional moderada e tardia (apenas um caso relatado) (REID et al., 2005).

2.4.2 Aspectos moleculares do sistema Duffy

Por meio de técnicas de citogenética, foi determinado que o *locus DARC* encontra-se no cromossomo 1, mais exatamente na posição 1q22-q23. Após clonagem e sequenciamento do gene *DARC* foi evidenciada a presença de dois éxons (MALLINSON et al., 1995; MENY, 2010).

O sistema Duffy apresenta alelos múltiplos, sendo os principais *FY*A* e *FY*B*, responsáveis pela expressão dos antígenos Fy^a e Fy^b respectivamente, e o alelo *FY*B^{ES}* (*erythroid silent*, relacionado ao silenciamento do alelo *FY*B*), associado ao fenótipo Fy(a-b-). Os alelos *FY*A* e *FY*B* diferem em um único nucleotídeo (*SNP*) e apresentam uma guanina (G) no alelo *FY*A* e uma adenina (A) no alelo *FY*B*, (125 G>A, rs12075). Esse polimorfismo está associado à presença de uma glicina no antígeno Fy^a e um ácido aspártico no antígeno Fy^b (códon 42) (MALLINSON et al., 1995).

O fenótipo Fy(a-b-), geralmente encontrado em indivíduos de origem africana, está associado à mutação pontual -33T>C (rs2814778), que ocorre na região promotora do gene, chamada GATA-box, impedindo a ligação do fator de transcrição GATA 1 apenas nos eritrócitos. Esse fenótipo é caracterizado predominantemente pela homozigose do alelo não funcional $FY*B^{ES}$, que acarreta a ausência de expressão do antígeno Fy^b na membrana dos eritrócitos, mas não altera a expressão dessa proteína em outros tecidos (MENY, 2010). Indivíduos que são Fy(b-) devido à mutação na região GATA-box não produzem anti-Fy^b, quando transfundidos com hemácias Fy(b+) (TOURNAMILLE et al., 1998). Esta informação é importante na medicina transfusional uma vez que elimina a necessidade de compatibilização do antígeno Fy^b nesses indivíduos.

Tendo em vista a grande importância atribuída ao fenótipo Fy(a-b-) na área de hemoterapia, o *First International Workshop on Blood Group Genotyping* recomenda a identificação da mutação GATA-box em pacientes Fy(b-) que necessitam de transfusão (DANIELS et al., 2005). Na Fundação Hemominas, a análise genotípica do sistema Duffy e da região GATA-box tem sido realizada por meio da técnica de PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição) desde 2009 (MARTINS et al., 2009).

A ocorrência do alelo $FY*A$ com a região GATA-box mutada impedindo a sua expressão também é conhecida. Esse genótipo foi relatado na população de Papua Nova Guiné e é extremamente raro (ZIMMERMAN et al., 1999). Os demais polimorfismos já descritos para o sistema Duffy estão descritos no Anexo 3.

2.4.3 Frequência dos antígenos Duffy

Por se tratar de um sistema de interesse em vários campos da ciência, diversos estudos descrevendo as frequências de alelos e antígenos desse sistema, em diferentes populações mundiais, são encontrados na literatura. Em 2011, Howes e colaboradores produziram o primeiro mapa da distribuição mundial de Duffy em um artigo reunindo a informação disponível na literatura sobre as frequências fenotípicas e genotípicas desse sistema (Figura 1). Este estudo mostrou que a frequência mundial dos alelos e antígenos do sistema Duffy é bastante heterogênea.

O alelo $FY*BES$ apresenta frequência superior a 90% na população africana, especialmente em regiões da África ocidental. Fora do continente africano, a frequência desse alelo varia, tendo sido estimada em 80% em Madagascar, superior a 50% na Península

Arábica e de 5 a 20% no sudeste da Ásia. Já na maior parte da Ásia oriental e da Europa, a frequência desse alelo é baixa, sendo inferior a 5% (HOWES et al., 2011).

O alelo *FY*A* é mais comum na população asiática e sua frequência é superior a 80% em regiões do sul da Ásia, Austrália e Mongólia e na parte oriental da China e da Rússia. Em regiões como o Alasca e o Canadá, a frequência do alelo *FY*A* alcança 90%. Embora a frequência do alelo *FY*A* seja baixa na maior parte da África subsaariana (inferior a 5%), fora do continente Africano esse alelo é relativamente comum, com frequência estimada em 67,7% da população mundial (HOWES et al., 2011).

O alelo *FY*B*, por sua vez, é considerado o menos frequente em nível mundial, apresentando frequência acima dos 50% apenas na população da Europa e ao longo da costa leste dos Estados Unidos. Nas Américas é encontrada a maior heterogeneidade na distribuição dos alelos do sistema Duffy, e a presença dos alelos *FY*BES*, *FY*A* e *FY*B* (HOWES et al., 2011).

No Brasil, estudos sugerem que há variação na frequência dos genótipos e fenótipos Duffy de acordo com a região do país. Embora o alelo *FY*B* seja o mais frequente nas regiões estudadas, sua frequência varia dependendo da população tendo sido estimada em 59,0% em Santa Catarina (COSTA et al., 2016), 63,4% na Amazônia (CAVASINI et al., 2007), 65,8% no Paraná (SIPPERT et al., 2013) e 71,8% em Minas Gerais (MARTINS et al., 2017). Estudos apontam ainda que no Brasil a frequência dos antígenos Duffy varia conforme a etnia, sendo que em afrodescendentes o fenótipo Fy(a-b-) é o mais frequente, chegando a 66,9%, enquanto em caucasoides sua frequência é de apenas 1,1% (NOVARETTI et al., 2000).

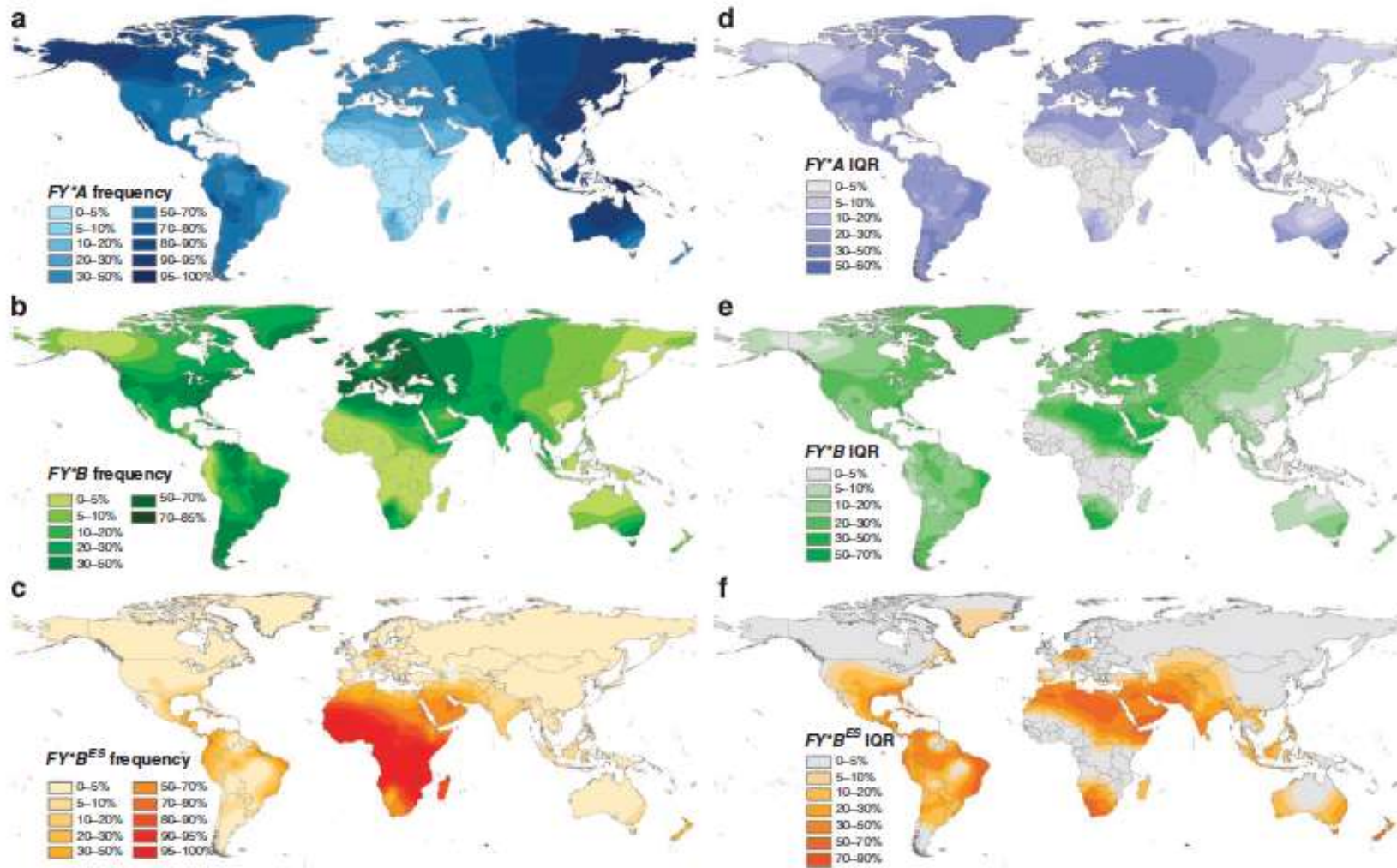


Figura 1- Frequências globais dos alelos Duffy

Fonte: Howes, 2011

2.5 Uso da PCR em tempo real para a genotipagem de grupos sanguíneos

A determinação de alelos e genótipos de grupos sanguíneos pode ser realizada por meio de diversas técnicas de biologia molecular incluindo diferentes variações da PCR, sequenciamento, microarranjos de DNA, dentre outros.

A PCR em tempo real é uma variação da técnica de reação em cadeia da polimerase, que permite ao operador a detecção e o monitoramento dos produtos de amplificação durante toda a reação (HIGUCHI et al., 1992; KUBISTA et al., 2006). A PCR em tempo real pode ser realizada por diversos métodos como sondas hidrolisáveis, sondas hibridizáveis e agentes ligantes ao DNA (KUBISTA et al., 2006). Dentre essas estratégias, tem se destacado o uso de sondas de hidrólise marcadas com fluoróforos, conhecido como sistema TaqMan (ThermoFisher) (HOLLAND et al., 1991). Esse sistema consiste no uso de sondas (fragmentos de DNA) ligadas a um fluoróforo em uma das extremidades, e a molécula chamada quencher na outra extremidade, sendo que o quencher tem a finalidade bloquear a fluorescência até que a sonda seja quebrada. Durante o processo de amplificação, a atividade 5' exonucleásica da DNA polimerase cliva a sonda e libera o fluoróforo repórter. Desta forma, o sinal de fluorescência vai aumentando de forma exponencial a cada ciclo da PCR (VALONES et al., 2009).

Para a PCR em tempo real é necessário um termociclador com sistema óptico, para que seja possível a excitação da fluorescência e captação da emissão, e de um computador contendo um software para aquisição dos dados gerados. Na PCR em tempo real, é realizado pelo equipamento o cálculo dos valores do “*threshold*” e o Ct (“*Cycle threshold*”). O “*threshold*” consiste no nível de detecção em que a reação atinge uma intensidade de fluorescência acima da fluorescência de fundo, e o ciclo da PCR onde a amostra atinge esse nível é chamado de Ct (“*Cycle Threshold*”) (KUBISTA et al., 2006).

A PCR em tempo real apresenta algumas vantagens como simplicidade técnica, rapidez de execução, especificidade de amplificação e custo relativamente baixo, com reduzido potencial de contaminação. Essas características têm tornado esta técnica uma opção vantajosa para a genotipagem de alelos relacionados aos sistemas de grupos sanguíneos (ARAÚJO et al., 2003; POLIN et al., 2008; SCHMIDT, 2010; RODRIGUES et al., 2015). Desta forma, no presente estudo a PCR em tempo real foi a técnica selecionada para a padronização da genotipagem dos alelos de interesse.

A Fundação Hemominas é o órgão público que gerencia o sistema hemoterápico de Minas Gerais, sendo responsável por mais de 90% das transfusões realizadas no estado. A Central de Imunohematologia da Fundação Hemominas realiza exames para compatibilização de hemocomponentes de doadores e receptores, incluindo testes sorológicos (fenotipagem) e de biologia molecular (genotipagem) para os principais antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos (Rh, Kell, Kidd, Duffy e MNS). No entanto, existe demanda para a implementação de testes para avaliação de outros sistemas, incluindo as variantes raras.

O desenvolvimento de estratégias para a triagem de fenótipos raros no Brasil é de extrema importância para assegurar a contínua inserção de doadores no Cadastro Nacional de Sangue Raro. Caso algum paciente apresente a necessidade de receber transfusão de hemocomponentes que apresentem fenótipo raro os hemocentros cadastrados são acionados e busca-se o hemocomponente. Dessa forma, a padronização de técnicas moleculares para genotipagem dos alelos *HY* do sistema Dombrock e *DI*A/DI*B* do sistema Diego no Hemocentro de Belo Horizonte - Fundação Hemominas é de grande relevância para aumentar a segurança transfusional em Minas Gerais e atender a demanda de hemocomponentes em nível nacional. Além disso, a padronização da genotipagem dos alelos *FY*A*, *FY*B* e *FY*BES* do sistema Duffy por PCR em tempo real possibilitará maior rapidez na liberação dos resultados.

3. OBJETIVO

Padronizar reações baseadas na técnica de PCR em tempo real para a genotipagem de variantes dos sistemas de grupos sanguíneos Duffy (*FY*A*, *FY*B* e *FY*BES*), Diego (*DI*A* e *DI*B*) e Dombrock (*HY*), aplicáveis a bancos de sangue.

Avaliar as novas técnicas desenvolvidas em relação à concordância, precisão e sensibilidade analítica.

