Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

JULIANA VIEIRA DOS SANTOS BIANCHI

Genotipagem de grupos sanguíneos por meio de microarranjos líquidos

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Prof. Dra. Ester Cerdeira Sabino

São Paulo

2016

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Bianchi, Juliana Vieira dos Santos

Genotipagem de grupos sanguíneos por meio de microarranjos
líquidos / Juliana Vieira dos Santos Bianchi. – São Paulo, 2016.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Ester Cerdeira Sabino

Descritores: 1. GENÓTIPOS. 2. GRUPOS SANGUÍNEOS. 3.
BANCOS DE SANGUE.

USP/IMTSP/BIB-02/2016.

Este trabalho é dedicado:

Primeiramente a Deus, por ter permitido que eu começasse e
concluísse este trabalho.

À minha filha Julia, que acompanhou, desde a barriga, grande
parte dos experimentos e das aulas e me motivou a não desistir,
mesmo diante de tantas dificuldades.

Ao meu marido Daniel, pelo companheirismo, paciência e amor
dedicado ao longo desses anos e por não me deixar desistir,
obrigada meu amor.

À minha mãe Neide e ao meu pai Adão, que foram meus
primeiros mestres e modelos, ensinando-me o
valor da honestidade e do trabalho.

A todos os meus professores que me ensinaram a amar essa
profissão e a me dedicar com todas as forças a ela.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Ester Sabino**, pela oportunidade de ser sua aluna e poder realizar este trabalho, por todos os ensinamentos e pelo conhecimento que me passou ao longo dos anos de convivência.

À minha amiga **Vivian Dionisio Tavares Niewiadonski**, pela parceria neste trabalho, por dividir minhas dúvidas e me ajudar em todas as etapas deste desafio.

À minha amiga e orientadora **Dra. Carla Luana Dinardo**, eu agradeço imensamente pelo auxílio na elaboração do artigo científico, pela paciência e pelos comentários sempre assertivos na dissertação desta tese. Agradeço também pelo empenho em conseguir os insumos para comparação do método OpenArray e ainda por tornar possível a introdução da metodologia na rotina da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo.

À minha amiga **Cecília Salete Alencar**, a quem devo todos os conhecimentos em sequenciamento. Agradeço também pela amizade e por ser companheira e conselheira, durante o desenvolvimento dos experimentos laboratoriais, e também na dissertação da tese.

À minha amiga e conselheira **Márcia Dezan**, pelo apoio científico e pela amizade que nasceu durante o desenvolvimento deste trabalho.

À **Dra. Mariza Mota**, pela disponibilização das amostras controles utilizadas neste trabalho e pelas valiosas sugestões na fase de qualificação.

Ao **Eduardo Jens** e **Thiago Pagliarini**, por me dar a primeira oportunidade dentro da Imuno-hematologia e pela indicação de minha orientadora, abrindo caminhos para o mundo da pesquisa.

A todos os meus amigos que passaram pelo Laboratório de Imuno-hematologia Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP, especialmente, **Karen Chinoca** e **Marilene Pazjos**, pela amizade e companheirismo, permitindo que dividíssemos nossas alegrias, angústias e experiências.

À **Silvia Leão Bonifácio** e **Victor Medeiros**, pela auxílio no desenvolvimento das técnicas moleculares envolvendo o BLOODchip.

Ao **Aparecido Braz** e **Roberta Carlutti**, pelo apoio na coleta das amostras biológicas e pelo auxílio na compra dos insumos utilizados neste trabalho.

Ao **Rodrigo Secolin** e toda equipe do laboratório de Genética Médica da Unicamp, por disponibilizar a utilização da plataforma OpenArray.

Ao **Prof. Dr. José Eduardo Levi**, pelas valiosas sugestões na qualificação para aprimorar este estudo.

Às minhas alunas **Vanessa, Ingrid, Márcia, Julia, Renata e Camila**, que participaram ativamente da implementação da técnica na rotina da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo e tornaram o sonho possível.

À **Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo**, por possibilitar a realização do estudo e a todos os doadores que gentilmente concordaram em participar desta pesquisa.

*“O saber se aprende com os mestres.
A sabedoria, só com o corriqueiro da vida.”*

Cora Coralina

RESUMO

Bianchi JVDS. Genotipagem de grupos sanguíneos por meio de microarranjos líquidos [tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Os sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários e plaquetários têm grande importância na medicina transfusional. Os serviços de hemoterapia têm investido cada vez mais em protocolos profiláticos à aloimunização contra antígenos eritrocitários, sendo o surgimento das plataformas de genotipagem em larga escala um avanço muito importante nesse âmbito. Este estudo tem por objetivo a padronização e a validação da plataforma OpenArray, por meio da técnica de microarranjos líquidos para genotipagem de antígenos eritrocitários e plaquetários em larga escala para futura implementação na rotina de doadores de sangue. Tal genotipagem permitirá a análise da frequência genotípica encontrada nos doadores de sangue da Fundação Pró-sangue/Hemocentro de São Paulo. **Métodos:** Foram analisadas 400 amostras de sangue total coletadas de doadores de sangue entre outubro e novembro de 2011. A genotipagem dos polimorfismos de troca de um nucleotídeo (*Single nucleotide polymorphism* - SNPs) que codifica os principais antígenos eritrocitários e plaquetários de relevância transfusional foi realizada utilizando a tecnologia OpenArray para as 400 amostras. Dessas, 242 também foram analisadas pela plataforma de genotipagem BLOODchip, em larga escala. Procedeu-se à comparação entre as técnicas em termos de acurácia, reprodutibilidade, número de resultados incorretos, número de resultados não amplificados ou indeterminados, possibilidade de customização dos ensaios, tempo total de duração da reação e número de amostras processadas por bateria. Foi também calculada a frequência genotípica dos SNPs e feita a comparação com dados prévios de literatura. **Resultados e discussão:** as amostras que foram testadas em ambas as plataformas apresentaram acurácia de 99,9% pela técnica OpenArray e 100% pela técnica BLOODchip, sendo os resultados discrepantes analisados por sequenciamento direto (técnica Sanger), confirmando os resultados obtidos pela genotipagem realizada no BLOODchip. Além disso, a técnica OpenArray apresentou maior número de resultados não amplificados ou indeterminados (*no call*), o que representa uma grande desvantagem do método, em decorrência da perda de insumos. Entretanto, a técnica OpenArray apresentou outras vantagens em relação ao BLOODchip, como a possibilidade de customização do ensaio, menor tempo para processamento das amostras, considerando a possibilidade de automatização total do processo e número de amostras testadas por bateria superior ao método comparativo. Os resultados da frequência alélica e genotípica dos polimorfismos analisados pelo método OpenArray foram comparados com as frequências encontradas na literatura, observando-se prevalência de doadores com perfil genotípico mais próximo da população caucasóide, porém, com a presença de alelos encontrados na população negra. Entretanto, esse perfil genotípico dos doadores predispõe à aloimunização de doentes falciformes, com perfil fenotípico negroide, reiterando a necessidade de transfusões com fenótipo compatível como profilaxia à aloimunização.

Descritores: Genótipos. Grupos sanguíneos. Bancos de Sangue.

ABSTRACT

Bianchi JVDS. Genotyping of the blood groups using liquid microarrays (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Background: The erythrocyte and platelets blood groups are extremely important for transfusional medicine. Hemotherapy services have increasingly invested in prophylactic protocols for alloimmunization against erythrocyte antigens and the emergence of high-throughput genotyping platforms are a very prominent advance in this area. The aim of this study was to validate and to standardize the OpenArray platform, which is based on the microarray technology for the erythrocyte antigens genotyping on large scale, to further implementation in blood bank routine. This technique also allowed to assess the genotype frequencies in blood donors from Fundação Pró-sangue/Hemocentro de São Paulo. **Method:** We examined 400 blood donor samples collected from October to November 2011. The SNPs were detected using OpenArray technology. From the 400 blood samples, 272 were also tested using BLOODchip platform, to compare the results between both techniques and evaluate the accuracy, reproducibility, number of incorrect results, failed samples, possibility of assays customization, duration of procedures, and number of samples that can be processed per batch. The genotype frequency of SNPs was also assessed and the findings were compared to previous studies. **Results and Discussion:** the OpenArray method showed accuracy of 99.9% and the BLOODchip of 100%. The inconsistent results were confirmed by Sanger Sequencing which showed that BLOODchip analysis was accurate. Besides, the OpenArray method showed a higher number of non-amplification or failed results (no call), which may be a major disadvantage, due to reagent loss. However, the OpenArray platform showed other advantages when compared to BLOODchip such as the possibility of assay customization and full automation of the process, it was less time-consuming and allowed a higher number of samples per batch. The genotypic and allelic frequencies of each SNP tested in the blood donor population were calculated by the OpenArray method and the results were compared to reports from previous studies. We observed a prevalence of genotypic profiles closest to the Caucasian population, however, there was the presence of alleles found in the black population as well. This genotypic profile donors predispose to alloimmunization of sickle cell patients, with negroid phenotypic profile, reiterating the need for compatible phenotype transfusions and prophylaxis to alloimmunization.

Descriptors: Genotypes. Blood Groups. Blood Banks.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Sistemas de grupos sanguíneos e seus cromossomos	15
Figura 2 –	Sequência hipotética de DNA e efeitos dos SNPs.....	16
Figura 3 –	Esquema do gene <i>GYPB</i>	23
Figura 4 –	Esquema do gene <i>LU</i>	24
Figura 5 –	Esquema do gene <i>KEL</i>	25
Figura 6 –	Esquema do gene <i>FY</i>	27
Figura 7 –	<i>Interpretação</i> do fenótipo deduzido na presença do alelo <i>FY*01N.01</i>	28
Figura 8 –	<i>Interpretação</i> do fenótipo deduzido na presença do alelo <i>FY*02W.01</i>	29
Figura 9 –	Esquema do gene <i>JK</i>	30
Figura 10 –	Esquema do gene <i>DI</i>	31
Figura 11 –	Esquema do gene <i>YT</i>	32
Figura 12 –	Esquema do gene <i>YT</i>	33
Figura 13 –	Esquema do gene <i>CO</i>	34
Figura 14 –	Esquema do gene <i>CROM</i>	35
Figura 15 –	Esquema do gene <i>CROM</i>	36
Figura 16 –	Esquema do gene <i>ITGB3</i>	42
Figura 17 –	Esquema do gene <i>CP1BA</i>	43
Figura 18 –	Esquema do gene <i>ITGA2B</i>	44
Figura 19 –	Esquema do gene <i>ITGA2</i>	45
Figura 20 –	Esquema do gene <i>CD109</i>	46
Figura 21 –	Fluxograma do processamento das amostras testes.....	59
Figura 22 –	Fluxograma do processamento das amostras controles.....	60
Figura 23 –	Representação esquemática do formato da lâmina de OpenArray	63
Figura 24 –	Esquema de anelamento das sondas VIC e FAM	64
Figura 25 –	Representação esquemática dos resultados no software do Genotyper 1.3.	66
Figura 26 –	Resultados obtidos para os alelos <i>GYPB</i> *S e <i>GYPB</i> *s	113
Figura 27 –	Resultados obtidos para os alelos <i>LU</i> *01 e <i>LU</i> *02	114
Figura 28 –	Resultados obtidos para os alelos <i>KEL</i> *01 e <i>KEL</i> *02	114
Figura 29 –	Resultados obtidos para os alelos <i>KEL</i> *03 e <i>KEL</i> *04	115
Figura 30 –	Resultados obtidos para os alelos <i>KEL</i> *06 e <i>KEL</i> *07	115

Figura 31 –	Resultados obtidos para os alelos FY*01 e FY*02	116
Figura 32 –	Resultados obtidos para os alelos FY*02N.01	116
Figura 33 –	Resultados obtidos para os alelos FY*02W.01	117
Figura 34 –	Resultados obtidos para os alelos JK*01 e JK*02	117
Figura 35 –	Resultados obtidos para os alelos DI*01 e DI*02	118
Figura 36 –	Resultados obtidos para os alelos DI*02.03 e DI*02.04	118
Figura 37 –	Resultados obtidos para os alelos YT*01 e YT*02	119
Figura 38 –	Resultados obtidos para os alelos DO*01 e DO*02	119
Figura 39 –	Resultados obtidos para o alelo DO*02.04	120
Figura 40 –	Resultados obtidos para o alelo DO*01.05	120
Figura 41 –	Resultados obtidos para os alelos CO*01 e CO*02	121
Figura 42 –	Resultados obtidos para o alelo XK*N.28	121
Figura 43 –	Resultados obtidos para os alelos CROM*01.02 e CROM*01.03... ..	122
Figura 44 –	Resultados obtidos para o alelo CROM*01	122
Figura 45 –	Resultados obtidos para o alelo CROM*01.05.....	123
Figura 46 –	Resultados obtidos para os alelos KN*01 e KN*02	123
Figura 47 –	Resultados obtidos para os alelos KN*01.03 e KN*01.06.....	124
Figura 48 –	Resultados obtidos para os alelos KN*01.04 e KN*01.07	124
Figura 49 –	Resultados obtidos para o alelo JMH*01.03 e seu respectivo fenótipo deduzido JMH+ (em homozigose, observado em vermelho)	125
Figura 50 –	Resultados obtidos para os alelos HPA-1a e HPA-1b	125
Figura 51 –	Resultados obtidos para os alelos HPA-2a e HPA-2b	126
Figura 52 –	Resultados obtidos para os alelos HPA-3a e HPA-3b	126
Figura 53 –	Resultados obtidos para os alelos HPA-4a e HPA-4b	127
Figura 54 –	Resultados obtidos para os alelos HPA-5a e HPA-5b	127
Figura 55 –	Resultados obtidos para os alelos HPA-15a e HPA-15b	128

LISTA DE TABELAS e QUADROS

Tabela 1 –	Sistemas de grupos sanguíneos	18
Tabela 2 –	Antígenos plaquetários.....	39
Tabela 3 –	Plataforma existente para genotipagem eritrocitária e plaquetária	50
Tabela 4 –	Genótipos estudados – antígenos eritrocitários	55
Tabela 5 –	Genótipos estudados – antígenos plaquetários	56
Tabela 6 –	Resultado da pesquisa no “ <i>Repeat Masker</i> ”	57
Tabela 7 –	Número de controles para cada SNP contemplado no OpenArray	61
Tabela 8 –	Comparação dos fenótipos deduzidos na Plataforma OpenArray e no ID-Core XT e ID-HPA XT	69
Tabela 9 –	Primers utilizados para o sequenciamento das amostras discrepantes entre o OpenArray e BLOODchip e para validação dos alelos de alta frequência.....	71
Tabela 10 –	Comparação entre as plataformas OpenArray e Luminex BLOODchip (ID-Core e ID-HPA)	76
Tabela 11 –	Polimorfismos comuns entre os métodos OpenArray e BLOODchip	77
Tabela 12 –	Confirmação dos resultados discrepantes por sequenciamento Sanger.....	79
Tabela 13 –	Número de controles para cada SNP contemplado no OpenArray	81
Tabela 14 –	Frequência alélica e genotípica dos SNPs estudados	83
Tabela 15 –	Comparação estatística da frequência genotípica encontrada na FPS/HSP e outros estudos da população brasileira	85
 Quadro 1 –	 Frequência fenotípica dos antígenos eritrocitários.....	 20
Quadro 2 –	Frequência fenotípica dos antígenos plaquetários.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	Alanina
AQP1	Aquaporina 1
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato (Ácido aspártico)
Asx	Asparagina ou Aspartato
CAPPesq	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Cys	Cisteína
DARC	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
DHRN	Doença Hemolítica do Recém-Nascido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Éxon	Região codificante do gene
Fluoróforo	Componente da molécula que faz com que esta seja fluorescente
FvW	Fator de Von Willebrand
gDNA	DNA genômico
Gln	Glutamina
GLOB	Globosídeo
Glu	Glutamato (Ácido glutâmico)
Glx	Glutamina
Gly	Glicina
GP	Glicoproteína
GPA	Glicoforina A
GPB	Glicoforina B
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
His	Histidina
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPA	Human Antigen Platelet
HTLA	High Titer Low Avidity
IgG	Imunoglobulina Gamma
Ile	Isoleucina
Íntron	Região do gene não codificante

ISBT	International Society of Blood Transfusion
kpb	Quilobase (corresponde a 1.000 pares de bases)
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MAIPA	Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen
Met	Metionina
Missense	Substituição de um par de bases por outro, codifica um aminoácido diferente do original
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
nM	Nanomolar
Non-sense	Substituição de um par de bases por outro, que gera um códon de parada
NTC	No template control (Controle Branco)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR-SSP	Sequence Specific Primed
Phe	Fenilalanina
PPT	Púrpura pós-transfusional
Primer	Sequência de oligonucleotídeos sintéticos
Pro	Prolina
PTAN	Purpura Trombocitopênica Aloimune Neonatal
RNA	Ácido ribonucleico
SAPE	Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate
Ser	Serina
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Sonda	Fragmento de DNA marcado para hibridizar outra molécula de DNA
TAD	Teste de Antiglobulina Direto
Taq DNA	Enzima termoestável com atividade polimerase
TaqMan	Polimerase marcada com sonda
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	10
3	REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1	Antígenos eritrocitários	13
3.1.1	Sistema Rh	20
3.1.2	Sistema MNS	22
3.1.3	Sistema Lutheran	24
3.1.4	Sistema Kell	25
3.1.5	Sistema Kx	26
3.1.6	Sistema Duffy	27
3.1.7	Sistema Kidd	30
3.1.8	Sistema Diego	31
3.1.9	Sistema Cartwright	32
3.1.10	Sistema Dombrock	33
3.1.11	Sistema Colton	34
3.1.12	Sistema Cromer	35
3.1.13	Sistema Knops	36
3.1.14	Sistema JMH	37
3.2	Antígenos Plaquetários	38
3.2.1	Antígenos plaquetários presentes na GPIIIa: HPA-1 e HPA-4	41
3.2.2	Antígeno plaquetário presente na GPIIb: HPA-2	43
3.2.3	Antígeno plaquetário presente na GPIIb: HPA-3	44
3.2.4	Antígeno plaquetário presente na GPIa: HPA-5	45
3.2.5	Antígeno plaquetário presente no CD109: HPA-15	46
3.3	Metodologias aplicadas para genotipagem dos antígenos eritrocitários e plaquetários	47
4	MÉTODOS	51
4.1	Casuística	52
4.2	Ética	52
4.3	Análise Molecular	53
4.3.1	Seleção dos SNPs	53
4.3.2	Estratégia para validação do método	58
4.3.3	Controles	59

4.4	Extração e quantificação de DNA.....	62
4.5	PCR - OpenArray	63
4.6	BLOODchip (plataforma Luminex) – ID-Core XT e ID-HPA	66
4.7	Sequenciamento por técnica Sanger	70
4.8	Comparação entre OpenArray vs BLOODchip.....	71
4.9	Comparação entre frequências genotípicas com a literatura	73
5	RESULTADOS	74
5.1	Genotipagem - Comparação dos resultados entre OpenArray e BLOODchip	75
5.2	Comparação de resultados OpenArray com resultados prévios de genotipagem nas amostras controles.....	80
5.3	Sequenciamento para os alelos de alta frequência.....	82
5.4	Frequências alélicas e genotípicas	82
6	DISCUSSÃO	86
7	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICES.....	112
	APÊNDICE A - Resultados dos SNPs analisados no Taqman Genotyper	113
	APÊNDICE B - Artigo publicado pela ISBT Science Series	129
	ANEXOS	136
	ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	137
	ANEXO B - Aprovação do Comitê Ética em Pesquisa	140

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de grupos sanguíneos compreendem antígenos que estão presentes na membrana das hemácias e podem ser detectados sorologicamente por anticorpos específicos pelo método de hemaglutinação ¹. Essas estruturas podem ser proteínas, glicoproteínas, glicolípides ou proteínas ligadas à glicosilfosfatidilinositol.

Desde a descoberta do grupo sanguíneo ABO, no início do século XX, mais de 300 antígenos de grupos sanguíneos foram caracterizados e organizados em 36 sistemas de grupos sanguíneos ¹⁻⁵. Tais sistemas são estudados principalmente por sua importância clínica transfusional, sendo que os sistemas de grupos sanguíneos Rh, MNS, Kell, Duffy e Kidd são os mais imunogênicos e os principais envolvidos em reações hemolíticas transfusionais. Além disso, os anticorpos da classe IgG dirigidos contra esses antígenos podem causar doença hemolítica do perinatal ¹.

