UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

THIAGO VIANNA DE CARVALHO

**Desenvolvimento de estratégia de genotipagem para discriminação de alelos antitéticos
do sistema de grupo sanguíneo Diego utilizando *pool* de DNA**

Ribeirão Preto

2018

THIAGO VIANNA DE CARVALHO

**Desenvolvimento de estratégia de genotipagem para discriminação de alelos antitéticos
do sistema de grupo sanguíneo Diego utilizando *pool* de DNA**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e
Biotecnologia.

Área de Concentração: Hemoterapia e Medicina
Transfusional.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Carvalho, Thiago Vianna de
Desenvolvimento de estratégia de genotipagem para discriminação de alelos antitéticos do sistema de grupo sanguíneo Diego utilizando *pool* de DNA - Ribeirão Preto, 2018.

69f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia.
Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Orientadora: Haddad, Simone Kashima

1. Genotipagem
2. Sistema Diego
3. *Pool* de DNA
4. Imuno-hematologia
5. Banco de Sangue

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

1. Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP) e Ministério da Saúde (Convênio 798370/2013).

Nome: CARVALHO, Thiago Vianna de

Título: Desenvolvimento de estratégia de genotipagem para discriminação de alelos antitéticos do sistema de grupo sanguíneo Diego utilizando *pool* de DNA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia, Área de Concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a Deus que, através
de Jesus Cristo, me deu coisa muito mais valiosa
que fortunas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela oportunidade de passar pela experiência desse mestrado. Toda honra, glória e louvor a Ele.

Aos meus pais, **Rizete Vianna de Carvalho** e **Valdir Faria de Carvalho**, pelo amor em todo o tempo e aos meus irmãos, **Christina** e **Raphael**, por se orgulharem do caçula aqui! **Thayla, Nicolle, Bernardo e João Pedro**, titio ama muito vocês.

À minha avó **Gizete Xavier Vianna** (*in memorian*) porque rezava a Deus por mim todos os dias quando nem eu o fazia. Saudades demais.

À minha orientadora, **Simone Kashima Haddad**, por todos os ensinamentos, paciência, gentileza e por acreditar que eu seria capaz de desenvolver esta pesquisa.

À **Evandra Strazza Rodrigues** que foi junto comigo no desenvolvimento e elaboração de cada técnica e à **Dra. Flávia Leite** por ser uma porta-voz quando eu não conseguia ser claro em minhas palavras. Agradeço por serem dois alicerces no desenrolar do processo desse trabalho e pelas incontáveis contribuições.

À **equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto** que me receberam como um deles e comigo compartilharam seus conhecimentos, seus momentos de descontração, um pouco de suas vidas, inclusive festas de família (**Obrigado Fernandinha! rsrs**) e, em especial a **Juliana de Matos Maçoneto, Jonathan Milhomens dos Santos Lima, Alexander Rodrigo Ferreira, Rafaela Rossetti e a Talitha Baldin Cuter** por terem, além de tudo, me ajudado nas extrações de DNA, buscar doador para participar do trabalho, catalogação de amostras, nas amplificações e em tudo quando eu não podia estar com vocês. Muito obrigado de verdade.

À **Dra. Shirley Lopes de Castilho** pelo despertar da ciência da imuno-hematologia na minha vida, pelas oportunidades de aprendizado e pela confiança depositada. A senhora é uma inspiração.

À **equipe do Laboratório de Imuno-hematologia do Serviço de Hemoterapia do Hemorio**, que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho.

Ao amigo **Everaldo José Schörner do Hemocentro de Santa Catarina** por ser, desde o princípio um companheiro na estrada da biologia molecular de grupos sanguíneos e pela disponibilização de raras amostras controle.

À **Raquel Botelho (Quequel)** por ser uma amiga de todos da turma e incansavelmente nos ajudar a chegar ao final dessa caminhada.

Aos **meus amigos da turma do mestrado (*Quequel's Crazy Team*)**, por serem as melhores pessoas com quem eu poderia viver esses dias. Com vocês, tudo foi infinitamente mais prazeroso. Viva os 4F's!!!!

À minha esposa, **Georgia**, e ao meu filho, **Matheus**, que creram que os dias investidos neste trabalho em detrimento do lazer com eles valeu a pena. Obrigado por resistirem e persistirem comigo! Amo vocês.

Thiago

Descobri que há uma harmonia maravilhosa nas verdades complementares da fé e da ciência. O Deus da Bíblia é também o Deus do genoma. Deus pode ser encontrado na catedral e no laboratório. Investigando a criação incrível e majestosa de Deus, a ciência pode na verdade ser uma forma de louvor.

Francis Collins (1960-), diretor do Instituto Nacional de Saúde dos EUA e diretor do Projeto Genoma Humano

RESUMO

CARVALHO, Thiago Vianna de. **Desenvolvimento de estratégia de genotipagem para discriminação de alelos antitéticos do sistema de grupo sanguíneo Diego utilizando *pool* de DNA**. 2018. 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, 2018.

Nesta dissertação, foi proposto o desenvolvimento de uma metodologia molecular por PCR em tempo real (*qPCR*) utilizando *pool* de DNA para a detecção de alelos que codificam antígenos importantes do sistema de grupo sanguíneo Diego. Esta ferramenta molecular será útil uma vez que são escassos os reagentes sorológicos para detecção desses antígenos e, quando existem, não permitem uma investigação em larga escala devido à pouca confiabilidade e alto custo. O sistema Diego (DI) possui 22 antígenos, sendo o antígeno Di^a mais importante na prática transfusional. Eles são carregados pela proteína da Banda 3 que é proteína mais abundante na s hemácias, com 10⁶ cópias. O antígeno possui uma maior prevalência, em indígenas americanos e asiáticos (6%-52%), já que é considerado um marcador antropológico de ancestrais mongóis; no entanto, a incidência desse antígeno tem aumentado dentre outras populações, como em caucasianos e afrodescendentes, e detectado em doadores de sangue, o que pode resultar em aloimunização de pacientes e dificultando o seu manejo terapêutico. Em contrapartida, a frequência do antígeno Di^b em todas as populações é extremamente alta (>99,99%) e encontrar o raro fenótipo Di (a+b-) é ainda mais laborioso do que a busca pelo antígeno Di^a. Sabe-se ainda muito pouco sobre a frequência dos antígenos W^r^a e W^r^b nas diferentes populações, mas estima-se que a prevalência seja de 0,01% e >99,99% respectivamente. Foram utilizadas 410 amostras de doadores de sangue e 230 amostras de pacientes para genotipagem em *qPCR* utilizando *pool* de DNA para detecção dos alelos *DI*01*, *DI*02*, *DI*02.03* e *DI*02.04*. A amplificação individualizada foi realizada quando a reação com *pool* demonstrou a amplificação de um dos alelos de interesse, *DI*01* ou *DI*02.03*. Procedeu-se também com a clonagem dos alelos após à amplificação com as amostras controle, porém, ocorreu somente a clonagem dos alelos *DI*02* e *DI*02.03*. Os fragmentos clonados apresentaram amplificação excelente e serão utilizados como controle positivo em testes moleculares futuros. Não foi possível a clonagem do *DI*01* pelo problema da zigozidade da amostra controle. Houve 100% de concordância entre o resultado da genotipagem e as informações de fenotipagem das amostras controle. O alelo *DI*01* ocorreu em 0,6% dos doadores de sangue e 1,7% em afrodescendentes, que corresponde a uma frequência genotípica *DI*01/DI*02* de 1,2% e 1,3% respectivamente. Procedeu-se com as análises estatísticas comparativas entre o resultado desta pesquisa e de outras na população brasileira sobre os diferentes genótipos para entender se havia uma diferença estatística considerável. Ainda que a frequência para o genótipo *DI*01/DI*02* seja mais baixa em doadores e mais alta em afrodescendentes do que o publicado em outros trabalhos brasileiros, a análise dos dados demonstrou que não havia diferença estatística com a maioria deles. A incidência aumentada do alelo *DI*01* na população afrodescendente demonstra o aspecto da miscigenação. Conclui-se que a metodologia proposta funciona e tem aplicabilidade imediata em doadores de sangue e na busca de fenótipos raros. A incidência do alelo para Di^a em doadores de sangue está abaixo do que um estudo anterior detectou em Ribeirão Preto (COZAC, 2004), que pode ser explicado pelas diferenças no censo populacional entre os estudos e pela coleta de amostra de universitários (62%). Não foram encontrados os genótipos *DI*01/DI*01*, *DI*02.03/DI*02.03* e *DI*02.03/DI*02.04* nas populações estudadas.

Palavras-chave: Sistema Diego. Genotipagem. *Pool* de DNA. Imuno-hematologia. Banco de Sangue

ABSTRACT

CARVALHO, Thiago Vianna de. **Development of genotyping strategy for discrimination of antithetical alleles of the Diego blood group system using DNA pool.** 2018. 69 f. Thesis (Master's Degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, 2018.

This work proposed the development of a molecular methodology by Real Time-PCR (*qPCR*) using DNA *pool* for the detection of alleles that encode important antigens of the Diego blood group system. This molecular tool will be useful since the serological reagents for the detection of these antigens are scarce and, when they exist, do not allow a large scale investigation due to the low reliability and high cost. The Diego (DI) system has 22 antigens, the Di^a antigen is the most important in transfusion practice. They are carried by the Band 3 protein which is the most abundant protein on the erythroid surface, about 10⁶ copies. The antigen has a higher prevalence in american indians and asians (6%-52%), since it is considered an anthropological marker of Mongolian ancestors; however, the incidence of this antigen has increased among other populations, such as in caucasians and afrodescendants, and detected in blood donors, which may result in alloimmunization of patients and make difficult their therapeutic management. In contrast, the frequency of Di^b antigen in all populations is extremely high (>99.99%) and finding the rare phenotype Di (a+b-) is even more laborious than the search for Di^a antigen. The frequency of Wr^a and Wr^b antigens in different populations is not well-known, but it is estimated that the prevalence is 0.01% and >99.99% respectively. 410 blood donor samples and 230 patient samples were used for genotyping in *qPCR* using DNA *pool* to detect the alleles *DI*01*, *DI*01*, *DI*02.03* and *DI*02.04*. The single amplification was performed when the *pool* reaction demonstrated the amplification of one of the alleles of interest, *DI*01* or *DI*02.03*. The alleles were also cloned after the control samples amplification. Only the cloning of the *DI*02* and *DI*02.03* alleles occurred, they presented excellent amplification and will be used as positive controls in future molecular tests, it was not possible to clone *DI*01* by the control sample zygosity though. There was 100% agreement between the genotyping results and the phenotype information of the control samples. The *DI*01* allele occurred in 0,6% of the blood donors and 1,7% in afrodescendants, which corresponds to a genotypic frequency *DI*01/DI*02* of 1,2% and 1,3% in respectively. The comparative statistical analyzes between this research results and others in the Brazilian population on the different genotypes was performed to understand if there was a considerable statistical difference. Although the frequency of the genotype *DI*01/DI*02* is lower in donors and higher in afrodescendants than that published in other Brazilian studies, data analysis showed that there was no statistical difference with most of them. The increased incidence of the *DI*01* allele in the afrodescendant population demonstrates the aspect of miscegenation. It is concluded in this work that the proposed methodology works and has immediate applicability in the screening of blood donors and search for rare phenotypes. The incidence of the allele encoding Di^a antigen in blood donors is below than previously detected in Ribeirão Preto (COZAC, 2004), which can be explained by the differences in the population census between the studies and by the sample collection of university students (62%). The genotypes *DI*01/DI*01*, *DI*02.03/DI*02.03* and *DI*02.03/DI*02.04* were not found in the populations studied.