4 METODOLOGIA

4.1 População e amostras

A população de estudo para a padronização e avaliação dos testes moleculares para genotipagem de alelos do sistema Duffy (FY^*A , FY^*B e FY^*BES), Diego (DI^*A e DI^*B) e Dombrock (HY) foi composta por doadores de sangue voluntários.

Considerando todos os testes realizados, foram utilizadas 148 amostras, sendo 40 para o sistema Duffy, 57 para o sistema Diego e 51 para o sistema Dombrock, sendo esta uma amostra de conveniência. As amostras foram fornecidas a partir da Central de Imunohematologia da Fundação Hemominas (amostras excedentes após testes de rotina) ou de biorrepositório localizado no Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas sob o número CAAE: 43237415.8.0000.5118.

Para os antígenos Fy^a , Fy^b e Di^a , foram selecionadas amostras de doadores com fenótipos conhecidos. Já para o alelo HY , apenas a genotipagem foi realizada.

4.2 Fenotipagem eritrocitária

A fenotipagem eritrocitária consiste no teste que investiga presença ou ausência dos antígenos de grupos sanguíneos da superfície dos eritrócitos, utilizando anticorpos específicos.

Os testes de fenotipagem para os antígenos Fy^a e Fy^b do sistema Duffy e Di^a do sistema Diego foram realizados na rotina de atendimento da Central de Imunohematologia da Fundação Hemominas (CIH), pela técnica de hemaglutinação em colunas de gel de centrifugação. Os resultados desses testes foram utilizados para a seleção das amostras para a padronização e avaliação do ensaio de genotipagem por PCR em Tempo Real.

4.2.1 Fenotipagem Fy^a e Fy^b

A fenotipagem Fy^a e Fy^b foi feita adicionando-se 50 μ L de suspensão de hemácias a 1% e 50 μ L de anticorpos anti- Fy^a e de anti- Fy^b (Bio-Rad), respectivamente, em dois microtubos de um cartão LISS/Coombs (Bio-Rad). A suspensão de hemácias foi produzida adicionando-se 5 μ L de papa das hemácias a serem fenotipadas a 500 μ L de solução de baixa

força iônica (LISS - Bio-Rad). Os cartões foram incubados em temperatura ambiente, por 10 minutos, e centrifugados por 10 minutos a 85g em uma centrífuga própria (Bio-Rad). A ocorrência de aglutinação, evidenciada pela presença de hemácias ao longo do microtubo do cartão, indicou a presença do antígeno correspondente.

4.2.2 Fenotipagem Di^a

A fenotipagem do antígeno Di^a do sistema Diego foi feita adicionando-se 50µL de uma suspensão de hemácias a 1% a 25µL de plasma humano contendo anticorpo anti-Di^a, em um microtubo de um cartão ID-LISS/Coombs (Bio-Rad). A suspensão de hemácias foi produzida adicionando 5µL de papa das hemácias a serem fenotipadas a 500µL de solução de baixa força iônica (LISS-Bio-Rad). O plasma humano contendo anti-Di^a foi obtido de um indivíduo aloimunizado e foi previamente caracterizado na CIH da Fundação Hemominas, usando como controles amostras com fenótipos previamente caracterizadas como Di^{a+} e Di^{a-}. Os cartões foram incubados a 37°C, durante 15 minutos, e centrifugados por 10 minutos a 85g em centrífuga própria (Bio-Rad). A presença de aglutinação, evidenciada pela presença de hemácias ao longo do microtubo do cartão, indicou a presença do antígeno correspondente.

4.3 Testes moleculares

4.3.1 Purificação de DNA

A purificação do DNA genômico dos doadores de sangue foi realizada a partir de amostras colhidas em tubos contendo anticoagulante EDTA, utilizando o kit Biopur Mini Spin Plus (Mobius Life Science), seguindo as instruções do fabricante como descrito a seguir.

Em um microtubo de 1,5mL foram adicionados 20µl de Proteinase K previamente reconstituída, 200µl de *Buffy Coat* da amostra a ser estudada, e 200µl de Tampão de lise A. O microtubo foi agitado em vortex por 10 segundos e, em seguida, foi incubado a 56°C, por 15 minutos no banho seco, com agitação de 5 segundos a cada 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 400µl de Tampão de Ligação B6 ao conteúdo do tubo, o qual foi então homogeneizado no vortex por 5 segundos. A mistura foi transferida para outro tubo contendo uma coluna (filtro Spin), o qual foi incubado à temperatura ambiente, por 1 minuto, e centrifugado por 13000xg por 2 minutos. Em seguida, a coluna foi retirada e transferida para outro tubo limpo e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Ao tubo contendo a coluna,

adicionou-se 500µl de tampão de lavagem 1. Após centrifugação por 1 minuto à 13000xg, o filtrado presente no microtubo foi descartado. Foram então adicionados 800µl de tampão de lavagem 2 ao tubo contendo a coluna e esse foi centrifugado a 13000xg, por 4 minutos. O tubo contendo o filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para outro tubo limpo com capacidade para 1,5mL. Adicionou-se sobre a coluna 70µl de tampão de eluição, previamente aquecido a 56°C, e este foi incubado por 1 minuto e centrifugado posteriormente a 8000xg por 1 minuto. A coluna foi descartada e o DNA eluído foi quantificado no equipamento NanoVue (GE Healthcare).

O DNA purificado foi diluído para uma concentração final de 50n/µl em água e foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

4.3.2 Genotipagem por PCR-RFLP

As amostras utilizadas para a padronização das novas técnicas de genotipagem por PCR em tempo real foram avaliadas utilizando as técnicas de PCR-RFLP já descritas na literatura. Esta etapa foi realizada para assegurar a obtenção de amostras com genótipos conhecidos, possibilitando, assim, a padronização das reações de PCR em tempo real. As técnicas empregadas foram previamente descritas na literatura e as sequências dos iniciadores (*primers*) e as enzimas de restrição utilizadas estão apresentados na tabela 1.

*4.3.2.1 Genotipagem dos alelos FY*B e FY*A do Sistema Duffy por PCR-RFLP*

A genotipagem dos alelos *FY*B* e *FY*A* do sistema Duffy foi realizada utilizando a técnica descrita por Rios e colaboradores em 2000.

Nesses ensaios foram utilizados 100ng de DNA genômico em uma reação de 20µl contendo 2µl de tampão (1x), 1,5mM de MgCl₂, 2pmol de cada iniciador específico, 200µM de cada dNTPs e 0,8U da enzima Taq Platinum (Invitrogen, USA). A PCR foi realizada usando o termociclador modelo Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems), nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma fase de extensão final de 72°C por 10 min.

Para a fase de restrição foram usados 2,5µL de Buffer FD (Thermo), 5U da Enzima Ban I (BshN1) (Thermo Fisher) e 8µL do produto da PCR, totalizando um volume de 25µL. Esta mistura foi incubada por 1 hora a 37°C para a restrição, e por 20 minutos a 65°C para a

inativação da enzima de restrição.

Tabela 1. Alelo pesquisado, sequências de primers e enzima de restrição utilizados para a genotipagem de alelos dos sistemas Diego e Dombrock e Duffy

Alelo	Primers	Enzima de Restrição
<i>DI*A/</i> <i>DI*B</i>	DIABF:5'-TGG CGC ATG CAC TTA TTC AC-3' DIABR:5'-TTC CTG AAG ATG AGC GGC AG -3'	<i>Msp I</i>
<i>HY/</i> <i>DO*</i>	DoX2F: 5'-TCAGTACCAAGGCTGTAGCA-3' Do378R:5'-AGTAAAGTCAGAATGAACATTGCTGCACAAT-3'	<i>BseDI</i>
<i>FY*A/</i> <i>FY*B</i>	FYAB1: 5'-TCCCCCTCAACTGAGAACTC-3' FYAB2: 5'-AAGGCTGAGCCATACCAGAC-3'	<i>Ban I</i>
<i>FY*B/</i> <i>FY*BES</i>	FYN1:5'-CAAGGCCAGTGACCCCCATA-3' FYN2:5'-CATGGCACCGTTTGGTTCAG-3'	<i>Stil I</i>

* *DO* indica o alelo selvagem (ausência do polimorfismo responsável pela variante *HY*)

Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídeo. Para cada um dos genótipos encontrados são esperados os seguintes padrões: para o *FY*A/FY*A*, três fragmentos (210, 96 e 86 pb), para *FY*A/FY*B*, quatro fragmentos (306, 210, 96 e 86pb), e para *FYB/FYB*, dois fragmentos (306 e 86pb).

4.3.2.2 Genotipagem do alelo *FY*BES* do sistema Duffy por PCR-RFLP

A genotipagem do alelo *FY*B^{ES}* do sistema Duffy foi realizada utilizando a técnica descrita por Rios e colaboradores em 2000.

Nesse ensaio foram utilizados 100ng de DNA genômico em uma reação de 20µl contendo 2µl de Tampão (1x), 1,5mM de MgCl₂, 2pmol de cada um dos iniciadores, 200µM de dNTPs e 0,8U da enzima Taq Platinum (Invitrogen, USA). A PCR foi realizada usando o termociclador modelo Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems), nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma fase de extensão final de

72°C por 10 min.

Para a fase de restrição foram usados 2,5µL de Buffer B3, 10U da Enzima *StyI* (Jena Bioscience) e 5µL do produto de PCR, totalizando um volume de 20µL. Esta mistura foi incubada por 20 minutos a 37°C para restrição, e mais 20 minutos 65°C para a inativação da enzima de restrição.

Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, e os padrões de banda visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídeo. Para cada um dos genótipos são esperados os seguintes padrões: para *FYB^{ES}/FYB*, dois fragmentos (108 e 81pb), para *FYB/FYB^{ES}*, quatro fragmentos (108, 81, 61 e 20pb) e para *FYB^{ES}/FYB^{ES}* três fragmento (108, 61 e 20pb).

4.3.2.3 Genotipagem dos alelos *DI*A* e *DI*B* do Sistema Diego por PCR-RFLP

A genotipagem dos alelos *DI*A* e *DI*B* do sistema Diego foi realizada utilizando a técnica descrita por Baleotti em 2002.

Nesse ensaio foram utilizados 100ng de DNA genômico em uma reação com volume final de 20µl contendo 2µl de Tampão B1 (1x), 1,6mM de MgCl₂, 2pmol de cada um dos iniciadores, 200µM de dNTPs e 0,8U de Taq DNA Polimerase-Platinun (Invitrogen, USA). A PCR foi feita em termociclador modelo Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems), nas seguintes condições de temperatura: fase inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma fase de extensão final de 72°C por 10 minutos, com produto final de 149pb.

Para a fase de restrição foram usados 2,5µL do CutSmart Buffer, 10U da Enzima *MSP I* (Jena Bioscience) e 8µL do produto de PCR, totalizando um volume de 25µL. Esta mistura foi incubada por 5 horas, a 37°C para restrição, e por 20 minutos a 65°C, para inativação da enzima.

Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídeo. Para cada um dos genótipos encontrados é possível visualizar os seguintes padrões: para *DI*A/DI*A* um fragmento (149pb), para *DI*A/DI*B* três fragmentos (149, 79 e 70pb) e *DI*B/DI*B* dois fragmentos (79 e 70pb).

4.3.2.4 Genotipagem do alelo *HY* do sistema Dombrock por PCR-RFLP

A genotipagem do alelo *HY* do sistema Dombrock foi realizada utilizando a técnica descrita por Piassi e colaboradores em 2010.

Nesse ensaio foram utilizados 100ng de DNA genômico em uma reação de 20µl contendo 2µl de Tampão (1x), 3,5mM de MgCl₂, 2pMol de cada um dos iniciadores, 200µM de dNTPs e 0,8 U de Taq DNA Polimerase-Platinun (Invitrogen, USA). A PCR foi feita em termociclador modelo Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems), nas seguintes condições: fase inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 20 segundos, 58°C por 20 segundos e 72°C por 10 segundos, com uma fase de extensão final de 72°C por 10 min.

Para a fase de restrição foram usados 2µL de Buffer Tango (1x), 10U da Enzima de restrição *BseDI* (Thermo Scientific) e 10µL do produto de PCR, totalizando um volume de 20µL. Essa mistura foi incubada por 3 horas a 55°C para restrição, e mais 20 minutos a 80°C para inativação da enzima.

Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídeo.

Na presença do alelo *HY* (SNP323T), a enzima *BseDI* reconhece apenas um sítio de clivagem, gerando dois fragmentos de 212 e 8pb. Quando o alelo *HY* está ausente, a enzima reconhece dois sítios de restrição, gerando três produtos de 120, 92 e 8pb.

4.3.3 Genotipagem por PCR em Tempo Real

Novas reações para a genotipagem dos alelos *FY*A*, *FY*B* e *FY*BES* do sistema Duffy, *DI*A* e *DI*B* do sistema Diego e *HY* do sistema Dombrock foram padronizadas utilizando a técnica de PCR em tempo real empregando sondas de hidrólise (sistema Taqman). Os primers e as sondas foram desenhados utilizando o software Primer Express (tabela 2).

4.3.3.1 Genotipagem *FY*B* e *FY*A* por PCR em Tempo Real

Para a determinação da presença dos alelos *FY*A* e *FY*B* (rs12075) foi padronizada uma reação contendo Taqman Genotyping Master Mix Kit (1x) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 600nM dos primers FY1 e FY2, 200nM das sondas FYA P 5'-FAM e FYB P 5'-VIC, acrescida de 100ng de DNA genômico, totalizando um volume final de 20µl. A PCR

em tempo real foi realizada no equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 60°C por 1 minuto, 95°C 10 minutos seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 90 segundos e 60°C por 30 segundos.