Os HPAs (*human platelet antigen* - antígenos plaquetários humanos) são formados por epítomos imunogênicos presentes nas glicoproteínas da membrana plaquetária. Até o momento, foram descritos 35 antígenos plaquetários que podem apresentar importância em casos de púrpura trombocitopênica aloimune neonatal, púrpura pós-transfusional e refratariedade plaquetária ^{6, 7}.

Tanto os antígenos eritrocitários como os plaquetários, em sua maioria, são bialélicos, constituídos por pares antitéticos, diferindo-se de seu par antitético por um polimorfismo de único nucleotídeo missense (SNP) ⁸.

Atualmente, a metodologia utilizada para a determinação de grupos sanguíneos pela maioria dos serviços de hemoterapia é a fenotipagem, realizada pelo método de hemaglutinação. Essa técnica tem sido utilizada há décadas com o uso de soros contendo anticorpos específicos, em que a maioria dos grupos

sanguíneos é determinada, após leitura do resultado em fase de antiglobulina humana (hemaglutinação indireta), descrito por Coombs e colaboradores em 1945^{9, 10}. Embora seja um método simples, específico e sensível, possui limitações, como alto custo dos soros monoclonais e falta de soro para a fenotipagem de alguns antígenos clinicamente significantes^{11, 12}.

A fenotipagem estendida inclui a determinação dos sistemas Rh (C, c, E, e), Kell (K e k), Duffy (Fy^a e Fy^b), Kidd (Jk^a e Jk^b) e MNS (S e s). O fornecimento de unidades compatíveis com a fenotipagem estendida dos pacientes é uma estratégia que tem sido adotada por alguns serviços para evitar a formação de anticorpos em pacientes cronicamente transfundidos, em especial, aqueles com anemia falciforme, que têm alta predisposição à aloimunização eritrocitária^{13, 14}.

Para a escolha da técnica adequada na determinação de grupos sanguíneos, deve-se levar em consideração a quantidade de amostras a serem testadas e o objetivo da determinação; ou seja, para a busca de doadores raros ou testagem de doadores de sangue para diversos sistemas concomitantemente, seria adequado a utilização de métodos automatizados e de baixo custo, como as plataformas de genotipagem em larga escala^{9, 10, 13}.

A determinação de grupos sanguíneos em pacientes é indicada como contraprova na presença de anticorpos irregulares e pode ser realizada para direcionamento da pesquisa de anticorpos irregulares; tal determinação pode ser feita por métodos sorológicos. No entanto, nesse caso, existe como fator limitante a impossibilidade de fenotipagem para alguns grupos sanguíneos em indivíduos que apresentam teste de antiglobulina direto (TAD) positivo ou que tenham recebido transfusão nos últimos quatro meses, viabilizando novamente a utilização de métodos moleculares^{8, 11, 12, 15, 16}.

A descrição da base molecular dos antígenos eritrocitários e plaquetários foi crucial para o desenvolvimento das estratégias de genotipagem dos sistemas de

grupos sanguíneos, que está desempenhando um papel de apoio importante na medicina transfusional, especialmente, para fornecer sangue compatível para pacientes cronicamente transfundidos ^{9, 13, 14}. A amplificação dos alelos estudados pode ser realizada por PCR (*polymerase chain reaction* - reação em cadeia da polimerase) primer alelo-específico (PCR-SSP), por detecção de polimorfismos por meio de enzimas de restrição (PCR-RFLP) ou PCR em tempo real. No entanto, essas técnicas não são ideais para aplicação em larga escala devido a sua complexidade e ao formato de trabalho intensivo e de baixa capacidade de produtividade, necessitando, na maioria dos protocolos, de um ensaio para cada SNP ^{13, 14}.

Atualmente, os métodos moleculares disponíveis para genotipagem de grupos sanguíneos podem ser divididos em duas categorias: para baixo a médio rendimento e de alto rendimento ¹⁷. São exemplos dos métodos modernos de alto rendimento as plataformas de genotipagem: BLOODchip Reference, BLOODchip (ID-Core, ID-Core+, ID-Core XT, ID-HPA), HEA Beadchip, HIFI BLOOD 96, GenomeLab, SNPstream, MALDI-TOF MS, OpenArray e SNaPshot ^{13, 18, 19}. Tais plataformas podem ser aplicadas em doadores de sangue e possibilitam a organização de um grupo de doadores extensivamente genotipados, que possam atender às necessidades de transfusão profilática para pacientes com anemia falciforme, e também identificar um grupo raro de doadores de sangue. Essas plataformas permitem a determinação de múltiplos alelos de grupos sanguíneos, utilizando um único ensaio e podem ser realizadas mais rapidamente do que os métodos sorológicos ou moleculares convencionais ^{8-10, 20-24}.

Assim sendo, a escolha do método depende das necessidades específicas do laboratório, podendo ser influenciada pela demanda de trabalho e pela necessidade de resultados rápidos. Nesse contexto, a técnica de microarranjos líquidos pode ser implementada em bancos de sangue para a realização da

genotipagem dos principais sistemas de grupos sanguíneos que apresentam significância clínica, permitindo, assim, a realização de transfusões compatíveis em pacientes politransfundidos, especialmente, aqueles com anemia falciforme, objetivando a profilaxia de aloimunização eritrocitária.

A aloimunização consiste na indução da resposta imune contra antígenos alogênicos desenvolvidos por meio da exposição a células ou tecidos de um indivíduo geneticamente diferente da mesma espécie, sendo ainda maior em populações miscigenadas ²⁵. Tal processo envolve vários passos, incluindo o reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos eritrocitários pelo HLA (*human leukocyte antigen* – antígeno leucocitário humano) de classe II e ativação de Linfócitos T CD4, culminando na interação de células T e B que se diferenciam em Plasmócitos e secretam imunoglobulinas específicas ao antígeno em questão ²⁶. Pacientes aloimunizados com presença de múltiplos anticorpos têm maior risco de reação hemolítica transfusional decorrente da ação de anticorpos contra hemácias alogênicas ^{14, 25, 27, 28}.

Estudos demonstraram que de 0 a 3% dos pacientes hospitalizados transfundidos de forma randômica são aloimunizados ^{10, 29}; entretanto, o risco de aloimunização aumenta com a exposição transfusional decorrente de doenças onco-hematológicas ³⁰. Todavia, essa taxa aumenta consideravelmente em doentes falciformes, nos quais o índice de aloimunização atinge cerca de 20% a 50% ^{26, 31-33}. Já em pacientes com β Talassemia apresentam um índice de aloimunização de 22,8% ^{30, 34}.

O desenvolvimento de anticorpos irregulares é mais comum em doentes falciformes em decorrência do microambiente favorável à aloimunização e à diferença étnica entre doadores caucasoides e receptores negros. Os anticorpos mais envolvidos nesse processo são dirigidos contra os antígenos C, E, Kell, Fy^a, Jk^b e S, reiterando a necessidade de transfusões de concentrados de hemácias

compatíveis para os principais antígenos dos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, e MNS, para minimizar o índice de aloimunização^{26, 35}.

Atualmente, a maioria dos serviços de hemoterapia realiza transfusão compatível somente para os aloanticorpos já existentes. Entretanto, essa estratégia pode levar ao desenvolvimento de múltiplos anticorpos e subsequente dificuldade na identificação dos anticorpos, promovendo a demora no encontro de hemocomponente compatível^{29, 36}. Os programas de profilaxia primária à aloimunização geralmente são implantados em pacientes com doença falciforme e talassemia. Esses protocolos visam prover concentrado de hemácia compatível para os antígenos que apresentam maior imunogenicidade do sistema Rh, como: C, c, E, e; podendo, ainda, fornecer sangue com fenótipo estendido para os antígenos K, Fy^a, Fy^b, Jk^a e Jk^b, S e s, prevenindo a aloimunização a esses antígenos e facilitando o processo de investigação imuno-hematológica de anticorpos¹⁴.

A tecnologia de microarray e outras tecnologias de alto rendimento têm o potencial não só de aumentar o estoque de sangue genotipado, especialmente de bolsas com ausência de antígenos de alta frequência, como também de facilitar o atendimento aos pacientes aloimunizados e os cronicamente transfundidos, devido ao rápido acesso ao banco de dados dos hemocomponentes estocados, facilitando o fornecimento de unidades compatíveis e levando a uma redução nas taxas de aloimunização aos antígenos eritrocitários^{22, 37-40}. Contudo, plataformas comerciais de genotipagem em larga escala que já estão validadas são muito dispendiosas, tornando-se inviáveis na utilização para o rastreamento de doadores de sangue^{10, 12}. De forma semelhante, a genotipagem dos antígenos HPA pode ser realizada por microarranjos líquidos e representa uma ferramenta funcional para o encontro de doadores HPA compatíveis no suprimento de concentrado de plaquetas aos neonatos com PTAN (púrpura trombocitopênica aloimune neonatal) e ainda para

atendimento transfusional em pacientes aloimunizados contra os antígenos HPA com PPT (púrpura pós-transfusional) e refratariedade plaquetária ^{38, 41-43}.

A púrpura trombocitopênica aloimune neonatal (PTAN) é causada por incompatibilidade plaquetária materno-fetal, em que a mãe é aloimunizada contra antígenos HPAs presentes no feto ou no neonato ⁴⁴. Clinicamente, o neonato apresenta petéquias, púrpura generalizada, hemangiomas, hepato e esplenomegalia, entre outros sintomas menos comuns, como hemorragia visceral, sangramento gastrointestinal ou hematúria, sendo que a complicação mais grave é a hemorragia intracraniana. Os sintomas aparecem ao nascimento, ou algumas horas após, e, diferentemente da doença hemolítica do recém-nascido (DHRN), pode ocorrer na primeira gestação ^{45, 46}. Os principais responsáveis pelos casos de incompatibilidade materno-fetal plaquetária são: HPA 1a, 5b, 3a e 1b responsáveis por 79%, 9%, 2% e 4% dos casos de PTAN, respectivamente ⁴⁷⁻⁵⁰. O anti-HPA-1a é o mais relacionado com casos de aloimunização e gravidade da doença. Turner e colaboradores demonstraram que, das mulheres com genotipagem como HPA 1a negativo, 7,9% apresentaram anti-HPA-1a detectado pela primeira vez, sendo que, 43 a cada 100.000 deu à luz bebês com PTAN e 27 a cada 100.000 apresentaram trombocitopenia grave ⁴⁹.

A púrpura pós-transfusional é um episódio raro, 1 a cada 465.000 transfusões de plaquetas caracterizados por trombocitopenia grave após uma semana da transfusão. Geralmente, ocorre em mulheres HPA-1a negativo previamente aloimunizadas por gestação. A transfusão pode ocasionar uma resposta secundária em que os anticorpos anti-HPA-1a destroem as plaquetas HPA 1a positivo e também HPA-1a negativo por um mecanismo desconhecido ⁴⁴.

A refratariedade plaquetária é uma condição clínica em que o paciente não apresenta incremento na contagem plaquetária, após a transfusão podendo ocorrer por causas não imunes ou imunes ⁵¹. A refratariedade não imune pode ser o

resultado de complicações clínicas subjacentes, como infecções, febre, esplenomegalia, transplante de medula óssea e de células progenitoras de sangue periférico, coagulação intravascular disseminada, doença do enxerto contra o hospedeiro, doenças vaso-oclusivas, trombocitopenia pelo uso de medicamentos (quinidina, penicilina, sulfas, heparina, diuréticos e vancomicina) e hemorragias ⁵²⁻

⁵⁵.

Na refratariedade plaquetária imune, a aloimunização ocorre em resposta à transfusão, transplante ou gestação, e envolve a produção de anticorpos direcionados contra antígenos plaquetários do doador, HLA ou HPA, sendo a última responsável por, aproximadamente, 20% dos casos de refratariedade ^{44, 51, 56}. O principal anticorpo envolvido é o anti-HLA, sendo que os anticorpos HPA ocorrem em uma frequência de 8% a 25%. Entretanto, a maioria dos pacientes aloimunizados e refratários possui anticorpos anti-HPA associados a anticorpos anti-HLA, sendo o anti-HPA-5b o mais frequente (50%), seguido pelo anti-HPA-1b e anti-HPA-5a, ambos com importância clínica associada à refratariedade plaquetária ⁵⁷. Já, Ghevaert *et al.* descreveram que, na população caucasóide, a maior parte dos anticorpos anti-HPA pertence a cinco sistemas (1, 2, 3, 5 e 15) sendo que, em 95% dos casos, os anticorpos envolvidos têm especificidade contra HPA-1a ou 5b, e em 5% dos casos, envolvem aloanticorpos contra o HPA-2, -3 e -15 ⁵⁸. Segundo Ertel *et al.* ³⁶, a detecção de anticorpos contra o HPA-15, é dificultada pela expressão variável de baixa e de instabilidade da molécula CD109, durante o preparo e armazenamento. Em um estudo realizado, observou-se, pela pesquisa de anticorpos antiplaquetários (MAIPA), que a incidência de aloimunização contra o HPA-15 em pacientes politransfundidos é significativamente maior do que a PTAN em mães (3% contra 0,22%).

Os serviços de hemoterapia têm investido cada vez mais em técnicas para o suprimento de hemocomponentes compatíveis aos pacientes aloimunizados. Com

isso, as técnicas de genotipagem em larga escala têm sido amplamente utilizadas. Entretanto, a maioria das plataformas existentes no mercado são comerciais, elevando o custo e inviabilizando sua utilização em serviços públicos. Assim sendo, torna-se necessário a busca de tecnologias custo-efetivas para genotipagem de antígenos eritrocitários e plaquetários para utilização na profilaxia à aloimunização de pacientes cronicamente transfundidos.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

1) Padronizar e validar a plataforma OpenArray, por meio da técnica de microarranjos líquidos para genotipagem eritrocitária e plaquetária em larga escala, passível de implementação na rotina de doadores de sangue;

2) Determinar as frequências alélicas e genóticas dos sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários e plaquetários para os seguintes SNPs S/s, Lu^a/Lu^b, K/k, Kp^a/Kp^b, Js^a/Js^b, Fy^a/Fy^b, Fy(a-b-), Fy^x, Jk^a/Jk^b, Di^a/Di^b, Wr^b/Wr^a, Yt^a/Yt^b, Do^a/Do^b, Hy, Jo^a, Co^a/Co^b, Kx, Tc^a/Tc^b, Dr(a+), Cr(a+), Kn^a/Kn^b, McC^a/McC^b, Sl^a/Vil, JMH, HPA-1, -2, -3, -4, -5 e -15 pelo método OpenArray, visto que este estudo contempla alelos com frequência desconhecida na população brasileira.

3 Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Antígenos eritrocitários

Os sistemas de grupos sanguíneos foram descritos primeiramente por Karl Landsteiner, no início do século XX, que observou que o soro de alguns indivíduos aglutinava quando colocado em contato com as hemácias de outros indivíduos ¹⁵.

Após 45 anos, com a implementação do soro de antiglobulina humana por Coombs, Mourant a Race foi possível a descoberta de novos antígenos pelo método de aglutinação indireta ^{2, 59}. Nos primeiros 90 anos, os sistemas de grupos sanguíneos foram determinados por hemaglutinação, método utilizado para inferir o genótipo em alguns casos. Atualmente, ocorre o inverso, a genotipagem por DNA (ácido desoxirribonucleico) é utilizada para predizer o fenótipo. A ISBT (*Internacional Society of Blood Transfusion* - Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea) reconhece, até o momento, 36 sistemas de grupos sanguíneos e mais de 300 antígenos eritrocitários. A classificação dos sistemas ocorre de acordo com a sua origem, ou seja, quando um ou mais antígenos são controlados por um único locus gênico ou por dois ou mais genes homólogos ligados muito proximamente, com rara ou nenhuma recombinação gênica “*crossing-over*” entre eles ^{2, 11}.

Os grupos sanguíneos podem ser definidos como uma característica herdada encontrada na superfície dos eritrócitos, reconhecidos por anticorpos específicos. Essa definição pode não ser utilizada universalmente, já que os antígenos presentes nas superfícies das plaquetas e leucócitos também podem ser considerados sistemas de grupos sanguíneos ⁴⁴.

Essas estruturas podem ser classificadas em carboidratos (glicolípides ou glicoproteínas), proteínas simples de membrana, proteínas de multipassagem ou proteínas ligadas ao Glicosilfosfatidilinositol (GPI), conforme mostra a Figura 1. São provenientes de polimorfismos nos genes codificadores, alterando a superfície da membrana eritrocitária que pode ser reconhecida pelo sistema imune, induzindo à produção de anticorpos^{2, 60, 61}.

Sistemas de grupos sanguíneos e seus cromossomos

Figura 1 - Sistemas de grupos sanguíneos e seus cromossomos (Castilho *et al.* 2016)⁶².

Nos últimos 20 anos, foi identificada a maioria dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos presentes em eritrócitos, possibilitando a caracterização dos seus antígenos e a elucidação dos fenótipos muito variantes. Assim como os eritrócitos foram utilizados como modelo para caracterização bioquímica de membranas celulares, os genes têm se mostrado um modelo acessível para o estudo da sua expressão e diversidade. Houve, assim, incomparável progresso no entendimento, na análise estrutural e funcional dos antígenos de grupos sanguíneos expressos, tanto nas hemácias quanto em superfícies celulares não eritroides ^{63, 64}.

O conhecimento da genética molecular tem aumentado, a cada dia, com o avanço da tecnologia, possibilitando novas descobertas moleculares ⁸. A maioria dos antígenos eritrocitários é proveniente da substituição de um único nucleotídeo, conhecido como SNP (*single nucleotide polymorphism* - polimorfismo de único nucleotídeo). A Figura 2 representa uma pequena sequência hipotética de DNA, ilustrando alguns exemplos de polimorfismos existentes em grupos sanguíneos ⁶⁵.

DNA { A T G T C G A A G G A A G C A -3' } T A C A G C T T C C T T C G T -5' }		Dupla fita de DNA
mRNA	AUG UCG AAG GAA GCA	Transcrição do produto
Proteína	Met Ser Lys Glu Ala	Tradução do produto
Único nucleotídeo substituído		Example:
Silencioso	AUG UCG ^CAAG GAA GCA Met Ser Lys Glu Ala	378 C>T in <i>DO</i> exon 2 Tyr126Tyr = Não muda
Missense	AUG UCG AA^C GAA GCA Met Ser Asn Glu Ala	698 C>T in <i>KEL</i> exon 6 Thr193Met = Muda de k para K
Nonsense	AUG UCG AAG ^UAA GCA Met Ser Lys Stop	287G>A in <i>FY</i> exon 2 Trp96Stop = Fy(a-b-)
Único nucleotídeo deletado (-1 frameshift/stop)		
Nova sequência	AUG MCGA AGG AAG CA Met Arg Arg Lys	261del G in <i>O</i> exon 6 Frameshift → 116Stop = 0
Stop Códon	AUG UXGA AGG AAG CA Met Stop	Sem exemplo conhecido
Único nucleotídeo inserido (+1 frameshift/stop)		
Nova sequência	AUG UCG A^GA GGA AGC A Met Ser Arg Gly Ser	307-308 ins T in <i>CO</i> exon 2 Frameshift → Stop = Co(a-b-)
Stop Códon	AUG UCG AAG ^UGA AGC A Met Ser Lys Stop	Sem exemplo conhecido

Figura 2 – Sequência hipotética de DNA e efeitos dos SNPs (Reid, 2008) ⁶⁵.

Em um SNP silencioso, a mudança de nucleotídeos não altera o aminoácido codificado, portanto, não afeta a expressão do antígeno. As alterações missenses resultam na troca de um único nucleotídeo e consequente alteração do aminoácido traduzido. Essas formas alternativas do alelo codificam antígenos antitéticos. A deleção ou inserção de um nucleotídeo pode resultar em uma nova sequência de DNA. Normalmente, isso leva à codificação de uma proteína truncada, mas também pode causar o alongamento proteico. Da mesma forma, a deleção ou a inserção de nucleotídeos resulta na mudança dos códons subsequentes, levando a um “*stop códon*” prematuro ⁶⁵.