Descriptors: Diego Blood Group System. Genotyping. DNA *pool*. Immuhematology. Blood Bank

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Proteína carreadora dos antígenos do sistema Diego.	20
Figura 2 - Diagrama esquemático da membrana eritrocitária (Visão Lateral) mostrando interações da Banda 3.	21
Figura 3 - Localização cromossômica do gene SLC4A1.	22
Figura 4 - Mapa de distribuição do alelo <i>DI*01</i> entre as populações ameríndias das Américas do Norte, Central e Sul.	28
Figura 5 - Fluxograma simplificado de trabalho.	34
Figura 6 - Esquema de construção dos <i>pools</i> de DNA.	37
Figura 7 - Esquema de montagem dos mixes para padronização das reações	40
Figura 8 - Fluxo da amplificação individualizada a partir da identificação do alelo <i>DI*01</i> na reação do <i>pool</i>	41
Figura 9 - Resultado da amplificação em <i>qPCR</i> das amostras controle.	45
Figura 10 - Resultados da amplificação dos ensaios de padronização das reações em <i>pools</i> ..	46
Figura 11 - Resultado da amplificação em <i>qPCR</i> do clone dos alelos <i>DI*02</i> e <i>DI*02.03</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência dos antígenos Di ^a , Di ^b , Wr ^a e Wr ^b em diferentes populações	25
Tabela 2 - Informações sobre os anticorpos do sistema Diego	26
Tabela 3 - Lista com as diferentes patologias dos pacientes submetidos à pesquisa	35
Tabela 4 - Conjuntos de <i>primers</i> e <i>reporters</i> utilizados	38
Tabela 5 - Protocolo de amplificação em <i>qPCR</i>	38
Tabela 6 - Constituição dos ensaios e <i>pools</i> para padronização.....	40
Tabela 7 - Frequência dos genótipos dos alelos <i>DI*01</i> e <i>DI*02</i> em doadores de sangue e pacientes	48
Tabela 8 - Frequência dos alelos <i>DI*01</i> , <i>DI*02</i> , <i>DI*02.03</i> e <i>DI*02.04</i> em doadores de sangue e pacientes.....	49
Tabela 9 - Frequência dos genótipos dos alelos <i>DI*01</i> e <i>DI*02</i> em pacientes de doença falciforme e outras patologias.....	49
Tabela 10 - Frequência dos alelos <i>DI*01</i> , <i>DI*02</i> , <i>DI*02.03</i> e <i>DI*02.04</i> em pacientes de doença falciforme e outras patologias.....	50
Tabela 11 - Análise estatística entre estudos sobre a frequência genotípica dos alelos <i>DI*01</i> e <i>DI*02</i> em doadores de sangue.....	51
Tabela 12 - Comparação estatística entre estudos da frequência genotípica em afrodescendentes	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µL	Microlitro
A	Adenina
ABO	Sistema de grupo sanguíneo ABO
AHAI	Anemia hemolítica autoimune
C	Citosina
CD47	<i>Cluster of differentiation 47</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cl-	Cloro
ddNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
DHPN	Doença hemolítica perinatal
DI	Sistema de grupo sanguíneo DI
<i>DI*01</i>	Alelo que codifica antígeno Di ^a
<i>DI*02</i>	Alelo que codifica antígeno Di ^b
<i>DI*02.03</i>	Alelo que codifica antígeno W _I ^a
<i>DI*02.04</i>	Alelo que codifica antígeno W _I ^b
Di ^a	Antígeno Di ^a
Di ^b	Antígeno Di ^b
DISK	Antígeno DISK
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAM	Fluoróforo 6-carboxifluoresceína
FY	Sistema de grupo sanguíneo Duffy
G	Guanina
Glu	Ácido Glutâmico
GLUT 1	Transportador de glicose
GPA	Glicoforina A
GPB	Glicoforina B
GPC	Glicoforina C

H2DIDS	Ânion 4,4'-di-isotiocianato-1,2-difeniletano-2,2'-ácido dissulfônico
<i>HBB</i>	Gene da hemoglobina
HbS	Hemoglobina S
HCO ₃ ⁻	Ânions bicarbonato
HT	<i>High transport</i> (alto transporte)
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
JK	Sistema de grupo sanguíneo Kidd
Kb	Quilobase
kD	Quilodaltons
KEL	Sistema de grupo sanguíneo Kell
LB	Meio Luria-Bertani
Leu	Leucina
Lys ou Lis	Lisina
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MNS	Sistema de grupo sanguíneo MNS
ng	Nanograma
N-terminal	Porção amino terminal
°C	Graus Celsius
PCR	Reação da cadeia da polimerase
<i>PCR-AS</i>	<i>PCR-Allele-Specific</i>
<i>PCR-RFLP</i>	<i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Pro	Prolina
<i>qPCR</i>	<i>Quantitative-PCR</i>
RH	Sistema de grupo sanguíneo Rh
RhAG	Glicoproteína associada a Rh
RhD	Antígeno D do sistema RH

RHT	Reação hemolítica transfusional
RT	Reação Transfusional
<i>SCL4A1</i>	Gene que codifica a Banda 3
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SOC	<i>Super optimal broth</i> (caldo super ideal) – meio de cultura
T	Timina
TAD	Teste da antiglobulina humana direta
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
V	Volume
VIC	Fluoróforo 4, 7, 2'-triclora-7'-fenil-6-carboxifluoresceína
W ^r ^a	Antígeno W ^r ^a
W ^r ^b	Antígeno W ^r ^b
Wu	Antígeno Wu
x g	Unidade de medida gravidade
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo
Neg	Reação negativa – ausência de agregados e fundo bem vermelho
±	Reação fracamente positiva – microagregados e fundo bem vermelho
1+	Reação 1+ - pequenos agregados e fundo vermelho
2+	Reação 2+ - pequenos agregados e fundo róseo
3+	Reação 3+ - agregados maiores e fundo róseo claro
4+	Reação 4+ - agregado único, firme e fundo claro
DP	Reação de Dupla População – agregados maiores e fundo bem vermelho

NOTA SOBRE A NOMENCLATURA DE GENES E PROTEÍNAS

Os genes e alelos foram descritos em letras maiúsculas e em itálico de acordo com a *International Society of Blood Transfusion* (ISBT). Os quatro alelos abordados neste trabalho irão compor o exemplo na tabela abaixo:

ISBT					
Nome do Sistema:		Diego	Símbolo do Sistema:		DI
Antígeno	Di ^a	Di ^b	Wr ^a	Wr ^b	
Fenótipo	Di (a+b-)	Di (a-b+)	Wr (a+b-)	Wr (a-b+)	
Genótipo	<i>DI*01/DI*01</i>	<i>DI*02/DI*02</i>	<i>DI*02.03/DI*02.03</i>	<i>DI*02.04/DI*02.04</i>	
Alelos	<i>DI*01</i>	<i>DI*02</i>	<i>DI*02.03</i>	<i>DI*02.04</i>	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	A Banda 3	20
1.2	Antígenos Di ^a e Di ^b e seus anticorpos.....	23
1.3	Antígenos Wr ^a e Wr ^b e seus anticorpos	24
1.4	A herança do sistema sanguíneo Diego	26
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	32
4	HIPÓTESE.....	33
5	METODOLOGIA	34
5.1	Fluxograma de trabalho	34
5.2	Casuística	35
5.3	Extração e quantificação de DNA	36
5.4	Constituição do <i>pool</i> de DNA.....	37
5.5	<i>Primers</i> e <i>reporters</i>	37
5.6	Reação da cadeia da polimerase	38
5.6.1	qPCR	38
5.7	Amostras controle	39
5.8	Padronização e funcionalidade dos <i>pools</i> de DNA.....	39
5.9	Amplificação individualizada.....	41
5.10	Construção do vetor para clonagem dos alelos <i>DI*01</i> e <i>DI*02.03</i>	41
5.10.1	Reação de amplificação dos fragmentos-alvo.....	41
5.10.2	Ligação do fragmento de DNA amplificado ao vetor.....	42
5.10.3	Preparação de placas LB Agar	42
5.10.4	Transformação bacteriana	42
5.10.5	Crescimento de bactérias	43
5.10.6	Extração de DNA plasmidial	43

5.10.7 Amplificação do DNA plasmidial	43
5.11 Comparação das frequências genotípicas com a literatura	44
6 RESULTADOS	45
7 DISCUSSÃO	53
8 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	67

ANEXO A - Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP).....	67
--	----

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) fornecido aos doadores de sangue e pacientes participantes da pesquisa.	68
--	----

1 INTRODUÇÃO

O sistema de grupo sanguíneo Diego consiste de 22 antígenos dispostos na proteína da Banda 3: três pares de antígenos antitéticos (Di^a/Di^b , Wr^a/Wr^b e $Wu/DISK$) e mais 16 antígenos de frequência extremamente baixas. O antígeno Di^a é um excelente marcador antropológico pois é bastante polimórfico em populações mongóis, mas, é considerado ausente em outros grupos étnicos, como em afrodescendentes (FIGUEROA, 2013; LAYRISSE et al, 1955; LAYRISSE et al, 1956).

O gene que codifica a Banda 3 e todos os antígenos do sistema Diego é o *SLC4A1*. A análise da sequência de DNA mostrou que o polimorfismo antigênico Di^a/Di^b é resultado de uma mutação de ponto no nucleotídeo C2561T, resultando em uma substituição de um único aminoácido, sendo a posição 854Pro (2561C) correspondente ao antígeno Di^b e a 854Leu (2561T) ao antígeno Di^a . Análises moleculares da Banda 3 de indivíduos com eritrócitos expressando o antígeno Di^a mostraram que ocorre uma mutação simultânea 2561T (854Leu) e 166G (56Glu) responsável pela variante Banda 3-Memphis (OKUBO et al., 1994; SHOWE; BALLANTINE; HUEBNER, 1987; ZELINSKI et al., 1993).

Os antígenos Wr^a e o Wr^b são representados pela 658Lis (1972A) e 658Glu (1972G) na Banda 3, respectivamente. Hemácias com deficiência de GPA são Wr (a-b-), já que a expressão do antígeno Wr^b requer a presença de ambos Banda 3 e GPA (ARRIAGA et al., 2005; WALLIS et al., 1996).

Todos os outros antígenos de baixa frequência do sistema Diego estão associados com uma substituição do aminoácido na Banda 3. Nenhum indivíduo saudável foi detectado com o fenótipo Diego *null*, refletindo a importância fisiológica da Banda 3 (COZAC, 2004; LAYRISSE; WILBERT, 1961). A figura 1 ilustra a proteína que carrega os antígenos do sistema Diego.

1.1 A Banda 3

A Banda 3 é uma das mais importantes e numerosas glicoproteínas da membrana eritrocitária e é composta por 911 aminoácidos, cujo peso molecular é de 95.000 daltons e possui cerca de 1 milhão de cópias na membrana do eritrócito (FAIRBANKS; STECK; WALLACH, 1971).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da proteína carreadora dos antígenos do sistema Diego. A proteína Banda 3 está inserida na membrana eritrocitária e possui 22 antígenos representados em suas sete alças extra-membranares. Em destaque nas caixas pretas, os dois pares de antígenos antitéticos Di^a/Di^b e Wr^a/Wr^b. (Adaptado de REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012).

Essa glicoproteína apresenta-se com dois domínios funcionalmente distintos: um domínio amino-terminal citoplasmático com 403 aminoácidos que desempenha papel crucial na manutenção da integridade celular por atuar como sítio de ligação com proteínas do citoesqueleto, enzimas glicolíticas e hemoglobina (JAY; CANTLE, 1986; LOW, 1986; TANNER, 1997); o outro domínio carboxiterminal, com 29 aminoácidos, tem como principal função, direcionar o fluxo de HCO₃⁻ e Cl⁻, através da membrana eritrocitária (TANNER, 1997). A figura 2 apresenta a interação da Banda 3 com outras glicoproteínas na hemácia.

Os estudos da função da Banda 3 demonstraram que o canal de transporte de ânions é formado por dois resíduos de lisina (539Lis e 851Lis) que reagem covalentemente com a mesma molécula do inibidor de transporte de H₂DIDS (OKUBO et al., 1994).

O gene que codifica a glicoproteína Banda 3 chama-se *SLC4A1* (FIGURA 3) e está localizado no cromossomo 17q12-q21 em uma organização de 20 éxons dentro de uma sequência genômica de 20 Kb (SHOWE; BALLANTINE; HUEBNER, 1987; ZELINSKI et al., 1993).

O gene *SLC4A1* é altamente polimórfico e diversas formas variantes da Banda 3 têm sido descritas na literatura. Estas variantes podem estar associadas a alterações na sua atividade de transporte de ânions, tais como a Banda 3-Memphis (HSU & MORRISON, 1985) e a Banda 3 HT (BRUCE et al., 1993); a patologias tais como, neuroacantocitose (KAY et al., 1991), esferocitose hereditária (JAROLIM et al., 1992), ovalocitose do sul da Ásia (JAROLIM et al., 1991; MOHANDAS et al., 1992; TANNER, 1997) bem como a expressão dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo Diego (DANIELS et al., 2001).

Figura 2 - Diagrama esquemático da membrana eritrocitária (Visão Lateral) mostrando interações da Banda 3. Visão lateral da membrana eritrocitária com as proteínas principais: glicoforina C (GPC), proteína Rh (Rh), banda 3 (3), transportador de glicose (GLUT 1), glicoproteína associada a Rh (RhAG), CD47 e glicoforina A (GPA). As proteínas de membrana periférica marcadas incluem: espectrina, anquirina, proteína 4.1 (4.1) e proteína 4.2 (4.2), aducina, P55 e dematina. Note-se que as três populações hipotetizadas da banda 3 incluem a banda 3 livre, a banda 3 em um complexo de anquirina e a banda 3 no complexo juncional (KODIPPILI et al., 2009).

A variante da Banda 3 mais comum encontrada é a Banda 3-Memphis que foi descrita pela primeira vez por MUELLER & MORRISON, 1977. Eles verificaram a presença da Banda 3 com peso molecular maior (63 kD) que o da Banda 3 normal (60 kD) através da digestão

proteolítica de eritrócitos intactos e da técnica de eletroforese SDS-PAGE. Os resultados da digestão com pronase sugeriram que o aumento do peso molecular da Banda 3-Memphis poderia estar relacionado com a incorporação de um segmento adicional do domínio N-terminal citoplasmático da Banda 3.

A Banda 3-Memphis foi inicialmente detectada em 6-7% das amostras de doadores sangue caucasianos (MUELLER; MORRISON, 1977). Na população brasileira a Banda 3-Memphis foi encontrada em 8% dos indivíduos de um grupo de caucasianos e 24% em afrodescendentes (PALATNIK et al., 1990). Em outras populações, as frequências da Banda 3-Memphis foram: 16% em afro-americanos, 18,5% em índios americanos, 29% em japoneses, 13% em chineses e 17,3% em filipinos (IDEGUCHI et al., 1992; RANNEY et al., 1990).

Figura 3 - Localização cromossômica do gene SLC4A1. A seta azul indica a localização aproximada do gene *SLC4A1* no braço longo do cromossomo 17 (National Library of Medicine (US), 2018)

SPRING et al., (1992) observaram a associação da Banda 3-Memphis com a expressão do antígeno Di^a (antígeno de baixa incidência do sistema de grupo sanguíneo Diego), quando examinavam a afinidade da reação entre H2DIDS em eritrócitos com diferentes fenótipos Diego: Di (a+b-), Di (a+b+) e Di (a-b+). Estes autores afirmaram que os eritrócitos com fenótipo Di (a+) estão sempre associados com a Banda 3-Memphis, caracterizando a variante II, mas nem sempre a presença da Banda 3-memphis está associada ao fenótipo Di (a+).