Tabela 2. Sequências de primers e sondas desenhados para a genotipagem dos alelos dos sistemas Diego, Dombrock e Duffy

Sistema	Alelos	Sequências de primers e sondas
Diego	<i>DI*A/DI*B</i>	DIAB-F: 5'-AAGACCTGGCGCATGCA-3' DIAB-R: 5'-GCGGCACAGTGAGGATGAG-3' DI-PA: 5'-FAM-AAGTCCACGCTGGC-3' DI-PB: 5'-VIC-TGAAGTCCACGCCGG-3'
Dombrock	<i>HY</i>	DOHY-F: 5'- AAAAGACATAGAAGCCCAGAAGAATT-3' DOHY-R: 5'-CAGCGTGTGTGGTAGTCATGTTC-3' DOHY-P1: 5'-FAM-TGGCTTAACCAAGTAA-3' DOHY-P2: 5'-VIC-TTAACCAAGGAAAAGTTCTA-3'
Duffy	<i>FY*A/FY*B</i>	FY1 5'-CTGAGAACTCAAGTCAGCTG-3' FY2 5'-AGGATGAAGAAGGGCAGTGC-3' FYA-P 5'-VIC-CAGATGGAGACTATGGTG-3' FYB-P 5'-FAM-ATGGAGACTATGATGCCA-3'
	<i>FY*BES</i>	GATA-1 5'-CGTGGGGTAAGGCTTCCTGA-3' GATA-2 5'-CTGTGCAGACAGTTCCCCAT-3' GATA-W 5'-VIC-TTGGCTCTTATCTTGGA-3' GATA-M 5'-FAM-TTGGCTCTTACCTTGG-3'

4.3.3.2 Genotipagem *FY*BES* por PCR em Tempo Real

Para a determinação da presença do alelo *FY*BES* (rs2814778) foi padronizada uma reação contendo Taqman Genotyping Master Mix Kit (1x) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 600nM dos primers GATA-1 e GATA-2, 200nM das sondas GATA-W 5'-FAM e GATA-W 5'-VIC, acrescida de 100ng de DNA genômico, totalizando um volume final de 20µl. A PCR em Tempo Real foi realizada no equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 60°C por 1 min, 95°C por 10 minutos seguida por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 90 segundos e 60°C por 30 segundos.

4.3.3.3 Genotipagem *DI*A* e *DI*B* por PCR em Tempo Real

Para a genotipagem dos alelos *DI*A* e *DI*B* (rs2285644) foi padronizada uma reação contendo Taqman Genotyping Master Mix Kit (1x) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 200nM dos primers DIAB-RT-F e DIAB-RT-R, 200nM da sonda DI-PA2-FAM e 100nM da sonda DI-PB-VIC, acrescida de 100ng de DNA genômico, totalizando um volume final de 20µl. A PCR em Tempo Real foi realizada no equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA), nas seguintes condições de temperatura: fase inicial a 60°C por 1 minuto, 95°C 10 minutos seguida por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 64°C por 60 segundos e 60°C por 60 segundos.

4.3.3.4 Genotipagem do alelo *HY* por PCR em Tempo Real

Para a genotipagem do alelo *HY* foi padronizada uma reação contendo Taqman Genotyping Master Mix Kit (1x) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 200nM dos primers DOHY-RT-F e DOHY-RT-R, 400nM da sonda DOHY-P1-FAM e 100nM da sonda DOHY-P2-VIC, acrescida de 100ng de DNA genômico, totalizando um volume final de 20µl. A PCR em Tempo Real foi realizada no equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA), nas seguintes condições: fase inicial a 60°C por 1 minuto, 95°C por 10 minutos, seguida por 50 ciclos a 95°C por 15 segundos, 62°C por 60 segundos e 60°C por 60 segundos.

Na PCR em tempo real, o equipamento calcula dois valores: O “*threshold*” e o Ct (“*Cycle threshold*”). O *threshold* corresponde ao nível de detecção onde a reação atinge uma intensidade de fluorescência acima da fluorescência de fundo. O ciclo da PCR no qual a amostra atinge esse nível é denominado de Ct (*Cycle Threshold*).

Ao final de cada uma das reações foi observada a discriminação dos alelos utilizando o programa computacional 7300/7500/7500 Fast system SDS software (Applied Biosystems), funcionalidade *Allelic Discrimination Plot*, e os valores dos Cts para cada amostra foram devidamente registrados.

4.3.4 Avaliação das técnicas padronizadas

Para avaliação das novas técnicas de genotipagem por PCR em tempo real padronizadas no presente estudo foram realizados os testes de concordância, precisão e sensibilidade analítica utilizando o software Microsoft Excel 2010.

A concordância foi avaliada comparando-se os resultados de genotipagem gerados pelas técnicas de PCR-RFLP (reações já descritas na literatura), os fenótipos (quando disponíveis) e o resultado da PCR em tempo real (nova técnica) Ao todo foram comparados os resultados de 24 amostras para a genotipagem *FY*A e FY*B* (8 *FY*A/FY*B*, 8 *FY*A/FY*A e 8 FY*B/FY*B*); 24 amostras para a genotipagem *FY*BES* (8 *FY*B/FY*B*, 8 *FY*B/FY*BES e 8 FY*BES/FY*BES*); 57 amostras para a genotipagem *DI*A/DI*B* (30 amostras *DI*B/DI*B*, 26 *DI*A/DI*B e 1 DI*A/DI*A*); e 51 amostras para a genotipagem *HY* (48 amostras *DO/DO*, 2 *DO/HY e 1 HY/HY*) (“*DO*” foi usado no presente estudo para indicar o alelo selvagem, ou seja, a ausência do polimorfismo responsável pela variante *HY*).

A precisão dos testes padronizados foi avaliada por meio dos parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade. Para isto, foram calculados os coeficientes de variação (CV) para os *Cycle threshold* (Cts) de amostras genotipadas em triplicata para avaliação da variação intra e inter-ensaio, respectivamente. Para a genotipagem *FY*A/FY*B* foram avaliadas oito amostras *FY*AFY*B*, oito *FY*AFY*A e oito FY*BFY*B*, para a genotipagem *FY*BES* foram avaliadas oito amostras *FY*BES/FY*BES*, oito amostras *FY*B/FY*B e oito amostras FY*B/FY*BES*, para a genotipagem *DI*A e DI*B*, foram avaliadas sete amostras *DI*A/DI*B e sete amostras DI*B/DI*B e para a genotipagem HY* foram avaliadas 3 amostras *DO/HY*, 5 amostras *DO/DO e 1 amostra HY/HY*.

A sensibilidade analítica dos testes foi verificada por meio da avaliação do limite mínimo de detecção para os testes padronizados. Para isto foram feitas diluições em série (1:10) do DNA genômico purificado de uma amostra heterozigota *DI*A/DI*B* e uma amostra heterozigota para alelo *HY*. As concentrações de DNA avaliadas foram de 100ng a 1pg de DNA. Esses testes foram realizados em duplicata.

5. RESULTADOS

A genotipagem dos alelos relacionados aos antígenos de grupos sanguíneos FY^*A , FY^*B e FY^*BES do sistema Duffy, DI^*A e DI^*B do sistema Diego e HY do sistema Dombrock utilizando a técnica de PCR em tempo real, foi padronizada por meio da avaliação de amostras clínicas de doadores de sangue com fenótipos e/ou genótipos previamente conhecidos.

As condições de amplificação (concentração de *primers* e sondas, tempo e temperaturas de ciclagem) foram otimizadas de modo a permitir a discriminação dos alelos estudados e produzir reações reprodutíveis. Ao final da padronização, a distinção dos alelos de cada variante estudada pôde ser verificada, tanto por meio da visualização das curvas de amplificação (determinação de resultados de genotipagem manualmente pelo operador) e observação dos valores de Ct, quanto por meio da análise automatizada de genótipos realizada pela função *Allelic Discrimination Plot* do programa computacional *7300/7500/7500 Fast system SDS* (Applied Biosystems).

5.1 Padronização da genotipagem dos alelos DI^*A e DI^*B do sistema Diego por PCR em Tempo Real

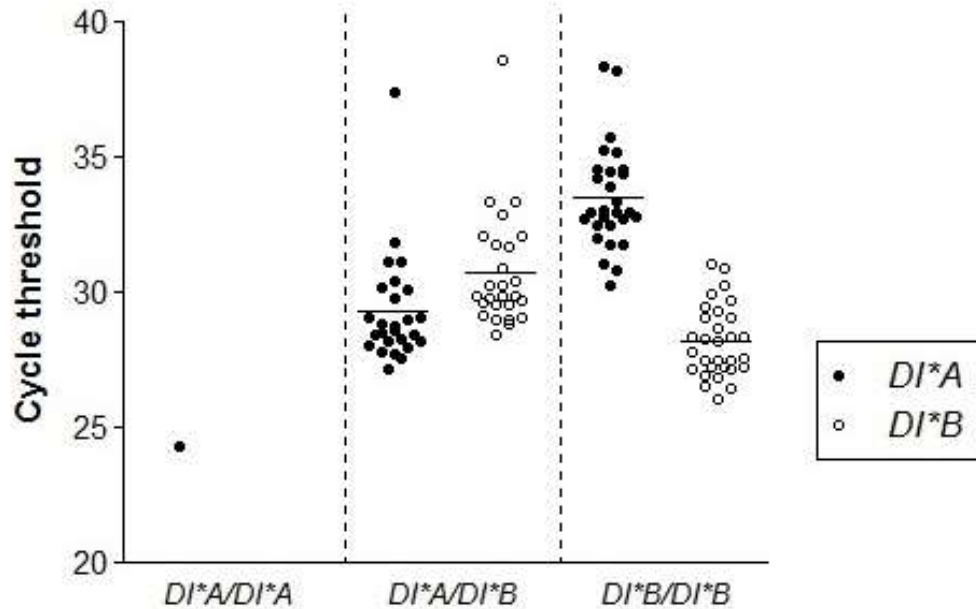
Os resultados da padronização da genotipagem dos alelos DI^*A e DI^*B do sistema Diego indicam a ocorrência de completa concordância entre os resultados obtidos com a PCR-RFLP (técnica já descrita na literatura) e com a nova técnica (PCR em Tempo Real), ao avaliar 57 amostras, sendo 30 homozigotas DI^*B/DI^*B , 26 heterozigotas DI^*A/DI^*B e 1 homozigota DI^*A/DI^*A .

Entretanto, ao comparar os resultados de genotipagem com os resultados de fenotipagem foi observado que uma das amostras fenotipadas como Di(a+), cedidas pela CIH da Fundação Hemominas, apresentou resultado discordante, ou seja, a amostra apresentou resultado de genotipagem DI^*B/DI^*B , enquanto o esperado, considerando o fenótipo informado, seria DI^*A/DI^*B ou DI^*A/DI^*A . Após repetição dos testes de fenotipagem e de genotipagem foi possível concluir que se tratava de erro de fenotipagem.

Os Cts médios observados para o alelo DI^*B foram de 30,74 para as amostras com genótipo DI^*A/DI^*B e 28,20 para as amostras com o genótipo DI^*B/DI^*B (Figura 2) e os Cts médios observados para o alelo DI^*A foram de 29,30 para as amostras com genótipo DI^*A/DI^*B e 33,49 para as amostras com o genótipo DI^*B/DI^*B (amplificação inespecífica).

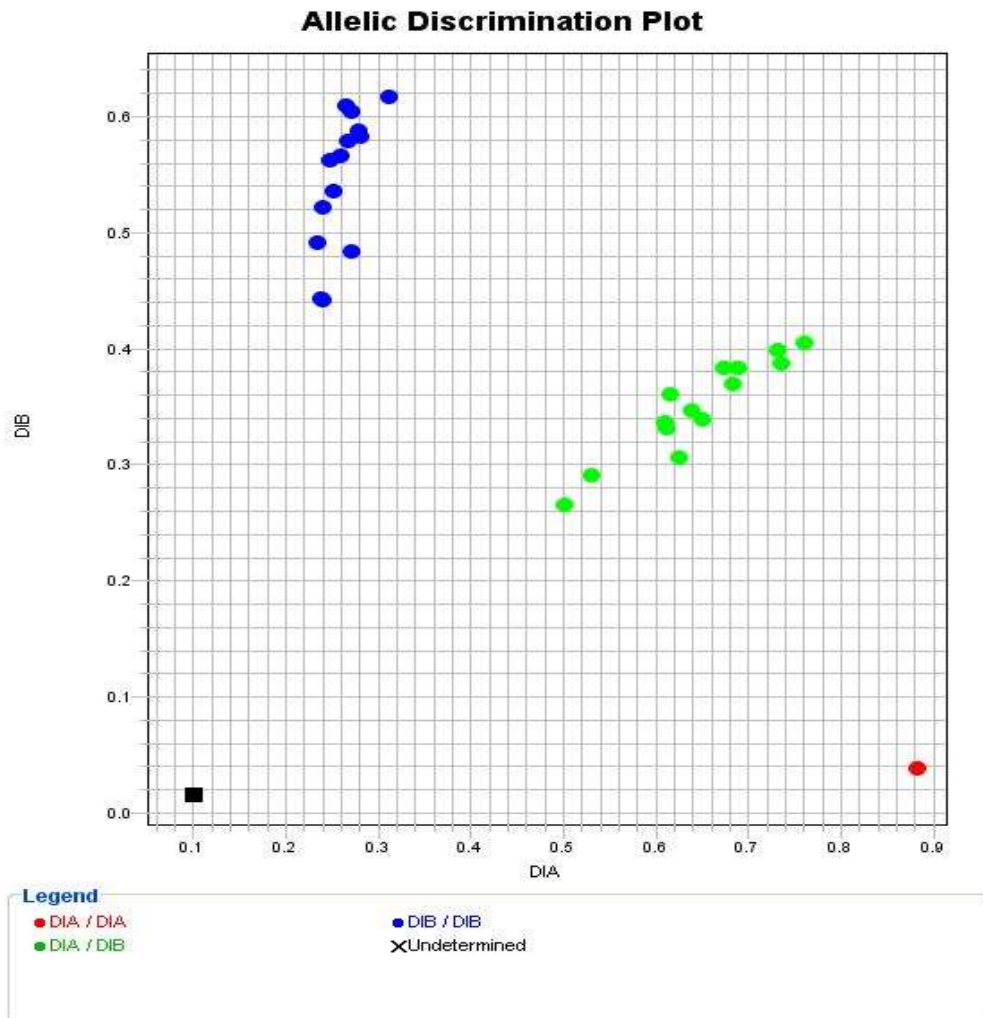
Para a única amostra rara homocigota para o alelo DI^*A genotipada, o Ct foi igual a 24,36.