Os cromossomos e as localizações gênicas dos principais sistemas podem ser observados na Tabela 1 ¹⁹. A expressão antigênica é regulada por um único locus gênico ou por um complexo de dois ou mais genes homólogos que são intimamente ligados, sendo que as recombinações gênicas ocorrem entre eles ⁵⁹.

Tabela 1 - Sistemas de grupos sanguíneos.

Nº ISBT	Nome e Símbolo do sistema	Nome do Gene	Localização Cromossômica	Nº total de antígenos
001	ABO	<i>ABO</i>	9q34.2	4
002	MNS	<i>GYPA GYPB</i>	4q31.21	48
003	P1PK	<i>A4GALT</i>	22q13.2	3
004	Rh(RH)	<i>RHD RHCE</i>	1p36.11	54
005	Lutheran(LU)	<i>LU</i>	19q13.32	21
006	Kell(KEL)	<i>KEL</i>	7q34	35
007	Lewis(LE)	<i>LE (FUT3)</i>	19p13.3	6
008	Duffy(FY)	<i>FY (DARC)</i>	1q23.2	5
009	Kidd(JK)	<i>JK (SLC14A1 HUT11A)</i>	18q12.3	3
010	Diego(DI)	<i>DI (SLC4A1 AE1 EPB3)</i>	17q21.31	22
011	Yt(YT)	<i>YT (ACHE)</i>	7q22.1	2
012	Xg(XG)	<i>XG (PBDX)</i>	Xp22.33	2
013	Scianna(SC)	<i>SC (ERMAP)</i>	1p34.2	7
014	Dombrock(DO)	<i>DO (ART4)</i>	12p12.3	10
015	Colton(CO)	<i>CO (AQP1)</i>	7p14.3	4
016	Landsteiner-Wiener(LW)	<i>LW (ICAM4)</i>	19p13.2	3
017	Chido-Rodgers(CH/RG)	<i>CH (C4B)</i>	6p21.3	9
018	H(H)	<i>H (FUT1)</i>	19q13.33	1
019	Kx(XK)	<i>XK</i>	Xp21.1	1
020	Gerbich(GE)	<i>GE (GYPC)</i>	2q14.3	11
021	Cromer(CROM)	<i>CROM (DAF)</i>	1q32.2	18
022	Knops(KN)	<i>KN (CR1)</i>	1q32.2	9
023	Indian(IN)	<i>IN (CD44)</i>	11p13	4
024	Ok(OK)	<i>OK (BSG EMPRI)</i>	19p13.3	3
025	Raph(RAPH)	<i>RAPH (CD151)</i>	11p15.5	1
026	John Milton Hagen (JMH)	<i>JMH (SEMA7A)</i>	15q24.1	6
027	I(I)	<i>I (GCNT2 IGnT)</i>	6p24.2	1
028	Globoside(GLOB)	<i>GLOB (B3GALT3)*</i>	3q26.1	2
029	Gill(GIL)	<i>GIL (AQP3)</i>	9p13.3	1
030	Rh associado a glicoproteína (RHAG)	<i>RHAG</i>	6p21-qter	4
031	FORS(FORS)	<i>FORS (GBGT1) A3GALNT)</i>	9q34.13	1
032	JR(JR)	<i>JR (ABCG2)</i>	4q22	1
033	Lan(LAN)	<i>LAN (ABCB6)</i>	2q36	1
034	Vel (VEL)	<i>VEL (SMIM1)</i>	1p36.32	1
035	CD59	<i>CD59</i>	11p13	1
036	AUG	<i>ENT1, SLC29A1</i>	6p21.1	2

Baseado em St-Louis, 2014¹⁹ e Castilho et al. 2016⁶²

Os principais sistemas de grupos sanguíneos são os que apresentam maior imunogenicidade e, conseqüentemente, maior importância transfusional como os sistemas Rh, Kell, Kidd, Duffy, Ss e Diego. Existem ainda antígenos de alta frequência com interesse na clínica transfusional como o Lutheran, Cartwright, Hy, Jo^a e Colton e aqueles cuja frequência antigênica não é descrita na população brasileira, apesar de pouca ou nenhuma importância transfusional como o Dombrock, KX, Tc, Dr(a), Cr(a) , Kn, McC e SI^a/Vil.

As frequências dos antígenos podem variar de acordo com a etnia; entretanto, em populações miscigenadas existe um viés para a determinação das etnias, visto que essa não pode ser determinada pela característica fenotípica dos indivíduos. O quadro 1 apresenta as frequências fenotípicas dos antígenos contemplados neste trabalho, conforme Reid e colaboradores.

Quadro 1 – Frequência fenotípica dos antígenos eritrocitários.

		Homozigoto para o alelo 1			Heterozigoto			Homozigoto para o alelo 2		
		Fenótipo	Raça Branca	Raça Preta*	Fenótipo	Raça Branca	Raça Preta*	Fenótipo	Raça Branca	Raça Preta*
MNS	S/s	S+s-	11	6	S+s+	44	25	S-s+	45	68
Lutheran	Lu ^a /Lu ^b	Lu(a+b-)	0,2**	†	Lu(a+b+)	7,4**	†	Lu(a-b+)	92,4**	†
Kell	K/k	K+k-	0,2	raro	K+k+	8,8	2	K-k+	91	98
	Kp ^a /Kp ^b	Kp(a+b-)	Raro	0	Kp(a+b+)	2,3	Raro	Kp(a-b+)	97,7	100
	Js ^a /Js ^b	Js(a-b+)	0	1	Js(a+b+)	Raro	19	Js(a-b+)	100	80
Duffy	Fy ^a /Fy ^b	Fy(a+b-)	17	9	Fy(a+b+)	49	1	Fy(a-b+)	34	22
Kidd	Jk ^a /Jk ^b	Jk(a+b-)	26,3	51,1	Jk(a+b+)	50,3	40,8	Jk(a-b+)	23,4	8,1
Diego	Di ^a /Di ^b	Di(a+b-)	<0,01	<0,01	Di(a+b+)	<0,1	<0,1	Di(a-b+)	>99,9	>99,9
	Wr ^a /Wr ^b	Wr(a+b-)	<0,01	†	Wr(a+b+)	<0,01	†	Wr(a-b+)	>99,9	†
Cartwright	Yt ^a /Yt ^b	Yt(a+b-)	91,9	†	Yt(a+b+)	7,8	†	Yt(a-b+)	0,3	†
Dombrock	Do ^a /Do ^b	Do(a+b-)	18	11	Do(a+b+)	49	44	Do(a-b+)	33	45
	Hy	Hy+	100	†						
	Jo ^a	Jo ^a +	100	†						
Colton	Co ^a /Co ^b	Co(a+b-)	90	†	Co(a+b+)	9,5	†	Co(a-b+)	0,5	†
Kx	Kx	Kx+	100	†						
Cromer	Tc ^a /Tc ^b	Tc(a+b-)	100	90						
	Dr(a+)	Dr(a+)	100	†						
	Cr(a+)	Cr(a+)	100	99						
Knops	Kn ^a /Kn ^b	Kn(a+b-)	94,5	99,9	Kn(a+b+)	4,5	0,1	Kn(a-b+)	1	0
	McC ^a /McC ^b	McC(a+)	98	94						
	Sl ^a /Vil	Sl(a+)	98	60						
JMH	JMH+	JMH+	100	†						

Baseado em Reid *et al.* 2012 ¹

* Nomenclatura em concordância com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)

** Frequência encontrada na maioria das populações

† Frequência não publicada por Reid *et al.* 2012 ¹

3.1.1 Sistema Rh

O Sistema de grupo sanguíneo RH (ISBT 004) consiste em 54 antígenos, sendo 14 polimórficos, 27 de baixa frequência e 13 de alta frequência. Entre os antígenos polimórficos, os que apresentam maior relevância são: D, C, E, c, e, f, Ce, G e cE. Porém, alguns antígenos considerados de baixa frequência, como V e

VS, também podem ser polimórficos nas populações afrodescendentes. Tais antígenos são codificados por dois genes com 98% de homologia, são eles os genes *RHD* e *RHCE* localizados no cromossomo 1p36.11^{19, 62}. Esses genes interagem com o gene *RHAG* localizado no cromossomo 6p21.3, que produz a proteína RhAG, sendo responsável pela inserção das proteínas RhD e RhCE no complexo proteico Rh na membrana; ou seja, pela expressão antigênica. Os genes *RHD* e *RHCE* contêm 10 éxons distribuídos em 69 kpb de gDNA em orientação oposta (5'RHD3' – 3'RHCE5'), sendo o *RHD* a fita senso e o *RHCE* a fita antisenso²⁰. Esses genes são separados por uma região de aproximadamente 30 kpb que contém o gene *TMEM50A*; o gene *RHD* é flanqueado por duas caixas *Rhesus* de 9 kpb^{61, 65, 69}. Os genes *RHD* e *RHCE* são altamente polimórficos devido a mutações como: *crossing-over* único, conversão gênica, modificação da proteína pós-translocação e interação com outros genes⁶⁶. Tais mutações dificultam a investigação do sistema Rh em plataforma de larga escala customizada, tornando necessário o desenho de ensaios para investigação exclusiva do sistema Rh.

As proteínas RhD e RhCE são de multipassagem e atravessam a membrana eritrocitária 12 vezes com os segmentos aminoterminal e carboxiterminal, na face intracelular da membrana. Tais proteínas são compostas por 417 aminoácidos, diferindo-se em 32 e 35 aminoácidos e interagem com as proteínas RhAG, Banda 3, GPA, GPB, LW e CD47⁶².

Os anticorpos dirigidos contra esses antígenos são da classe IgG com capacidade de ativação do sistema complemento, têm reatividade a 37°, implicando grande importância em reações hemolíticas transfusionais³⁴.

3.1.2 Sistema MNS

O sistema de grupo sanguíneo MNS (ISBT 002) consiste em 48 antígenos, sendo 35 de baixa frequência, 9 de alta frequência e 4 polimórficos: M, N, S e s. Esses antígenos são codificados por dois genes homólogos com 95% de correspondência, localizados no cromossomo 4q31.21, expressos na Glicoforina A (GPA), codificada pelo gene *GYP A* composto por 7 éxons distribuídos em 60 kpb de gDNA, e na Glicoforina B (GPB), codificada pelo gene *GYP B* composto por 6 éxons (sendo um pseudoéxon) distribuídos em 58 kpb de gDNA, conforme mostra a Figura 3. Existe ainda um terceiro gene codificador, o *GYPE*, embora não codifique um produto na membrana dos eritrócitos, está envolvido em rearranjos, resultando em alelos variantes^{62, 67-69}.

As glicoforinas são proteínas de única passagem do Tipo I, sendo a GPA uma glicoproteína de 131 aminoácidos e a GPB uma glicoproteína de 72 aminoácidos. Tais glicoproteínas apresentam grande quantidade de ácido siálico (sialoglicoproteínas), sendo responsável por 80% da eletronegatividade eritrocitária, prevenindo, assim, a aglutinação espontânea dos eritrócitos. Assim sendo, o tratamento de eritrócitos com enzimas proteolíticas favorece a aglutinação *in vitro*^{1, 62}.

O sistema MNS é o mais complexo após o Rh, sendo os antígenos M, N, S, s e U, extremamente polimórficos, e a frequência variada de acordo com a população. O fenótipo S-s-U- é causado pela deleção do éxon 2-6 do gene *GYP B* não havendo sua expressão no eritrócito. Já o fenótipo S-s-U+var é caracterizado pela expressão enfraquecida do antígeno U e ausência do antígeno S, na membrana dos eritrócitos, causadas por duas mutações no gene *GYP B*, designadas de *GYP B.P2* e *GYP B.NY*. A mutação *P2* é caracterizada por uma alteração C>G na extremidade 3' do éxon 5 do gene *GYP B*, no sítio acceptor de

splicing e uma alteração G>T na posição +5 do íntron 5. Por isso, também é conhecida como *plus5intron5*, afetando o sítio doador de *splicing*. Essas mutações acarretam um salto do éxon 5 no momento do *splicing* e, consequentemente, mudam o quadro de leitura aberta no *GYPB* mRNA, levando ao silenciamento de um alelo S do gene *GYPB*. Já a mutação *GYPB.NY* é resultado do SNP 208G>T e 230C>T no éxon 5 do gene *GYPB*, resultando em um salto parcial do éxon, acarretando a ausência do antígeno S na membrana eritrocitária^{67, 68, 70}.

Os antígenos M e N estão presentes na GPA e raramente estão envolvidos em reações hemolíticas; assim sendo, na maior parte das vezes, não apresenta importância clínica transfusional. Já os antígenos S, s e U estão presentes na GPB e estão implicados com reação hemolítica transfusional devido à presença de anticorpos da classe IgG, tornando-se importante na investigação imuno-hematológica^{65, 68}.

Figura 3 - Esquema do gene *GYPB* (Adaptado de Reid, 2012)¹.

3.1.3 Sistema Lutheran

O sistema de grupo sanguíneo Lutheran (ISBT 005) consiste em 22 antígenos, sendo 2 de baixa frequência e 17 de alta frequência. Os antígenos polimórficos desse sistema são: Lu^a , Au^a e Au^b . Tais antígenos são codificados pelo cromossomo 19q13.32, composto por 15 éxons distribuídos aproximadamente em 12kpb de gDNA, conforme demonstrado na Figura 4. Os antígenos do sistema Lutheran estão expressos em uma glicoproteína de única passagem do Tipo I, composta por 597 aminoácidos, e na proteína B-CAM composta por 557 aminoácidos, devido ao *splicing* alternativo no éxon 13^{62, 71, 72}.

Os antígenos relacionados com aloimunização são principalmente o Lu^a e Lu^b , com capacidade de desenvolver resposta imune da classe IgG levando a reações hemolíticas brandas e tardias⁶².

Figura 4 - Esquema do gene *LU* (Adaptado de Reid, 2012)¹.

3.1.4 Sistema Kell

O sistema de grupo sanguíneo Kell (ISBT 006) contém 35 antígenos, sendo 10 de baixa frequência e 24 de alta frequência, sendo que somente o Kell tem característica polimórfica. São codificados pelo cromossomo 7q34, pelo gene *KEL*, composto por 19 éxons distribuídos em aproximadamente 21,5 kpb do gDNA (conforme demonstrado na Figura 5). Essa sequência é traduzida em uma glicoproteína de única passagem do Tipo II de 732 aminoácidos, associada covalentemente à proteína KX por ligações dissulfídicas^{62, 73}.

Os anticorpos desenvolvidos contra os antígenos do sistema Kell geralmente são da classe IgG e estão envolvidos em reações hemolíticas transfusionais, clinicamente significantes na medicina transfusional, especialmente os antígenos Kell, Cellano (k), Kp^a, Kp^b, Js^a, Js^b^{62, 65, 73}.

Figura 5 - Esquema do gene *KEL* (Adaptado de Reid, 2012)¹.

3.1.5 Sistema Kx

O sistema de grupo sanguíneo KX (ISBT 019) é composto por apenas 1 antígeno de alta frequência codificado pelo cromossomo Xp21.1, pelo gene XK, composta por 3 éxons, podendo apresentar tipos de alelos null decorrentes de deleções, *splicing* alternativo, mutação missense e inserção de nucleotídeo. É uma proteína não glicosilada de multipassagem, atravessando dez vezes a membrana eritrocitária e contendo 444 aminoácidos. A ausência da proteína KX ocorre no fenótipo McLeod, associado à acantocitose, manifestações neurológicas e redução na expressão dos antígenos do sistema Kell. Nessas condições, pode ocorrer aloimunização pós-transfusional, levando ao desenvolvimento de um anticorpo contra os antígenos de alta frequência Kx e Km da classe IgG com significância clínica. Entretanto, por tratar-se de um gene ligado ao cromossomo X, a mutação que leva à ausência do antígeno, o anticorpo anti-Kx poderia ser encontrado somente em homens ^{1, 62, 65, 73}.

3.1.6 Sistema Duffy

O sistema de grupo sanguíneo Duffy (ISBT 008) é chamado de DARC (*Duffy antigen receptor for chemokines* - antígeno Duffy, receptor de citocinas) e consiste em 5 antígenos altamente imunogênicos. O gene *FY*, responsável por esse sistema, se localiza no cromossomo 1q23-2, organizado em 2 éxons que estão distribuídos ao longo de 1,5 kpb de gDNA (conforme mostra a Figura 6), formando uma proteína de multipassagem que atravessa a membrana da célula 7 vezes e é constituída por 336 (β) ou 338 (α) aminoácidos ⁷⁴.

Figura 6 - Esquema do gene *FY* (Adaptado de Reid, 2012) ¹.

Existem mutações que podem levar à baixa expressão ou à ausência do antígeno Fy^b na membrana eritrocitária, levando aos fenótipos Fy^x e Fy(a-b-), respectivamente. O fenótipo Fy(a-b-) encontrado principalmente na população negra é caracterizado pela presença do alelo *FY*02N.01*, decorrente de uma mutação nonsense na região promotora -67 T>C da região GATA do gene *FY*. Essa mutação impede que o antígeno Fy^b seja expresso somente nos eritrócitos. O

fenótipo Fy^x é caracterizado pela presença do alelo $FY^{*02W.01}$ diante dos polimorfismos 265C>T, 298G>A ou pela presença do alelo $FY^{*02W.02}$ ante os polimorfismos 145G>T, 265C>T, 298G>A. Para a interpretação do fenótipo deduzido a partir do genótipo, é necessário a análise em conjunto dos polimorfismos, em que o alelo $FY^{*02N.01}$ silencia a expressão de Fy^b e a presença do alelo FY^{*02W} enfraquece a expressão de Fy^b na membrana eritrocitária, conforme demonstrado nas Figuras 7 e 8, respectivamente ^{59, 74, 75}.

Figura 7 – Interpretação do fenótipo deduzido na presença do alelo $FY^{*01N.01}$.

Figura 8 – Interpretação do fenótipo deduzido na presença do alelo *FY*02W.01*.

A frequência global dos principais alelos do sistema de grupo sanguíneo Duffy, *FY*A*, *FY*B*, *FY*02N.01* e *FY*02W* está fortemente associada a padrões geográficos. O fenótipo Fy(a-b-) é raro na população branca, no entanto, na população negra, esse é o fenótipo mais prevalente, encontrado em 68% dos indivíduos ^{1, 75}.

Os anticorpos desenvolvidos contra os antígenos desse sistema são clinicamente significantes e dirigidos principalmente contra os antígenos Fy^a e Fy^b, sendo este último mais raro, em decorrência da mutação na região *GATA-67 CC* que silencia o antígeno somente na membrana eritrocitária, mantendo a expressão antigênica em outras células ⁶².

3.1.7 Sistema Kidd

O sistema de grupo sanguíneo Kidd (ISBT 009) consiste em apenas 3 antígenos, sendo Jk^a e Jk^b, polimórficos e o antígeno Jk3, de alta frequência, na população. Esses antígenos são codificados pelo cromossomo 18q12.3 pelo gene *JK* (*SLC14A1*, *HUT11A*), composto por 11 éxons e 30 kpb de gDNA, sendo os éxons de 4 a 11 codificam a proteína madura, conforme demonstrado na Figura 9^{62, 76}. O produto desse gene é uma glicoproteína de multipassagem com 389 aminoácidos que atravessam a membrana eritrocitária 10 vezes⁶².

O polimorfismo existente entre os antígenos Jk^a e Jk^b consiste na alteração de um único nucleotídeo na posição 838G>A do éxon 9. Existem, ainda, deleções, mutação do tipo missense e nonsense que podem levar ao fenótipo null. Ainda não se sabe a que se deve a presença ou a ausência do antígeno Jk3 na membrana das células^{76, 77}.

Os anticorpos desenvolvidos contra os antígenos do sistema Kidd são extremamente hemolíticos devido à resposta imune da classe IgG₁ e IgG₃, com capacidade de ativar o sistema complemento. Assim, as transfusões devem ser compatíveis para esse antígeno em pacientes aloimunizados⁷⁸.

Figura 9 - Esquema do gene *JK* (Adaptado de Reid, 2012)¹.