A associação entre o antígeno Di^a e a Banda 3-Memphis variante II foi também observada por BRUCE et al., 1994, quando relacionaram o polimorfismo antigênico Di^a/Di^b com a troca dos aminoácidos Pro854Leu na cadeia polipeptídica da Banda 3 e os efeitos destas alterações sobre a reatividade com H2DIDS.

1.2 Antígenos Di^a e Di^b e seus anticorpos

Em 1994, Bruce descreveu que o polimorfismo Di^a/Di^b era caracterizado por troca única de aminoácido na posição 854Leu (2561T) para o Di^a, ou a presença de 854Pro (2561C) no caso do antígeno Di^b.

Os antígenos Di^a e Di^b são codificados respectivamente pelos alelos *DI*01* e *DI*02* e foram considerados o primeiro par de antígenos antitéticos do sistema Diego, logo são os mais estudados do sistema. Estes são caracterizados pela presença necessariamente de um deles na ausência do outro, ocorrendo a obrigatoriedade de expressão antigênica, por exemplo, do Di^b na ausência do Di^a e vice-versa. O fenótipo Di (a+b-) é encontrado raramente, predominando em asiáticos e índios. Alguns indivíduos com este fenótipo são, na realidade, geneticamente *DI*01/DI*02*, o que sugere a presença de uma nova mutação na Banda 3, especificamente no alelo *DI*02*, a qual inibe a expressão do Di^b (JAROLIM et al, 1994; JAROLIM; RUBIN, 1996). Doadores com fenótipo Di (b-) foram inseridos na lista de fenótipos raros pela *International Society of Blood Transfusion* (ISBT) à partir de 1999 (ANSTEE et al., 1999).

Sabe-se que os antígenos Di^a e Di^b estão completamente formados ao nascimento e por essa razão é que eles começaram a ser estudados. O anti-Di^a foi originalmente descrito em criança que nascera com doença hemolítica perinatal (DHPN). À partir de então, o potencial hemolítico deste anticorpo foi evidenciado em uma série de estudos e atualmente, sabe-se que ele pode causar hemólise *in vitro*, assim como reação hemolítica transfusional (RHT) severa, podendo ser imediata ou tardia, além da DHPN como já fora mencionado. (FIGUEROA, 2013).

Já o anti-Di^b foi relatado como podendo produzir casos leves de DHPN com um teste de antiglobulina humana direta (TAD) positivo, mas sem manifestação clínica da doença. Quanto a RHT, pode produzir um quadro de reação moderada, imediata ou tardia. Há relatos na literatura de auto-anti-Di^b (DANIELS, 2002; FIGUEROA, 2013).

Vários estudos foram conduzidos ao longo dos anos a fim de se identificar a frequência do antígeno Di^a em inúmeras populações, mas segundo Poole, em 1999, a frequência geral de do fenótipo Di (a+b+) em caucasianos e negros é <0,1%, enquanto que em asiáticos e indígenas americanos, esta frequência pode alcançar 10 a 36% dos indivíduos. Outro estudo conduzido por Novaretti et al. (2010) encontrou uma frequência de 3,6% de Di (a+b+) em doadores de São Paulo, porém neste caso as amostras não foram caracterizadas de acordo com a raça ou cor.

1.3 Antígenos W_r^a e W_r^b e seus anticorpos

O polimorfismo $DI*02.03/DI*02.04$ foi descrito por Bruce et al em 1995, pela demonstração de uma troca de aminoácido, sendo então a alteração 658Lis (1972A) para o antígeno W_r^a e a alteração 658Glu (1972G) para W_r^b . Ficou então estabelecido o segundo par de antígenos antitéticos do sistema Diego.

Em 1953, Holman descreveu um antígeno eritrocitário de baixa incidência chamado W_r^a (HOLMAN apud DANIELS, 2002). Após sua descoberta, vários outros casos de indivíduos W_r (a+) foram encontrados. Estudos populacionais demonstraram uma incidência de cerca de 0,1% de indivíduos W_r (a+) em indivíduos de origem caucasiana. Estudos em amostras de doadores de sangue na Holanda evidenciaram uma incidência do antígeno W_r^a em aproximadamente 4,3%, no entanto, outros estudos apresentaram uma frequência de 0,4 a 1,3% da presença do antígeno (SCHONEWILLE; VAN ZIJL; WIJERMANS, 2003; SQUIRES et al., 2012; WALLIS et al., 1996). Um estudo conduzido no Brasil avaliou 1662 amostras de doadores de sangue aleatórios em São Paulo e verificou uma frequência para esse antígeno de 0,06% (MUNIZ et al., 2015). Na ocasião, apesar de este antígeno ter sido vastamente estudado do ponto de vista sorológico, não havia qualquer suspeita de que tivesse algo em comum com o antígeno Di^a .

Existe a ocorrência do fenótipo W_r (a+b-) por homozigotidade dos alelos $DI*02.03$, porém, há alguns casos desse fenótipo, ou com a expressão antigênica enfraquecida de W_r^b , que na realidade correspondem ao genótipo $DI*02.03/DI*02.04$ com alteração nos resíduos da GPA, que é uma sialoglicoproteína atuante durante a biossíntese da Banda 3 pois age como uma molécula acompanhante no auxílio de sua dobradura correta e para ser eficientemente depositada na membrana da hemácia (BRUCE et al., 1995; TELEN; CHASIS, 1990).

Existe a sugestão de que o antígeno W_r^b está intimamente associado com a presença dos resíduos 61-70 da GPA segundo dados da literatura e este fato explicaria por que o antígeno W_r^b não é expresso se parte da GPA não estiver íntegra. É necessário considerar que hibridismos entre GPA e GPB também podem levar a falta de expressão do antígeno W_r^b nas hemácias, e eventualmente, o antígeno W_r^a (BRUCE et al., 1995; TELEN; CHASIS, 1990).

O anti-Wr^a encontra-se implicado em reações transfusionais imediatas e tardias graves e na DHPN (CONTRERAS; LUBENKO, 1992). Ao contrário do anti-Di^a, o anti-Wr^a pode ser encontrado como anticorpo de ocorrência natural e no soro de pacientes com anemia hemolítica autoimune (BANZHAF; GREENDYKE, 1977; POOLE, 1999).

Em 1971, foi relatado um caso de um anticorpo direcionado a um antígeno de alta incidência desenvolvido por uma mulher que, após estudos de dosagem, sugeriu ser geneticamente *DI*02.03/DI*02.03*, tendo sido chamado de anti-Wr^b (ADAMS et al., 1971).

A tabela 1 demonstra a frequência dos antígenos Di^a, Di^b, Wr^a e Wr^b nas diferentes etnias e pode ser observado que a incidência de Di^a varia dentre elas (0,1% a 54%), enquanto o antígeno Di^b demonstra sua alta prevalência. Quanto ao par de antígenos Wr^a e Wr^b, a tabela evidencia a falta de polimorfismo encontrada nas populações, sendo o Wr^a de baixíssima frequência e o Wr^b de altíssima.

TABELA 1 - INCIDÊNCIA DOS ANTÍGENOS Di^a, Di^b, Wr^a E Wr^b EM DIFERENTES POPULAÇÕES

Etnias	Antígeno Di ^a	Antígeno Di ^b	Antígeno Wr ^a	Antígeno Wr ^b
Japoneses	12%	>99%	<0,01%	100%
Chineses	5%	>99%	<0,01%	100%
Hispânicos	1%	>99%	<0,01%	100%
Indígenas sul-americanos	2% a 54%	99%	<0,01%	100%
Caucasianos	<0,1%	>99,99%	<0,01%	100%
Negros	<0,1%	>99,99%	<0,01%	100%

Fonte: adaptado de REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012

A tabela 2 demonstra informações sobre os anticorpos do sistema Diego segundo Reid, Lomas-Francis e Olsson (2012). Todos os anticorpos do sistema Diego, são da classe IgG e podem não desenvolver RHT até reações graves. O conhecimento desses anticorpos é importante na medicina materno-fetal pois eles podem causar DHPN de leve a grave, o que compromete a saúde do bebê a gravidez corrente e das futuras gestações.

TABELA 2 - INFORMAÇÕES SOBRE OS ANTICORPOS DO SISTEMA DIEGO

Anticorpo	Classe da Ig	DHPN¹	RHT²
Anti-Di^a	IgG	Leve a grave	Nenhuma a grave/tardia
Anti-Di^b	IgG	Leve	Nenhuma a moderada/tardia
Anti-Wr^a	IgM; IgG	Leve a grave	Nenhuma a severa/imediata ou tardia/hemolítica
Anti-Wr^b	IgM e IgG	TAD positivo sem significado clínico	Testes sugerem destruição acelerada no caso de transfusão incompatível

¹Doença hemolítica perinatal ²Reação Hemolítica Transfusional
 Fonte: Adaptado de REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012

1.4 A herança do sistema sanguíneo Diego

Em 1953, Miguel Layrisse e seus colaboradores estudaram o soro de um recém-nato, sexo masculino, nascido a termo, com quadro clínico e laboratoriais normais ao nascimento, no entanto, os níveis de bilirrubina não haviam sido pesquisados. A icterícia ficou evidente 12 horas após o nascimento e se tornou bastante severa ao ponto de levar o recém-nato à óbito em três dias. O TAD demonstrou que os eritrócitos da criança estavam recobertos com anticorpos. Outros testes com as amostras da mãe e da criança foram desenvolvidos. Após alguns deles, nenhum anticorpo foi demonstrado no soro materno quando testado contra um painel de hemácias selecionadas, cuja hemácia do pai não estava inclusa. Logo que a incompatibilidade ABO e RhD foram excluídas, a ocorrência de um novo fator sanguíneo de baixa incidência com seu anticorpo correspondente entrou em suspeita (LEVINE et al., 1954).

Em outubro de 1953, o soro materno foi testado com outras 200 amostras de doadores de sangue caucasianos e com a amostra do pai da criança. Com as 200 amostras não houve reação alguma enquanto uma forte aglutinação fora evidenciada com a amostra paterna. Assim surgiu o nome desse novo fator de grupo sanguíneo, Diego, em referência a família onde ele fora descoberto (LEVINE et al., 1954).

Já em 1955, diante de uma segunda gravidez, novos testes puderam ser realizados. Layrisse e colaboradores estudaram quatro gerações da família Diego original e perceberam que a terceira e quarta gerações pareciam ser caucasoides, mas a sua pele era levemente mais

morena que o usual, embora os membros da segunda geração e a matriarca (geração parental) tinham características da pele com tom mais moreno que as gerações subsequentes, inferindo então uma linhagem familiar indígena (LAYRISSE; ARENDS; DOMINGUEZ, 1955).

Levando essas informações em conta, Layrisse e Levine começaram a observar as características da população de diferentes países com 286 indivíduos cujas hemácias foram testadas com o anti-Di^a pelo teste indireto da antiglobulina. A frequência dos resultados positivos levou Layrisse a concluir que o fator sanguíneo Diego não estava restrito a uma família em si, mas que poderia ser de relativa alta incidência em determinada população na Venezuela e provavelmente na América do Sul, com aparente significância genética, clínica e antropológica associada. Estudos com populações indígenas corroboravam para esse entendimento. (LAYRISSE apud JUNQUEIRA; CASTILHO, 2002; JUNQUEIRA et al., 1956; LAYRISSE; ARENDS, 1957a). Logo entendeu-se que podia se tratar de um “Fator Indígena”.

Em 1956, um artigo publicado pela *Nature*, Layrisse e Arends afirmaram que desde que os indígenas do continente americano são considerados como relacionados antropologicamente com o povo mongol do velho mundo, eles decidiram investigar a incidência do fator Diego na população asiática residente na Venezuela. Os achados direcionavam ao entendimento de que o fator Diego não era um fator restrito a América do Sul e sugeriram que este antígeno era um fator mongol (antropológico) e não um fator indígena em si (LAYRISSE; ARENDS, 1956).

A dispersão do antígeno Di^a deu-se então da Ásia para o continente americano pelo Estreito de Bering, chegando à América do Sul ao passar pelo canal do Panamá (FIGURA 4) (HENN; CAVALLI-SFORZA; FELDMAN, 2012).

Outros testes nos anos seguintes com outras populações indígenas, negroides e asiáticas dos Estados Unidos, Canadá, Brasil, etc., continuavam a corroborar de que este fator era mais mongol do que a qualquer outro anteriormente associado (LAYRISSE; ARENDS, 1956, 1957a, 1957b; LEWIS et al., 1956).

Artigos subsequentes continuavam a apontar para a distribuição do antígeno Di^a de que ele é essencialmente mongol, sendo considerado um marcador antropológico, ausente em caucasianos, negros e em aborígenes australianos, assim como em outras populações. Um ponto interessante, foi quando houve um caso de uma DHPN por anti-Di^a em uma família polonesa, o que era de certa maneira contraditório com os últimos achados de frequência negativa para esse antígeno nas populações caucasianas, que naturalmente incluía poloneses. A presença do

antígeno Di^a nessa população pode ser explicada pelas sucessivas invasões da Polônia por tártaros entre os séculos XIII e XVII (DANIELS, 2002; LEWIS et al., 1956, 1976).