Figura 2- Cycle thresholds (Cts) da PCR em tempo real para genotipagem dos alelos DI^*A/DI^*B do sistema Diego



A amplificação inespecífica para o alelo DI^*A ocorreu em amostras DI^*B/DI^*B . Contudo, essa situação é facilmente identificada pela análise dos valores de Ct, uma vez que na amplificação específica, o Ct do alelo DI^*A para cada amostra é sempre menor que o Ct do alelo DI^*B , o que possibilita a interpretação dos resultados. Além disso, foi possível verificar que a discriminação alélica pode ser gerada automaticamente pela funcionalidade *Allelic Discrimination Plot* (Figura 3).

Figura 3- Resultados da genotipagem por PCR em Tempo Real para os alelos DI^*A e DI^*B do sistema Diego – Discriminação alélica



Com o objetivo de avaliar o limite mínimo de detecção dos alelos DI^*A e DI^*B , pela técnica de PCR em Tempo Real, foi realizada uma diluição em série (1:10) do DNA genômico extraído de uma amostra heterozigota. A tabela 3 mostra o resultado obtido na PCR em Tempo Real realizada em duplicata para essas diluições. O limite mínimo de detecção dos alelos DI^*A e DI^*B foi de 1ng.

A reprodutibilidade e a repetibilidade do teste foram avaliadas por meio do cálculo do coeficiente de variação para os Cts de amostras em triplicata. Os coeficientes de variação dos Cts nos testes inter-ensaio apresentaram resultados médios de 1,68% para o alelo DI^*A e 1,65% para o alelo DI^*B . A média dos coeficientes de variação dos Cts para testes intra-ensaio, foram de 2,96% para o alelo DI^*A e de 2,94% para o alelo DI^*B .

Tabela 3. Avaliação do limite mínimo de detecção dos alelos *DI*A* e *DI*B* na PCR em Tempo Real.

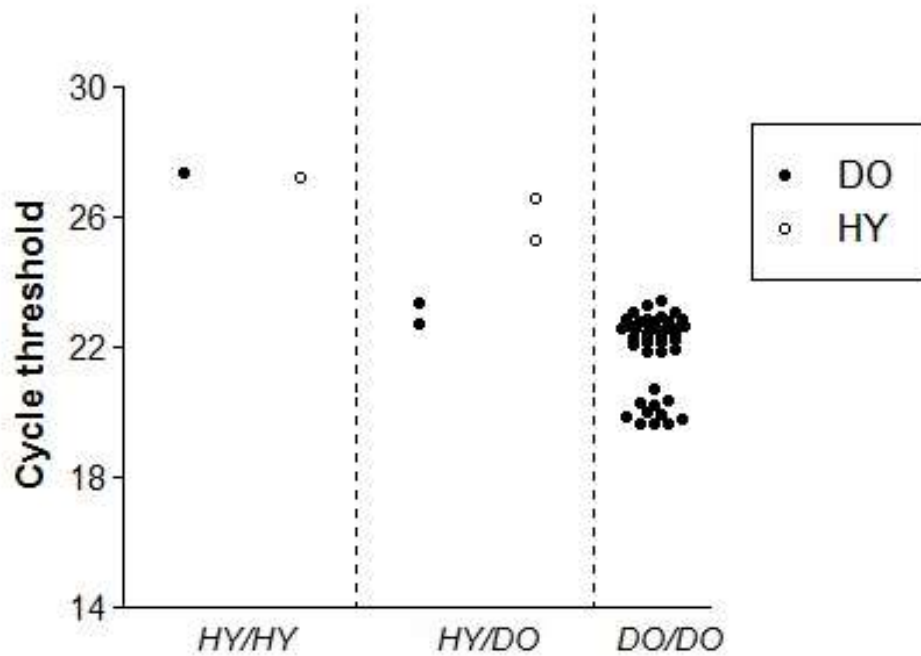
Quantidade de DNA	Cycle threshold	
	Alelo <i>DI*A</i>	Alelo <i>DI*B</i>
100ng	27,14	31,67
100ng	27,09	31,52
10ng	31,05	34,93
10ng	34,98	34,93
1ng	39,71	36,95
1ng	36,31	38,93
100pg	39,82	-
100pg	38,30	-
10pg	-	-
10pg	-	-
1pg	-	-
1pg	-	-

5.2 Padronização da análise do sistema Dombrock por PCR em Tempo Real

Os resultados da padronização da genotipagem do alelo *HY* do sistema Dombrock indicam concordância total entre os resultados obtidos com a PCR-RFLP (técnica já descrita na literatura) e com a nova técnica baseada na PCR em tempo real, ao avaliar 51 amostras sendo: 48 negativas para o alelo *HY*, 2 heterozigotas e uma homozigota.

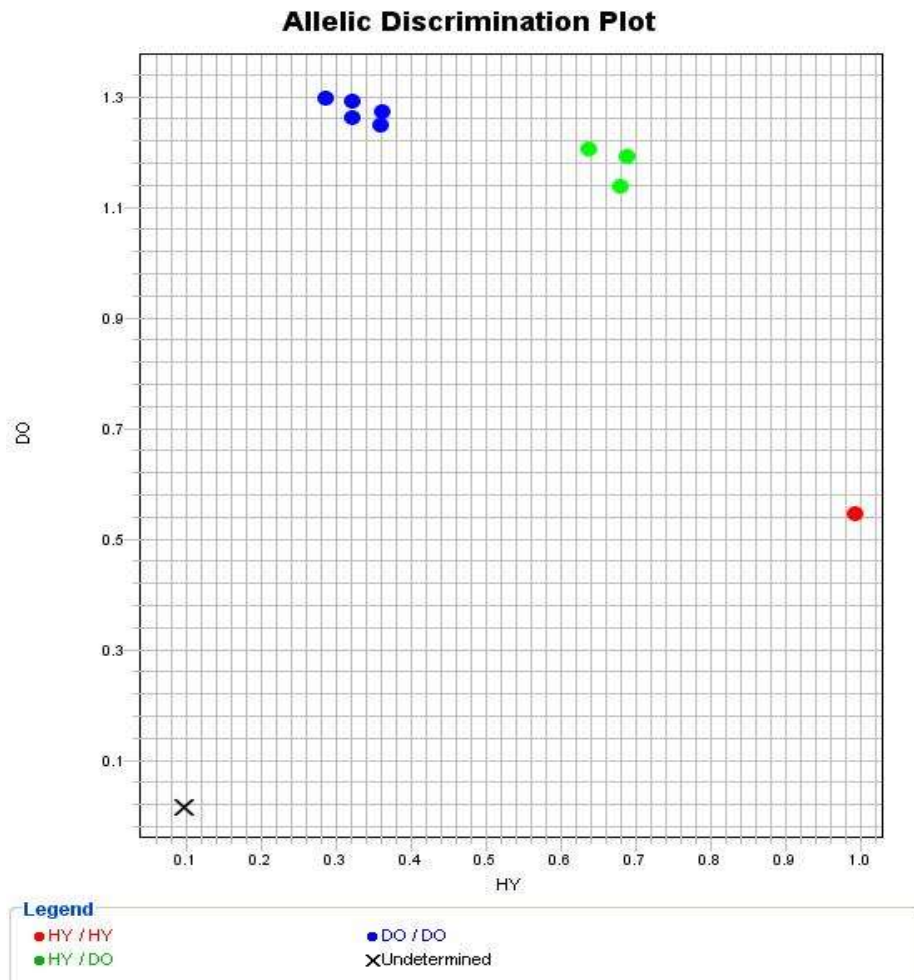
O Ct médio observado para o alelo *HY* foi 25,96 em amostras heterozigotas para esse alelo. Para a amostra homozigota para o alelo *HY* o Ct observado foi igual a 27,35 (Figura 4). Os Cts para a amplificação específica do alelo selvagem (*DO*) apresentaram média de 22,00 para a amostra homozigota e 23,06 para as amostras heterozigotas.

Figura 4- Cycle thresholds (Cts) da PCR em tempo real para genotipagem do alelo *HY* do sistema Dombrock



A ocorrência de amplificação inespecífica para o alelo *DO* foi observada na amostra homocigota para o alelo *HY*, no entanto, essa situação foi facilmente pela análise dos valores de Ct. Na amplificação específica, o Ct do alelo *DO* para cada amostra é sempre menor que o Ct do alelo *HY*, o que possibilita a interpretação dos resultados. Desta forma, os genótipos são facilmente reconhecidos e a discriminação alélica pode ser gerada automaticamente com a funcionalidade *Allelic Discrimination Plot* (Figura 5).

Figura 5- Resultados da genotipagem por PCR em Tempo Real para o alelo *HY* do sistema Dombrock – Discriminação alélica



Visando avaliar o limite mínimo de detecção para o alelo *HY* pela técnica de PCR em Tempo Real desenvolvida, foi realizada uma diluição em série (1:10) do DNA genômico, extraído de uma amostra heterozigota. A tabela 4 mostra o resultado obtido em reações realizadas em duplicata. O limite mínimo de detecção definido para o alelo *HY* foi de 100pg.

A reprodutibilidade e a repetibilidade do teste de genotipagem *HY* foram avaliadas por meio do cálculo do coeficiente de variação para os Cts de amostras em triplicata. Os coeficientes de variação para os Cts nos testes inter-ensaio, apresentaram resultados médios de 2,57% para o alelo *HY* e 1,33% para o alelo selvagem (*DO*). Os coeficiente de variação para os Cts nos testes intra-ensaio apresentaram valores médios de 2,24% para o alelo *HY* e de 1,28% para o alelo selvagem (*DO*).

Tabela 4. Avaliação do limite mínimo de detecção dos alelos *HY* e *DO* na PCR em Tempo Real.

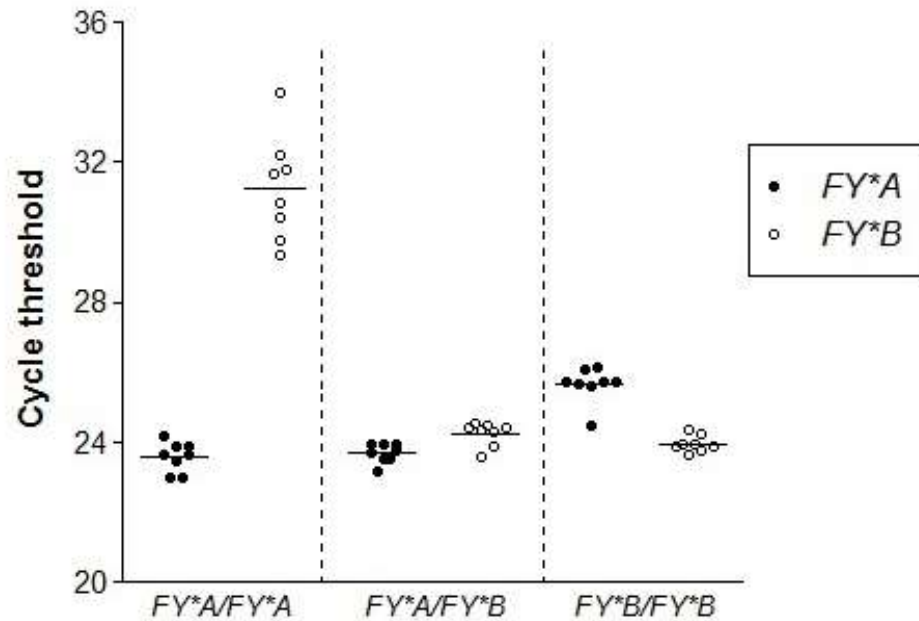
Quantidade de DNA	Cycle threshold	
	Alelo <i>HY</i>	Alelo <i>DO</i>
100ng	25,783	23,396
100ng	25,782	23,471
10ng	29,237	26,474
10ng	28,528	26,545
1ng	31,453	29,492
1ng	31,298	29,571
100pg	34,711	32,745
100pg	33,917	32,766
10pg	37,58	36,285
10pg	-	36,054
1pg	-	-
1pg	-	-

5.3 Padronização da análise do sistema Duffy por PCR em Tempo Real

Os resultados dos testes realizados durante a padronização da PCR em tempo real para a genotipagem dos alelos *FY*A*, *FY*B* e *FY*BES* foram totalmente concordantes com aqueles obtidos por PCR-RFLP, técnica já descrita na literatura. Além disso, foi constatada a ocorrência de 100% de concordância ao comparar os resultados da fenotipagem e da genotipagem (considerando conjuntamente os loci avaliados).