3.1.8 Sistema Diego

O sistema de grupo sanguíneo Diego (ISBT 010) possui 22 antígenos, sendo 3 de alta frequência (Di^b , Wr^b e DISK) e os outros 19, de baixa frequência. Os antígenos do sistema Diego são codificados pelo cromossomo 17q21.31 do gene *DI* (*SLC4A1*, *AE1*, *EPB3*), composto por 20 éxons distribuídos em 20 kpb de gDNA, conforme demonstrado na Figura 10. O produto desse gene é a proteína da Banda 3 de multipassagem, atravessando a membrana 14 vezes ^{1, 62, 79, 80}.

O antígeno Di^a é de baixa frequência na população branca e negra; no entanto, na população dos índios da América do Sul, ele está presente em heterozigose em, aproximadamente, 36% dos indivíduos, e, na população asiática, está presente em 10 ¹. Os anticorpos mais implicados com reações transfusionais são o Di^a , Di^b , Wr^a e, mais raramente, ELO e DISK ^{1, 79}.

Figura 10 - Esquema do gene *DI* (Adaptado de Reid, 2012) ¹.

3.1.9 Sistema Cartwright

O sistema de grupo sanguíneo Cartwright (ISBT 011) consiste em apenas 2 antígenos (Yt^a e Yt^b) localizados no cromossomo 7q22.1 pelo gene *YT(ACHE)* composto por 6 éxons distribuídos em 2,2 kpb de gDNA, sendo os éxons 5 e 6 alternativamente encaixados, conforme ilustrado na Figura 11. O produto desse gene é uma proteína ligada às GPI (Glicosilfosfatidilinositol) ⁶².

Anticorpos contra esses dois antígenos são relativamente raros. No entanto, são da classe IgG e clinicamente significantes ^{1, 81}.

Figura 11 - Esquema do gene *YT* (Adaptado de Reid, 2012) ¹.

3.1.10 Sistema Dombrock

O sistema de grupo sanguíneo Dombrock (ISBT 014) consiste em 10 antígenos, sendo dois pares antitéticos Do^a e Do^b e 8 antígenos de alta frequência (Gy^a , Hy , Jo^a , DOYA, DOMR, DOLG, DOLC, DODE). A expressão dos antígenos Do^a e Do^b é dependente dos antígenos de alta frequência. Tais antígenos são codificados pelo cromossomo 12p12.3 composto por 3 éxons distribuídos em 14 kpb de gDNA e esses são expressos em uma glicoproteína de 253 ou 240 aminoácidos ligados GPI, conforme demonstrado na Figura 12^{62, 82}.

Figura 12 - Esquema do gene *YT* (Adaptado de Reid, 2012)¹.

3.1.11 Sistema Colton

O sistema de grupo sanguíneo Colton (ISBT 015) consiste em 4 antígenos, sendo 1 polimórfico (Co^b) e 3 de alta frequência (Co^a , $\text{Co}3$, $\text{Co}4$), codificados pelo cromossomo 7p14.3, pelo gene *CO* [*AQP1* (*Aquaporina-1*)], composto por 4 éxons distribuídos em 11,6 kpb de gDNA, ilustrado na Figura 13. O produto desse gene é a proteína Aquaporina 1 (AQP1), uma proteína de multipassagem, atravessando a membrana eritrocitária 6 vezes ⁶².

Os anticorpos desenvolvidos contra esses antígenos são da classe IgG e clinicamente significantes e, até o momento, os soros para a determinação sorológica dos antígenos não foram comercializados. O anti- Co^a é mais clinicamente significativo que o anti- Co^b ^{1, 83}.

Figura 13 - Esquema do gene *CO* (Adaptado de Reid, 2012) ¹.

3.1.12 Sistema Cromer

O Sistema de grupo sanguíneo Cromer (ISBT 021) consiste em 18 antígenos, sendo 3 de baixa frequência (Tc^b , Tc^c e WES^a) e 15 de alta frequência. Os antígenos do sistema Cromer são codificados pelo cromossomo 1q32.2, gene *CROM* (*DAF*) composto por 11 éxons distribuídos em 40 kpb de gDNA, ilustrado na Figura 14. O produto desse gene é uma Glicoproteína ligada à GPI ⁶².

O antígeno Tc^b , de baixa frequência, está presente em até 6% da população negra. Já, os demais antígenos são de alta frequência nas populações ^{1, 62}, tornando o desenvolvimento de anticorpos menos provável. No entanto, tais anticorpos são clinicamente significantes ⁸⁴.

Figura 14 - Esquema do gene *CROM* (Adaptado de Reid, 2012) ¹.

3.1.13 Sistema Knops

O sistema de grupo sanguíneo Knops (ISBT 022) consiste em 9 antígenos, sendo 4 de baixa frequência e 5 de alta frequência. Desses, os antígenos SI^a, McC^b, Vil e KCAM são polimórficos em negros. Os antígenos do sistema Knops são codificados pelo cromossomo 1q32.2, gene *KN* (*CR1*), compostos por 39 éxons no *CR1*1*, 47 éxons no *CR1*2*, 30 éxons no *CR1*3* e 31 éxons no *CR1*4*, distribuídos em aproximadamente 160 kpb de gDNA, demonstrado na Figura 15^{1, 62}. O produto desse gene é expresso em uma Glicoproteína de única passagem do Tipo I, receptora de complemento tipo 1.

Os antígenos desse sistema geralmente não possuem significância clínica transfusional e são caracterizados pelo comportamento dos anticorpos HTLA (*high titer low avidity* - alto título e baixa aversez). Além disso, os anticorpos não fixam complemento, sendo considerados de baixa significância clínica^{1, 85}.

Figura 15 - Esquema do gene *CROM* (Adaptado de Reid, 2012)¹.

3.1.14 Sistema JMH

O Sistema de grupo sanguíneo JMH (ISBT 026) consiste em 6 antígenos de alta frequência, codificados pelo cromossomo 15q24.1, gene *JMH* (*SEMA7A*, *SEMA-L*, *CD108*), compostos por 14 éxons em 9 kpb de gDNA. O produto desse gene é uma Glicoproteína ligada à GPI ⁶².

Devido à alta frequência e à baixa imunogenicidade dos antígenos relacionados a esse sistema, raramente teremos anticorpos dirigidos contra esses antígenos. Os anticorpos desenvolvidos contra os antígenos do sistema JMH geralmente não têm importância clínica transfusional, no entanto, podem mascarar outros aloanticorpos de importância clínica, dificultando a investigação imuno-hematológica ^{1, 86, 87}.

3.2 Antígenos Plaquetários

Os antígenos plaquetários humanos (HPA) são formados por epítomos imunogênicos resultantes do polimorfismo nos genes que codificam as glicoproteínas de membrana das plaquetas⁸⁸. Esses antígenos são imunogênicos e sua frequência é variável entre diferentes grupos étnicos tendo importância clínica em casos de imunização por anti-HPA. Os anticorpos anti-plaquetários estão envolvidos em casos de PTAN (púrpura trombocitopênica aloimune neonatal), refratariedade plaquetária e púrpura pós-transfusional.

Até o momento, foram descritos 35 antígenos plaquetários, sendo os principais os HPAs 1 a 5 e o HPA-15, que são bialélicos, totalizando 12 antígenos. Os demais HPAs são de baixa frequência, conforme descrito na Tabela 2. Os genes que codificam as glicoproteínas que apresentam os antígenos HPAs estão localizados no braço longo do cromossomo 17, com exceção do HPA 5 e 15 que são codificados pelos cromossomos 5 e 6, respectivamente^{6, 7, 19, 89}.

Os antígenos expressos na membrana plaquetária podem ser de natureza glicolipídica ou glicoproteica, sendo que os antígenos ABO, P e Lewis têm característica glicolipídica, e os antígenos do sistema HLA de classe I, locus A, B, C e antígenos HPA presentes nas GPIIb/IIIa, GPIa/IIa, GPIb/IX, CD109 possuem característica glicoproteica^{7, 19, 89}.

Tabela 2 - Antígenos plaquetários

Antígeno	Glicoproteína	Nome do Gene	Localização Cromossômica
HPA-1	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-2	GP1ba	<i>GP1BA</i>	17p13.2
HPA-3	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17q21-q32
HPA-4	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-5	GP1a	<i>ITGA2</i>	5q11.2
HPA-6w	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-7w	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-8w	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-9w	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17q21-q32
HPA-10w	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-11w	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-12w	GP1bb	<i>GP1BB</i>	22q11.21
HPA-13w	GP1a	<i>ITGA2</i>	5q11.2
HPA-14w	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-15	CD109	<i>CD109</i>	6q13
HPA-16w	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-17w	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-18w	GP1a	<i>ITGA2</i>	5q11.2
HPA-19w	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HAP-20w	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17q21-q32
HPA-21w	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-22bw	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17q21-q32
HPA-23bw	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-24bw	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17q21-q32
HPA-25bw	GP1a	<i>ITGA2</i>	5q11.2
HPA-26bw	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32
HPA-27bw	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17q21-q32
HPA-28bw	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17q21-q32
HPA-29bw	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17q21-q32

Adaptado de St-Louis, 2014 ¹⁹

As glicoproteínas plaquetárias, especialmente, a GPIIb/IIIa e a GPIb/IX têm função na coagulação sanguínea, interagem com outras proteínas como a proteína extracelular do endotélio vascular fvW (fator de Von Willebrand) e a proteína plasmática (fibrinogênio), implicando no envolvimento delas na hemostasia ⁹⁰.

Assim como os antígenos eritrocitários, os antígenos plaquetários são resultados de polimorfismo de único ponto (SNP) na codificação genética e consequente substituição de um único aminoácido na Glicoproteína ^{91, 92}.

Os antígenos plaquetários mais imunogênicos, ou seja, que oferecem maior chance de aloimunização são os HLAs de classe I e os HPA 1, 2, 3, 4, 5 e 15. Para a identificação dos anticorpos que reagem com esses antígenos plaquetários específicos, têm sido utilizadas algumas técnicas sorológicas, como a imunofluorescência, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ensaio imunoenzimático), MAIPA (*monoclonal antibody immobilization of platelet antigen* - imobilização de antígeno plaquetário por anticorpo monoclonal), Citometria de fluxo e Imunoblot. No entanto, essas técnicas são complexas, demoradas e de difícil interpretação ⁹³.

Devido à dificuldade em realizar a fenotipagem dos antígenos plaquetários por testes "*in vitro*", técnicas de PCR foram elaboradas com o objetivo de detectar a presença dos alelos HPAs que codificam a produção dos antígenos plaquetários mais imunogênicos, como HPA-1, -2, -3, -4, -5 e -15 ^{6, 43}. A genotipagem pode ser empregada em casos de PTAN, PPT e em pacientes politransfundidos com refratariedade plaquetária imune por incompatibilidade HPA ⁹⁴. Além disso, o HPA-3b e 5b podem ser utilizados como marcadores de predisposição para síndrome vaso-oclusiva em pacientes com anemia falciforme, infarto agudo do miocárdio e predisposição a eventos pró-trombóticos ^{95, 96}.

Em casos de transfusão, possibilita a genotipagem de doadores de sangue, especialmente doadores de plaquetaférese para a compatibilização entre os

principais antígenos HPA, prevenindo a formação de anticorpos que são responsáveis por 2-17% dos casos de refratariedade plaquetária imune. Porém, os anticorpos anti-HLA também são mais prevalentes em pacientes politransfundidos^{24, 25}. Sendo assim, é interessante a associação da genotipagem com o uso de plaquetas leucorreduzidas para diminuir a chance de aloimunização HLA, otimizando o risco benefício em transfusão de plaquetas^{9, 10}.

O quadro 2 apresenta as frequências fenotípicas dos antígenos plaquetários contemplados neste trabalho^{43, 89, 97}.

Quadro 2 – Frequência fenotípica dos antígenos plaquetários

		Homozigoto para o alelo 1			Heterozigoto			Homozigoto para o alelo 2		
		Fenótipo	Raça Branca	Raça Preta*	Fenótipo	Raça Branca	Raça Preta*	Fenótipo	Raça Branca	Raça Preta*
HPA	HPA-1	1aa	71,3**	82,6 [†]	1aa	24,7**	15,4 [†]	1bb	4**	2 [†]
	HPA-2	2aa	70**	65,4 [†]	2ab	26**	31,3 [†]	2bb	4**	3,3 [†]
	HPA-3	3aa	51,3**	45,4 [†]	3ab	37,3**	42,6 [†]	3bb	11,3**	12 [†]
	HPA-4	4aa	100**	100 [†]	4ab	Raro**	0 [†]	4bb	Raro**	0 [†]
	HPA-5	5aa	79,3**	76 [†]	5ab	18,7**	23,3 [†]	5bb	2**	0,7 [†]
	HPA-15	15aa	24,7**	40 ^{††}	15ab	42**	33 ^{††}	15bb	33,3**	27 ^{††}

* Nomenclatura em concordância com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)

** Baseado em Bianchi *et al.* 2012⁸⁹

[†] Baseado em Castro *et al.* 1999⁴³

^{††} Baseado em Cardone *et al.* 2004⁹⁷

3.2.1 Antígenos plaquetários presentes na GPIIIa: HPA-1 e HPA-4

A glicoproteína IIIa é uma integrina de cadeia β_3 sendo encontrada junto com a cadeia α_{IIb} em plaquetas, podendo combinar com diferentes cadeias, resultando em diferentes integrinas. Essas integrinas são conhecidas por participarem na adesão e agregação celular^{51, 92}.

Tanto o HPA-1, primeiramente descrito como Pl^A ou Zw, como o HPA-4 descrito como Pen ou Yuk, estão presentes na GPIIIa (antígeno CD61) constituída por 788 aminoácidos. Essa glicoproteína expressa outros antígenos plaquetários que não apresentam significância clínica HPA-6, -7, -8, -10, -11, -14, e -16⁵¹. Esses antígenos plaquetários são codificados pelo gene *ITGB3*, localizado no cromossomo 17q21-q32, composto por 15 éxons, conforme ilustrado na Figura 16.

O HPA-1 é responsável direto por mais de 90% dos casos de púrpura pós-transfusional e púrpura trombocitopênica aloimune neonatal em indivíduos caucasianos; em casos de aloimunização, os anticorpos podem agir como inibidores da agregação plaquetária⁸⁹.

Embora o HPA-4 tenha sido identificado após um caso de púrpura trombocitopênica aloimune neonatal, raramente esse antígeno está relacionado com casos de aloimunização, em decorrência da homogeneidade de sua frequência em nossa população^{61, 98}.

Figura 16 - Esquema do gene *ITGB3* (Baseado em www.ncbi.nlm.nih.gov/gene).

3.2.2 Antígeno plaquetário presente na GPIba: HPA-2

A GPIba é uma glicoproteína de superfície de membrana plaquetária composta por um heterodímero, sendo uma cadeia α de 140 kD ligada por pontes dissulfídicas à cadeia β de 22 kD. É parte do complexo GPIb/IX/V, em que a GPIb funciona como um receptor de fvW, controlando a adesão das plaquetas na circulação arterial ^{51, 92}.

O HPA-2, conhecido como Ko ou Sib, está presente na GPIba constituída por 226 aminoácidos. A subunidade GPIb β expressa o antígeno HPA-12. Esse sistema de antígeno plaquetário é codificado pelo gene *GP1BA* localizado no cromossomo 17p13.2, composto por 2 éxons, conforme demonstrado na Figura 17 ^{7, 89}.

Figura 17 - Esquema do gene *GP1BA* (Baseado em www.ncbi.nlm.nih.gov/gene).

3.2.3 Antígeno plaquetário presente na GPIIb: HPA-3

A glicoproteína IIb é uma integrina de cadeia α_{IIb} . As integrinas são proteínas de membranas heterodiméricas compostas de uma cadeia alfa e de uma cadeia beta. Desempenham um papel crucial na coagulação pela participação na sinalização de superfície celular ⁵¹.

O HPA-3, conhecido como Bak ou Lek, está presente na GPIIb (do complexo GPIIb/IIIa) constituída por 1039 aminoácidos, cuja glicoproteína expressa o antígeno HPA-9. Tais antígenos plaquetários são codificados pelo gene *ITGA2B* localizado no cromossomo 17q21-q32, composto por 30 éxons ^{61, 98}.

O primeiro exemplo de púrpura trombocitopênica aloimune neonatal foi decorrente de incompatibilidade materno-fetal pelo HPA-3. É responsável por cerca de 2% dos casos de PTAN, em que o diagnóstico, muitas vezes, é dificultado em decorrência da baixa sensibilidade dos métodos para detecção de anticorpos ⁹³.

Figura 18 - Esquema do gene *ITGA2B* (Baseado em www.ncbi.nlm.nih.gov/gene).

3.2.4 Antígeno plaquetário presente na GPIa: HPA-5

A GPIa pertence à família das integrinas α , está envolvida na adesão celular e também participa da sinalização mediada pela superfície celular ⁵¹.

O HPA-5, descrito como Br, Hc ou Zav, está presente na GPIa (do complexo GPIIb/IIIa) constituída por 1181 aminoácidos. Essa mesma glicoproteína expressa o antígeno HPA-13, sendo esse codificado pelo gene *ITGA2* localizado no cromossomo 5q11.2, composto por 30 éxons, conforme ilustrado na Figura 19.

Segundo Klen, Mollison e Anstee, o HPA-5 é muito imunogênico e associa-se frequentemente com a púrpura trombocitopênica aloimune neonatal ^{61, 98, 99}.

Figura 19 - Esquema do gene *ITGA2* (Baseado em www.ncbi.nlm.nih.gov/gene).

3.2.5 Antígeno plaquetário presente no CD109: HPA-15

O CD109 está ligado a Glicosilfosfatidilinositol constituída por 1445 aminoácidos. Nele está expresso o HPA-15, descrito primeiramente como Gov^a e Gov^b, correspondente ao HPA-15b e HPA-15a, respectivamente.

O HPA-15 é codificado pelo gene *CD109* localizado no cromossomo 6q13, composto por 33 éxons, conforme demonstrado na Figura 20.

A sensibilização contra o HPA-15 está relacionada à refratariedade plaquetária e é responsável por 6,2% dos casos de aloimunização ³⁶. Os anticorpos anti-HPA-15, geralmente ocorrem em associação a outros anticorpos contra HPA ³⁶.

100 .

Figura 20 - Esquema do gene *CD109* (Baseado em www.ncbi.nlm.nih.gov/gene).

3.3 Metodologias aplicadas para genotipagem dos antígenos eritrocitários e plaquetários

Todas as metodologias para determinação de grupos sanguíneos são baseadas em PCR¹⁹. A maior parte dos ensaios são desenvolvidos para a detecção de polimorfismo de único nucleotídeo do tipo missense, que leva à alteração do aminoácido da proteína, alterando o fenótipo. Dessa forma, pode-se deduzir o fenótipo, a partir do genótipo em antígenos codificados diretamente pelos genes do grupo sanguíneo específico. No entanto, alguns antígenos não são produtos primários dos genes, ou seja, existe uma relação indireta entre o genótipo e o fenótipo, cujo processo pode ser observado nos genes que codificam as enzimas envolvidas nas cadeias de carboidratos (ABO, H, I, GLOB). Nesses casos, a predição do fenótipo baseado no genótipo é mais complicada. Na presença de genes homólogos *RHD* e *RHCE* (sistema de RH) e *GYP A* e *GYP B* gene (sistema MNS), existe maior dificuldade na genotipagem devido à troca de sequências de DNA entre os genes que podem gerar formação de novos antígenos e antígenos variantes^{18, 20, 63}.

Os SNPs podem ser determinados por uma variedade de métodos de genotipagem, incluindo reação em cadeia da polimerase com primer de sequência específica (PCR-SSP), utilizando enzimas de restrição (PCR-RFLP), PCR em tempo real baseado em extensão alelo-específico, ensaios de hibridação (PCR-ELISA), sequenciamento e espectrometria de massa, sendo que a diferença entre esses métodos é principalmente o processo de detecção dos SNPs selecionados e o número de amostras processadas por corrida^{18-20, 101}.

Os experimentos iniciais de genotipagem envolveram a amplificação da sequência de genes relevantes de grupos sanguíneos com o uso de enzimas de

restrição, conhecido como PCR-RFLP. O desenho desses experimentos foi baseado na introdução ou perda de sítios de restrição do SNP de interesse. A desvantagem é a complexidade na realização dos ensaios ¹⁸.