Figura 4 - Mapa de distribuição do alelo *DI*01* entre as populações ameríndias das Américas do Norte, Central e Sul. A figura mostra a distribuição geográfica contrastante da frequência do alelo *DI*01* nas Américas com base no estudo de 144 populações indígenas nativas do continente americano. Foram observadas altas frequências nos Andes peruanos, no planalto da Guiana, na bacia Amazônica, em uma região do Pará e ao longo de afluentes do rio Amazonas. As baixas frequências ocorreram principalmente na América do Norte, no Chaco e no extremo sul da América do Sul. O alelo *DI*01* estava totalmente ausente no Ártico, no Istmo do Panamá, na Terra de Fogo e em algumas áreas na América do Norte, na fronteira entre extremo norte do Brasil com o sul da Venezuela do Sul (Adaptado de BÉGAT et al., 2015).

Por suposto que não se pode afirmar que determinada população é exclusivamente caucasiana, negra ou de origem mongol, mas, é possível de se afirmar que uma população é predominante em alguma delas. Logo, não seria um fato atípico se antígenos inexistentes em certas populações aparecessem e mudassem seu *status* para antígeno de baixa frequência à medida que os estudos avançam, ao exemplo do antígeno Di^a em afrodescendentes no Brasil.

Estudos brasileiros revelam que já existe uma frequência aumentada do antígeno Di^a na população doadora de sangue, chegando até 6%, (BALEOTTI, 2002; BIANCHI, 2016; COZAC, 2004; LATINI et al., 2014) e isso representa um problema transfusional pelas possíveis aloimunizações decorrentes da transfusão de um concentrado de hemácias com Di^a.

Considerando que a frequência desse antígeno tem aumentado na população e a inexistência de reagentes sorológicos adequados e com preço viável para sua caracterização em doadores de sangue, uma estratégia molecular é uma alternativa interessante na triagem desse antígeno.

O emprego de técnicas moleculares em imuno-hematologia é diverso, podendo ser aplicada em pacientes cuja fenotipagem eritrocitária ficaria comprometida por testes sorológicos, como em pacientes com múltiplas transfusões recentes, com TAD positivo e AHAI. Também pode ser empregada para resolução de discrepâncias ou resultados inconsistentes na fenotipagem e ainda na medicina-materno fetal. O seu emprego na rotina de doadores também é possível na caracterização de fenótipos importantes e raros na população, como é no caso dos antígenos do sistema Diego (MOTA et al., 2006).

Outra vantagem dos testes moleculares é a possibilidade de realizar ensaios com alto desempenho. Para isso, podem ser realizados de múltiplos testes em uma única reação com a identificação dos alelos antitéticos sem a necessidade de processamento da amostra após a fase de amplificação, além da possibilidade de automação e redução de custos, que agilizaria a obtenção dos resultados (CASTILHO, 2009).

Desta forma, com a obtenção de resultados em uma metodologia em larga escala, é possível fazer a triagem do máximo possível de doadores com relação a antígenos de interesse, como é o caso desse estudo para Di^a , Di^b , Wr^a e Wr^b e considerar a busca de fenótipos raros, como $Di(a+b-)$. Além disso, será possível aumentar a segurança transfusional, determinar as frequências alélicas e genóticas associadas aos antígenos mencionados e entender melhor a distribuição desses antígenos na população estudada.

2 JUSTIFICATIVA

A miscigenação é um fenômeno que permite que características, genéticas ou não, próprias de uma determinada população exótica possam ser difundidas na população residente. O Brasil passa por esse processo desde a sua descoberta em 1500. A incidência de determinados antígenos de grupos sanguíneos também obedece a esse fenômeno.

O sistema de grupo sanguíneo Diego leva esse nome após a descoberta do seu primeiro antígeno, Di^a. Esse antígeno não tem representatividade na população caucasiana e afrodescendente, mas tem uma prevalência aumentada em populações indígenas e asiáticas e é considerado um marcador antropológico para essas populações.

No entanto, com o vigoroso processo de globalização dos últimos 15 anos, a introdução dessas populações no perfil urbano brasileiro pode acarretar no aumento da frequência desse antígeno na população doadora de sangue e, com isso, a possibilidade de aloimunização dos pacientes.

A detecção prévia do antígeno Di^a não é simples pelo fato da indisponibilidade de antissoro que possua valor acessível no mercado, tenha alta confiabilidade, que garanta a exclusiva especificidade do anticorpo, tenha estabilidade para armazenamento e possua volume suficiente para testes em larga escala.

Em contrapartida, também é razoável analisar o fato de que, com a possível crescente na frequência do antígeno Di^a na população, haja a formação de um fenótipo extremamente raro, o Di (a+b-). Da mesma forma, não há reagentes específicos para a detecção do antígeno Di^b.

O Hemocentro de Ribeirão Preto tem uma estimativa de 6-7% de doadores com antígeno Di^a (COZAC, 2004), o que corrobora com a ideia de que a aloimunização para o antígeno é aumentada entre os pacientes da região, principalmente aqueles que estão ou são candidatos a regime crônico de transfusão.

Não há maiores estudos sobre a prevalência do antígeno Wr^a na população brasileira. Talvez isso ocorra por ele não ser considerado um marcador antropológico como o antígeno Di^a; logo, associá-lo a uma determinada população ou movimento migratório é muito difícil.

A importância desse trabalho ocorre pela necessidade de se evitar a aloimunização dos pacientes, principalmente os que estão em regime crônico de transfusão, visando à padronização e validação de uma ferramenta molecular para a caracterização dos alelos *DI*01/DI*02* e *DI*02.03/DI*02.04* em doadores de sangue utilizando *pool* de DNA.

A metodologia de *qPCR* possui alto grau de confiabilidade, não necessita de manipulação dos produtos pós amplificação e tem grande potencial de automação, o que a torna aplicável a testes em larga escala para busca, inclusive, de fenótipos raros, como o fenótipo Di (a+b-) em doadores de sangue. O *pool* de DNA é uma estratégia que promove um número de menor de reações de PCR para uma maior quantidade de amostras simultaneamente, o que garante um maior poder de processamento da metodologia.

Com os resultados será possível conhecer melhor o perfil genotípico dos doadores de sangue da região e principalmente aumentar a segurança transfusional.

3 OBJETIVOS

Como não há maiores estudos que demonstrem uma estratégia molecular com custo *versus* benefício adequado à prática transfusional no auxílio da triagem de doadores na busca dos alelos dos antígenos Di^a/Di^b e Wr^a/Wr^b com a falta de dados na literatura sobre a incidência, principalmente, dos antígenos Wr^a/Wr^b na população, os objetivos são:

- a) Desenvolver uma estratégia molecular para caracterização dos alelos antitéticos $DI*01/DI*02$ e $DI*02.03/DI*02.04$ utilizando *pool* de DNA;
- b) Determinar a incidência dos genótipos e alelos $DI*01/DI*02$ e $DI*02.03/DI*02.04$ em doadores de sangue Hemocentro de Ribeirão Preto e pacientes atendidos no serviço e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina.
- c) Construir clones dos alelos $DI*01$ e $DI*02.03$ para fins de controle positivo em testes futuros.

4 HIPÓTESE

É possível elaborar uma estratégia molecular para discriminação dos alelos *DI*01/DI*02* e *DI*02.03/DI*02.04* utilizando *pool* de DNA para ser utilizado na triagem de doadores de sangue.

5 METODOLOGIA

5.1 Fluxograma de trabalho

Figura 5 - Fluxograma simplificado de trabalho. O fluxograma descreve de forma simplificada o processo de trabalho desde a coleta da amostra até o resultado dos ensaios. Primeiramente coleta-se a amostra do indivíduo que segue para o processo de extração de DNA

e posteriormente, para sua quantificação. Havendo a quantidade ideal de 0,1 µg/µL de DNA, é feita a preparação do *pool* de DNA com parte de mais nove amostras, totalizando o *pool* com 10 amostras. Esse *pool* segue para os testes de *qPCR* para identificação dos alelos *DI*01* e *DI*02.03* e havendo amplificação, testes individualizados para detecção desses alelos com as amostras constituintes do *pool* devem ser realizados. Todos os resultados devem ser registrados. Fonte: Própria.

5.2 Casuística

Foram utilizadas neste estudo amostras de sangue total de 410 doadores candidatos a doação de sangue do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto. Também foram utilizadas 230 amostras provenientes de pacientes com diversas patologias (TABELA 3) atendidos na unidade e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que são candidatos a múltiplas transfusões conforme recomendação clínica.

TABELA 3 - LISTA COM AS DIFERENTES PATOLOGIAS DOS PACIENTES SUBMETIDOS À PESQUISA

Patologia	Quantidade de amostras
Anemia Aplástica	30
Insuficiência Renal Crônica	32
Linfomas	7
Leucemias	32
Mielodisplasia	18
Mieloma Múltiplo	9
Talassemias	35
Doença Falciforme	30
Tumores Sólidos	28
AHAI idiopáticas	9

Fonte: Própria

Foram coletados 4 mL de sangue periférico em tubos a vácuo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Greiner Bio-One, Áustria) e este material foi utilizado para extração de DNA.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob o número de processo 9563/2014 (ANEXO A). Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram informados quanto ao procedimento de coleta de amostra biológica, sua utilização no estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B).

5.3 Extração e quantificação de DNA

A amostra de sangue foi centrifugada a 1.455 x g durante 10 minutos e o *buffy-coat* foi coletado e transferido para um tubo de polipropileno de 15 mL, seguido da adição de 9 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos. Após homogeneizar o tubo durante 15 minutos em temperatura ambiente, foi realizada centrifugação a 1.455 x g durante 10 minutos e em seguida o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado.

Em seguida, 3 mL de solução de lise de células e 15 µL de RNase A (Qiagen, Alemanha) foram adicionados, o volume todo foi homogeneizado e posteriormente incubado em banho-maria a 37°C por 15 minutos, seguido de manutenção em banho de gelo por 3 minutos. Foi adicionado 1 mL de precipitante de proteínas (Qiagen, Alemanha), homogeneizado e centrifugado a 2.000 x g por 10 minutos. Um novo tubo contendo 3 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA) foi preparado para receber o sobrenadante resultante da centrifugação.

Para verificar a precipitação do DNA, o tubo foi homogeneizado e centrifugado a 2.000 x g por 3 minutos e em seguida, foram adicionados mais 3 mL de etanol 70% gelado, com mais uma posterior centrifugação a 2.000 x g por 1 minuto.

Após o descarte do sobrenadante, o tubo com a amostra de DNA permaneceu secando por 5-10 minutos em temperatura ambiente e o DNA foi eluído em água estéril para ser estocado a -20°C. Todas as amostras de DNA foram quantificadas no equipamento Nanodrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e diluídas para 0,1 µg/µL.

5.4 Constituição do *pool* de DNA

Cada *pool* de DNA foi constituído com base no trabalho de Mota (2012). A constituição foi feita com uma parte de 10 amostras já diluídas na concentração de interesse ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Cada parte corresponde ao volume de $5 \mu\text{L}$ de cada amostra, que totaliza um volume final do microtubo do *pool* de $50 \mu\text{L}$. Em seguida, os testes já podem ser realizados (FIGURA 6).

Figura 6 - Esquema de construção dos *pools*. O esquema demonstra como é feita a produção de cada *pool* de DNA. Todas as amostras de DNA (1 a 10) são previamente quantificadas, diluídas a uma concentração de $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e devidamente catalogadas. Para produção do *pool*, seleciona-se 10 amostras e transfere-se $5 \mu\text{L}$ de cada uma para um outro microtubo, com volume final de $50 \mu\text{L}$ e esse *pool* então é catalogado com as informações das 10 amostras que o compõe. Com o *pool* constituído, os testes são realizados conforme protocolo. Fonte: Própria.

5.5 Primers e reporters

Os *primers* e as *probes* hidrolíticas (Thermo Fisher Scientific, EUA) foram desenhadas de acordo com os SNPs: $DI2561T>C$ / $DI^a>DI^b$ e $DII972A>G$ / $Wt^a>Wt^b$ e a *probe* que representa o alelo de baixa frequência foi marcada com o *reporter* é 6-carboxifluoresceína (FAM) e o de alta com o 4, 7, 2'-triclóro-7'-fenil-6-carboxifluoresceína (VIC).

Os *primers* e *reporters* encontram-se descritos na TABELA 4.

TABELA 4 - CONJUNTOS DE *PRIMERS* E *REPORTERS* UTILIZADOS

	<i>DI*01/DI*02</i>	<i>DI*02.03/DI*02.04</i>
Primer F 5'- 3'	TGCTGTGGGTGGTGAAGTC	ATCCACCCACTGGGCTTG
Primer R 5'- 3'	TTCGTCCTCATCCTCACTGTG	ATCTGGATGATGTTTGCCTCCG
Reporters	VIC-CACGCC ¹ GGCCTCCCT-MGB	VIC-CGTTCCG ¹ AGTTTCC-MGB
	FAM-CACGCT ¹ GGCCTCCCT-MGB	FAM-CGTTCCA ¹ AGTTTCC-MGB

¹Local do polimorfismo. F: *Primer sense*. R: *Primer anti-sense*

Fonte: Própria.

5.6 Reação da cadeia da polimerase

5.6.1 *qPCR*

Os protocolos para amplificação das regiões estão descritos na tabela 5 conforme padronização prévia. O *master mix* utilizado foi o GoTaq® Probe *qPCR* Master Mix (Promega, Alemanha). O equipamento utilizado para a amplificação foi o 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®, EUA).

TABELA 5 - PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO EM *qPCR*

	<i>DI*01/DI*02</i>	<i>DI*02.03/DI*02.04</i>
Reagentes	Volume (µL)	Volume (µL)
Master Mix	10	10
TaqMan Assay (40X)	2	1
DNA (0,1 µg/µL)	10	10
Volume final	22	21

Ciclos: 50°C - 2min, 95°C - 10min, 50x; 95°C - 15s, 60°C - 1min30s

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto, 2017

5.7 Amostras controle

Para padronização do *pool* de DNA, foram utilizadas amostras de pacientes e doadores de sangue voluntários com fenotipagem conhecida. As informações de fenotipagem das amostras Di (a+b+) e Di (a-b+) foram fornecidas pelo laboratório de imuno-hematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto. As amostras controle Wr (a+b-) e Wr (a-b+) foram fornecidas gentilmente pelo Hemocentro de Santa Catarina.