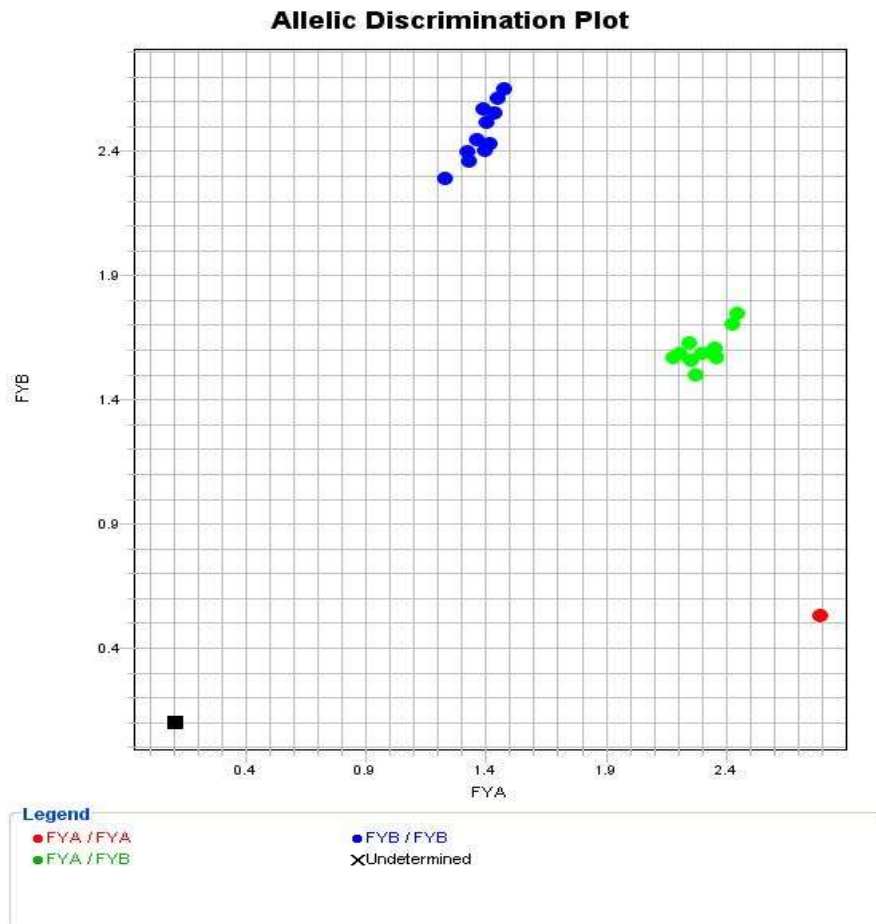
Na genotipagem *FY*A/FY*B*, os Cts médios observados para o alelo *FY*A* foram de 23,71 para as amostras com genótipo *FY*A/FY*B*, 25,65 para as amostras com o genótipo *FY*B/FY*B* (amplificação inespecífica) e 23,60 para as amostras homozigotas *FY*A/FY*A*. Os Cts médios observados para o alelo *FY*B* foram de 24,25 para as amostras com genótipo *FY*A/FY*B*, 23,97, para as amostras com o genótipo *FY*B/FY*B*, e 31,26 para as amostras com o genótipo *FY*A/FY*A* (amplificação inespecífica) (Figura 6).

Figura 6- Cycle thresholds (Cts) da PCR em tempo real para genotipagem dos alelos *FY*A* e *FY*B* do sistema Duffy



A ocorrência de amplificação inespecífica para o alelo *FY*A* foi observada em amostras *FY*B/FY*B*, assim como a amplificação inespecífica do alelo *FY*B* em amostras *FY*A/FY*A*. Essa situação pode ser identificada pela análise dos valores de Ct, que são mais elevados amplificação inespecífica, quando comparados à amplificação específica, o que viabiliza a determinação dos genótipos. Desta forma, o operador pode determinar os genótipos baseando-se nos padrões das curvas geradas, pois nos casos de amplificação específica do alelo *FY*A* (amostras *FY*A/FY*A* ou *FY*A/FY*B*) o Ct deste alelo é sempre menor do que o Ct do alelo *FY*B*, enquanto nos casos de amplificação específica do alelo *FY*B*, o Ct desse alelo é sempre menor do que o Ct de *FY*A* para amostras homocigotas (*FY*B/FY*B*) e praticamente igual ao valor de Ct de *FY*A* para amostras heterocigotas (*FY*A/FY*B*). Além disso, a discriminação alélica é gerada com sucesso pelo software *Allelic Discrimination Plot*, independente das amplificações inespecíficas (Figura 7).

Figura 7- Resultados da genotipagem por PCR em Tempo Real para os alelos *FY*A* e *FY*B* do sistema Duffy – Discriminação alélica



Na genotipagem *FY*BES*, os Cts médios observados para o alelo *FY*BES* foram de 25,78 para as amostras com genótipo *FY*B/FY*BES* e 24,95 para as amostras com o genótipo *FY*BES/FY*BES*. Para o alelo selvagem, os Cts médios observados foram de 24,25 para amostras *FY*B/FY*B* e 25,49 para amostras *FY*B/FY*BES* (Figura 8). Amplificações inespecíficas não foram observadas e a discriminação do alelo *FY*BES* também foi realizada com sucesso pela funcionalidade *Allelic Discrimination Plot* (Figura 9).

Figura 8- Cycle thresholds (Cts) da PCR em tempo real para genotipagem do alelo *FY*BES* do sistema Duffy

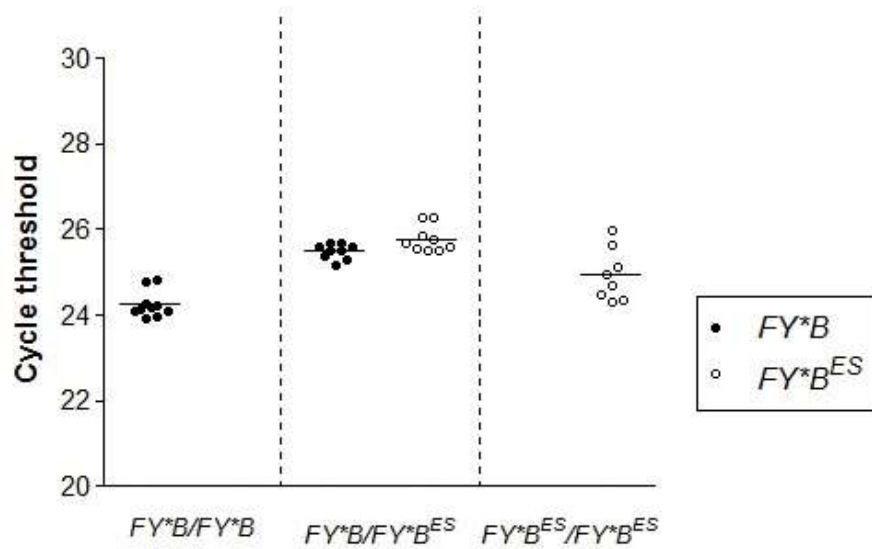
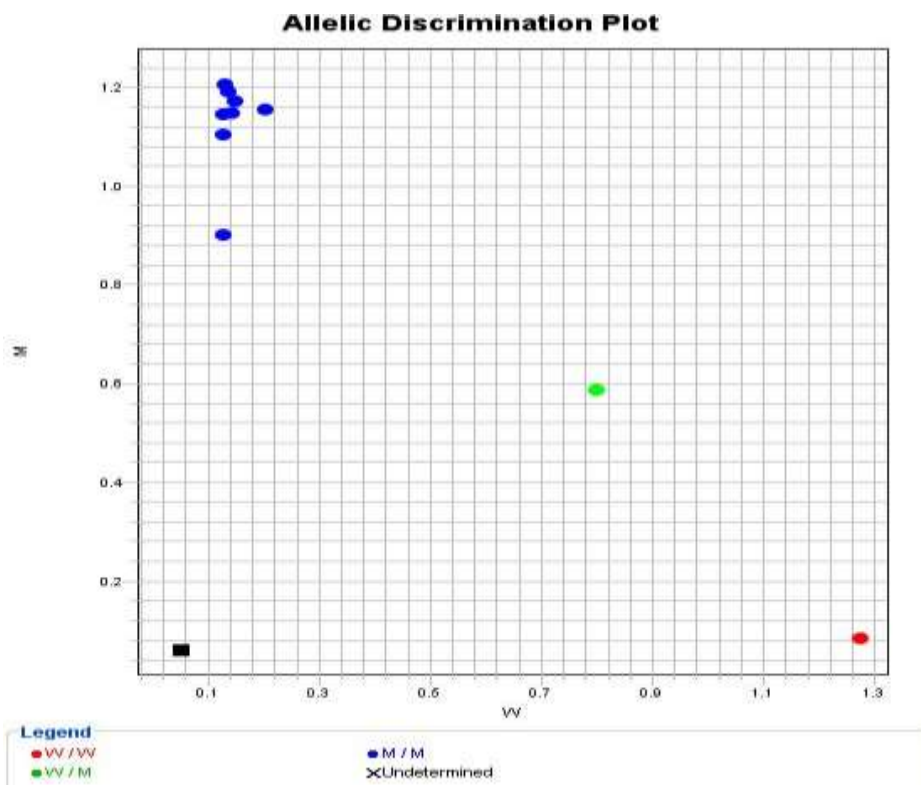


Figura 9- Resultados da genotipagem por PCR em Tempo Real para os alelos *FY*B* e *FY*BES* do sistema Duffy – Discriminação alélica



A reprodutibilidade e a repetibilidade dos testes de genotipagem foram avaliadas por meio do cálculo do coeficiente de variação para os Cts de amostras genotipadas em triplicata. A reprodutibilidade da genotipagem FY^*A/FY^*B , avaliada pelo coeficiente de variação médio para os Cts nos testes inter-ensaio, apresentou valores de 1,47% para o alelo FY^*A e de 5,00% para o alelo FY^*B . A repetibilidade da genotipagem FY^*A/FY^*B , avaliada pelo coeficiente de variação médio dos Cts para testes intra-ensaio foi de 1,79% para o alelo FY^*A e de 5,60% para o alelo FY^*B .

A reprodutibilidade da genotipagem FY^*BES , avaliada pelo coeficiente de variação médio para os Cts nos testes inter-ensaio apresentou valores de 3,07% para o alelo FY^*BES e de 3,56% para o alelo selvagem (FY^*B). A repetibilidade da genotipagem FY^*BES , avaliada pelo coeficiente de variação médio dos Cts para testes intra-ensaio, foi de 0,84% para o alelo FY^*B^{ES} e de 0,69% para o alelo selvagem (FY^*B).

6. DISCUSSÃO

Em diferentes indivíduos, antígenos de grupos sanguíneos podem variar. Essas variações são geneticamente herdadas e, após uma transfusão sanguínea ou gravidez, os antígenos podem ser reconhecidos pelo sistema imune do receptor como substâncias não-próprias, o que poderá levar à produção de anticorpos anti-eritrocitários, em um processo chamado aloimunização. As principais consequências da imunização, através da formação de anticorpos específicos contra antígenos de grupos sanguíneos, são as reações transfusionais e a doença hemolítica perinatal. Desta forma, os laboratórios de imunohematologia dos bancos de sangue buscam a compatibilização de antígenos eritrocitários para aumentar a segurança dos receptores de hemocomponentes.

O presente estudo foi proposto a partir do levantamento das principais demandas para testes de biologia molecular junto à coordenação da CIH da Fundação Hemominas. Nesse levantamento foi identificada a necessidade de padronização de técnicas moleculares, para genotipagem de antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos Diego e Dombrock, assim como a introdução da técnica de PCR em tempo real para a genotipagem do sistema Duffy.

A hemaglutinação é o método de escolha para a determinação dos antígenos de grupos sanguíneos, ou seja, a fenotipagem, em bancos de sangue. Esse método apresenta vantagens como o baixo custo e a facilidade de execução. No entanto, vários fatores podem tornar difíceis as fenotipagens. No caso dos fenótipos considerados raros ou incomuns a fenotipagem na maioria das vezes é considerada difícil, exigindo a utilização de reagentes raros de origem humana, que na maioria das vezes não são comercializados (soros raros). Neste caso, técnicas de biologia molecular são consideradas úteis para a inferência dos antígenos de grupos sanguíneos (PEYRARD et al., 2008).

Além da utilidade na identificação de fenótipos raros, a genotipagem é amplamente empregada nos casos de pacientes com histórico de transfusão recente, onde é possível verificar hemácias do doador na circulação do receptor e também nos casos de pacientes com auto anticorpos (REID et al., 2000). Sendo assim, cada vez mais a utilização da biologia molecular na rotina dos laboratórios de Imunohematologia tem se tornado essencial para garantir a segurança e eficácia transfusional, sobretudo em pacientes politransfundidos.

Várias técnicas de biologia molecular têm sido empregadas na genotipagem de grupos sanguíneos como PCR alelo-específica (SSP-PCR), PCR-RFLP, PCR em tempo real, microarranjos de DNA, espectrometria de massa e sequenciamento. Dentre essas, a PCR em tempo real tem se destacado pela facilidade de execução, potencial de automação, rapidez

para liberação de resultados, além do fato de que todo o processo de amplificação e detecção é realizado em um sistema fechado, minimizando o risco de contaminação. Assim, a PCR em tempo real tem sido cada vez mais utilizada para a inferência de grupos sanguíneos (POLIN et al., 2008).

Sabe-se que o antígeno Di^a apresenta baixa frequência em populações da África e Europa. Entretanto, a frequência desse antígeno é considerada maior entre os asiáticos e nativos americanos (GERSHOWITZ, 1959; POOLE, 1999; WEI et al., 2013). Desta forma, em populações com miscigenação ameríndia, como a brasileira, a determinação dos antígenos Di^a e Di^b pode ser importante para possibilitar a compatibilização de hemocomponentes, auxiliar na identificação de anticorpos irregulares e para a triagem de doadores de sangue com fenótipos raros.

No caso do sistema Diego, atualmente a Fundação Hemominas realiza a fenotipagem do antígeno Di^a em situações específicas, como por exemplo, para análise de pacientes quando há suspeita da presença de aloanticorpos com especificidade anti- Di^a ou busca de doadores compatíveis. Esta fenotipagem é feita usando reagente não comercial de origem humana (plasma humano contendo anticorpo anti- Di^a) uma vez que os anticorpos comerciais são de difícil aquisição. No entanto, a utilização de anticorpos não comerciais de origem humana pode apresentar problemas devido à fraca reatividade ou à caracterização insuficiente (WESTHOFF, 2006).

A padronização da técnica de PCR em tempo real para genotipagem dos antígenos Di^a e Di^b , feita nesse estudo, mostrou resultados satisfatórios, com 100% de concordância comparando-se à técnica de genotipagem por PCR-RFLP. Entretanto, ao comparar os resultados das fenotipagens Di^a , com os resultados da genotipagem, constatou-se que uma das amostras consideradas com o fenótipo $Di(a+)$, era na verdade $Di(a-)$. Uma análise mais detalhada do caso foi realizada pela CIH sendo que a discrepância observada foi atribuída falha pré-analítica relacionada incompatibilidade ABO entre as hemácias testadas e o soro humano contendo anti- Di^a utilizado na fenotipagem que havia sido previamente realizada. A fenotipagem foi repetida, tendo sido confirmado o fenótipo $Di(a-)$.