Na técnica de PCR-SSP, o produto de PCR será produzido somente se a sequência de interesse estiver presente. Esse teste requer iniciadores específicos para a amplificação somente do alelo de interesse. Para isso, é importante a realização de um marcador (Ladder) para a análise do tamanho do fragmento amplificado e a confiabilidade do resultado. Pode-se, ainda, associar essa técnica ao multiplex, para facilitar a pesquisa de vários alelos simultaneamente desde que os alelos estudados tenham produtos de tamanhos diferentes. O PCR-SSP pode ser utilizado em serviços de produção pequena e média, já que os ensaios exigem uma análise pós-PCR em gel de agarose, aumentando o trabalho e o tempo de liberação dos resultados ¹⁶.

Atualmente, a técnica mais moderna para a análise do DNA é conhecida como Microarray, que é uma poderosa ferramenta experimental para a detecção de sequências específicas do genoma e tem valor inestimável em diversas aplicações, inclusive, na determinação genotípica dos antígenos plaquetários e eritrocitários, na qual os fragmentos de DNA são hibridizados com sondas para ativar sensores do equipamento, e os dados são analisados usando softwares específicos para cada plataforma ⁴⁰⁻⁴². Conforme descrito por Denomme, Johnson, e Pietz, somente no ano de 2005, quatro artigos foram publicados simultaneamente sobre os benefícios da genotipagem eritrocitária e plaquetária em larga escala e, nos últimos anos, a tecnologia tem sofrido avanços muito rápidos dentro dessa linha de pesquisa ²¹. O microarray é um método para detecção de SNP, em larga escala, usando um PCR alelo-específico, no qual os produtos marcados são anelados às lâminas contendo as sondas de oligonucleotídeos alelo-específico. A Tabela 3 apresenta as

tecnologias em fase de desenvolvimento tanto de plataformas desenvolvidas em pesquisas como das plataformas comerciais já existentes no mercado ¹⁹.

Nos últimos 8 anos, foram desenvolvidos testes comerciais utilizados para genotipagem em larga escala, aplicáveis em Bancos de Sangue, com base na tecnologia de microarray. Os testes desenvolvidos pela Progenika são: BLOODchip Reference e os ensaios da plataforma Luminex: ID-Core, ID-Core⁺, ID-Core XT. Os testes desenvolvidos pela Immucor são: IDHPA BioArray™ HEA Beadchip, BioArray™ HPA, BioArray™ RHCE Beadchip™, BioArray™ RHD Beadchip™ e um ensaio desenvolvido pela AXO Science: HIFI BLOOD 96™ ¹⁹.

Além das plataformas comerciais, existem também aquelas desenvolvidas por pesquisa como o GenomeLab™ SNPstream® (Beckman Coulter), MALDI-TOF MS (Sequenom Bioscience), OpenArray® e SNaPshot® (Life Technologies) ^{16, 19}. Essas metodologias têm alta sensibilidade e especificidade, podendo ser aplicadas na rotina de pacientes politransfundidos, genotipagem fetal, genotipagem de doadores em larga escala, entre outras aplicações; no entanto, são técnicas muito dispendiosas ^{16, 19, 37, 39, 102}.

Tabela 3 - Plataforma existente para genotipagem eritrocitária e plaquetária.

Plataforma	Empresa	Quantidade de alelos/SNPs analisados
Desenvolvido por pesquisadores		
GenomeLab™ SNPstream®	Beckman Coulter, USA	19 alelos/22 alelos
MALDI-TOF MS	Sequenom Bioscience, USA	13 alelos
OpenArray®	Life Technologies, USA	17 alelos
SNaPshot®	Life Technologies, USA	35 alelos/16 alelos
Plataformas comerciais		
BLOODchip Reference	Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain	128 SNPs eritrocitários e plaquetários
ID-Core	Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain	23 alelos eritrocitários
ID-Core ⁺	Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain	33 alelos eritrocitários
ID-Core XT	Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain	37 alelos eritrocitários
IDHPA	Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain	12 alelos plaquetários
BioArray™ HEA Beadchip™	Immucor, USA	24 SNPs ou 38 alelos
BioArray™ HPA	Immucor, USA	22 alelos plaquetários
BioArray™ RHCE Beadchip	Immucor, USA	35 alelos variantes
BioArray™ RHD Beadchip	Immucor, USA	75 alelos variantes
HIFI BLOOD 96™	AXO, Science, França	29 alelos eritrocitários

Adaptado de St-Louis, 2014 ¹⁹

4 Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Amostras de sangue de 400 doadores da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (FPS-HSP) foram coletadas no período de 24 de outubro a 8 de novembro de 2011, após consentimento informado. Após a assinatura do TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido), a coleta da bolsa de sangue e dos tubos para os ensaios sorológicos e imuno-hematológicos, um tubo de EDTA contendo aproximadamente 3,5 mL de sangue foi coletado para a análise molecular realizada nesta pesquisa. Essa amostragem permitiria a detecção de alelos de baixa frequência, encontrados em aproximadamente 1% da população.

As amostras de DNA com diferentes alelos para todos os SNPs estudados foram utilizadas para validar o método OpenArray. Para desenho do ensaio OpenArray, foram escolhidos 30 SNPs, sendo 24 codificadores de antígenos eritrocitários e 6 de antígenos plaquetários.

4.2 Ética

Os doadores foram convidados a participar do estudo, de forma voluntária, no momento da doação de sangue. Aqueles que concordaram em participar receberam e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), contendo informações sobre o estudo (ANEXO A). Este estudo foi aprovado pelo

Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa nº 275/11 – ANEXO B).

4.3 Análise Molecular

4.3.1 Seleção dos SNPs

O método de genotipagem pelo OpenArray permite somente a análise de polimorfismos missense ou SNPs. Os SNPs analisados foram escolhidos de acordo com os principais sistemas de grupos sanguíneos para a customização do ensaio, sendo organizados em dois grupos: aqueles com relevância na prática transfusional e aqueles cuja frequência era desconhecida na população brasileira.

Primeiramente, foram selecionados 42 SNPs referentes a alelos de antígenos eritrocitários, 6 SNPs relacionados a alelos de antígenos plaquetários e 16 SNPs referentes a alelos não relacionados a este trabalho, compondo uma lâmina de 64 SNPs. Dos 42 SNPs selecionados, 6 SNPs não foram sintetizados pela empresa por serem de regiões com alta possibilidade de mascaramento, levando a resultados incorretos; 5 SNPs foram realizados apenas para teste sem intuito de análise e 7 SNPs tiveram resultados diferentes das amostras controles e foram excluídos do trabalho. Embora sejam considerados de extrema importância na genotipagem de grupos sanguíneos, entre eles, foram excluídos C/c, E/e, V, VS e M/N. Esse erro foi atribuído ao fato de esses SNPs apresentarem regiões repetidas no genoma, o que exigiria o desenho de um novo primer em outra região que não houvesse mascaramento e sintetizar novamente as lâminas, inviabilizando

a repetição dos experimentos. Restaram, assim, 24 SNPs referentes aos antígenos eritrocitários (conforme demonstrado na tabela 4) e 6 SNPs referentes aos antígenos plaquetários (conforme demonstrado na tabela 5), totalizando 30 SNPs (60 alelos) para serem estudados.

Nenhum dos sistemas mencionados abaixo foi validado pelo método OpenArray em decorrência da falta de qualidade nos RS ou falta de informações para sintetizar o ensaio de: ABO(001), P1PK(003), RH(004), LE(007) XG(012), SC(013), LW(016), CH/RG(017), H(018), ~~XK(019)~~, GE(020), IN(023), OK(024), RAPH(025), I(027), GLOB(028), GIL(029), RHAG(030), FORS(031), JR(32), LAN(033), VEL(034), CD59(035) e AUG(036).

Tabela 4 - Genótipos estudados – Antígenos Eritrocitários

Sistema de grupo sanguíneo	Nome do Gene	Fenótipo	Alelo	Aminoácido substituído (nucleotídeo substituído)	RS
002 MNS	<i>GYPB</i>	S	<i>GYPB*03</i>	T48M (143C>T)	7683365
		s	<i>GYPB*04</i>		
005 Lutheran	<i>LU</i>	Lu(a+)	<i>LU*01</i> ou <i>LU*A</i>	R77H (230G>A)	28399653
		Lu(b+)	<i>LU*02</i> ou <i>LU*B</i>		
006 Kell	<i>KEL</i>	K	<i>KEL*01</i>	T193M (578C>T)	8176058
		k	<i>KEL*02</i>		
		Kp(a+)	<i>KEL*03</i>	R281W (841C>T)	8176059
		Kp(b+)	<i>KEL*04</i>		
		Js(a+)	<i>KEL*06</i>	L597P (1790T>C)	8176038
		Js(b+)	<i>KEL*07</i>		
008 Duffy	<i>DARC</i>	Fy(a+)	<i>FY*01</i> ou <i>FY*A</i>	D42G (125A>G)	12075
		Fy(b+)	<i>FY*02</i> ou <i>FY*B</i>		
		Fy(a-b-) somente nos eritrócitos	<i>FY*02N.01</i>	(1-67T>C)	2814778
		Fy ^x	<i>FY*02W.01</i>	R89C (265C>T)	34599082
009 Kidd	<i>SLC14A1, HUTII</i>	Jk(a+)	<i>JK*01</i> ou <i>JK*A</i>	N280D (838A>G)	1058396
		Jk(b+)	<i>JK*02</i> ou <i>JK*B</i>		
010 Diego	<i>SLC4A1, AE1</i>	Di(a+)	<i>DI*01</i> ou <i>DI*A</i>	P854L (2561C>T)	2285644
		Di(b+)	<i>DI*02</i> ou <i>DI*B</i>		
		Wr(a+)	<i>DI*02.03</i>	E658K (1972G>A)	45568837
		Wr(b+)	<i>DI*02.04</i>		
011 Cartwright	<i>ACHE</i>	Yt(a+)	<i>YT*01</i> ou <i>YT*A</i>	H353N (1057C>A)	1799805
		Yt(b+)	<i>YT*02</i> ou <i>YT*B</i>		
014 Dombrock	<i>ART4</i>	Do(a+)	<i>DO*01</i> ou <i>DO*A</i>	N265D (793A>G)	11276
		Do(b+)	<i>DO*02</i> ou <i>DO*B</i>		
		Hy+	<i>DO*02.04</i>	G108V (323G>T)	28362797
		Jo(a+)	<i>DO*02.05</i>	T117I (350C>T)	28362798
015 Colton	<i>AQP1</i>	Co(a+)	<i>CO*01</i> ou <i>CO*A</i>	A45V (134C>T)	28362692
		Co(b+)	<i>CO*02</i> ou <i>CO*B</i>		
019 KX	<i>XK</i>	KX+	<i>XK*N.28</i>	C294R (880T>C)	28933690
021 Cromer	<i>CD55 (DAF)</i>	Tc(a+)	<i>CROM*01.02</i>	R52L (155G>T)	28371588
		Tc(b+)	<i>CROM*01.03</i>		
		Dr(a+)	<i>CROM*01.05</i>	S199L (596C>T)	56283594
		Cr(a+)	<i>CROM*01</i> ou <i>CR*A</i>	A227P (679G>C)	60822373
022 Knops	<i>CR1</i>	Kn(a+)	<i>KN*01</i> ou <i>KN*A</i>	V1561M (4681G>A)	41274768
		Kn(b+)	<i>KN*02</i> ou <i>KN*B</i>		
		McC(a+)	<i>KN*01.03</i>	K1590E (4768A>G)	17047660
		McC(b+)	<i>KN*01.06</i>		
		Sl(a+)	<i>KN*01.04</i>	R1601G (4801A>G)	17047661
		Vil	<i>KN*01.07</i>		
026 JMH	<i>SEMA7A</i>	JMH+	<i>JMH*01.03</i>	R203Q (620G>A)	55637216

Baseado em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>; Storry *et al.* 2014; Reid *et al.* 2006¹⁰³⁻¹⁰⁷

Tabela 5 - Genótipos estudados – Antígenos Plaquetários

Sistema de grupo sanguíneo	Nome do Gene	Alelo	Aminoácido substituído (nucleotídeo substituído)	RS
Antígenos Plaquetários	<i>ITGB3</i>	HPA-1a HPA-1b	L59P (176T>C)	5918
	<i>GP1BA</i>	HPA-2a HPA-2b	T161M (482C>T)	6065
	<i>ITGA2B</i>	HPA-3a HPA-3b	I874S (2621T>G)	5911
	<i>ITGB3</i>	HPA-4a HPA-4b	R169Q (506G>A)	5917
	<i>ITGA2</i>	HPA-5a HPA-5b	E534K (1600G>A)	1801106
	<i>CD109</i>	HPA-15a HPA-15b	S703Y (2108C>A)	10455097

Baseado em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

Todos os SNPs foram consultados no “Repeat Masker” (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>), retornando a consulta com a informação das sequências que podem ser mascaradas, ou seja, que podem existir em outras regiões do genoma e amplificar de forma inespecífica. Os resultados da pesquisa estão expressos na Tabela 6. Os SNPs inventariados pela empresa (Life Technologies, Foster City , CA , EUA) têm funcionamento garantido pelo fornecedor, visto que passam por uma série de testes antes de o ensaio ser registrado.

Tabela 6 - Resultado da pesquisa no “Repeat Masker”

RS	SNPs INVENTÁRIADOS LIFE TECHNOLOGIES	SNP	PESQUISA REPEATMASKER
rs7683365	*	S/s	MASCARADO***
rs28399653	C__25764173_10	Lu ^a /Lu ^b	MASCARADO**
rs8176058	*	K/k	OK
rs8176059	C__25596888_20	Kp ^a /Kp ^b	OK
rs8176038	C__25596899_20	Js ^a /Js ^b	OK
rs12075	C__2493442_10	Fy ^a /Fy ^b	OK
rs2814778	C__15769614_10	Fy ^b silencioso somente no eritrócito	OK
rs34599082	C__25952780_20	Fy ^x	OK
rs1058396	C__1727582_10	Jk ^a /Jk ^b	MASCARADO**
rs2285644	C__26654865_10	Di ^a /Di ^b	OK
rs45568837	C__86381382_10	Wr ^a /Wr ^b	MASCARADO**
rs1799805	C__8786419_20	Yt ^a /Yt ^b	OK
rs11276	C__2687344_20	Do ^a /Do ^b	MASCARADO**
rs28362797	C__22271557_20	Hy	OK
rs28362798	C__25640120_20	Jo ^a	OK
RS28362692	*	Co ^a /Co ^b	OK
rs28933690	C__27528415_20	KX	OK
rs28371588	C__25599739_10	Tc ^a /Tc ^b	OK
rs56283594	*	Dr(a)	MASCARADO***
rs60822373	*	Cr(a)	OK
rs41274768	C__25598594_10	Kn ^a /Kn ^b	OK
rs17047660	C__25598593_10	McC ^a /McC ^b	OK
rs17047661	C__25473166_10	Sl ^a /Vil	OK
rs56367230	C__89222171_10	JMH	OK
rs55637216	C__89222170_10	JMH	OK
rs5911	C__3017440_10	HPA 3a/3b	OK
rs5918	C__818008_30	HPA 1a/1b	OK
rs5917	C__11416452_20	HPA 4a/4b	OK
rs6065	C__11442703_10	HPA 2a/2b	OK
rs1801106	C__27862812_10	HPA 5a/5b	MASCARADO**
rs10455097	C__3226894_10	HPA 15a/15b	MASCARADO**

*SNPs não inventariados pela LifeTechnologies

**SNPs Mascarados, porém, inventariados pela LifeTechnologies com resultados compatíveis aos controles

*** SNPs Mascarados, porém, com resultados compatíveis aos controles

4.3.2 Estratégia para validação do método

A análise molecular foi dividida em três etapas:

Primeira etapa: testamos 400 amostras no equipamento de OpenArray para alelos referentes a antígenos eritrocitários e plaquetários (conforme mostra a Figura 21). Paralelamente, foram testadas as amostras controles para a análise da exatidão dos resultados (conforme mostra a Figura 22).

Segunda etapa: foram selecionadas 242 amostras previamente genotipadas pelo OpenArray para a comparação dos resultados por uma plataforma fechada e validada de genotipagem em larga escala, o BLOODchip (Plataforma Luminex), cujos kits são denominados ID-Core XT e ID-HPA. O critério para a escolha das amostras a serem testadas no BLOODchip foi de acordo com o resultado encontrado no OpenArray, priorizando a testagem de amostras que apresentaram presença de alelos de baixa frequência em heterozigose e homozigose, entre outras amostras escolhidas aleatoriamente.

Terceira etapa: para a validação do método, as amostras que apresentaram resultados discrepantes entre o OpenArray e o BLOODchip foram sequenciadas pelo método Sanger para a confirmação dos resultados (conforme mostra a Figura 21).

Figura 21 - Fluxograma do processamento das amostras testes.

4.3.3 Controles

Para validação da plataforma OpenArray, foram utilizadas 173 amostras de DNA que possuíam todos os perfis de alelos analisados por este estudo, denominadas controles. Os genótipos dos controles foram previamente determinados, utilizando métodos de PCR, conforme demonstrado na Figura 22. Os números de controles submetidos à avaliação de cada SNP estão descritos na Tabela 7.

Figura 22 - Fluxograma do processamento das amostras controles

Tabela 7 - Número de controles para cada SNP contemplado no OpenArray

Sistema de grupo sanguíneo	SNP	Número de Amostras Controles
002 MNS	S/s	80
005 Lutheran	Lu ^a /Lu ^b	67
006 Kell	K/k	80
	Kp ^a /Kp ^b	69
	Js ^a /Js ^b	69
008 Duffy	Fy ^a /Fy ^b	81
	Fy(a-b-) somente nos eritrócitos	80
	Fy ^x	68
009 Kidd	Jk ^a /Jk ^b	88
010 Diego	Di ^b /Di ^a	71
	Wr ^a /Wr ^b	0 [†]
011 Yt	Yt ^a /Yt ^b	4*
014 Dombrock	Do ^a /Do ^b	68
	Hy	67
	Jo ^a	65
015 Colton	Co ^a /Co ^b	68
019 KX	KX	0 [†]
021 Cromer	Tc ^a /Tc ^b	0 [†]
	Dr(a)	0 [†]
	Cr(a)	0 [†]
022 Knops	Kn ^a /Kn ^b	1*
	McC ^a /McC ^b	0 [†]
	Sl ^a /Vil	1*
	JMH	0 [†]
HPA	HPA 1a/1b	56
	HPA 2a/2b	54
	HPA 3a/3b	48
	HPA 4a/4b	56
	HPA 5a/5b	46
	HPA 15a/15b	48

*Controles testados por PCR convencional

0[†] Amostras sem controles

4.4 Extração e quantificação de DNA

O DNA foi isolado a partir de 200 µL de sangue total, utilizando o QIAamp DNA Mini-kit (Qiagen, Hilden Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade e a qualidade do DNA foi determinada pelo método de espectrofotometria utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Todas as amostras com pureza 260/280 e 260/230 abaixo de 1.8 e acima de 2.1 foram reextraídas e posteriormente diluídas para uma concentração final de 35ng/uL.

4.5 PCR - OpenArray

A genotipagem foi realizada com a plataforma OpenArray (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) com os ensaios TaqMan. Essa plataforma é uma tecnologia de alta performance, larga escala, baseada em PCR em tempo real, capaz de avaliar 3072 SNPs por lâmina e permite a customização do ensaio ¹⁰⁸. Cada lâmina utilizada no OpenArray permite a execução de 64 genotipagens por amostra, em 48 amostras por lâmina, conforme mostra a Figura 23. Existem 6 formatos disponíveis, nomeados por meio do número de ensaios disponíveis, e variam pelo número de ensaios TaqMan para genotipagem por cada subarranjo. O formato refere-se ao número de SNPs investigados por amostra.

Figura 23 - Representação esquemática do formato da lâmina de OpenArray. Esse formato contém 48 subarranjos com 64 poços (cada poço com volume de 33nL) totalizando 3.072 poços, no formato 64, há 64 ensaios para 48 amostras (Martins *et al.* 2013) ¹⁰⁸.