Elas foram quantificadas, diluídas a 0,1 µg/µL e posteriormente amplificadas individualmente de acordo com os protocolos definidos nesse trabalho para confirmação dos fenótipos informados pelas instituições supracitadas. Somente após essa confirmação, os testes das reações dos *pools* foram iniciados.

5.8 Padronização e funcionalidade dos *pools* de DNA

Foram conduzidos quatro ensaios para cada par de alelos antitéticos durante a fase de padronização das reações dos *pools*. Utilizou-se 10 µL de cada *pool* de DNA previamente constituído a uma concentração final de 0,1 µg/µL, conforme abordado anteriormente. Os *pools* para os ensaios dos alelos *DI*01/DI*02* foram nomeados como: *pool A* e *pool B*; enquanto que para os alelos *DI*02.03/DI*02.04*, foram nomeados como: *pool C* e *pool D* (FIGURA 7). Cada ensaio recebeu o nome do *pool* que foi utilizado para amplificação e foram realizados em triplicata.

As informações da constituição de cada ensaio estão descritas na tabela 6.

TABELA 6 - CONSTITUIÇÃO DOS ENSAIOS E POOLS PARA PADRONIZAÇÃO

Ensaio/ Pools	Constituição	Proporção	Finalidade
A	5 µL DNA Di (a+b+) + 45 µL DNA Di (a-b+)	1:9	Avaliar amplificação com o mínimo de DNA disponível com alelo <i>DI*01</i>
B	50 µL DNA Di (a-b+) diferentes indivíduos	1:1	Avaliar ocorrência de amplificação inespecífica para o alelo <i>DI*01</i>
C	5 µL DNA Wr (a+b-) + 45 µL DNA Wr (a-b+)	1:9	Avaliar amplificação com o mínimo de DNA disponível com alelo <i>DI*02.03</i>
D	50 µL DNA Wr (a-b+) diferentes indivíduos	1:1	Avaliar ocorrência de amplificação inespecífica para o alelo <i>DI*02.03</i>

Fonte: Própria.

Figura 7 - Esquema de montagem dos mixes para padronização das reações. Esquema demonstrando a constituição dos mixes para padronização das reações em cada ensaio. Ensaios para os alelos *DI*01/DI*02* são: A e B; ensaios para os alelos *DI*02.03/DI*02.04* são: ensaios D e E. Fonte: Própria.

5.9 Amplificação individualizada

A amplificação individualizada ocorreu após a identificação da amplificação para os alelos *DI*01* e/ou *DI*02.03* em uma reação de *qPCR* do *pool*. A figura 8 exemplifica o processo.

Figura 8 - Fluxo da amplificação individualizada a partir da identificação do alelo *DI*01* na reação do *pool*. Esquema de seleção das amostras para amplificação individualizada. No exemplo, o *pool* é constituído por 10 µL de cada amostra (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) e segue para análise em *qPCR* dos alelos *DI*01/DI*02*. O resultado demonstra a amplificação do fluoróforo FAM (azul) que corresponde ao alelo *DI*01*. As amostras que constituíram o *pool* são selecionadas para amplificação individualizada em *qPCR* para os mesmos alelos do teste do *pool*. Com o resultado, é possível afirmar qual amostra possui o alelo *DI*01*. Fonte: Própria.

5.10 Construção do vetor para clonagem dos alelos *DI*01* e *DI*02.03*

5.10.1 Reação de amplificação dos fragmentos-alvo

As regiões-alvo do DNA foram obtidas dos produtos amplificados por reação em cadeia da polimerase em tempo real (*qPCR*) de acordo com o protocolo previamente mencionado.

Esses produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel *Low Melting* 2% (Sigma-Aldrich, EUA) para observação das bandas-alvo, que foram devidamente removidas do gel para posterior purificação com o kit *QIAEx II Gel Extraction* (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

5.10.2 *Ligação do fragmento de DNA amplificado ao vetor*

Foram utilizados 4 µL do produto de PCR, 1 µL de solução salina e 1 µL do vetor PCR 2,1-TOPO (Invitrogen, EUA) em um microtubo. Após esse momento, o microtubo foi homogeneizado e incubado em temperatura ambiente por 30 minutos.

5.10.3 *Preparação de placas LB Agar*

O meio LB Agar foi solubilizado em micro-ondas, fracionado em tubos de polipropileno de 50 mL, ligeiramente resfriado e adicionado 50 µL do antibiótico ampicilina (100 mg/mL) para posterior homogeneização. Em seguida, foram adicionados 35 mL do volume total em placas de cultura de 150 mm³ para aguardar a solidificação com a tampa aberta em fluxo laminar.

Com a uma haste de vidro, foi cuidadosamente espalhado por toda a placa 40 µL de IPTG (1M) e 80 µL de X-Gal (20 mg/mL), e manteve-se a placa com a tampa aberta em fluxo laminar no escuro para secagem.

5.10.4 *Transformação bacteriana*

Para transformação bacteriana foram utilizadas bactérias competentes (*E. coli*) do Laboratório de Biologia Molecular da Hemocentro de Ribeirão Preto que estavam armazenadas em *freezer* -80°C. As bactérias foram descongeladas em gelo por aproximadamente 15 minutos e um volume 40 µL de bactérias foram distribuídas em microtubos pré-resfriados no gelo. Foram adicionados 2 µL dos produtos da PCR com os alelos de interesse (*DI*01* e *DI*02.03*)

à alíquota de bactérias competentes do microtubo e em seguida foram incubadas em repouso no gelo por 30 minutos. Após esse passo, cada microtubo com esta mistura foi submetida ao choque térmico em banho-maria a 42°C durante 1 minuto e em seguida mantidas no gelo por mais 15 minutos.

Em seguida, foram adicionados 270 µL de meio SOC (Invitrogen, EUA) previamente aquecido e os microtubos foram incubados a 37°C sob agitação constante durante 60 minutos. Com a placa LB Ágar previamente preparada e identificada como o nome dos alelos de interesse, ao término desse tempo, as bactérias foram plaqueadas e incubadas *overnight* a 37°C

5.10.5 Crescimento de bactérias

Foram adicionados 5 mL de meio LB líquido contendo 5 µL de ampicilina (100 mg/mL) em tubos de polipropileno de 50 mL identificados com o nome dos alelos (*DI*01* e *DI*02.03*). Com palitos autoclavados, foram coletadas três colônias brancas isoladas provenientes de cada placa LB Ágar e então, cada palito com uma colônia foi introduzido no tubo de polipropileno e incubado *overnight* a 37°C sob agitação constante. O crescimento bacteriano foi observado por turvação do meio de cultura.

5.10.6 Extração de DNA plasmidial

As bactérias em meio líquido foram centrifugadas a 2.383G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a seguir foi realizada a extração de DNA plasmidial com uso do kit *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi eluído em 50 µL de água nuclease *free* (Promega, Alemanha) e quantificado pelo Nanodrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) na técnica de espectrofotometria de absorvância 260/280 nm para avaliação da concentração e pureza.

5.10.7 Amplificação do DNA plasmidial

Para confirmação da clonagem dos alelos *DI*01* e *DI*02.03* no vetor referência, foi realizada uma *qPCR* conforme protocolo já definido para sua identificação.

5.11 Comparação das frequências genotípicas com a literatura

As frequências genotípicas para *DI*01* e *DI*02* foram comparadas com outros estudos brasileiros e a análise da frequência foi realizada com o cálculo da diferença estatística pelo método Chi-quadrado (disponível em: socscistatistics.com/tests/chisquare2/default2.aspx).

6 RESULTADOS

Com o objetivo inicial de padronizar a ferramenta neste trabalho, foram comparados os resultados da fenotipagem das amostras controle a genotipagem. Esses testes também serviram para avaliar a correta amplificação dos alelos.

A figura 9 demonstra os resultados da amplificação das amostras controle. Nos gráficos 1 e 2, o fluoróforo FAM (curva em azul) representa o alelo *DI*01* e o VIC (curva em verde) representa o alelo *DI*02*. Nos gráficos 3 e 4, o fluoróforo FAM (curva em azul) representa o alelo *DI*02.03* e o VIC (curva em verde), o alelo *DI*02.04*. O resultado dos quatro ensaios evidenciou a amplificação dos alelos esperados de acordo com as amostras controle e que não houve inibição da reação. Sobre o fenótipo informado e a genotipagem, obteve-se 100% de concordância.

Figura 9 - Resultado da amplificação em *qPCR* das amostras controle. Amplificação por *qPCR* das amostras controle com fenotipagens conhecidas fornecidas pelo Laboratório de

Imuno-hematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto e pelo Hemocentro de Santa Catarina. Gráfico 1: Amostra controle $DI*01/DI*02$ – fenótipo inferido Di (a+b+); gráfico 2: Amostra controle $DI*02/DI*02$ – fenótipo inferido Di (a-b+); gráfico 3: amostra controle $DI*02.03/DI*02.03$ – fenótipo inferido Wr (a+b-) e gráfico 4: amostra controle $DI*02.04/DI*02.04$ – fenótipo inferido Wr (a-b+). Fonte: Própria.

Em seguida, foi avaliada se haveria amplificação quando as amostras estivessem reunidas em *pools*, uma vez que ocorre a diluição da amostra e uma menor concentração dos alelos de interesse tem que ser detectada ($DI*01$ e $DI*02*03$). Os resultados podem ser observados na Figura 10 (Ensaio A e C). O resultado foi satisfatório, pois as curvas demonstraram excelente amplificação.

Buscou-se ainda investigar a especificidade da reação (Figura 10 – Ensaio B e D). O resultado demonstrou que não houve amplificação inespecífica dos alelos $DI*01$ e $DI*02*03$ pois nenhum sinal de fluorescência foi detectado para esses alelos durante a amplificação por *qPCR*.

Figura 10 – Resultados da amplificação dos ensaios de padronização das reações em *pools*. Padronizações da amplificação por *qPCR* utilizando *pools* de DNA. A: Amplificação para o

alelo *DI*01* na diluição 1:9, utilizando 1 parte *DI*01/DI*02* e 9 partes *DI*02/DI*02*; B: Ausência de amplificação para o alelo *DI*01* quando não presente na reação; C: Amplificação para o alelo *DI*02.03* quando ele está na diluição 1:9, utilizando 1 parte *DI*02.03/DI*02.03* e 9 partes *DI*02.04/DI*02.04*; D: Ausência de amplificação para o alelo *DI*02.03* quando não presente na reação. Fonte: Própria.

Decidiu-se construir clones referência para os alelos *DI*01* e *DI*02.03* a fim de serem utilizados como controle em reações futuras de *qPCR*. Após a transformação bacteriana e extração do DNA plasmidial, a análise por *qPCR* revelou a presença de dois clones com o genótipo *DI*02* (Figura 11 - A) e três clones com o genótipo *DI*02.03* (Figura 11- B). No entanto, a reação de *qPCR* revelou que não houve amplificação para o clone *DI*01* (Figura 11 - A).

Foram amplificados 42 *pools* de DNA de doadores de sangue para os alelos *DI*01/DI*02* e *DI*02.03/DI*02.04* de acordo com o preconizado nesta pesquisa e destes, foram abertos cinco *pools* com amplificação para o alelo *DI*01*, que revelou cinco amostras *DI*01/DI*02* quando realizada a genotipagem individualizada.

Figura 11 - Resultado da amplificação em *qPCR* do clone dos alelos *DI*02* e *DI*02.03*. Amplificação dos alelos *DI*02* e *DI*02.04* clonado no vetor TOPO e que serão utilizados como controle positivo em testes moleculares futuros. Gráfico A: Observa-se amplificação para o fluoróforo VIC (verde) correspondente ao alelo *DI*02* e ausência de amplificação no fluoróforo FAM (azul), que representa o alelo *DI*01*; Gráfico B: observa-se amplificação para o fluoróforo FAM (azul) que corresponde ao alelo *DI*02.04* e ausência de amplificação para VIC (verde), que representa o alelo *DI*02.04*. Em vermelho está representada a fluorescência passiva ROX. Fonte: Própria.

Das amostras de pacientes, foram constituídos 23 *pools* de DNA para os mesmos alelos supracitados e foram abertos três *pools* que demonstraram amplificação para *DI*01*. A genotipagem individualizada das amostras desses *pools* revelou três resultados *DI*01/DI*02* sendo uma delas de uma paciente com doença falciforme.

Os resultados obtidos foram catalogados e as tabelas de 7 a 10 demonstram as frequências genóticas e alélicas para as diferentes populações estudadas.

Em doadores de sangue, 405 amostras apresentam o genótipo homozigoto *DI*02/DI*02* e 5, o genótipo heterozigoto *DI*01/DI*02*. Em pacientes, 227 amostras possuem o genótipo *DI*02/DI*02* e 3, o genótipo heterozigoto *DI*01/DI*02*. Todas as amostras de doadores e pacientes apresentam o genótipo *DI*02.03/DI*02.03*. A incidência dos diferentes genótipos em doadores e pacientes encontra-se na tabela 7.