A possibilidade de ocorrência de problemas na determinação de antígenos eritrocitários raros advindos do uso de soros não comerciais de origem humana em laboratórios de imunohematologia é enfrentada por hemocentros no Brasil e no mundo. Exemplos desse tipo de situação já foram relatados para a fenotipagem do antígeno U do sistema MNS, na qual a fraca reatividade dos anticorpos levou a resultados falso-negativos para amostras portadoras do fenótipo $U+var$ (REID et al., 1997; OMOTO et al., 2008; FARIA

et al., 2012); e dos antígenos Hy e Jo^a do sistema Dombrock, na qual o uso de hemácias e soros insuficientemente caracterizados resultaram em confusão entre as especificidades (LOMAS-FRANCIS; REID, 2010). Ainda assim, o uso de soros raros não comerciais persiste, constituindo a única opção para a fenotipagem de antígenos eritrocitários em diversas situações (LOPEZ et al., 2015; GOURRI et al., 2017; MICHALEWSKA et al., 2018).

Este resultado expõe a importância de implementar técnicas de biologia molecular em laboratórios de imunohematologia para aplicação no estudo dos casos inconclusivos e dos fenótipos considerados raros (POLIN et al., 2008; MARTINS et al., 2009; LOMAS-FRANCIS; REID, 2010; HUSTINX, 2014).

No caso do sistema Dombrock, estudos conduzidos com populações de doadores de sangue de Minas Gerais apontaram que há uma prevalência diferenciada do alelo *HY*, associado ao fenótipo Hy- em Minas Gerais (2,4%) quando comparado a outras populações, nas quais a frequência desse antígeno não chega a 1% (BALLEOTTI et al., 2007; PIASSI et al., 2013; SCHMIDT et al., 1967; HASHMI et al., 2005). Assim, a implementação da genotipagem dessa variante em nossa população constitui uma oportunidade única para a detecção de doadores de sangue portadores do fenótipo raro Hy-.

A detecção do antígeno Hy, assim como dos demais antígenos do sistema Dombrock, não é realizada atualmente na Fundação Hemominas. Embora reações transfusionais envolvendo esse antígeno sejam raras, sua ocorrência já foi descrita na literatura (LOMAS-FRANCIS; REID et al., 2010). Além disso, acredita-se que a frequência de reações envolvendo antígenos do sistema Dombrock seja subestimada devido às dificuldades técnicas relacionadas à identificação de antígenos e anticorpos desse sistema (REID et al., 2005).

O presente estudo possibilitou a padronização de uma nova técnica molecular para verificação do alelo *HY* visando a identificação de doadores raros na Fundação Hemominas. A técnica padronizada apresentou resultados satisfatórios tendo sido observado 100% de concordância dos resultados com a técnica PCR-RFLP. Um desfecho surpreendente do presente estudo foi à identificação de um doador apresentando o genótipo raro *HY/HY*, ou seja, um doador que não apresenta na superfície das hemácias o antígeno de alta frequência Hy. Desta forma, este estudo possibilitou que a Fundação Hemominas fornecesse a primeira bolsa de hemocomponentes Hy- no Brasil (anexo 4). Este fato reforça a utilidade prática da implantação de técnicas complementares, baseadas em biologia molecular na área da hemoterapia.

A determinação dos antígenos Fy^a e Fy^b faz parte da rotina laboratorial da CIH da Fundação Hemominas e, para isso, estão disponíveis anticorpos comerciais anti-Fy^a e anti-

Fy^b, usados na fenotipagem. Apesar de boa especificidade e sensibilidade, a técnica de fenotipagem apresenta limitações, sobretudo em casos de transfusões recentes, que podem ser superadas pelas técnicas de genotipagem.

Além disso, a utilização da genotipagem Duffy é importante por permitir a identificação de indivíduos portadores da variante *FY*BES*. Este conhecimento é relevante uma vez que estima-se que 100% dos pacientes com Fy(a-b-) e cerca de 63,85% dos pacientes Fy(a+b-) da Fundação Hemominas podem receber transfusões de sangue positivas para o antígeno Fy^b sem risco de aloimunização, porque são portadores da variante (*FY*BES*), a qual impede expressão do antígeno Fy^b exclusivamente nos eritrócitos. Esta informação é útil para o uso racional de hemocomponentes, uma vez que os doadores de sangue negativos para o antígeno Fy^b representam apenas 34,3% dos doadores de sangue fenotipados de Minas Gerais (MARTINS et al., 2017).

Atualmente, encontra-se disponível na rotina da CIH da Fundação Hemominas o teste de genotipagem dos alelos *FY*A*, *FY*B* e *FY*BES*, usando a técnica de PCR-RFLP. No presente estudo foi desenvolvido um novo teste de genotipagem de alelos do sistema Duffy, baseado na PCR em tempo real. Os resultados obtidos indicam a ocorrência de 100% de concordância entre os resultados da genotipagem por PCR-RFLP e PCR em tempo real e, também, com os resultados da fenotipagem (considerando a análise simultânea dos dois loci). A introdução da genotipagem Duffy por PCR em tempo real possibilitará maior rapidez na liberação dos resultados.

Métodos para a genotipagem de alelos raros de grupos sanguíneos já foram descritos na literatura, existindo inclusive plataformas comerciais de *high throughput* como o kit comercial Lifecodes RBC/RBC-R (Immucor) (DENOMME; SCHANEN, 2015; MCBEAN et al., 2014). Entretanto, a implantação desses métodos nem sempre é viável, pois os equipamentos e insumos para a aplicação dessas estratégias têm custo muito elevado e existe a necessidade de espaço físico adequado e mão de obra qualificada.

Em relação aos alelos dos sistemas Diego, Dombrock e Duffy embora já existam diferentes técnicas de genotipagem descritas, inclusive utilizando o sistema de PCR em tempo real (ARAÚJO et al., 2003; NOVARETTI et al., 2010; ZHOU et al., 2015), nem sempre as técnicas são claramente descritas para permitir sua reprodução e, em geral, os detalhes sobre a validação não são fornecidos. Além disso, embora a técnica Taqman seja amplamente utilizada em diversos laboratórios, existindo inclusive a possibilidade da aquisição de ensaios pré-desenhados (customizados), as empresas não revelam a sequência de *primers* e sondas. Considerando que as etapas de validação são de grande importância para ensaios de PCR em

tempo real, tanto comerciais quanto *in house*, (RAYMAEKERS et al., 2009), optou-se por desenhar novos *primers* e sondas e validar as reações, visando o uso para a genotipagem de doadores e receptores de hemocomponentes.

Os resultados dos testes de avaliação das técnicas de PCR em tempo real padronizadas no presente estudo indicaram que o limite mínimo de detecção é de 1ng de DNA genômico para os alelos *DI*A* e *DI*B* do sistema Diego e 100pg para os alelos *HY* e *DO* do sistema Dombrock (Tabelas 3 e 4). Assim, pode-se concluir que os testes padronizados apresentam limites de detecção satisfatórios, tendo em vista que esses valores são pelo menos 100 vezes menores do que aqueles usualmente utilizados em reações de PCR na Fundação Hemominas (100ng). Esses resultados indicam que as técnicas de PCR em tempo real padronizadas são capazes de fazer a determinação dos alelos em concentrações de DNA usualmente empregadas em laboratórios de biologia molecular.

Os testes de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) para as técnicas padronizadas também apresentaram resultados satisfatórios, considerando que se trata de técnicas qualitativas. Esses testes basearam-se nos coeficientes de variação para os Cts em testes intra e inter-ensaio.

O coeficiente de variação é uma medida de dispersão empregada para estimar a precisão de experimentos e representa o desvio-padrão expresso como porcentagem da média. Desta forma, quanto menor é o coeficiente de variação, mais preciso é o teste. O coeficiente de variação dos valores de Ct é uma medida amplamente empregada na avaliação de desempenho de técnicas baseadas na PCR em tempo real quantitativos. Em estudos qualitativos, como os usados na genotipagem de SNPs ou detecção de patógenos, esse cálculo não é mandatório, não havendo, portanto, parâmetros de aceitação pré-definidos (BROEDERS et al., 2014). Entretanto, o coeficiente de variação pode ser útil na avaliação de precisão dos testes qualitativos, sobretudo quando a variação nos valores de Ct pode interferir na interpretação dos resultados e, conseqüentemente, na determinação dos genótipos.

Embora não exista um consenso na literatura em relação ao parâmetro de aceitação para coeficientes de variação em testes qualitativos de PCR em tempo real, observou-se que valores similares aos encontrados no presente estudo são descritos na literatura. Para a genotipagem do polimorfismo rs12979860, envolvido na resposta ao tratamento da hepatite C, os coeficientes de variação foram utilizados como parâmetro de controle de qualidade do teste desenvolvidos, tendo sido calculados como de 2,2% a 8,8% em testes inter-ensaios (COOK et al., 2012). Outro estudo que apresenta a padronização de teste de genotipagem desse mesmo polimorfismo traz Cv médio de 4,30% para testes inter-ensaio e 4,69% para

testes intra-ensaio (KOVANDA; POLJAK, 2011). Já para alterações genéticas relacionadas a leucemia, os valores de Cv foram de 0,41% a 0,74% para testes intra-ensaio e entre 1,62% e 2,83% para testes inter-ensaio (ZHENG et al., 2017). Cálculos de Cv como parâmetros de qualidade para testes qualitativos de PCR em tempo real para a detecção de patógenos também foram utilizados em estudos prévios (NIESTERS et al., 2000; PANZARIN et al., 2010).

A utilização dos valores de Ct para tomada de decisão pelo operador quanto à determinação de resultados é uma prática utilizada em testes de PCR em tempo real, sendo aceitável desde que baseada em evidências (CARAGUEL et al., 2011). Além disso, é comum o estabelecimento de algoritmos baseados nos Cts e nos padrões de amplificação para a determinação dos genótipos (COOK et al., 2012, BOGGIONE et al., 2017; ZIZA et al., 2017). No presente estudo, a análise do comportamento das curvas de amplificação foi decisiva para que o operador realizasse a determinação dos genótipos. Além disso, observa-se concordância entre a avaliação pelo operador e a determinação automática dos genótipos feita pelo programa computacional 7300/7500/7500 *Fast system SDS software (Applied Biosystems)* e os resultados obtidos por meio da PCR-RFLP.

Tendo em vista os resultados obtidos, é possível admitir-se que as estratégias de genotipagem padronizadas no presente estudo apresentam características técnicas que favorecem sua incorporação ao conjunto de testes atualmente disponíveis na CIH da Fundação Hemominas, para a triagem de indivíduos portadores de alelos raros. Uma vez detectados esses indivíduos, um segundo teste confirmatório é desejável para a confirmação do genótipo, já que curvas inespecíficas podem ocorrer. Estudos de avaliação de custo-benefício são importantes para se decidir sobre a conveniência da implementação.

Considerando a importância da identificação de variantes dos sistemas Diego e Dombrock, tanto para auxiliar na caracterização de anticorpos irregulares em indivíduos aloimunizados contra antígenos desses sistemas, quanto para identificar doadores de sangue com fenótipos raros, o principal impacto desse estudo será a disponibilização, para uso na Fundação Hemominas, de novas técnicas de genotipagem de alelos desses sistemas. Além disso, a genotipagem do sistema Duffy por PCR em tempo real propiciará maior agilidade na liberação de resultados, contribuindo na otimização do uso de hemocomponentes.

7. CONCLUSÃO

Os resultados de genotipagem dos alelos *FY*A*, *FY*B* e *FY*BES* do Sistema Duffy, *HY* do sistema Dombrock e *DI*A/DI*B* do sistema Diego utilizando técnicas de PCR em tempo real apresentaram concordância total com os resultados obtidos pela técnica de PCR-RFLP.

As reações de genotipagem dos alelos *FY*A*, *FY*B* e *FY*BES* do Sistema Duffy, *HY* do sistema Dombrock e *DI*A/DI*B* do sistema Diego, por PCR em tempo real, apresentam precisão adequada, considerando-se um teste qualitativo.

Os limites de detecção observados indicam que os testes padronizados permitem a determinação dos alelos estudados nas concentrações de DNA habitualmente utilizadas em testes de biologia molecular.

As técnicas de PCR em tempo real padronizadas apresentam potencial para utilização na rotina de bancos de sangue, podendo ser úteis na triagem de indivíduos portadores dos alelos raros avaliados.

REFERÊNCIAS

- AKALIN, E.; NEYLAN, J.F. The influence of Duffy blood group on renal allograft outcome in African American. **Transplantation**, v. 75, n.9, p. 1496-1500, 2003.
- AMERICAN ASSOCIATION BANK OF BLOOD (AABB). Technical Manual. 17a ed. Bethesda MD: AABB, 2011.
- ARAÚJO, F. et al. Genotyping Dombrock alleles in Portuguese blood donors by real-time PCR. **Transfusion**, v.43, n.10, p.1495-1496, 2003.
- BALEOTTI, W. J. 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.**, v. 25, n.2, p.79-82, 2011.
- BALEOTTI, Wilson Junior. **Estudo molecular dos DI*A/DI*B e da Banda-3 Memphis na população brasileira**. 2002. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- BALEOTTI, W. J. et al. Caracterização molecular do sistema de grupo sanguíneo Dombrock em uma população brasileira. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.29, n.2, p. 200. 2007.
- BAUMGARTEN, R. et al. Recurrent acute hemolytic transfusion reactions by antibodies against Do^a antigens, not detected by cross-matching. **Transfusion**, v.46, n.2, p.244-249, 2006.
- BEATTIE, K. M.; CASTILLO S. A case report of a hemolytic transfusion reaction caused by anti-Holley. **Transfusion**, v.15, p.476-480, 1975.
- BOGGIONE, C. T. et al. Genotyping approach for non-invasive foetal RHD detection in an admixed population. **Blood Transfus.**, v.15, n.1, p.66-73, 2017.
- BOOTH, P. B. et al. Selective depression of blood group antigens associated with hereditary ovalocytosis among lanesians. **Vox Sang**, v. 32, n.2, p.99-110, 1977.
- BRASCHLER, T. et al. Management of a Pregnant Woman with Anti-Holley Alloantibody. **Transfus. Med. Hemother.**, v.42, n.2, p.129-130, 2015.
- BROEDERS, S. et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods S. **Trends Food Sci. Technol.**, v.37, p. 115-126, 2014.
- BRUCE, L. J. et al. Banda 3 Memphis Variant II, Altered StilbeneDisulfonate Binding and the Diego (Dia) Blood Group Antigen are Associated With the Human Erythrocyte Banda 3 Mutation Pro854-Leu*. **J. Biol. Chemy.**, v.269, n.23, p.16155-1658, 1994.
- CARAGUEL, C. G. B. et al. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 23, n. 1, p. 2-15, 2011.