Esse sistema permite o processamento de até quatro lâminas por hora, isto é, 384 amostras em uma lâmina de 64 SNPs, totalizando 12.288 genotipagens por dia. Cada poço possui primers e sondas específicas para cada alelo marcadas com os fluoróforos VIC e FAM, no qual, o alelo 1 é marcado com VIC e o alelo 2 é marcado com FAM. Assim, temos os resultados em VIC/VIC, VIC/FAM ou FAM/FAM (conforme mostra a Figura 24). Esse método baseia-se na atividade 5'-endonuclease de Taq polimerase para clivar uma sonda anelada durante a extensão do DNA. O sinal de fluorescência é detectado quando o “*quencher*” e o “*reporter*” se separam. A vantagem dos ensaios com TaqMan é a facilidade na obtenção dos resultados, o fato de não aumentar significativamente o tempo de ensaio, e a possibilidade de conceber ensaios em condições semelhantes para facilitar a transcrição dos resultados. Além disso, há limitação à contaminação do ambiente por amplicons, devido ao uso de sistema fechado.

Figura 24 - A figura mostra o esquema de anelamento das sondas VIC e FAM, em indivíduos homozigotos para o alelo 1; o produto de PCR apresenta fluorescência de VIC em indivíduos homozigotos para o alelo 2; o produto de PCR apresenta fluorescência de FAM em indivíduos heterozigotos, o produto de PCR apresenta fluorescência de VIC e FAM (disponível em <http://www.lifetechnologies.com/br>).

O DNA foi previamente misturado ao TaqMan Genotyping Master Mix (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) em uma placa de 384 poços (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) e, em seguida, esse conteúdo foi transferido para a lâmina, de forma automatizada, pelo equipamento chamado AccuFill™ (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A superfície da lâmina é hidrofóbica e o interior dos poços é hidrofílico e biocompatível (conforme mostra a figura 4), permitindo o carregamento e a retenção das amostras com um volume de 33nL em cada poço¹⁰⁹.

Após o carregamento, a lâmina foi transferida para um estojo de acrílico preenchido com um fluido de imersão e selado com cola para seguir com a reação de PCR, no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), com o seguinte ciclo de PCR: um passo inicial a 93°C, durante 10 minutos; seguido por 50 ciclos de 45 segundos a 95°C, 13 segundos a 94°C e 2 minutos e 14 segundos a 53°C, seguido de uma etapa final, durante 2 minutos a 25°C e infinito a 4°C.

Os resultados de fluorescência foram lidos no “*endpoint*” no BioTrove OpenArray SNP plataforma de genotipagem (Life Technologies, Foster City, CA, EUA). A análise da genotipagem foi feita com o software versão TaqMan® Genotyper 1.3 (disponível em <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/global/forms/taqman-genotyper-software-download-reg.html>), utilizando “*autocalling*” como o método de interpretação automática dos resultados, exceto para Kell e Jo^a, nos quais o software de interpretação considerou que as fluorescências de VIC e FAM estavam muito próximas, sendo indicado, nesse caso, a leitura manual. Os resultados foram considerados válidos quando a taxa chamada de “*Call Rate*” que é determinada pela intensidade do sinal de fluorescência foi maior ou igual a 90%. O software de interpretação dos resultados agrupa as amostras homozigotas para FAM (alelo 2) no eixo Y do gráfico (em azul), as amostras homozigotas para VIC

estão agrupadas no eixo X do gráfico (em vermelho) e as amostras heterozigotas ficam agrupadas entre os dois eixos (em verde). Um controle branco (NTC) foi utilizado em todas as baterias, sinalizado em amarelo, conforme mostra a Figura 25.

Figura 25 - Representação esquemática dos resultados no software do TaqMan® Genotyper 1.3. Em azul estão as amostras homozigotas para o alelo 2 (FAM/FAM); em vermelho, estão as amostras homozigotas para o alelo 1 (VIC/VIC) e, em verde, estão as amostras heterozigotas (VIC/FAM). Em amarelo, está demonstrado o branco (NTC) e os resultados plotados em forma de quadrados são amostras controles.

4.6 BLOODchip (plataforma Luminex) – ID-CORE XT E ID-HPA

Como o OpenArray é uma plataforma aberta, para a validação do ensaio proposto foi necessária a comparação dos resultados de 242 amostras com BLOODchip (plataforma Luminex), uma plataforma fechada e padronizada que contempla os principais alelos desse estudo.

A necessidade de testar um número maior de amostras surgiu das discrepâncias observadas nas amostras controles entre uma pequena porcentagem

dos resultados de Microarray em plataforma fechada BeadCheap HEA e o OpenArray.

O BLOODchip (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain) é uma matriz disponível no mercado projetado para a genotipagem eritrocitária (ID-Core) e plaquetária (ID-HPA) e contempla os alelos demonstrados na Tabela 8, usando o sistema Luminex. O Luminex é um citômetro de fluxo modificado que utiliza sondas de oligonucleotídeos específicos, fixados a microesferas codificadas por cor, que hibridizam especificamente com os produtos marcados de PCR. Nessa plataforma, as regiões alvo do DNA genômico são amplificadas em uma reação de PCR multiplex, realizada com nucleotídeos biotinilados, seguida da hibridização, utilizando sondas de oligonucleotídeos alelos específicos ligadas a microesferas ("beads") e marcadas com ficoeritrina e estreptavidina conjugadas e posterior revelação com SAPE (*Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate* – Streptavidina conjugada a Ficoeritrina).

Nessa técnica, o DNA (previamente diluído a 20 ng/μL) foi amplificado por PCR usando o Master Mix (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain) e a Taq Hot Start (Qiagen). As reações de PCR foram realizadas no termociclador Geneamp PCR 9700 com bloco de ouro (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), com o seguinte ciclo de PCR: um passo inicial a 95°C, durante 15 minutos, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 80 segundos a 72°C, seguido de uma etapa final durante 7 minutos a 72°C e infinito a 4°C.

Após a amplificação, foi realizada a hibridização do produto de PCR com as microesferas marcadas, pipetando-se 4μL do produto de PCR para 46μL das Beads Master Mix (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain). As reações foram realizadas no termociclador Geneamp PCR 9700 com bloco de ouro com o seguinte programa: 95°C durante 2 minutos, seguido por 52°C, durante 30

minutos. Após os 30 minutos de hibridização, a placa foi mantida no termociclador e o siler foi removido para a adição do SAPE (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain) em todos os poços promovendo a revelação da hibridização.

O produto da reação foi analisado no sistema Luminex 100/200 com software xPONENT 3.1 (Luminex, USA), no qual verifica-se a presença de polimorfismos específicos em cada amostra analisada, por meio do sinal de fluorescência intrínseca de cada microesfera, com a presença ou ausência de um sinal correspondente à ficoeritrina. O software de análise de dados interpreta os sinais quantificados e produz um banco de dados com os resultados de genótipo para cada um dos SNPs incluídos. O software também converte os genótipos em fenótipos previstos para os antígenos dos grupos sanguíneos testados.

O ID-HPA contempla sequências para a determinação do HPA-1 ao HPA-11 e HPA-15 e o ID-Core contempla sequências para a determinação do *RHD*, *RHCE*, *GYPB*03*, *GYPB*04*, *LU*A*, *LU*B*, *KEL*01*, *KEL*02*, *KEL*03*, *KEL*04*, *KEL*06*, *KEL*07*, *FY*A*, *FY*B*, *FY*02N.01*, *FY*02W*, *JK*A*, *JK*B*, *DI*A*, *DI*B*, *DI*03*, *DI*04*, *YT*A*, *YT*B*, *DO*A*, *DO*B*, *DO*02.04*, *DO*02.05*, *CO*A* e *CO*B*, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Comparação dos fenótipos deduzidos avaliados na Plataforma OpenArray e no ID-Core XT e ID-HPA

Antígenos correspondentes aos alelos estudados	OpenArray	BLOODchip
RHCE, V, VS e variantes		X
S e s	X	X
Me N		X
U, Mi(a), Mur		X
Lu ^a e Lu ^b	X	X
Kell, Kp ^a e Kp ^b , Js ^a e Js ^b	X	X
Fy ^a e Fy ^b ; Fy ^X , Fy(a-b-) somente nos eritrócitos	X	X
Jk ^a e Jk ^b	X	X
Jk ^b null		X
Di ^a e Di ^b	X	X
Wr ^a e Wr ^b	X	
Yt ^a e Yt ^b	X	X
Do ^a e Do ^b	X	X
Hy	X	X
Jo ^a	X	X
Co	X	X
KX	X	
Tc ^a e Tc ^b , Dr(a), Cr(a)	X	
Kn ^a e Kn ^b , McC ^a e McC ^b , Sl ^a e Vil	X	
JMH	X	
HPA1 - HPA5 + HPA15	X	X
HPA6		X
HPA7		X
HPA8		X
HPA9		X
HPA10		X
HPA11		X

4.7 Sequenciamento por técnica Sanger

Para a confirmação dos resultados discrepantes entre OpenArray e BLOODchip, foi utilizada a metodologia de sequenciamento Sanger convencional.

O método de sequenciamento também foi utilizado para os alelos de alta frequência que não tinham amostras controles previamente testadas em outra metodologia ou não estavam contemplados na plataforma BLOODchip. Os alelos sequenciados foram: *DI*02.04*, *XK*N.28*, *CROM*01.02*, *CROM*01.05*, *CROM*01*, *KN*01*, *KN*01.03* e *JMH*01.03*, os quais são responsáveis pela expressão dos antígenos Wr^b , KX, Tc^a , Dr(a), Cr(a), Kn^a , McC^a e JMH, respectivamente. Os produtos de PCR amplificados específicos foram purificados utilizando o kit de purificação de PCR (Qiagen) e testados com o ABI Prism BigDye terminator kit v3.1 (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), conforme descrito por Sanger e Coulson^{110, 111}.

Os iniciadores foram desenhados utilizando o Primer3 software online (v 0.4.0), conforme demonstrado na Tabela 9. Primeiramente, as reações foram padronizadas por um protocolo padrão com volume final de 25µL e DNA em concentração de 200ng. As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemanha) com o seguinte programa: um passo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, gradiente de temperatura de 45°C a 65°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando com 4°C infinito. As temperaturas de anelamento foram todas padronizadas em 61°C.

Após a padronização, foi realizado o sequenciamento utilizando amostras para controle positivo e negativo de cada SNP discrepante. As reações foram corridas no Sequenciador 3500 Genetic Analyzer for Resequencing (Life

Technologies) e os resultados foram analisados utilizando Sequencher – software de análises de sequências de DNA 4.1.4 (Life Technologies).

Tabela 9 - Primers utilizados para o sequenciamento das amostras discrepantes entre o OpenArray e BLOODchip e para validação dos alelos de alta frequência

RS	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>	Tamanho do Fragmento
rs28399653 (Lu)	GACACCCGGAGCTGAGAG	TGGCTTTGCTGTGAAAAGA	360pb
rs8176059 (Kp)	CAGGTAAGATGGCACATGGA	GGGCACTAGGAGGAAGAAGG	369pb
rs1799805 (Yt)	CACTGGTGGGAATGACACAG	CCTCAGGGAGGACTTCTGG	320pb
rs5917 (HPA4)	TCAATCTTGGTGGGAGAAGAA	ACCAGGACTTGGACCTTCCT	364pb
rs45568837 (Wr)	CCACTGACCCTGTCATGTCC	CTGGGTATAGCGGGAGATGA	228pb
rs28933690 (KX)	GTAGAGTGGGCACCACCATT	AGAATGGCTGTGCAGTACCC	276pb
rs28371588 (Tc)	AGCACACGATGCTGCAAAC	CATTCCATTCCCAGAACTTTTC	360pb
rs56283594 (Dra)	TGAAGCCCATATTTAGAACTCAGA	TGGACAGAGCTGCCTGAAAT	376pb
rs60822373 (Cra)	TCAAAGCTCCACATACTACCA	GGTCACGTTCCCCTTGAAT	242pb
rs41274768 (Kn)	CCATACTCTTCTCTCTCAGTCA	CAGTGAGGGTAAAGAACTCCTG	310pb
rs17047660 (McC)	TCCAATGGAGACTTCTACAGCA	GGAGCAGTGTGGCAGCTT	361pb
rs5637216 (JMH)	AGGGGGATGCTTCTGAACTG	AAGGTCCTGCTTCTCTGCAT	357pb

4.8 Comparação entre OpenArray vs BLOODchip

A performance de ambos os métodos de genotipagem foram comparados levando-se em consideração o número de SNPs contemplados em cada metodologia, acurácia, número de resultados incorretos, reprodutibilidade, porcentagem de SNPs com baixo sinal de fluorescência (*no call*), tempo total para a realização da técnica, número de amostras que podem ser realizadas por bateria,

software para a análise dos resultados e possibilidade de customização dos ensaios.

Para a determinação da acurácia, foi calculada a quantidade de alelos corretos, multiplicado pelo número de amostras testadas com resultados válidos, levando-se em consideração 21 SNPs (42 alelos) comuns entre as metodologias: S/s, Lu^a/Lu^b, K/k, Kp^a/Kp^b, Js^a/Js^b, Fy^a/Fy^b, Fy(a-b-), Fy^x, Jk^a/Jk^b, Di^a/Di^b, Yt^a/Yt^b, Do^a/Do^b, Hy, Jo^a, Co^a/Co^b, HPA 1a/1b, HPA 2a/2b, HPA 3a/3b, HPA 4a/4b, HPA 5a/5b, HPA 15a/15b. Nos casos de resultados discrepantes entre as duas metodologias, as amostras foram analisadas por sequenciamento pelo método Sanger para a confirmação dos resultados.

A reprodutibilidade do BLOODchip foi avaliada testando-se três amostras em triplicata organizadas em nove baterias. Na técnica OpenArray, foi analisada a reprodutibilidade, testando-se 10 amostras em triplicata em diferentes lâminas organizadas em dez baterias.

Outro parâmetro analisado na comparação dos métodos foi a porcentagem de experimentos com baixo sinal de fluorescência, resultados não amplificados ou indeterminados, classificados como “*no call*”, de acordo com a leitura do equipamento. A análise da diferença estatística foi realizada pelo método Chi-quadrado (SPSS, 17^a versão Laerd statistics).

Para o cálculo do tempo total para a realização da técnica, foi levado em consideração que o OpenArray processa 96 a 384 amostras, em uma bateria, contemplando os antígenos eritrocitários e plaquetários. Já a técnica BLOODchip processa, no máximo, 96 amostras por bateria. Assim sendo, foi realizado o cálculo para 96 amostras por bateria, incluindo o tempo de pipetagem e a análise dos resultados.

No software de análise, foi observado a capacidade de conversão dos genótipos em fenótipos deduzidos e a possibilidade de busca de doadores pelo fenótipo/genótipo.

4.9 Comparação entre frequências genotípicas com a literatura

As frequências genotípicas para *GYPB**S e *GYPB**s, *KEL**01 e *KEL**02, *KEL**03 e *KEL**04, *KEL**06 e *KEL**07, *FY**A e *FY**B, *GATA* -67, *JK**A e *JK**B, *DI**A e *DI**A, *DI**03 e *DI**04, *YT**A e *YT**B, *HPA*-1, *HPA*-2, *HPA*-3, *HPA*-4, *HPA*-5 e *HPA*-15, foram comparadas com estudos da população brasileira 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).

Os demais alelos contemplados neste trabalho foram comparados com a frequência descrita por Reid e colaboradores¹. Entretanto, não foi possível calcular a diferença estatística com outros estudos da população brasileira por falta de dados na literatura.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Genotipagem - Comparação dos resultados entre OpenArray e BLOODchip

Entre as 400 amostras de doadores testadas no OpenArray, 8 foram excluídas da análise devido à baixa qualidade dos resultados (*call rate*) determinada pelo software TaqMan Genotyper versão 1.3 (Life Technologies) com resultado inferior a 90%, 242 foram comparadas com o BLOODchip (plataforma Luminex) e 150 foram analisadas somente pelo OpenArray.

As 400 amostras processadas no OpenArray para 30 SNPs originaram 11.699 resultados, correspondentes a 23.398 alelos, excluindo-se as amostras com baixa qualidade (*call rate*) e as amostras sem resultados (*no call*). As amostras processadas no BLOODchip foram testadas para 52 SNPs, por meio do ID-Core XT e do ID-HPA, originando 12.538 resultados correspondentes a 25.076 alelos, após a exclusão dos alelos não amplificados. Embora o número de amostras testadas no OpenArray tenha sido maior, o BLOODchip apresentou maior número de resultados, visto que essa plataforma é composta por mais SNPs. Os 21 SNPs comuns entre ambas as metodologias permitiram a comparação de 5.082 resultados correspondentes a 10.164 alelos. Os critérios comparados entre as duas plataformas estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação entre as plataformas OpenArray e Luminex BLOODchip (ID-Core e ID-HPA)

	OpenArray	BLOODchip ID-Core	BLOODchip ID-HPA
Número de SNPs investigados	30	41	11
Acurácia	99,93%	100%	100%
Número de resultados incorretos (%)	6 (0,12%)	0	0
Reprodutibilidade	100%	100%	100%
Número de <i>no call</i> (%)	46 (0,90%)	43 (0,85%)	Calculado junto com ID-Core XT
Possibilidade de customização dos ensaios	Sim	Não	Não
Tempo total de duração da reação (96 amostras)	5h30	5h	5h
Número de amostras processadas por bateria	48 - 192 (lâminas de 64 SNPs)	1 - 96	1-96
Interpretação dos resultados de genótipo em fenótipo deduzido pelo software de análise	Não (os resultados são reportados em VIC/VIC ou VIC/FAM ou FAM/FAM)	Sim	Sim

De acordo com os resultados observados na Tabela 10, as duas plataformas de genotipagem em larga escala OpenArray e BLOODchip são acuradas para determinação de genotipagem eritrocitária e plaquetária, 99.93% de acurácia para OpenArray vs 100% para BLOODchip, conforme demonstrado na Tabela 11. As duas metodologias apresentaram reprodutibilidade de 100% dos resultados, demonstrando serem técnicas precisas.

O número de resultados não amplificados ou indeterminados (*no call*), de acordo com a leitura do equipamento, foi 1,2% no OpenArray vs 0,85% no BLOODchip e não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as duas metodologias ($p=0,0947$) considerando $p<0,05$. No entanto, quando essa informação foi analisada por SNP, foi possível observar que o BLOODchip apresentou resultado com baixo sinal de fluorescência, principalmente para Lutheran, HPA-1 e HPA-3, podendo-se observar na Tabela 11.

Tabela 11 – Polimorfismos comuns entre os métodos OpenArray e BLOODchip

Sistema de grupo sanguíneo	SNP	Número de resultados do OpenArray	Número de resultados do BLOODchip	Número de <i>No call</i> OpenArray	Número de <i>No call</i> BLOODchip	Número de resultados discrepantes (%)
002 MNS	S/s	239	242	3	0	0
005 Lutheran	Lu ^a /Lu ^b	238	233	4	9	2
006 Kell	K/k	237	242	5	0	0
	Kp ^a /Kp ^b	242	242	0	0	1
	Js ^a /Js ^b	239	242	3	0	0
008 Duffy	Fy ^a /Fy ^b	242	241	0	1	0
	Fy(a-b-)	242	242	0	0	0
	Fy ^x	240	242	2	0	0
009 Kidd	Jk ^a /Jk ^b	242	242	0	0	0
010 Diego	Di ^a /Di ^b	236	242	6	0	0
011 Yt	Yt ^a /Yt ^b	240	242	2	0	2
014 Dombrock	Do ^a /Do ^b	239	242	3	0	0
	Hy	241	242	1	0	0
	Jo ^a	235	242	7	0	0
015 Colton	Co ^a /Co ^b	242	242	0	0	0
HPA	HPA 1a/1b	242	236	0	6	0
	HPA 2a/2b	241	241	1	1	0
	HPA 3a/3b	239	217	3	25	0
	HPA 4a/4b	240	242	2	0	1
	HPA 5a/5b	238	241	4	1	0
	HPA 15a/15b	242	242	0	0	0
Total				46	43	6

Quanto à possibilidade de customização do ensaio, o OpenArray permite a escolha dos polimorfismos, de acordo com a necessidade do serviço, sendo possível desenhar lâminas para a detecção de 16, 32, 64, 128, 192 e 256 SNPs. Já, a placa do BLOODchip é sempre composta pelos mesmos SNPs, no entanto, é possível adquirir outro kit que contempla outros polimorfismos raros de grupos sanguíneos como método complementar.