TABELA 7 – FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DOS ALELOS *DI*01* E *DI*02* EM DOADORES DE SANGUE E PACIENTES

Genótipo	Doadores de sangue		Pacientes	
	Número	Frequência	Número	Frequência
<i>DI*02/DI*02</i>	405	0,988	227	0,987
<i>DI*01/DI*02</i>	5	0,012	3	0,013
<i>DI*01/DI*01</i>	0	0	0	0
<i>DI*02.04/DI*02.04</i>	410	1	230	1
<i>DI*02.03/DI*02.04</i>	0	0	0	0
<i>DI*02*03/DI*02.03</i>	0	0	0	0

Fonte: Própria.

Quanto a frequência alélica verificada nessas populações, tanto em doadores de sangue quanto na população de pacientes, a frequência alélica é a mesma. O alelo *DI*01* corresponde a 0,006 e *DI*02* a 0,994. As duas populações também o mesmo perfil para os alelos *DI*02.03* e *DI*02.04*, correspondendo com 1 e 0 respectivamente (TABELA 8)

TABELA 8 - FREQUÊNCIA DOS ALELOS *DI*01*, *DI*02*, *DI*02.03* E *DI*02.04* EM DOADORES DE SANGUE E PACIENTES

Alelos	Doadores de sangue		Pacientes	
	Número	Frequência	Número	Frequência
<i>DI*01</i>	5	0,006	3	0,006
<i>DI*02</i>	815	0,994	457	0,994
<i>DI*02.03</i>	0	0	0	0
<i>DI*02.04</i>	820	1	460	1

Fonte: Própria.

Ao estratificar o resultado da genotipagem dos pacientes, das 3 amostras positivas para o genótipo *DI*01/DI*02*, 1 era de um paciente com DF, sendo então considerado afrodescendente, enquanto as outras 2 eram de portadores de outras patologias. A incidência dos diferentes genótipos em pacientes com DF e outras patologias encontra-se na tabela 9.

TABELA 9 – FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DOS ALELOS *DI*01* E *DI*02* EM PACIENTES DE DOENÇA FALCIFORME E OUTRAS PATOLOGIAS

Genótipo	Doença Falciforme		Outras patologias	
	Número	Frequência	Número	Frequência
<i>DI*02/DI*02</i>	29	0,967	198	0,990
<i>DI*01/DI*02</i>	1	0,033	2	0,010
<i>DI*01/DI*01</i>	0	0	0	0
<i>DI*02.04/DI*02.04</i>	30	1	200	1
<i>DI*02.03/DI*02.04</i>	0	0	0	0
<i>DI*02*03/DI*02.03</i>	0	0	0	0

Fonte: Própria.

Sobre a frequência alélica, pacientes com DF e portadores de outras patologias possuem frequência para o *DI*01* de 0,017 e 0,005; e para o alelo *DI*02*, 0,983 e 0,995, respectivamente. Ambas as populações possuem a frequência alélica de *DI*02.04* de 1 (TABELA 10).

TABELA 10 - FREQUÊNCIA DOS ALELOS *DI*01*, *DI*02*, *DI*02.03* E *DI*02.04* EM PACIENTES DE DOENÇA FALCIFORME E OUTRAS PATOLOGIAS

Alelos	Doença Falciforme		Outras patologias	
	Número	Frequência	Número	Frequência
<i>DI*01</i>	1	0,017	2	0,005
<i>DI*02</i>	59	0,983	398	0,995
<i>DI*02.03</i>	0	0	0	0
<i>DI*02.04</i>	60	1	400	1

Fonte: Própria.

A população brasileira é miscigenada e este estudo apresenta frequências genotípicas dos alelos *DI*01* e *DI*02* diferentes das encontradas em outros estudos brasileiros, então um estudo para análise da diferença estatística entre os resultados foi proposto.

Quando considerada a população de doadores de sangue deste trabalho com os demais, encontrou-se somente uma diferença estatística significativa ($p < 0,01$) quando comparada ao estudo da Cozac (2004). Em relação aos outros estudos, a análise não demonstrou essa diferença. A tabela 11 demonstra os resultados das diferentes frequências genotípicas entre os quatros trabalhos referência.

TABELA 11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE ESTUDOS SOBRE A FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DOS ALELOS *DI*01* E *DI*02* EM DOADORES DE SANGUE

Genótipos	Frequência da pesquisa		Frequência comparada		Estudo referência	p
	N	%	N	%		
<i>DI*01/DI*01</i>	0	0	0	0	Cozac, 2004 Ribeirão Preto, SP	<0,01
<i>DI*01/DI*02</i>	5	1,2	24	6,12		
<i>DI*02/DI*02</i>	405	98,8	368	93,87		
<i>DI*01/DI*01</i>	0	0	0	0	Baleotti, 2002 Marília, SP	0,3773
<i>DI*01/DI*02</i>	5	1,2	3	3,23		
<i>DI*02/DI*02</i>	405	8,8	90	96,77		
<i>DI*01/DI*01</i>	0	0	0	0	Latini et al, 2015, São Paulo, SP	0,0369
<i>DI*01/DI*02</i>	5	1,2	13	4,26		
<i>DI*02/DI*02</i>	405	98,8	292	95,74		
<i>DI*01/DI*01</i>	0	0	0	0	Bianchi, 2016, São Paulo, SP	0,4012
<i>DI*01/DI*02</i>	5	1,2	10	2,5		
<i>DI*02/DI*02</i>	405	98,8	390	97,5		

p<0,01 = Diferença estatisticamente significativa

Fonte: Própria.

Quando considerada a população de afrodescendentes, os estudos de frequência dos genótipos dos alelos *DI*01* e *DI*02* são escassos. Apesar deste trabalho verificar uma frequência de 3,3% do genótipo *DI*01/DI*02* – que é maior já verificada nessa população –

quando realizada a análise estatística de comparação com os resultados dos outros dois estudos referência, não houve diferença estatística relevante. A tabela 12 demonstra esses resultados.

TABELA 12 - COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE ESTUDOS DA FREQUÊNCIA GENOTÍPICA EM AFRODESCENDENTES

Genótipos	Frequência da pesquisa		Frequência comparada		Estudo referência	p
	N	%	N	%		
<i>DI*01/DI*01</i>	0	0	0	0	Cozac, 2004 Ribeirão Preto, SP	0,8011
<i>DI*01/DI*02</i>	1	3,3	0	0		
<i>DI*02/DI*02</i>	29	96,67	13	100		
<i>DI*01/DI*01</i>	0	0	0	0	Baleotti, 2002 Marília, SP	0,7449
<i>DI*01/DI*02</i>	1	3,3	1	1,2		
<i>DI*02/DI*02</i>	29	96,67	83	98,80		

p<0,01 = Diferença estatisticamente significativa
Fonte: Própria.

7 DISCUSSÃO

A proposta inicial deste trabalho é o desenvolvimento de uma ferramenta molecular para genotipagem de alto rendimento em *qPCR* para detecção dos alelos *DI*01/DI*02* e *DI*02.03/DI*02.04* em doadores de sangue, utilizando *pool* de DNA. Essa abordagem não havia sido descrita anteriormente, o que o torna de grande relevância por ser o primeiro a propor tal metodologia.

O sistema de grupo sanguíneo Diego, em especial seu antígeno Di^a , tem despertado interesse de estudo desde os anos 50. No entanto, quando se busca aplicação prática do conhecimento difundido na sociedade científica acerca do sistema no que tange a prática transfusional, não há grandes avanços.

Segundo um estudo de Cruz et al. (2011) no Hospital Israelita Albert Einstein que verificou a incidência de aloanticorpos em pacientes politransfundidos, o anticorpo contra o antígeno Di^a foi o quarto mais prevalente com 6,02% dentre todos os anticorpos e o mais prevalente dentre os anticorpos contra antígenos de baixa frequência. Um outro estudo realizado em um hospital holandês, publicado em 2003, tinha por objetivo verificar a prevalência de anticorpos contra antígenos de baixa prevalência, que variou de 0,3 a 10%, sendo o anti- Wt^a o mais prevalente (SCHONEWILLE; VAN ZIJL; WIJERMANS, 2003).

Ainda que estudos demonstrem altas taxas de aloimunização para esses antígenos, não existem métodos sorológicos eficientes na busca de doadores antígeno-negativo para Di^a e Wt^a , como também hemácias comerciais de pesquisa e painéis para identificação de anticorpos irregulares de algumas empresas ainda não oferecem a fenotipagem desses antígenos em seus antigramas para caracterização dos seus respectivos anticorpos.

O método preconizado e mais utilizados em rotinas imuno-hematológicas para detecção de antígenos de superfície da hemácia é o sorológico, cujo processo se baseia na aglutinação devido a uma reação de interação antígeno/anticorpo que, em diversos casos, só é visualizada com o uso da antiglobulina humana (AGH). Essa técnica é de extrema confiabilidade, porém, em casos específicos, não é recomendado que ela seja executada por haver a possibilidade de uma má interpretação dos resultados obtidos, como em casos de problemas de fenotipagem para pacientes com TAD positivo, seja por reação transfusional (RT), anemia hemolítica autoimune (AHAI), DHPN, uso de certos medicamentos e que tenham realizado transfusão alogênica

recente de concentrado de hemácias. Casos de fenótipos variantes e subgrupos também podem levar a resultados inconsistentes com os preconizados.

A utilização da fenotipagem em larga escala na busca de doadores é de forma geral desencorajada, pois algumas técnicas são laboriosas, requerem diversas lavagens das amostras, múltiplos processos de identificação e posterior análise de dados, que dificulta o processamento de um grande número de testes. Quando se aborda a questão da fenotipagem em larga escala para antígenos de baixa frequência em doadores, como Di^a e Wr^a, de forma profilática como já acontece com os antígenos dos sistemas: RH, KEL, JK, FY e MNS, a situação fica ainda mais complexa pois além de se considerar as dificuldades supracitadas, deve-se ainda contar com a indisponibilidade de antissoro que possua especificidade, volume, pureza, título e estabilidade confiável durante armazenamento.

Os testes sorológicos são classicamente desenvolvidos em tubos de hemólise, porém existe atualmente o cartão gel-teste, microplacas e a metodologia de fase sólida *Capture* (Immucor®, EUA) que utiliza tiras de 8 micropoços recobertos por anticorpo de cabra anti-murino e anticorpo anti-eritrocitário (CAPTURE-R SELECT, 2013) e são passíveis de semi-automatização, o que diminui o trabalho de bancada de forma geral, mas mesmo assim, no Brasil não existe antissoro comercial para fenotipagem dos antígenos Di^a e Wr^a.

No entanto, todos estes testes sorológicos são dependentes de graus de aglutinação (neg, ±, 1+, 2+, 3+, 4+ e DP), cuja inferência, ainda que bem descrita na literatura é sujeita ao observador, sendo subjetivo o resultado final. Dessa forma, a interpretação mal realizada pode trazer implicações sem maiores impactos na prática transfusional até aloimunização e graves RTs. Na prática, a interpretação desses resultados depende de múltiplos fatores e o manejo da informação resulta em dados nem sempre confiáveis quando no contexto da realidade hemoterápica, seja ela em um doador de sangue ou paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Na tentativa de auxiliar e complementar os testes sorológicos, surgiram os testes moleculares, à princípio, como mais uma ferramenta na elucidação de casos cujos antígenos não podiam ser determinados por testes sorológicos de aglutinação, uma vez que seus resultados não são influenciados por fatores como TAD positivo ou transfusões recentes, nem por questões de disponibilidade de antissoros comerciais confiáveis, por contratempos do uso de medicamentos ou condições da patologia de um enfermo, pois o DNA necessário para os testes é normalmente extraído do *buffy-coat*.

Atualmente, são descritas várias técnicas moleculares que podem ser utilizadas na inferência de antígenos de grupos sanguíneos, como por exemplo as técnicas com base na corrida em gel de eletroforese (*PCR-RFLP* e *PCR-AS*), as técnicas com base em sequenciamento (Sanger, minisequenciamento e técnicas em *array*) e outras técnicas (*qPCR*). O *PCR-RFLP* e *PCR-AS* utilizam a técnica de corrida em gel por eletroforese e são excelentes para análise de poucas amostras devido ao baixo custo. No entanto, possuem pouca robustez, são bem laboriosas, e existe um risco aumentado de contaminação pelo manejo das amostras pós PCR. Além disso, têm um baixíssimo potencial de automação (NESS; SLOAN; MOULDS, 2011).

Uma outra metodologia utilizada é o sequenciamento de Sanger, que oferece um alto poder de resolução, mas um baixíssimo poder de processamento por também se utilizar da técnica de gel de eletroforese. Ele utiliza na PCR uma técnica com nucleotídeos marcados com um fluoróforo, chamados desoxirribonucleotídeos trifosfatados (ddNTPs). Cada ddNTP possui um fluoróforo específico para cada nucleotídeo e não permitem que a PCR continue a ocorrer uma vez que ela é inserida ao acaso, o que permite que sejam visualizados fragmentos de diferentes tamanhos separados pela fluorescência de cada ddNTP (SMITH et al., 1985).

O minisequenciamento é bem utilizado pois oferece um excelente poder de resolução com um alto poder de processamento, porém a um custo relativamente alto diante dos padrões brasileiros. Trata-se basicamente de uma metodologia que utiliza ddNTPs em uma solução com produtos de um PCR *multiplex* como modelos e *primers* de detecção que são especialmente desenhados para se anelarem de forma adjacente ao sítio do polimorfismo e posteriormente serem analisados através de uma eletroforese capilar (PALACAJORNSUK et al., 2009).