CARTRON, J. P.; COLIN, Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. **Transfus. Clin. Biol.**, v.8, p.163-199, 2001.

CAVASINI, C. E. et al. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. **Malar. J.**, v.6, p.167-175, 2007.

CHAPEL-FERNANDES, S. et al. Dombrock genotyping in a native Congolese cohort reveals two novel alleles. **Transfusion**, v.49, n.8. p.1661-1671, 2009.

COOK, L. et al. Allele-Specific PCR for Determination of IL28B genotype. **J. Clin. Microbiol.** v.50, n.12, p. 4144 – 4146, 2012.

COSTA, D. C. et al. Frequencies of polymorphisms of the Rh, Kell, Kidd, Duffy and Diego systems of Santa Catarina, Southern Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 38, n. 3, p. 199-205, 2016.

COSTA, F. P. S. et al. Absence of DOMR, a new antigen in the Dombrock blood group system that weakens expression of Dob, Gya, Hy, Joa, and DOYA antigens. **Transfusion**, v.50, n.9, p.2026-2031, 2010.

COZAC, Ana Paula Costa Nunes da Cunha. **Estudo do polimorfismo do sistema sanguíneo Diego em populações de brancos, negros, asiáticos, índios e doadores de sangue da região de Ribeirão Preto Ribeirão Preto.** 2004.171f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, 2004.

CUTBUSH, M.; MOLLISON, P. L.; PARKIN D. M. A new human blood group. **Nature**. v.165, p. 188-189, 1950.

DANIELS, G.; VAN DER SHOOT, C. E.; OLSSON, M. L. Report of the First International Workshop on molecular blood group genotyping. **Vox Sang.**, v.88, n.2, p.136-142, 2005.

DANIELS, G. et al. The clinical significance of blood group antibodies. **Transfus Med.**, v.12, p.287-295, 2002.

DANIELS, G.. The molecular genetics of blood group polymorphism. **Transpl. Immunol.**, v.14, p. 143 – 153, 2005.

DE LIMA, L. M. A. et al. Characterization of an anti-Dia antibody causing hemolytic disease in a newborn infant. **Transfusion**, v. 22, n. 3, p. 246-247, 1982.

DENOMME, G. A.; SCHANEN, M. J. Mass-scale donor red cell genotyping using real-time array technology. **Immunohematology**, v. 31, n. 2, p. 69-74, 2015.

FARIA, M. A. et al. Molecular analysis of the GYPB gene to infer S, s, and U phenotypes in an admixed population of Minas Gerais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.34, n.2 p.212–216, 2012.

FIGUEROA, D. The Diego blood group system: a review. **Immunohematology**, v.29, n. 2, p.73-8, 2013.

- GERSHOWITZ, H. The Diego Factor among Asiatic Indians, Apaches and West African Negroes; Blood Types of Asiatic Indians and Apaches. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v.17, n.3, p.195–200. 1959.
- GIANGRANDE, P. L.. The history of blood transfusion. **Br. J. Haematol.**, v.110, n.4, p.758-67, 2000.
- GOURRI, E. et al. Genetic background of the rare Yus and Gerbich blood group phenotypes: homologous regions of the GYPC gene contribute to deletion alleles. **Br. J. Haematol.**, v.177, n.4, p.630-640, 2017.
- GUBIN, A. N. et al. Identification of the Dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP ribosyltransferase gene family. **Blood**, v.96, n.7, p.2621-2627, 2000.
- HASHMI, G. et al. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. **Transfusion**, v.45, n.5, p.680-688. 2005.
- HENKE, J. The blood group antigen Do^a (Dombrock) in a German population sample. **Forensic. Sci. Int.**, v.15, p.205-206, 1980.
- HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology**, v.10, p.413-417, 1992.
- HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, 1991.
- HOWES, R. E. et al. The global distribution of the Duffy blood group. **Nature**, v.2, n.266 p.1-9, 2011.
- HUSTINX, H. DGTI Register of Rare Donors. **Transf. Med. Hemother.**, v.41, p.338-341, 2014.
- JENS, E.; PAGLIARINI T.; NOVARETTI, T. M. C. Z. Sistema de grupo sanguíneo Duffy: Biologia e prática Transfusional. **Ver. Bras. Hematol.Hemoter.**, v. 27, n.02, p. 109-110, 2005.
- JUNQUEIRA, P. C. et al. The Diego blood factor in Brazilian Indians. **Nature**, v.177, n.4497, p.41, 1956.
- KLEIN, H.G.; ANSTEE, D.J. **Mollison's blood transfusion in clinical medicine**. 11th ed. Blackwell Publishing, Oxford (UK), 2005.
- KOVANDA, A.; POLJAK, M. Real-time polymerase chain reaction assay based on high-resolution melting analysis for the determination of the rs12979860 polymorphism involved in hepatitis C treatment response. **J. Virol. Methods.**, v.175, n.1, p.125-8, 2011.
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Aspects. Med.**, v.27,

p.95-125, 2006.

LAKEN VAN DER, C. J. et al. The kinetics of radiolabelled interleukin-8 in infection and sterile inflammation. **Nucl. Med. Commun.**, v.19, n.03, p.271-281, 1998.

LANGHI JR, D. M. et al. Presença do alelo FYA null, do sistema de grupo sanguíneo Duffy, em habitantes de região endêmica para malária e dos doares de sangue no Brasil. **Rev. Bras. Hemoter. Hematol.**, v. 26, n.2, p. 268-269, 2004.

LARRICQ; D. et al. Incompatibilitéfœto-maternelle à l'antigène Dombrock1. **Trans. Clin. Biol.**, v.24, n.3, p.343-344, 2017.

LAYRISSE, M.; ARENDS, T.; DOMINGUES, SISICO R. Nuevo grupo sanguíneo encontrado em auloentes de índios. **Acta Med. Venezuelana.** v. 3. p.132-138, 1953.

LEVINE, P. et al. The Diego blood factor in Brazilian Indians. **Nature**, v.177. p. 40-41, 1956.

LEWIS, M. et al. ISBT working party on terminology for read cell surface antigens: munich report. **Vox Sang.** v. 49, n.2, p. 171-175, 1985.

LOMAS-FRANCIS, C.; REID, M. E. The Dombrock blood group system: a review. **Immunoematology.** v. 26, n. 2, p.71-78, 2010.

LOPEZ, G. H. et al. Molecular typing for the Indian blood group associated 252G>C single nucleotide polymorphism in a selected cohort of Australian blood donors. **Blood Transfus.**, v.13, n.1, p.78-85, 2015.

MAK, K. H. et al. The first example of anti-Gya detected in Hong Kong. **Immunoematology**, v.11, p.20–21, 1995.

MALLINSON, G. et al. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: The molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy (a-b-) phenotype. **Br. J. Haematol.** v.90, n. 4, p. 823–829, 1995.

MARTINS, M. L. et al. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, n. 4, p. 252–259, 2009.

MARTINS, Marina Lobato. et al. Duffy blood group system: New genotyping method and distribution in a Brazilian extra-Amazonian population. **Mol. Cell. Probes**, v. 35, p. 20-26, 2017.

MAYER, B. 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**, v.50. n.6, p.1295-1302, 2010.

MCBEAN, R.S; HYLAND, C. A.; FLOWER, R. L. Approaches to Determination of a Full Profile of Blood Group Genotypes: Single Nucleotide Variant Mapping and Massively Parallel Sequencing. **Comput. Struct. Biotechnol. J.**, v.11, n.19, p.147–151, 2014.

- MENY, G. M. The Duffy blood group system: a review. **Immunoematology**, Philadelphia, v. 26, p. 51-56, 2010.
- MICHALEWSKA, B. et al. FUT1 mutations responsible for the H-deficient phenotype in the Polish population, including the first example of an abolished start codon. **Blood. Transfus.**, v.16, n.1, p. 101–104, 2018.
- MILLER, L. H. et al. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy blood group genotype FY. **N. Engl. J. Med.**, v. 295, n. 6, p. 302-304, 1976.
- MOLTHAN, L.; CRAWFORD, M. N.; TIPPETT, P. Enlargement of the dombrock blood group aulo: the finding of ant-do b. **Vox Sangu.**, v.36, p.102-103, 1973.
- MOULDS, J. J. et al. Observations on the Gy^a and Hy antigens and the antibodies that define them. **Transfusion**, v.15. n.3 p. 270-274,1975.
- MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.29, p.168-17, 2007.
- NIESTERS, H. G. M. et al. Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 2, p. 712-715, 2000.
- NOVARETTI, M. C. Z.; DORLHIAC-LLACER, P. E.; CHAMONE, D. A. F. Estudos de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasoides e negroides da cidade de São Paulo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n.1, p. 23-32, 2000.
- NOVARETTI, M. C. et al. Application of real-time PCR and melting curve analysis in rapid Diego blood group genotyping. **Immunoematology**, v.26, n.2, p.66-70, 2010.
- OH, E. J. et al. Severe hemolytic disease of the newborn due to anti-Dib treated with phototherapy and intravenous immunoglobulin. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 38, n. 1, p. 80-82, 2008.
- OMOTO, R.; REID, M. E.; CASTILHO, L. Molecular analyses of GYPB in African Brazilians. **Immunoematology**, v.24, n.4, p.148-153, 2008.
- PACHECO, F. C. Crise e risco na história da transfusão de sangue. **Revista de Medicina Transfusional ABO**, n.16, p. 12-23, dez, 2003.
- PANZARIN, V. et al. Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. **Arch. Virol.**, v.155, p.1193-203, 2010.
- PEYRARD, T. et al. P. Lesphénotypes érythrocytaires rares: unenjeu de santé publique. The rare blood groups: A public health challenge. **Transfus. Clin. Biol.**, Paris. V.15. p.109–119, 2008.
- PIASSI, Fabiana Chagas Camargo. **Análise genotípica do sistema de grupo sanguíneo dombrock em doadores de sangue do estado de minas gerais**. 83 f. Dissertação (Mestrado em patologia) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Minas

Gerais, 2010.

PIASSI, F. et al. Dombrock genotyping in Brazilian blood donors reveals different regional frequencies of the HY allele. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.35, n.6, p. 400-403, 2013.

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

POOLE, J. The Diego blood group system – an update. **Immunohematology**, v.15, n. 4, p. 135-141, 1999.

POOLE, J.; DANIELS, G. Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. **Transfus. Med. Rev.**, v.21, n. 1, p.58-71, 2007.

RAYMAEKERS, M. et al. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.23, n.3, p.145–151, 2009.

REICH, D. et al. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. **PLoS Genet.**, v.5, n.1, 2009.

REID, M. E. Complexities of the Dombrock blood group system revealed. **Transfusion**, v.45, n.2 p. 92-99, 2005.

REID, M. E. et al. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. **Transfusion**, v. 40, n. 1, p 48-53, 2000.

REID, M. E. et al. Practical method for determination of the U status of S–s– erythrocytes. **Immunohematology**, v.13, n.4, p.111-114, 1997.

RIBEIRO, M. L. et al. Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3. **Blood**, v.96, p.1602-4, 2000.

RIOS M. et al. Two new molecular bases for the Dombrock null phenotype. **Br. J. Haematol.**, v.117, n. 3, p.765-767, 2002.

RIOS, M. et al. New genotypes in Fy(a-b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B. **Br. J. Haematol.**, v.108, n.2, p.448-54, 2000.

RODRIGUES, E. S. et al. Rapid blood group genotyping by allelic discriminative real-time PCR in multiply-transfused patients. **Transfus. Med.**, v.25, p.111-114, 2015.

ROSSE, W. F. et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**. v.76, p.1431-1437, 1990.

SANGER, R.; RACE, R. R.; JACK, J. The Duffy blood groups of New York negroes: The phenotype Fy(a–b–). **Br. J. Haematol.**, v. 1, n. 4, p. 370–374, 1955.

SCHMIDT, Luciana Cayres. **Genotipagem rhd fetal no plasma materno como ferramenta não invasiva na predição do risco da doença hemolítica perinatal em gestantes RhD negativo**. 2010. 18f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Minas

Gerais. Minas Gerais, 2010.

SCHMIDT, R. P.; FRANK S.; BAUGH, M: New antibodies to high incidence antigenic determinants (anti-So, anti-E1, antiHy and anti-Dp) (abstract). **Transfusion**, v.7, p.386, 1967.

SHIREY, R. S. et al. Assessment of the clinical significance of anti-Dob. **Transfusion**, v.38, p.1026-1029, 1998.

SIPPERT, E. A. et al. Association of duffy blood group gene polymorphisms with IL8 gene in chronic periodontitis, **PLoS ONE**, v. 8, n.12, p. e83286, 2013.

SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFUSÃO SANGUÍNEA (ISBT). Blood Group Terminology, 2013.