A comparação do tempo total para a realização da técnica no processamento de 96 amostras no OpenArray foi de 5h30, e para o BLOODchip ID-Core (determinação de alelos eritrocitários) foi de 5h, assim como para ID-HPA (determinação de alelos plaquetários). Considerando que a placa OpenArray é composta tanto dos SNPs relacionados aos antígenos eritrocitários como aos antígenos plaquetários, e que essa metodologia pode processar até 4 lâminas por vez, o OpenArray é uma técnica mais simples e rápida.

O número de amostras avaliadas no OpenArray por bateria foi de 192 amostras para 64 SNPs, ou seja, 4 lâminas contendo 48 amostras cada. Essa técnica não permite o processamento de amostras individuais, sendo processada, no mínimo, uma lâmina por vez. O BLOODchip permite a avaliação de 1 a 96 amostras por experimento, sem perda de insumos. É interessante seu uso na elucidação de múltiplos anticorpos irregulares ou anticorpos contra antígenos de alta frequência.

O software de análise do OpenArray apresentou os resultados considerando a fluorescência de VIC e FAM. Esse software foi alimentado com o nucleotídeo correspondente à VIC e o nucleotídeo correspondente à FAM para cada SNP e, posteriormente, os dados foram exportados para uma planilha Excel e tratados para interpretação. Além disso, esse software permite a inserção de dados para controle de qualidade e fornece informações como frequência alélica e genotípica para cada SNP, sendo interessante seu uso em pesquisa e rotina de doadores de sangue. O

software do BLOODchip é próprio para uso em rotina, trazendo uma série de ferramentas de controle de qualidade, e os resultados podem ser visualizados prontamente em genótipo ou fenótipo deduzido.

De 10.164 alelos comparados entre o OpenArray e o BLOODchip, foram detectadas 6 diferenças entre as metodologias, que compreendem os alelos *LU**A, *LU**B, *KEL**03, *YT**A e *HPA*-4B. O BLOODchip não apresentou nenhum erro de genotipagem, conforme demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Confirmação dos resultados discrepantes por sequenciamento Sanger

SNP	ID	OpenArray	BLOODchip	Alelo Discrepante	Sequencia- mento	Resultado Correto
<i>Lu</i> ^a / <i>Lu</i> ^b	85	<i>LU</i> *A/ <i>LU</i> *B	<i>LU</i> *B/ <i>LU</i> *B	<i>LU</i> *A	<i>LU</i> *B/ <i>LU</i> *B	ID-Core XT
	366	<i>LU</i> *A/ <i>LU</i> *A	<i>LU</i> *A/ <i>LU</i> *B	<i>LU</i> *B	<i>LU</i> *A/ <i>LU</i> *B	ID-Core XT
<i>Kp</i> ^a / <i>Kp</i> ^b	42	<i>KEL</i> *04/ <i>KEL</i> *04	<i>KEL</i> *03/ <i>KEL</i> *04	<i>KEL</i> *03	<i>KEL</i> *03/ <i>KEL</i> *04	ID-Core XT
<i>Yt</i> ^a / <i>Yt</i> ^b	19	<i>YT</i> *B/ <i>YT</i> *B	<i>YT</i> *A/ <i>YT</i> *B	<i>YT</i> *A	<i>YT</i> *A/ <i>YT</i> *B	ID-Core XT
	301	<i>YT</i> *B/ <i>YT</i> *B	<i>YT</i> *A/ <i>YT</i> *B	<i>YT</i> *A	<i>YT</i> *A/ <i>YT</i> *B	ID-Core XT
<i>HPA</i> 4a/4b	322	4AA	4AB	<i>HPA</i> 4B	4AB	ID-Core HPA

ID: Identificação da amostra

*LU**A refere-se ao antígeno *Lu*^a

*KEL**03 refere-se ao antígeno *Kp*^a

*KEL**04 refere-se ao antígeno *Kp*^b

*YT**A refere-se ao antígeno *Yt*^a

*YT**B refere-se ao antígeno *Yt*^b

5.2 Comparação de resultados OpenArray com resultados prévios de genotipagem nas amostras controles

As amostras controles previamente testadas por outros métodos moleculares estão organizadas por SNP na Tabela 13. Os controles apresentaram oito resultados discrepantes entre o OpenArray e o HEA. As amostras com discrepância para o alelo *JK*01* apresentaram resultado homozigoto para o alelo *JK*02* (A/A) no OpenArray e heterozigoto (A/G) no HEA. As três foram testadas por real time PCR, demonstrando que o OpenArray não detectou a presença do alelo *JK*01*, apresentando resultado falso negativo. As amostras com discrepância para *GYPB*s* apresentaram resultado homozigoto para o alelo *GYPB*S* (T/T) no OpenArray e heterozigoto (T/C) no HEA. Não foi possível realizar a confirmação desse resultado por sequenciamento, devido ao volume insuficiente da amostra. As amostras com discrepância para *DO*01* apresentaram resultado homozigoto para o alelo *DO*02* (C/C) no OpenArray e heterozigoto (C/T) no HEA. Não foi possível realizar a confirmação desse resultado por sequenciamento, devido ao volume insuficiente da amostra. A soma dos controles totalizou 2670 alelos comparados e 7 alelos discrepantes. Dessa forma, o método OpenArray apresentou acurácia de 99,74%.

Tabela 13 - Número de controles para cada SNP contemplado no OpenArray

Sistema de grupo sanguíneo	SNP	Número de Amostras Controles*	Número de resultados discrepantes (% de discrepância)
002 MNS	S/s	80	3 (3,8%)
005 Lutheran	Lu ^a /Lu ^b	67	0
006 Kell	K/k	80	0
	Kp ^a /Kp ^b	69	0
	Js ^a /Js ^b	69	0
008 Duffy	Fy ^a /Fy ^b	81	0
	Fy(a-b-)	80	0
	Fy ^x	68	0
009 Kidd	Jk ^a /Jk ^b	88	3 (3,4%)
010 Diego	Di ^b /Di ^a	71	0
011 Yt	Yt ^a /Yt ^b	4	0
014 Dombrock	Do ^a /Do ^b	68	1 (1,5%)
	Hy	67	0
	Jo ^a	65	0
015 Colton	Co ^a /Co ^b	68	0
022 Knops	Kn ^a /Kn ^b	1	0
	Sl ^a /Vil	1	0
HPA	HPA 1a/1b	56	0
	HPA 2a/2b	54	0
	HPA 3a/3b	48	0
	HPA 4a/4b	56	0
	HPA 5a/5b	46	0
	HPA 15a/15b	48	0

*Amostras controles previamente testados por BeadChip (HEA), PCR-real time e PCR convencional

5.3 Sequenciamento para os alelos de alta frequência

O sequenciamento realizado em 1% das amostras para a validação dos alelos de alta frequência que não tinham controle (*DI*02.04*, *XK*N.28*, *CROM*01.02*, *CROM*01.05*, *CROM*01*, *KN*01*, *KN*01.03* e *JMH*01.03*) confirmou os resultados obtidos pelo OpenArray, com 100% de concordância entre os resultados em 64 ensaios.

5.4 Frequências alélicas e genotípicas

A frequência encontrada neste estudo está demonstrada na Tabela 14. Os resultados individuais para cada SNP podem ser visualizados no Taqman Genotyper, de acordo com as figuras do Apêndice A.

Tabela 14 - Frequência alélica e genotípica dos SNPs estudados

Número	SNP	FREQUENCIA ALELICA		FREQUENCIA GENOTIPICA		
		alelo 1	alelo 2	Homozigoto para o alelo 1	Heterozigoto	Homozigoto para o alelo 2
rs7683365	S/s	0,313	0,687	11,9%	38,7%	49,4%
rs28399653	Lu ^a /Lu ^b	0,028	0,972	0,0%	5,0%	95,0%
rs8176058	K/k	0,014	0,986	0,0%	2,8%	97,2%
rs8176059	Kp ^a /Kp ^b	0,000	1,000	0,0%	0,0%	100,0%
rs8176038	Js ^a /Js ^b	0,024	0,976	0,2%	4,2%	95,6%
rs12075	Fy ^a /Fy ^b	0,320	0,680	13,1%	37,8%	49,1%
rs2814778	Fy(a-b-)	0,762	0,238	60,7%	31,0%	8,3%
rs34599082	Fy ^x	0,984	0,016	96,8%	3,2%	0,0%
rs1058396	JK ^a /JK ^b	0,568	0,432	32,9%	47,8%	19,3%
rs2285644	Di ^a /Di ^b	0,013	0,987	0,0%	2,5%	97,5%
rs45568837	Wr ^a /Wr ^b	0,000	1,000	0,0%	0,0%	100,0%
rs1799805	Yt ^a /Yt ^b	0,955	0,045	91,6%	8,4%	0,0%
rs11276	Do ^a /Do ^b	0,346	0,654	11,6%	46,1%	42,3%
rs28362797	Hy	0,989	0,011	97,7%	2,3%	0,0%
rs28362798	Jo ^a	0,989	0,011	97,7%	2,3%	0,0%
RS28362692	Co ^a /Co ^b	0,980	0,020	96,4%	3,4%	0,2%
rs28933690	Kx	1,000	0,000	100,0%	0,0%	0,0%
rs28371588	Tc ^a /Tc ^b	0,987	0,013	97,4%	2,6%	0,0%
rs56283594	Dr(a+)/Dr(a-)	1,000	0,000	100,0%	0,0%	0,0%
rs60822373	Cr(a+)/Cr(a-)	1,000	0,003	100,0%	0,0%	0,0%
rs41274768	Kn ^a /Kn ^b	0,972	0,028	94,5%	5,5%	0,0%
rs17047690	McC ^a /McC ^b	0,953	0,047	90,6%	9,4%	0,0%
rs17047661	Sl ^a /Vil	0,835	0,165	69,9%	27,1%	3,0%
rs55637216	JMH+	1,000	0,000	100,0%	0,0%	0,0%
rs5918	HPA 1a/1b	0,866	0,134	74,9%	23,3%	1,8%
rs6065	HPA 2a/2b	0,866	0,134	76,0%	21,2%	2,8%
rs5911	HPA 3a/3b	0,634	0,366	40,8%	45,1%	14,1%
rs5917	HPA 4a/4b	1,000	0,000	99,75%	0,25%	0,0%
rs1801106	HPA 5a/5b	0,878	0,122	76,9%	21,8%	1,3%
rs10455097	HPA 15a/15b	0,521	0,479	29,1%	47,6%	23,3%

As frequências são variáveis entre diversas etnias. A população brasileira é miscigenada, apresentando frequências diferentes das encontradas em outros estudos brasileiros. O estudo para a análise da diferença estatística entre a frequência obtida nos doadores de sangue da FPS/HSP e outros estudos realizados na população brasileira estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15 – Comparação estatística da frequência genotípica encontrada na FPS/HSP e outros estudos da população brasileira

Genótipo	Frequência FPS/HSP n (%)	Frequência comparada n (%)	Cidade, Estado	Referência	p
GYPB*S/ GYPB*S	47 (11,9)	15 (7,54)	Porto Velho, RO	Tarazona-Santos <i>et al.</i> ¹¹²	0,2605
GYPB*S/ GYPB*s	155 (38,7)	84 (42,21)			
GYPB*s/ GYPB*s	198 (49,4)	100 (50,25)			
KEL*01/ KEL*01	0 (0)	1 (0,25)	Maringá, PR	Guelsin <i>et al.</i> ¹¹³	0,2116
KEL*01/KEL*02	12 (2,8)	20 (5)			
KEL*02/KEL*02	388 (97,2)	379 (94,75)			
KEL*03/ KEL*03	0 (0)	0 (0)	São Paulo, SP	Latini <i>et al.</i> ¹¹⁴	0,0714
KEL*03/KEL*04	0 (0)	4 (1,31)			
KEL*04/KEL*04	400 (100)	301 (98,69)			
KEL*06/ KEL*06	1 (0,2)	0 (0)	São Paulo, SP	Latini <i>et al.</i> ¹¹⁴	0,12
KEL*06/KEL*07	17 (4,2)	23 (7,54)			
KEL*07/KEL*07	382 (95,6)	282 (92,46)			
FY*A/ FY*A	52 (13,1)	50 (12,5)	Maringá, PR	Guelsin <i>et al.</i> ¹¹³	<0,01
FY*A/FY*B	151 (37,8)	192 (48%)			
FY*B/FY*B	197 (49,1)	158 (39,5)			
GATA -67 TT	243 (60,7)	312 (78)	Maringá, PR	Guelsin <i>et al.</i> ¹¹³	<0,01
GATA -67 CT	124 (31)	78 (19,5)			
GATA -67 CC	33 (8,3)	10 (2,5)			
JK*A/ JK*A	132 (32,9)	109 (27,25)	Maringá, PR	Guelsin <i>et al.</i> ¹¹³	0,0842
JK*A/ JK*B	191 (47,8)	192 (48)			
JK*B/ JK*B	77 (19,3)	99 (24,75)			
DI*A/ DI*A	0 (0)	0 (0)	São Paulo, SP	Latini <i>et al.</i> ¹¹⁴	0,4274
DI*A/ DI*B	10 (2,5)	13 (4,26)			
DI*B/ DI*B	390 (97,5)	292 (95,74)			
DI*03/ DI*03	0 (0)	0 (0)	São Paulo, SP	Latini <i>et al.</i> ¹¹⁴	0,5194
DI*03/ DI*04	0 (0)	1 (0,33)			
DI*04/ DI*04	400 (100)	304 (99,67)			
YT*A/YT*A	367 (91,6)	276 (90,49)	São Paulo, SP	Latini <i>et al.</i> ¹¹⁴	0,47
YT*A/YT*B	33 (8,4)	28 (9,18)			
YT*B/ YT*B	0 (0)	1 (0,33)			
DO*A/ DO*A	46 (11,6)	25 (13,02)	Belo Horizonte, MG	Piassi <i>et al.</i> ⁸²	0,8694
DO*A/DO*B	184 (46,1)	87 (45,31)			
DO*B/ DO*B	170 (42,3)	80 (41,66)			
DO*02.04 (homozigose)	391 (97,7)	294 (96,39)	São Paulo, SP	Latini <i>et al.</i> ¹¹⁴	0,5599
DO*02.04 (heterozigose)	9 (2,3)	11 (3,61)			
DO*02.-04	0 (0)	0 (0)			
DO*02.05 (homozigose)	391 (97,7)	296 (97,05)	São Paulo, SP	Latini <i>et al.</i> ¹¹⁴	0,8437
DO*02.05 (heterozigose)	9 (2,3)	9 (9,95)			
DO*02.-05	0 (0)	0 (0)			
CO*A/ CO*A	386 (96,4)	287 (94,1)	São Paulo, SP	Latini <i>et al.</i> ¹¹⁴	0,3166
CO*A/ CO*B	14 (3,4)	18 (5,9)			
CO*B/ CO*B	0 (0,2)	0 (0)			
HPA-1A/HPA-1A	294 (74,9)	107 (71,3)	São Paulo, SP	Bianchi <i>et al.</i> ⁸⁹	0,2848
HPA-1A/HPA-1B	91 (23,3)	37 (24,7)			
HPA-1B/HPA-1B	7 (1,8)	6 (4)			
HPA-2A/HPA-2A	298 (76)	105 (70)	São Paulo, SP	Bianchi <i>et al.</i> ⁸⁹	0,3422
HPA-2A/HPA-2B	83 (21,2)	39 (26)			
HPA-2B/HPA-2B	11 (2,8)	6 (4)			
HPA-3A/HPA-3A	160 (40,8)	77 (51,3)	São Paulo, SP	Bianchi <i>et al.</i> ⁸⁹	0,087
HPA-3A/HPA-3B	177 (45,1)	56 (37,3)			
HPA-3B/HPA-3B	55 (14,1)	17 (11,3)			
HPA-4A/HPA-4A	391 (99,75)	150 (100)	São Paulo, SP	Bianchi <i>et al.</i> ⁸⁹	0,827
HPA-4A/HPA-4B	1 (0,25)	0 (0)			
HPA-4B/HPA-4B	0 (0)	0 (0)			
HPA-5A/HPA-5A	301 (76,9)	119 (79,3)	São Paulo, SP	Bianchi <i>et al.</i> ⁸⁹	0,5975
HPA-5A/HPA-5B	86 (21,8)	28 (18,7)			
HPA-5B/HPA-5B	5 (1,3)	3 (2)			
HPA-15A/HPA-15A	114 (29,1)	37 (24,7)	São Paulo, SP	Bianchi <i>et al.</i> ⁸⁹	0,055
HPA-15A/HPA-15B	187 (47,6)	63 (42)			
HPA-15B/HPA-15B	91 (23,3)	50 (33,3)			

p<0,01 = Diferença estatisticamente significante

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A proposta inicial deste trabalho foi a padronização de uma técnica de genotipagem de grupos sanguíneos com alto rendimento para atender as necessidades da rotina de doadores de sangue. Assim sendo, a técnica OpenArray foi desenhada para atender esse objetivo e apresentou boa acurácia. Com isso, foi possível analisar a frequência dos principais grupos sanguíneos (com exceção do Rh) e ainda encontrar doadores raros. Nesse cenário, a técnica OpenArray demonstrou ser custo-efetiva para o rastreio de doadores de sangue, podendo ainda ser associada à fenotipagem Rh para utilização em protocolos transfusionais de paciente cronicamente transfundido.

Os serviços de Hemoterapia têm encontrado cada vez mais dificuldade em atender as transfusões dos pacientes politransfundidos aloimunizados. Com isso, as ferramentas que o avanço tecnológico oferece têm sido cada vez mais empregadas nas rotinas dos bancos de sangue, como os métodos de genotipagem rápidos e de alto rendimento para apoiar a seleção de doadores de sangue e o atendimento dos pacientes, de forma rápida e eficiente. Além disso, a genotipagem de doadores de sangue será extremamente útil para rastreamento e obtenção de sangue com fenótipos raros, especialmente, com a ausência de antígeno de alta frequência. A determinação sorológica de múltiplos antígenos eritrocitários de grandes grupos de doadores é um exercício caro, trabalhoso e dificultada pela falta de soros, tornando mais atrativo o uso de plataformas de microarranjos para genotipagem deles ^{8, 10, 19, 22, 24, 102}.

Os maiores candidatos à transfusão profilática são os grupos mais vulneráveis à aloimunização, como: pacientes com anemia falciforme e doenças mielodisplásicas, haja visto que a aloimunização aumenta com a exposição

transfusional, agravando o risco de reação hemolítica transfusional. Em estudo realizado na Fundação Pró-sangue, observou-se que 62,5% dos doentes falciformes aloimunizaram mesmo com protocolo transfusional profilático. Desses, 33% iniciaram o protocolo antes da formação de anticorpos. Ou seja, mesmo com protocolos transfusionais, esses pacientes têm alta susceptibilidade à aloimunização.

Assim como ocorre a aloimunização eritrocitária, pode acontecer a aloimunização plaquetária em receptores de plaquetas e gestantes. A aloimunização contra antígenos HPA está associada à refratariedade plaquetária imunológica e púrpura trombocitopênica aloimune neonatal. A genotipagem de HPA em larga escala pode ser usada para criar um banco de doadores genotipados para atender pacientes com púrpura trombocitopênica aloimune neonatal, púrpura após a transfusão, e refratariedade plaquetária imunológica não HLA³³.

A técnica de genotipagem em larga escala OpenArray avaliada neste estudo apresentou alta acurácia (99%) e ofereceu vantagens como a possibilidade de customização do desenho das lâminas, permitindo a escolha da quantidade de polimorfismos estudados e o desenho do ensaio, de acordo com o objetivo do serviço e a população estudada, corroborando, assim, o estudo de Hopp e colaboradores²². Neste estudo, foi possível incluir alelos de alta frequência, não estudados em outras plataformas e sem estudo na população brasileira, são eles: *DI*02.04*, *XK*N.28*, *CROM*01.02*, *CROM*01.05*, *CROM*01*, *KN*01*, *KN*01.03* e *JMH*01.03*. Em contrapartida, a técnica BLOODchip contempla alelos não presentes no OpenArray, como: *RHCE* e variantes, *JK*B_null* (IVS5-1a), *JK*B_null* (871C), *GYPA*M*, *GYPA*N*, *GYPB*S null* (IVS5+5t), *GYPB*S nulo* (230T), deleção da *GYPB*, *GYPB*Mur* e HPA-6, -7, -8, -9, -10, -11.