Com alto poder de resolução e de processamento, existem as técnicas baseadas em arranjos de DNA (DNA *arrays*). Algumas técnicas de *array* e *microarrays* usam lâminas de vidro com *probes* de DNA inseridas, enquanto outras são baseadas em técnicas de pérolas (*beads*) e arranjos fluidificados (*fluidic array*). É uma tecnologia *multiplex* que serve para análise de múltiplos polimorfismos simultaneamente, porém, quando se trabalha com plataformas comerciais (BLOODChip ID®, Grifols, Espanha e BeadChip™, Immucor, EUA), o perfil do teste é fechado e inúmeras vezes, os polimorfismos que possuem não são adequados às populações estudadas ou não possuem os polimorfismos de interesse (NESS; SLOAN; MOULDS, 2011; WU; CSAKO, 2006).

Já o *qPCR* possui médio poder de resolução e de processamento. Sua tecnologia utiliza os parâmetros da PCR convencional, porém a sua maior inovação é que a amplificação do DNA pode ser mensurada em tempo real, a cada ciclo. Se forem utilizados equipamentos de alta resolução e *dyes* com excelente qualidade, também é possível a utilização da curva de *melting* para análise do produto da PCR. Além do mais, essa metodologia não necessita de manejo pós amplificação, o que diminui o risco de contaminação, tem um bom custo benefício e possui um alto potencial de automação (WU; CSAKO, 2006).

Gerenciamento do tempo pode definir os próximos passos na terapia transfusional em determinadas situações, logo, a escolha da técnica molecular mais adequada para resolução de casos complexos, sendo a abordagem na busca de doador genótipo compatível com o paciente ou na determinação antigênica correta do receptor, é circunstância de suma importância.

A metodologia de *qPCR* foi escolhida nesta pesquisa por ter um potencial grande de automação, uma rápida performance de PCR e o fato do processo de amplificação e detecção dos amplicons ser realizada em um sistema que minimiza o risco de contaminação pela manipulação do produto pós reação (POLIN et al., 2008; WU; CSAKO, 2006). Em outros trabalhos já foi descrito que o método para genotipagem de grupos sanguíneos é confiável e ainda permite que o procedimento seja feito em larga escala, com vantagem de detectar o par de alelos antitéticos em amostras heterozigotas e com custo acessível (ARAÚJO et al., 2002; NOVARETTI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2015).

O *pool* de DNA proposto nesse trabalho tornou viável a genotipagem em larga escala, já que ele possibilita um menor número de reações com maior quantidade de amostras. A escolha do *pool* com 10 amostras se deu por entender que a concentração ótima de DNA para a *qPCR* é entre 0,01 a 0,1 µg (POLIN et al., 2008), logo, os cálculos de diluição poderiam ser simplificados para que fosse constituído um *pool* de 10 diferentes amostras de DNA, cuja parte de cada amostra correspondesse a uma concentração de DNA de 0,01 µg, totalizando no *pool* constituído, 0,1 µg.

Durante a fase de padronização, foi verificado que *pools* contendo um mínimo de 0,01 µg/µL de DNA com o alelo de interesse, já era suficiente para que houvesse amplificação. Foi possível demonstrar também nessa fase que havendo 0,1 µg/µL, não haveria perda na qualidade da reação.

O *pool* de 10 amostras foi escolhido por uma facilidade metodológica em relação aos cálculos de volume e concentração de DNA, além de ser razoavelmente simples e rápido de

constituí-lo. No entanto, houve uma dúvida o *pool* de 10 amostras era o ideal na pesquisa de um alelo com uma frequência esperada de mais de 5% das amostras ($DI*OI$), o que significaria que, ao acaso, em 100 amostras coletadas de doadores voluntários e considerando uma dispersão homogênea do alelo nesses doadores, abriríamos 5 *pools* em 10, o que poderia não ser interessante pela inviabilidade de custos e empregabilidade para essa população. Já para o estudo da população afrodescendente selecionada, esperava-se uma frequência de $DI*OI$ próxima a zero.

De qualquer forma, decidiu-se trabalhar com essa metodologia pois ela pode ser facilmente repadronizada com menor número de amostras desde que se obedeça ao protocolo original de se trabalhar com a concentração final do DNA em 0,1 µg no *pool* constituído.

O resultado da frequência encontrada do fenótipo deduzido Di (a+b+) em doadores de sangue foi de 1,2%, resultado bem diferente do último levantamento realizado em Ribeirão Preto por Cozac (2004) e na cidade de São Paulo com doadores da Colsan por Latini et al. (2014), que encontraram uma frequência de 6,12% e 4,26% respectivamente. Um outro estudo conduzido com 392 doadores da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo em 2016, encontrou uma frequência de 2,5% para esse fenótipo (BIANCHI, 2016). A análise estatística demonstrou que só há diferença estatística significativa ($p < 0,01$) com o estudo de Cozac (2004).

Poole, em 1999, em uma revisão sobre o sistema Diego, descreve que a frequência do fenótipo Di (a+b+) em doadores é de menos de 0,1%, quando excluídos asiáticos e indígenas, que são populações com frequência aumentada de Di^a . Um estudo de implementação de metodologia molecular em *microarray* para busca de doadores raros em Milão, na Itália (REVELLI et al., 2011), detectou uma frequência de 0,2% do antígeno Di^a em uma amostragem de 1304 indivíduos.

Considerando a imigração de europeus motivada pela cafeicultura na região durante o final do século XIX e início do século XX, em 1902 eram 52.929 habitantes totais com 33.199 (62%) europeus e desses, 27.765 (83,6%) eram italianos (SANTOS, 2006). No último censo em 2010, a população de Ribeirão Preto era de 604.682 habitantes, sendo que 106.945 residentes eram de fora do Estado de São Paulo e 1.173 estrangeiros. A população de asiáticos era de 5651 e de indígenas 565, que correspondem respectivamente a 0,9% e 0,09% da população total, sendo considerados virtualmente insignificantes na massa geral de brancos, negros e pardos (421.800, 38.483 e 138.056 habitantes respectivamente) (IBGE, 2010a, 2010b).

Essa baixa frequência pode ser explicada pela própria característica da colonização da região que é primordialmente de caucasianos italianos, cuja frequência do antígeno Di^a é baixa (REVELLI et al., 2011) e pelo fato que 62% dessas amostras de doadores foram coletadas de universitários, que é uma população heterogênea dada a própria característica do ambiente universitário de Ribeirão Preto. O município apresenta alta taxa de imigração, com cerca de 7,58 novos habitantes para cada 1.000, enquanto que no resto do estado de São Paulo, o índice é de 1,21 (IBGE, 2010b).

Apesar dos achados dessa pesquisa apresentarem uma frequência para Di^a menor que em outros estudos, deve-se considerar que ela ainda é representativa pois corresponde a um aumento de mais 10% na frequência do antígeno em doadores quando comparado ao estudo de Poole (1999).

Todas essas informações corroboram no entendimento de que essa migração motivada por diversas razões, inclusive a educacional de jovens universitários, influencia no encontro de uma menor frequência do alelo *DI*01* quando comparado com outros estudos.

Um dado interessante observado nesse estudo é que dentro da população de pacientes estudada, foi possível identificar um indivíduo afrodescendente que possui o antígeno Di^a, cuja frequência de 3,3% é maior do que os relatos na literatura. O mesmo estudo de Cozac, em 2004, não evidenciou nenhum afrodescendente com a presença desse antígeno em Ribeirão Preto e o estudo de Baleotti, em 2002, identificou um somente um indivíduo afrodescendente com fenótipo Di (a+b+) na região de Marília (São Paulo), o que corresponde a 1,19%. A análise estatística não apresentou diferença estatística significativa entre os resultados dos estudos.

Com a globalização, os fenômenos migratórios têm colaborado para que as características de uma determinada população não fiquem restritas a ela, mas se difundam entre outras populações. É possível então assumir que o antígeno Di^a já é notado em populações afrodescendentes e/ou a presença do gene da HbS é que ganhou espaço em populações cujo antígeno Di^a é frequente, já que esse gene tem uma prevalência estimada em 2015 de 43 milhões de indivíduos heterozigotos e 4.4 milhões de portadores de doença falciforme (VOS et al., 2016). Esse estudo não dispôs de ferramentas para discutir essa questão.

De qualquer forma, não é registrado na literatura outra localidade no Brasil que tenha encontrado uma frequência para o alelo *DI*01* tão alta em afrodescendentes quanto a demonstrada neste estudo.

Não foram encontrados indivíduos Di (a+b-) em nenhuma das populações estudadas. Isso já é esperado dado o fato do alelo *DI*02* ser de alta prevalência em todas as populações (REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012). Um estudo multicêntrico desenvolvido nos EUA por Klapper, (2011), verificou apenas um indivíduo Di (b-) em uma amostragem de 7.307, o que corresponde a uma frequência de 0,013% desse fenótipo; e o estudo de Baleotti (2002) com amostras de indígenas da tribo Parakanã, encontrou uma prevalência de 38,6% desse fenótipo.

Os antígenos Di^a e Di^b são antitéticos, o que significa que um sempre deve existir na ausência do outro e por essa razão, a possibilidade de se encontrar um doador Di (b-), é somente se ele tiver dupla dose para o antígeno Di^a, uma vez que o fenótipo Di (a-b-) em doadores é inexistente pois essa condição é incompatível com a vida de um indivíduo saudável (DANIELS, 2002).

A metodologia empregada neste trabalho também pode ser destinada na busca de doadores com ausência de alelos de alta frequência, como é o caso do *DI*02*, pois dispõe de robustez compatível com exames em alta escala.

Não foram encontrados indivíduos de nenhuma das populações estudadas com fenótipos deduzidos Wr (a+b+) ou Wr (a+b-). Esse resultado já era esperado frente a altíssima frequência do alelo *DI*02.04* que é de mais de 99% em todas as populações do planeta (REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012) e é inclusive reproduzido em outros estudos brasileiros (ARNONI et al., 2015; BIANCHI, 2016; LATINI et al., 2014; MUNIZ et al., 2015).

8 CONCLUSÕES

A ferramenta molécula por *qPCR* para discriminação dos alelos *DI*01/DI*02* e *DI*02.03/DI*02.04* utilizando *pool* de DNA foi padronizada e validada com acurácia em 100% dos resultados com as amostras controle. Ela é custo-efetiva para a triagem de doadores em larga escala e busca de doadores raros, assim como para uso em pacientes candidatos a múltiplas transfusões com segurança. A metodologia ainda possui versatilidade para ser adaptada a pesquisa de outros genótipos de diferentes sistemas de grupos sanguíneos.

A frequência encontrada dos genótipos e alelos em doadores de sangue é correspondente a outros relatos da literatura, com exceção do trabalho de Cozac (2004) quanto ao genótipo *DI*01/DI*02*, o que pode ser explicado pela alta prevalência de amostras de universitários durante o período de coleta das amostras.

Em relação aos pacientes, encontrou-se uma prevalência de 3,3% para o genótipo *DI*01/DI*02*, o que, em frequência absoluta, é a maior encontrada nessa população. No estudo de Baleotti, em 2002, foi identificado um indivíduo afrodescendente com esse genótipo, observando-se uma frequência de 1,2%. Apesar deste estudo ter encontrado uma prevalência de mais de 50% sobre os achados de Baleotti, não diferença estatística significativa entre eles.

Não foram encontrados indivíduos com os genótipos *DI*01/DI*01*, *DI*02.03/DI*02.03* e *DI*02.03/DI*02.04* nas populações estudadas neste trabalho.

Foram construídos clones para dois alelos, *DI*02* e *DI*02.03*. A clonagem do fragmento do alelo que codifica o antígeno W_r^a oferece uma vantagem excelente, pois, como ele é um antígeno que ocorre em menos de 0,1% da população, há a dificuldade em se obter amostra de origem humana que sirva de controle positivo em testes moleculares. Com essa clonagem, uma amostra humana W_r^a (+) já não é mais necessária.

Não foi possível construir os clones para o alelo *DI** devido à zigozidade da amostra controle, que dificultou a seleção do alelo, havendo então a clonagem do seu par antitético *DI*02*.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. et al. An Antibody , in the Serum of a Wr (a +) Individual , Reacting with an Antigen of Very High Frequency. **Transfusion**, v. I, n. 5, p. 290–291, 1971.

ANSTEE, D. et al. Rare Blood: An ISBT Working Party Report on Rare Blood Donors. **Vox Sanguinis**, v. 77, p. 58–62, 1999.

ARNONI, C. P. et al. A simple approach to screen rare donors in Brazil. **Immunohematology**, v. 31, n. 1, p. 20–23, 2015.

ARRIAGA, F. et al. Incidence of Wra antigen and anti-Wra in a Spanish population. **Transfusion**, v. 45, n. 8, p. 1324–1326, 2005.

BALEOTTI, W. **ESTUDO MOLECULAR DOS ALELOS DI A /DI B E DA BANDA 3-MEMPHIS NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2002.

BANZHAF, A. N. D. J. C.; GREENDYKE, R. M. Occurrence of Anti-Wra in Blood Donors and in Selected Patient Groups , with a Note on the Incidence of the Wra Antigen. **Transfusion**, v. 17, n. 6, p. 621–624, 1977.

BÉGAT, C. et al. Revisiting the Diego Blood Group System in Amerindians: Evidence for Gene-Culture Comigration. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–14, 2015.

BIANCHI, J. V. S. **Genotipagem de grupos sanguíneos por meio de microarranjos líquidos**. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo, 2016.

BRUCE, L. J. et al. Band 3 HT, a human red-cell variant associated with acanthocytosis and increased anion transport, carries the mutation Pro-868-->Leu in the membrane domain of band 3. **The Biochemical journal**, v. 293, p. 317–320, 1993.

BRUCE, L. J. et al. Band 3 Memphis variant II: Altered stilbene disulfonate binding and the Diego (Dia) blood group antigen are associated with the human erythrocyte band 3 mutation Pro854-->Leu. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 23, p. 16155–16158, 1994.