STORRY J. R. et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Berlin report. **Vox Sang.**, v.101, n.1, p. 77–82, 2011.

STORRY J. R. et al. International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetics and terminology: report of the Seoul and London meetings. **ISBT Sci Ser**, v.11, p.118–122, 2016.

STRUPP, A.; CASH, K.; UEHLING, J., Difficulties in identifying antibodies in the Dombrock blood group system in multiply alloimmunized patients. **Tranfusion**, v.38, p. 11-14, 1998.

SWANSON, J. et al. A “new” blood group antigen Doa, (abstract). **Nature**, n.206, p. 313, 1965.

The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v.526, n. 7571, p.68–74, 2015.

THOMPSON, P. R.; CHILDERS, D.M.; HATCHER, D. E. Anti-Di^b –first and second examples. **Vox Sang**, v.13, n.4, p.314-318, 1967.

TOIVANEN, P.; HIRVONEN, T. Antigens Duffy, Kell, Kidd, Lutheran and Xg a on fetal red cells. **Vox Sang.**, v.24, n.4, p.372-6. 1973.

TOURNAMILLE, C. et al. Arg89Cys, substitution results in very low membrane Expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy^x individuals. **Blood**, v.92, n.6, p. 2147-2156, 1998.

VALONES, M. A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields : a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 1–11, 2009.

WEAVER, T. et al. An association between the Jo^a and Hy phenotypes. (Abstract). **Transfusion**, v.24, p.426, 1984.

WEI, C. T. et al. Prevalence of Diego blood group antigen and the antibody in three ethnic population groups in Klang valley of Malaysia. **Asian J. Transfus. Sci.**, v.7, n.1, p.26–

28, 2013.

WESTHOFF, C. M.; Molecular testing for transfusion medicine. **Curr. Opin. Hematol.**, v.13, p.471–475, 2006.

ZELINSKI, T. et al. Distinctive Swann blood group genotypes: molecular investigations. **Vox Sang.**, v.79, n.4, p. 215-218, 2000.

ZHENG, Z. et al. Simultaneous detection of 45 fusion genes in leukemia by dual-color fluorescence real-time PCR. **Int. J. Lab. Hematol.**, v. 39, n.2, p.175-184, 2017.

ZHOU, S. et al. A New Method for Analyzing the Duffy Blood Group Genotype by TaqMan Minor Groove Binding Probes. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.29, p.203-7, 2015.

ZIMMERMAN, P. A. et al. Emergence of FY*A (null) in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea. **Proc. Acad. Sci.**, v. 96, n.24, p.13973-13977, 1999.

ZIPURSKY, A. et al. The transplacental passage of foetal red blood-cells and the pathogenesis of Rh immunisation during pregnancy. **Lancet**, v.2, p. 489-493, 1963.

ZIZA, K. C. et al. Determination of Fetal RHD Genotype Including the RHD Pseudogene in Maternal Plasma. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.31, n.3, 2017.

ANEXO1

Alelos do Sistema de grupos sanguíneos Diego

FENÓTIPO	ALELO	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	ÉXON	AMINOÁCIDO
DI:1,-2 ou Di(a+b-)	<i>DI*1</i> ou <i>DI*A</i>	2561C>T	19	Pro854Leu
DI:-1,2 ou Di(a-b+)	<i>DI*2</i> ou <i>DI*B</i>	2561T>C	19	Leu854Pro
DI:3,-4 ou Wr(a+b-)	<i>DI*02.03</i>	1972G>A	16	Glu658Lys
DI:5 ou Wd(a+)	<i>DI*02.05</i>	1669G>A	14	Val557Met
DI:6 ou Rb(a+)	<i>DI*02.06</i>	1643C>T	14	Pro548Leu
DI:7 ou WARR+	<i>DI*02.07</i>	1655C>T	14	Thr552Ile
DI:8 ou ELO+	<i>DI*02.08</i>	1294C>T	12	Arg432Trp
DI:9,-22 ou Wu+, DISK-	<i>DI*02.09</i>	1694G>C	14	Gly565Ala
DI:10 ou Bp(a+)	<i>DI*02.10</i>	1707C>A	14	Asn569Lys
DI:11 ou Mo(a+)	<i>DI*02.11</i>	1967G>A	16	Arg656His
DI:12 ou Hg(a+)	<i>DI*02.12</i>	1966C>T	16	Arg656Cys
DI:13 ou Vg(a+)	<i>DI*02.13</i>	1663T>C	14	Tyr555His
DI:14 ou Sw(a+)	<i>DI*02.14.01</i>	1937G>A	16	Arg646Gln
DI:14 ou Sw(a+)	<i>DI*02.14.02</i>	1936C>T	16	Arg646Trp
DI:15 ou BOW+	<i>DI*02.15</i>	1681C>T	14	Pro561Ser
DI:16 ou NFLD+	<i>DI*02.16</i>	1287A>T; 1681C>G	12 14	Glu429Asp;
DI:17 ou Jn(a+)	<i>DI*02.17</i>	1696C>T	14	Pro566Ser
DI:18 ou KREP+	<i>DI*02.18</i>	1696C>G	14	Pro566Ala
DI:19 ou Tr(a+)	<i>DI*02.19</i>	1653G>C	14	Lys551Asn
DI:20 ou Fr(a+)	<i>DI*02.20</i>	1438G>A	13	Glu480Lys
DI:21 ou SW1+	<i>DI*02.21</i>	1936C>T	13	Arg646Trp
Di(a-b-) (null)	<i>DI*02N.01</i>	1462G>A	13	Val488Met

ANEXO 2

Alelos do Sistema de grupos sanguíneos Dombrock

FENÓTIPO	ALELO	NUCLEOTÍDIO ALTERADO	EXON	AMINOÁCIDO
DO:1+ ou Do(a+)	<i>DO*01</i> ou <i>DO*A</i>	793G>A	2	Asp265Asn
DO:2 ou Do(b+)	<i>DO*02</i> ou <i>DO*B</i>	793A>G	2	Asn265Asp
DO:-4 ou Hy-	<i>DO*02.-04</i>	323G>T	2	Gly108Val
DO:-5 ou Jo(a-)	<i>DO*01.-05</i>	350C>T	2	Thr117Ile
DO:-6 ou DOYA-	<i>DO*01.-06</i>	547T>G	2	Tyr183Asp
DO:-7 ou DOMR-	<i>DO*02.-07</i>	431C>A; 432C>A; 793A>G	2	Ala144Glu; Asn265Asp
DO:-8 ou DOLG-	<i>DO*02.-08</i>	674T>A; 793A>G	2	Leu225Gln; Asn265Asp
DO:-9 ou DOLC-	<i>DO*01.-09</i>	566C>T	2	Thr189Met
DO:-10 ou DODE-	<i>DO*01.-10</i>	405C>A	2	Asp135Glu
FENÓTIPOS NULL				
DO:-3 ou Gy(a-)	<i>DO*01N.01</i>	442C>T	2	Gln148Stop
DO:-3 ou Gy(a-)	<i>DO*01N.02</i>	343_350del	2	Met115Hisfs
DO:-3 ou Gy(a-)	<i>DO*02N.01</i>	145-2A>G	2	splicing alternativo
DO:-3 ou Gy(a-)	<i>DO*02N.02</i>	144+2T>C	2	splicing alternativo
DO:-3 ou Gy(a-)	<i>DO*02N.03</i>	185T>C; 793A>G	2	Phe62Ser; Asn265Asp
DO:-3 ou Gy(a-)	<i>DO*02N.04</i>	268C>T; 793A>G	2	Gln90Ter; Asn265Asp

ANEXO 3

Alelos do Sistema de grupos sanguíneos Duffy

FENÓTIPO	ALELO	NUCLEOTÍDE O ALTERADO	ÉXON	AMINOÁCID O
FY:1 ou Fy(a+)	<i>FY*01</i> ou <i>FY*</i>	125A>G	2	Asp42Gly
FY:2 ou Fy(b+)	<i>FY*02</i> ou <i>FY*B</i>	125A	2	Asp42
Fenótipos Null				
Fy(a-b-) erythroid cells only#	<i>FY*01N.01</i>	1-67T>C	Promotor	0
Fy(a-b-)	<i>FY*01N.02</i>	281_295del	2	Pro94fs
Fy(a-b-)	<i>FY*01N.03</i>	408G>A	2	Trp136Ter
Fy(a-b-)	<i>FY*01N.04</i>	287G>A	2	Trp96Ter
Fy(a-b-)	<i>FY*01N.05</i>	327delC	2	Phe109fs
Fy(a-b-)	<i>FY*01N.06</i>	395G>A	2	Gly132Asp
Fy(a-b-)	<i>FY*01N.07</i>	719delG	2	Gly240Ala
Fy(a-b-) erythroid cells only	<i>FY*02N.01</i>	1-67T>C	Promotor	0
Fy(a-b-)	<i>FY*02N.02</i>	407G>A	2	Trp136Ter
Fy(a-b-)	<i>FY*02N.03</i>	781G>A	2	Gly261Arg
Fenótipos fracos				
Fy(a+w)	<i>FY*01W.01</i>	265C>T	2	Arg89Cys
Fy(a+w)	<i>FY*01W.02</i>	265C>T, 298G>A	2	Arg89Cys, Ala100Thr
Fy(b+w), Fyx	<i>FY*02W.01</i>	265C>T, 298G>A	2	Arg89Cys, Ala100Thr
Fy(b+w), Fyx	<i>FY*02W.02</i>	145G>T, 265C>T, 298G>A	2	Ala49Ser, Arg89Cys, Ala100Thr
Fy(b+w)	<i>FY*02W.03</i>	266G>A	2	Arg89His
Fy(b+w)	<i>FY*02W.04</i>	901C>T	2	Pro303Ala

ANEXO 4



Aplicação prática do estudo - Fornecimento, pela Fundação Hemominas, da primeira bolsa de hemocomponentes Hy negativa no Brasil.

NOTÍCIAS

COMPARTILHAR

Fundação Hemominas fornece primeira bolsa de sangue raro Hy negativo do Brasil

Por Agência Minas, 13/09/2017 às 16:19

TEXTO:  

A Fundação Hemominas mais uma vez conseguiu identificar um doador de sangue raro. Trata-se de um doador Hy negativo, ou seja, que não possui o antígeno Holley no sangue.

A coordenadora da Central de Imunohematologia da Fundação Hemominas, Luciana Cayres Schmidt, esclarece que esse é um dos oito antígenos do Sistema de Grupo Sanguíneo Dombrock, sendo de alta incidência populacional.

“Segundo a literatura científica, 100% da população europeia e mais de 99% da população de origem africana possui o antígeno Holley na superfície de suas hemácias. Por isso, quando o doador não possui esse antígeno é considerado um doador raro”, explica.

O doador foi localizado no Hemocentro Regional de Uberaba (URA), no Triângulo Mineiro, e a bolsa de sangue foi enviada no dia 6 setembro à Agência Transfusional do Hospital São Paulo, ligado à Unifesp (Universidade Federal de São Paulo) e destinada a uma criança portadora de anemia falciforme.

A descoberta do doador Hy negativo foi possível em virtude do projeto de pesquisa “Análise Molecular de Grupos Sanguíneos em Doadores de Sangue para a Identificação de Variantes Raras”, desenvolvido pela Fundação Hemominas desde 2015.

“O principal impacto deste projeto é o desenvolvimento de uma estratégia de triagem de doadores raros baseada em genotipagem, visando o incremento da segurança transfusional em Minas Gerais. Ele nasceu da necessidade de desenvolvermos estratégias para identificar doadores que atendam às necessidades transfusionais de pacientes portadores de variantes raras atendidos nos ambulatórios da Hemominas”, afirma Maria Clara Fernandes da Silva Malta, coordenadora da pesquisa.

De acordo com Maria Clara, a pesquisa teve início pelos alelos dos sistemas Diego e Dombrock, pois alelos raros desses sistemas já haviam sido descritos anteriormente na população de Minas Gerais.

“No caso do sistema Dombrock, por exemplo, a doutora Fabiana Piassi havia identificado um doador raro Holley negativo no HBH (Hemocentro de Belo Horizonte) em uma pesquisa realizada em 2010, indicando que a população mineira seria promissora para a busca desse fenótipo raro”, esclarece a coordenadora.

Para Maria Clara, este tipo de descoberta “fecha um ciclo importantíssimo que envolve pesquisa, inovação e serviço, demonstrando que resultados concretos para a população podem ser obtidos a partir de projetos de pesquisa em centros de prestação de serviço, como a Hemominas”, enfatiza.

O projeto, que conta com a parceria da Faculdade de Farmácia da UFMG – e inclui o mestrado do aluno Adão Rogério da Silva, orientado pela professora Luci Dusse – foi beneficiado com o financiamento da Fapemig (Edital Universal) no final de 2016, o que vai permitir a ampliação das pesquisas.

“Com a liberação do recurso esperamos expandir o projeto, com a inclusão da genotipagem de um maior número de doadores e, até mesmo, com a inclusão de outros fenótipos raros na pesquisa”, completa Maria Clara Malta.

Rh nulo

Em agosto, a Fundação Hemominas também contribuiu para salvar a vida de uma criança de 5 anos, do Piauí, portadora de uma doença rara, a osteopetrose, com o envio de uma bolsa de sangue Rh nulo.

No Brasil só havia duas doadoras com o mesmo grupo sanguíneo da criança em condições de doar naquele momento, que, inclusive são irmãs, sendo uma cadastrada no Hemorio e outra na Fundação Hemominas (unidade de Juiz de Fora).

“Esse tipo raro de sangue foi descoberto na Hemominas através do processo de fenotipagem eritrocitária, método rotineiramente realizado na Central de Imunohematologia, para conhecer os antígenos de outros sistemas de grupos sanguíneos, expressos nas hemácias dos nossos doadores, além dos antígenos ABO/RhD”, afirma Luciana Cayres.

Fonte: <http://www.itatiaia.com.br/noticia/fundacao-hemominas-fornece-primeira-bolsa-de>