BRUCE, L. J. et al. Changes in the Blood Group Wright Antigens Are Associated With a Mutation at Amino Acid 658 in Human Erythrocyte Band 3: A Site of Interaction Between Band 3 and Glycophorin A Under Certain Conditions. **Blood**, v. 85, n. 2, p. 541–547, 1995.

CASTILHO, L. Imuno-hematologia molecular: onde estamos e para onde vamos? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 4, p. 216–217, 2009.

CONTRERAS, M.; LUBENKO, A. The incidence of hemolytic disease of the newborn attributable to anti-Wr^a. **Transfusion**, v. 32, n. 1, p. 87–88, 1992.

COZAC, A. P. C. N. C. **Estudo do polimorfismo do sistema sanguíneo Diego em populações de brancos, asiáticos, negros, índios e doadores de sangue da região de Ribeirão Preto**. 2004, 171 f., Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

CRUZ, R. D. O. et al. Prevalence of erythrocyte alloimmunization in polytransfused patients. **Einstein**, v. 9, n. 2, p. 173–178, 2011.

DANIELS, G. **Human Blood Groups**. Second ed. Oxford: Blackwell Science, 2002.

DANIELS, G. L. et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens. **Vox sanguinis**, v. 80, n. 3, p. 193–196, 2001.

FAIRBANKS, G.; STECK, T. L.; WALLACH, D. F. H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. **Biochemistry**, v. 10, n. 13, p. 2606–2617, 1971.

FIGUEROA, D. The Diego blood group: a review. **Immunohematology**, v. 29, n. 2, p. 73–81, 2013.

HENN, B. M.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN, M. W. The great human expansion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 44, p. 17758–17764, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEORGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo demográfico 2010: resultado do universo – características da população e domicílios**, 2010a. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=354340&idtema=67&search=sao-paulo|ribeirao-preto|censo-demografico-2010:-resultados-do-universo-caracteristicas-da-populacao-e-dos-domicilios->>. Acesso em: 02.Jan.2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEORGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo demográfico 2010: resultados gerais da amostra**, 2010b. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=354340&idtema=87&search=sao-paulo|ribeirao-preto|censo-demografico-2010:-resultados-gerais-da-amostra->>. Acesso em: 02.Jan.2018.

IDEGUCHI, H. et al. Band 3-Memphis is associated with a lower transport rate of phosphoenolpyruvate. **British Journal of Haematology**, v. 82, p. 122–125, 1992.

JAROLIM, P. et al. Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 24, p. 11022–11026, 1991.

JAROLIM, P. et al. Band 3 Tuscaloosa: Pro327----Arg327 substitution in the cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 protein associated with spherocytic hemolytic anemia and partial

deficiency of protein 4.2. **Blood**, v. 80, n. 2, p. 523–529, 1992.

JAY, D.; CANTLE, L. Structural aspects of the red cell anion exchange protein. **Ann. Rev. Biochem**, v. 55, p. 511–538, 1986.

JUNQUEIRA, P. C. et al. The Diego blood group in brazilian indians. **Nature**, v. 177, n. 4497, p. 41, 1956.

JUNQUEIRA, P. C.; CASTILHO, L. The history of the Diego blood group. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 24, n. 1, p. 15–23, 2002.

KAY, M. M. B. et al. Brain membrane protein band 3 performs the same functions as erythrocyte band 3. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 7, p. 2778–2782, 1991.

KLAPPER, E. Implementation of HEA BeadChip System at Medical Centers: Providing Extended Matched Units and Eliminating Complex Workups for Patients. In: NESS P., SLOAN S., M. J. (Ed.). . **BeadChip Molecular Immunohematology**. New York, NY: Springer, 2011. p. 57–71.

KODIPPILI, G. C. et al. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. **Blood**, v. 113, n. 24, p. 6237–6245, 2009.

LATINI, F. R. M. et al. A new strategy to identify rare blood donors: Single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles. **Blood Transfusion**, v. 12, n. SUPPL.1, 2014.

LAYRISSE, M.; ARENDS, T. The Diego Blood Factor in Chinese and Japanese. **Nature**, v. 177, n. 4519, p. 1083–1084, 1956.

LAYRISSE, M.; ARENDS, T. The Diego System - Steps in the investigation of a New Blood Group System. Further Studies. **Blood**, v. 12, n. 2, p. 115–122, 1957a.

LAYRISSE, M.; ARENDS, T. The Diego Blood Factor in Negroid Populations. **Nature**, v. 179, n. 4557, p. 478–479, 1957b.

LAYRISSE, M.; ARENDS, T.; DOMINGUEZ, S. R. Nuevo grupo sanguíneo encontrado en descendientes de Indios. **Acta Med Venezolana**, v. 3, p. 132–138, 1955.

LAYRISSE, M.; WILBERT, J. Absence of the Diego antigen, a genetic characteristic of early immigrants to South America. **Science**, v. 134, p. 1077–1078, 1961.

LEVINE, P. et al. Rare Human Isoagglutinins and Their Identification. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 24, n. 3, p. 292–304, 1954.

LEWIS, M. et al. The Blood Group Antigen Diego in North American Indians and in Japanese. **Nature**, v. 177, n. 4519, p. 1084–1084, 1956.

LEWIS, M. et al. The Diego Blood Groups : A Genetic Linkage Analysis. **American journal of human genetics**, v. 28, p. 18–21, 1976.

LOW, P. S. Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane—peripheral protein interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 864, n. 2, p. 145–167, 1986.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Imuno-Hematologia Laboratorial**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

MOHANDAS, N. et al. Molecular basis for membrane rigidity of hereditary ovalocytosis. A novel mechanism involving the cytoplasmic domain of band 3. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 2, p. 686–692, 1992.

MOTA, M. A. et al. Applications of blood group genotyping. **Einstein**, v. 4, n. 1, p. 27–31, 2006.

MOTA, M. A. **Identificação do gene RHD em doadores de sangue fenotipados como RhD negativos utilizando pools de DNA**. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2012.

MUELLER, T. J.; MORRISON, M. Detection of a variant of protein 3, the major transmembrane protein of the human erythrocyte. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 19, p. 6573–6576, 1977.

MUNIZ, J. G. et al. Frequency of W_r^a antigen and anti- W_r^a in Brazilian blood donors. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 37, n. 5, p. 316–319, 2015.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (US). **Genetics Home Reference**. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SLC4A1#location>>. Acesso em: 26 jan. 2018.

NESS, P. M. M.; SLOAN, S. R. M.; MOULDS, J. M. R. **BeadChip Molecular Immunohematology**. New York, NY: Springer, 2011.

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

OKUBO, K. et al. Red blood cell band 3. Lysine 539 and lysine 851 react with the same H2DIDS (4,4'-diisothiocyanodihydrostilbene-2,2'-disulfonic acid) molecule. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 3, p. 1918–1926, 1994.

PALACAJORNSUK, P. et al. Detection of blood group genes using multiplex SNaPshot method. **Transfusion**, v. 49, n. 4, p. 740–749, 2009.

PALATNIK, M. et al. The 60 and 63 kDa proteolytic peptides of the red cell membrane band-3 protein: their prevalence in human and non-human primates. **Human Genetics**, v. 86, p. 126–

130, 1990.

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

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

RANNEY, H. M. et al. Frequencies of Band 3 variants of human red cell membranes in some different populations. **British Journal of Haematology**, v. 75, n. 2, p. 262–267, 1990.

REID, M. E.; LOMAS-FRANCIS, C.; OLSSON, M. L. **The Blood Group Antigen FactsBook**. Third ed. San Diego: Academic Press, 2012.

REVELLI, N. et al. Implementation and Assessment of High-Throughput Donor Typing at the Milan, Italy, Immunohematology Reference Laboratory. In: NESS, P. M.; SLOAN, S. R.; MOULDS, J. M. (Eds.). **BeadChip Molecular Immunohematology**. New York, NY: Springer, 2011. p. 87–92.

SANTOS, J. R. **Imigração e Ascensão Social em Ribeirão Preto entre o final do século XIX e meados do XX**. In: XV Encontro Nacional de Estudos Populacionais. **Anais...**Caxambu, MG: 2006Disponível em: <<http://www.webcitation.org/68UTAiXgR>>

SCHONEWILLE, H.; VAN ZIJL, A. M.; WIJERMANS, P. W. The importance of antibodies against low-incidence RBC antigens in complete and abbreviated cross-matching. **Transfusion**, v. 43, n. 7, p. 939–944, 2003.

SHOWE, L. C.; BALLANTINE, M.; HUEBNER, K. Localization of the gene for the erythroid anion exchange protein, band 3 (EMPB3), to human chromosome 17. **Genomics**, v. 1, n. 1, p. 71–76, 1987.

SMITH, L. M. et al. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 7, p. 2399–2412, 1985.

SPRING, F. A. et al. A red cell band 3 variant with altered stilbene disulphonate binding is associated with the Diego (Dia) blood group antigen. **The Biochemical Journal**, v. 288 (Pt 3), p. 713–716, 1992.

SQUIRES, A. et al. Hemolytic Disease of the Newborn Caused by Anti-Wright (Anti-Wr^a): Case Report and Review of the Literature. **Neonatal Network: The Journal of Neonatal Nursing**, v. 31, n. 2, p. 69–80, 2012.

TANNER, M. J. A. The structure and function of band 3 (AE1): Recent developments (Review). **Molecular Membrane Biology**, v. 14, n. 4, p. 155–165, 1997.

TELEN, M. J.; CHASIS, J. A. Relationship of the human erythrocyte Wrb antigen to an interaction between glycophorin A and band 3. **Blood**, v. 76, n. 4, p. 842–848, 1990.

VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1545–1602, 2016.

WALLIS, J. P. et al. The incidence of anti-Wr^a and Wr^a antigen in blood donors and hospital patients. **Transfusion Medicine**, v. 6, n. 4, p. 361–364, 1996.

WU, Y. Y.; CSAKO, G. Rapid and/or high-throughput genotyping for human red blood cell, platelet and leukocyte antigens, and forensic applications. **Clinica Chimica Acta**, v. 363, n. 1–2, p. 165–176, jan. 2006.

ZELINSKI, T. et al. The Diego Blood Group Locus Is Located on Chromosome 17q. **Genomics**, v. 17, n. 3, p. 665–666, 1993.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 21 de outubro de 2015.

Ofício nº 3757/2015
CEP/LVG

PROCESSO HCRP nº 9563/2014

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado **“APLICAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL PARA GENOTIPAGEM DE PACIENTES COM MÚLTIPLAS TRANSFUSÕES” – Projeto de Pesquisa Versão 3 de 09/02/2015**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 416ª Reunião Ordinária realizada em 19/10/2015, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como a Criação de Biorrepositório e Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico Versão 1 de 07/10/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

PROF. DR. LUÍS VICENTE GARCIA
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
EVANDRA STRAZZA RODRIGUES SANDOVAL
SIMONE KASHIMA HADDAD (Orientadora)
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) fornecido aos doadores de sangue e pacientes participantes da pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário Monte Alegre

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA:

“Genotipagem de grupos sanguíneos em doadores de sangue e pacientes com múltiplas transfusões”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Profa Dra. Simone K. Haddad e Evandra S. R. Sandoval

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo corpo clínico do Hemocentro de Ribeirão Preto em conjunto com os pesquisadores do Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP. O objetivo deste trabalho é melhorar os testes diagnósticos para os antígenos eritrocitários de grupos sanguíneos.

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

Os eritrócitos ou hemácias são as células vermelhas que estão presentes no sangue. Na superfície dos eritrócitos encontram-se importantes proteínas que podem ser distintas entre os indivíduos, uma vez que são herdadas geneticamente. No caso de transfusões sanguíneas, deve-se conhecer as proteínas da superfície dos eritrócitos para evitar reações indesejadas. A melhor forma para identificar as proteínas da superfície dos eritrócitos é a análise por testes sorológicos seguida da avaliação do DNA de cada indivíduo. Desta forma, esta pesquisa procura melhorar o teste de DNA para a análise das proteínas da superfície dos eritrócitos.

Como será feita esta pesquisa?

Se você concordar em participar desta pesquisa e assinar este termo de consentimento, utilizaremos a sua amostra de sangue para analisar as proteínas presentes nas células vermelhas.

Quanto tempo durará a pesquisa?

A pesquisa será concluída em dois anos.

O que será feito com as amostras de DNA remanescentes a este estudo?

As amostras de DNA remanescentes a esta pesquisa serão conservadas no banco de amostras biológicas do Laboratório de Biologia Molecular para análises futuras, com finalidade científica, como você já concordou.

Como você vai participar da pesquisa, e quais são os riscos que podem ocorrer?

A pessoa que participar desta pesquisa concordará na utilização de 5 mL de seu sangue. Não será necessária a coleta de uma nova amostra de sangue, uma vez que serão utilizadas amostras que seriam descartadas após a realização de exames clínicos.

O que acontece se eu não aceitar em participar?

Caso não queira participar, o seu seguimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu atendimento e tratamento.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a melhorar o diagnóstico das proteínas presentes nas células vermelhas. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Garantimos o direito de receber respostas e esclarecimentos de quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, bem como a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu atendimento ou tratamento.

Estamos à disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa. Neste caso, favor entrar em contato com Evandra S. Rodrigues Sandoval pelo telefone (16) 2101 9300 ramal 9606.

Nome do participante (datilografado ou em letra de fôrma)	Assinatura do participante	Data
Nome do pesquisador que aplicou o TCLE (datilografado ou em letra de fôrma)	Assinatura do pesquisador que aplicou o TCLE	Data