Outra grande vantagem dessa plataforma é o tempo para processamento das amostras e a possibilidade de automatização total do processo, minimizando o

risco de erros e facilitando a inclusão dessa estratégia em hemocentros. Isso porque, é possível determinar 12.288 polimorfismos em cinco horas e meia; ou seja, 192 doadores testados para 64 SNPs ou 384 doadores testados para 32 SNPs em um curto período. Entretanto, como o ensaio requer o acúmulo de amostras (mínimo de 96 para genotipagem de 32 SNPs), essa ferramenta pode ser muito funcional para rotinas de doadores e receptores que entrarão em esquema de transfusão crônica. No entanto, é menos atraente para resolução de casos individuais para atendimento transfusional de emergência que o BLOODchip.

A principal desvantagem observada na plataforma OpenArray foi a impossibilidade de análise dos alelos de importância clínica do sistema Rh (*RH**C, *RH**c, *RH**E e *RH**e), em decorrência do grande número de resultados incorretos observados nos controles. Atribuímos essa dificuldade à presença de regiões mascaradas dentro do gene *RHD* e *RHCE*, que possivelmente foram desenhadas em regiões mais precisas em outras plataformas. Outro inconveniente dessa plataforma é a ausência de software desenhado para converter o genótipo em fenótipo deduzido.

A plataforma BLOODchip utilizada para a validação do OpenArray não apresentou nenhum erro dentre os alelos que foram comparados, corroborando o estudo de McBean e colaboradores e Finning e colaboradores com 100% de acurácia^{115, 116}. Outra vantagem em relação ao OpenArray é a presença de um software adequado para a interpretação dos resultados em fenótipo, tornando mais fácil para o operador a interpretação dos resultados.

Após a validação do método OpenArray, foi analisada a frequência alélica e genotípica eritrocitária e plaquetária dos 392 doadores com resultados válidos. Dentre eles encontramos 1 doador com ausência dos alelos de alta frequência *KEL**07 e *CO**A e 12 doadores com ausência do alelo *KN**01.04. Além disso, foi possível encontrar doadores com presença de alelos de baixa frequência em

heterozigose como: *LU**A em 19 (5%) doadores, *KEL**01 em 11 (2,8%) doadores, *KEL**06 em 17 (4,4%) doadores, *DI**A em 10 (2,5%) doadores, *CO**B em 13 (3,6%) doadores, *YT**B em 32 (8,4%) doadores, *CROM**01.03 em 9 (2,6%) doadores, *KN**B em 22 (5,5%) doadores, *KN**01.06 em 36 (9,4%) doadores. Outros alelos de alta frequência em heterozigose *DO**02.04 em 9 (2,3%) doadores e *DO**02.05 em 9 (2,3%) doadores.

Para a análise da frequência, não foi levado em consideração a raça autodeclarada dos doadores de sangue em virtude da alta taxa de miscigenação da população de doadores da Fundação Pró-sangue/Hemocentro de São Paulo. Em pesquisa desenvolvida por Dinardo e colaboradores, foi descrito que 15% dos indivíduos participantes de um estudo que se autodeclararam brancos apresentaram traços genéticos ancestrais de negros e 10% apresentaram traços ancestrais de ameríndios, inviabilizando, assim, a classificação dos doadores por raça ¹¹⁷. Entretanto, a análise das frequências obtidas foi comparada com a população caucasoide e negra de Reid e colaboradores ¹; com isso, ficou evidente a presença de alelos da população negra nos doadores de sangue da FPS/HSP.

O alelo *GYPB**S foi encontrado em homozigose em 11,9%, e o *GYPB**s em 49,4%. Tais alelos foram encontrados em heterozigose em 38,7%, corroborando os resultados encontrados em Reid e colaboradores, visto que o antígeno S está presente em homozigose em 11% da população caucasoide e 6% da população negra. Já o antígeno s está presente em homozigose em 45% da população caucasoide e 68% da população negra. Para esse sistema de grupo sanguíneo as frequências encontradas estão condizentes com a população caucasoide e corroboram o estudo realizado na população de Porto Velho por Tarazona-Santos e colaboradores e com a população de São Paulo em estudo de ^{1, 112}.

No sistema Lutheran não foi encontrado nenhum indivíduo com ausência do alelo de alta frequência. No entanto, 5% das amostras testadas apresentaram o

alelo de baixa frequência em heterozigose. Esses dados também confirmaram os resultados encontrados em Reid e colaboradores e Daniels que observaram o Lu^a em heterozigose em 7,4% e 7,6% na maioria das populações, respectivamente ^{1, 71}.

Foram encontrados 2,8% de doadores KEL^*01/KEL^*02 (heterozigoto para Kell); no entanto, esse fenótipo está presente em 8,8% dos caucasoides, 2% em negros e 0,77% no Oeste Africano. Já, o alelo de baixa frequência KEL^*03 (Kp^a) não foi encontrado em nenhum doador. Ele é encontrado em 2,3% dos caucasoides e, raramente, em negros. O alelo de baixa frequência KEL^*06 (Js^a) foi observado em 2,4% dos doadores de sangue. De acordo com Reid e colaboradores, o fenótipo $Js(a+)$ é observado em menos de 0,01% em caucasoides e 19,5% em negros ¹. Em estudo realizado por Arnoni e colaboradores, na população de doadores da Colsan, os alelos do sistema Kell foram encontrados nas seguintes frequências: KEL^*1 (2.2%), KEL^*2 (97.8%), KEL^*3 (0.69%), KEL^*4 (99.31%), KEL^*6 (2.69%) e KEL^*7 (97.31%), confirmando as frequências observadas neste estudo ¹¹⁸. Em ambos os estudos, o perfil fenotípico da população de doadores de sangue reflete a presença de alelos observados na população negra, podendo ser considerado como marca de ancestralidade ¹¹⁸.

No sistema Duffy, o fenótipo deduzido encontrado foi 24,62% de indivíduos $Fy(a+b-)$, 26,65% de indivíduos $Fy(a+b+)$, 40,36% de indivíduos $Fy(a-b+)$, 8,38% de indivíduos $Fy(a-b-)$ e 3,2% de indivíduos Fy^x (fraco). Tais resultados confirmaram o estudo desenvolvido nessa mesma população por Pagliarini ⁷⁵. Entretanto, diferem das frequências encontradas na população de Maringá, em estudo desenvolvido por Guelsin e colaboradores ¹¹⁷. A análise estatística para os alelos FY^*A , FY^*B e $FY^*02N.01$ (mutação na região $GATA -67CC$) apresentou diferença estatisticamente significativa, reiterando, mais uma vez, a presença de traços negros na população de doadores da FPS/HSP.

Os resultados encontrados para a frequência genotípica de JK^*A/JK^*A , JK^*A/JK^*B e JK^*B/JK^*B , foram 32,9%, 47,8% e 19,3%, respectivamente. Esses resultados corroboram o estudo de Guelsin e colaboradores realizado na população de doadores do Estado do Paraná e Kahar e Patel, cujos resultados relatados mostraram-se muito próximos da população caucasóide. Porém, na população de doadores deste estudo observamos as frequências discretamente inclinadas à população negra ^{113, 119}.

O alelo DI^*A foi encontrado apenas em homozigose em 2,5% dos indivíduos. O alelo DI^*B em homozigose foi encontrado em 97,5%, comprovando o estudo realizado por Bégat e colaboradores, no qual o alelo DI^*A foi encontrado em pelo menos 2% em estudo com Ameríndios ⁸⁰. No estudo de Latini e colaboradores o alelo DI^*A foi observado em 4,3% dos doadores de sangue da Colsan. No entanto, esse alelo é encontrado em menos de 0,1% da população de caucasóides e negros, chegando a 36% em Índios da América do Sul ¹¹⁴. O alelo $DI^*02.03$ (Wr^a) de baixa frequência não foi encontrado em nenhum indivíduo e seu par antitético, $DI^*02.04$ (Wr^b), de alta frequência foi observado em 100% dos indivíduos. Em estudo realizado por Muniz e colaboradores na Colsan, foi necessário testar 1662 doadores para encontrar 0,06% do antígeno Wr^a ¹²⁰.

No sistema Cartwright não foi observado nenhum indivíduo com ausência do alelo de alta frequência YT^*A ; entretanto, foi observado o genótipo YT^*A/YT^*B em 8,4% dos indivíduos, corroborando Latini e colaboradores, os quais encontraram 9,1% de indivíduos com esse genótipo ¹¹⁴. As frequências encontradas para esse sistema foram correspondentes ao estudo realizado por George ⁸¹.

A frequência genotípica observada no sistema Dombrock foi compatível aos resultados descritos por Piassi e colaboradores, na população de doadores de Minas Gerais ⁸², e ao estudo de Latini e colaboradores, e na população de doadores da Colsan, no qual, observaram o genótipo DO^*A/DO^*A em 17% dos

doadores, DO^*A/DO^*B em 46% e DO^*B/DO^*B em 36% ¹¹⁴. Os alelos $DO^*02.04$ (Hy) e $DO^*02.05$ (Jo^a) são de alta frequência na população e foram observados, neste estudo, em 100% dos resultados. Porém, 2,3% dos doadores apresentaram resultados em heterozigose para ambos os alelos, corroborando mais uma vez o estudo de Latini e colaboradores. Este dado nos leva a acreditar que o aumento do número de amostragem possibilitaria o encontro de indivíduos homozigotos para o alelo raro ¹¹⁴.

No sistema Colton, foi encontrado um indivíduo com ausência do alelo de alta frequência, CO^*A , representando 0,2%. Os demais resultados observados estavam de acordo com a revisão de Halverson e Peyrard e com Latini e colaboradores, realizada na população de doadores da Colsan, na qual encontraram 94,1% de indivíduos CO^*A/CO^*A e 5,9% de indivíduos CO^*A/CO^*B ^{83, 114}.

Os alelos referentes ao sistema de grupo sanguíneo Cromer, $CROM^*01.05$ e CR^*A , referente aos antígenos Dr(a) e Cr(a), respectivamente, foram observados em 100% dos indivíduos testados. Entretanto, o genótipo $CROM^*01.02/CROM^*01.03$, referente ao fenótipo Tc(a+b+), foi observado em 2,6% dos doadores. Esse fenótipo é observado em 6% da população negra ¹, demonstrando, mais uma vez, a presença da miscigenação na população estudada.

No sistema de grupo sanguíneo Knops, a frequência genotípica encontrada para KN^*A/KN^*A e KN^*A/KN^*B foi 94,5% e 5,5%, respectivamente. Não foi observado nenhum indivíduo homozigoto para o alelo de baixa frequência KN^*B . Esses dados confirmaram os apresentados por Reid, que postulou que o antígeno Kn^a apresenta alta frequência, tanto na população caucasoide como na negra. Já seu par antitético denominado Kn^b está presente em aproximadamente 4% da população caucasoide e é raro na população negra, demonstrando assim, a presença de alelo presente especialmente na população caucasoide ¹.

Os alelos *KN*01.03* e *KN*01.06* (McC^a e McC^b) apresentam grande variação na frequência observada entre a população caucasóide e negra, sendo que o alelo *KN*01.06* está presente em apenas 1% da população caucasóide e em 40%-50% da população negra. Neste estudo, observamos o alelo *KN*01.06* (McC^b) em 9,4% dos doadores de sangue. Tal resultado certamente é decorrente da miscigenação observada nessa população. O mesmo fato foi evidenciado no genótipo *KN*01.04* e *KN*01.07* (SI^a e Vil) em que, o alelo *KN*01.04* é de alta frequência e o antígeno *KN*01.07* é de baixa frequência na população caucasóide, já, na população negra, é observado em mais de 80%. Na população de doadores estudada, foi evidenciado 69,9% de indivíduos *KN*01.04/KN*01.04*, 27,1% de *KN*01.04/KN*01.07* e 3% de *KN*01.07/KN*01.07*, ou seja, com ausência do alelo de alta frequência. A frequência alélica de Vil foi observada em 16,5%, mais uma vez demonstrando frequência intermediária em população caucasóide e negra ^{1, 85}.

No SNP testado para o sistema JMH, o alelo selvagem (*JMH*01.03*) estava presente em todos os indivíduos testados em homozigose, conforme dados obtidos em Reid e colaboradores ¹.

Quanto aos antígenos plaquetários, conforme descrito por Conti e colaboradores, os métodos de genotipagem HPA em larga escala demonstraram ser eficientes para triagem de doadores e suprimento de plaquetas compatíveis, em casos de PPT, PTAN e refratariedade de causa imune ¹²¹.

As frequências genóticas para o HPA-1, -2, -3, -4, e -5 foram correspondentes à frequência observada na população de pacientes trombocitopênicos estudados por Bianchi e colaboradores e não apresentou diferença estatística ⁸⁹. Esses dados também corroboram a frequência descrita por Castro e colaboradores, tanto na população caucasóide como na negra. Nesse mesmo estudo, Castro ainda demonstrou que na população brasileira, classificada em caucasóide, negra e indígena, os primeiros apresentaram genótipos muito

semelhantes, sendo o último o único grupo com diferença genotípica estatisticamente significativa ⁴³.

O HPA-15 também foi comparado ao estudo de Bianchi e colaboradores ⁸⁹, sem diferença estatística. Esses dados confirmam os resultados observados por Cardone e colaboradores ⁹⁷.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

1) A plataforma OpenArray foi padronizada e validada para os alelos referentes aos antígenos eritrocitários e plaquetários: *GYPB*03/GYPB*04*, *LU*A/ LU*B*, *KEL*01/KEL*02*, *KEL*03/KEL*04*, *KEL*06/KEL*07*, *FY*A/ FY*B*, *FY*02N.01*, *FY*02W.01*, *JK*A/ JK*B*, *DI*A/DI*B*, *DI*03/DI*04*, *YT*A/YT*B*, *DO*A/DO*B*, *DO*02.04/DO*02.05*, *CO*A/CO*B*, *XK*N.28*, *CROM*01.02/CROM*01.03*, *CROM*01.05*, *CR*A*, *KN*A/KN*B*, *KN*01.03/KN*01.06*, *KN*01.04/KN*01.07*, *JMH*01.03*, *HPA-1A/ HPA-1B*, *HPA-2A/ HPA-2B*, *HPA-3A/ HPA-3B*, *HPA-4A/ HPA-4B*, *HPA-5A/ HPA-5B*, *HPA-15A/ HPA-15B*. Entretanto, os antígenos relacionados ao sistema de grupo sanguíneo Rh (C, c, E, e) não apresentaram resultados válidos para análise. Assim sendo, para a utilização dessa plataforma com o objetivo de profilaxia à aloimunização, seria necessária a utilização de técnicas complementares para a detecção dos principais antígenos ou alelos do sistema Rh. A plataforma OpenArray apresentou boa acurácia. Essa metodologia demonstrou ser custo-efetiva como método de triagem de doadores de sangue e busca de doadores raros ou para pacientes que entrarão em esquema de transfusão crônica. Contudo, em decorrência dos erros observados na análise comparativa, os serviços devem contar com o auxílio de uma metodologia para a confirmação dos genótipos raros;

2) A frequência encontrada nos doadores de sangue foi correspondente aos resultados encontrados na literatura, apresentando diferença estatisticamente significativa somente para os alelos *FY*A*, *FY*B* e *FY*02N.01*. Porém, a população de doadores da Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo apresentou genótipos pouco frequentes na população caucasóide, observados na população negra. Tal frequência pode estar relacionada ao alto índice de miscigenação

observada na região sudeste do Brasil. Ainda assim, os genótipos observados na população caucasóide apresentaram maior prevalência, podendo impactar no índice de aloimunização dos receptores falciformes. Os alelos de alta frequência: *XK*N.28*, *CROM*01.02*, *CROM*01.05*, *CROM*01*, *KN*01*, *KN*01.03* e *JMH*01.03*, que não estão contemplados em outras plataformas e não apresentavam frequência conhecida em nossa população, foram encontrados em 100% dos doadores.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Reid M, Lomas-Francis C; Olsson, ML The blood group antigen factsbook. 3rd ed. Cambridge: Academic Press; 2012.
2. Daniels G, Reid ME. Blood groups: the past 50 years. *Transfusion*. 2010 Feb;50(2):281-9.
3. Anliker M, von Zabern I, Hochsmann B, Kyrieleis H, Dohna-Schwake C, Flegel WA, *et al*. A new blood group antigen is defined by anti-CD59, detected in a CD59-deficient patient. *Transfusion*. 2014 Jul;54(7):1817-22.
4. Cvejic A, Haer-Wigman L, Stephens JC, Kostadima M, Smethurst PA, Frontini M, *et al*. SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. *Nat Genet*. 2013 May;45(5):542-5.
5. Storry JR, Joud M, Christophersen MK, Thuresson B, Akerstrom B, Sojka BN, *et al*. Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype. *Nat Genet*. 2013 May;45(5):537-41.
6. Fontao-Wendel R, Silva LC, Saviolo CB, Primavera B, Wendel S. Incidence of transfusion-induced platelet-reactive antibodies evaluated by specific assays for the detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. *Vox Sang*. 2007 Oct;93(3):241-9.
7. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang*. 2013 Feb;106(2):93-102.
8. Veldhuisen B, van der Schoot CE, de Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang*. 2009 Oct;97(3):198-206.
9. Drago F, Karpasitou K, Poli F. Microarray beads for identifying blood group single nucleotide polymorphisms. *Transfus Med Hemother*. 2009;36(3):157-60.

10. Jungbauer C, Hobel CM, Schwartz DW, Mayr WR. High-throughput multiplex PCR genotyping for 35 red blood cell antigens in blood donors. *Vox Sang*. 2012 Apr;102(3):234-42.
11. Reid ME. Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:171-7.
12. Liu Z, Zeng R, Chen Q, Li M, Shi GY, Wei P, *et al*. Genotyping for Kidd, Kell, Duffy, Scianna, and RHCE blood group antigens polymorphisms in Jiangsu Chinese Han. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Mar;125(6):1076-81.
13. Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajjhala P, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, *et al*. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion*. 2005 May;45(5):680-8.
14. Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, Costa FF, Pellegrino J, Jr., Castilho L. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang*. 2009 Aug;97(2):147-52.
15. Roback JD, Combs M, Grossman BJ, Hillyer C. Technical manual of the American Association of Blood Banks. 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2008.
16. Hillyer CD, Shaz BH, Winkler AM, Reid M. Integrating molecular technologies for red blood cell typing and compatibility testing into blood centers and transfusion services. *Transfus Med Rev*. 2008 Apr;22(2):117-32.
17. Moulds JM. Future of molecular testing for red blood cell antigens. *Clin Lab Med*. 2010 Jun;30(2):419-29.
18. Karpasitou K, Drago F, Crespiatico L, Paccapelo C, Truglio F, Frison S, *et al*. Blood group genotyping for Jk(a)/Jk(b), Fy(a)/Fy(b), S/s, K/k, Kp(a)/Kp(b), Js(a)/Js(b), Co(a)/Co(b), and Lu(a)/Lu(b) with microarray beads. *Transfusion*. 2008 Mar;48(3):505-12.
19. St-Louis M. Molecular blood grouping of donors. *Transfus Apher Sci*. 2014 Apr;50(2):175-82.
20. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet*. 2009 Dec;126(6):729-42.

21. Denomme GA, Johnson ST, Pietz BC. Mass-scale red cell genotyping of blood donors. *Transfus Apher Sci*. 2011 Feb;44(1):93-9.
22. Hopp K, Weber K, Bellissimo D, Johnson ST, Pietz B. High-throughput red blood cell antigen genotyping using a nanofluidic real-time polymerase chain reaction platform. *Transfusion*. 2010 Jan;50(1):40-6.
23. Finning K, Daniels G. Molecular blood grouping. *Transfus Apher Sci*. 2014 Apr;50(2):146-7.
24. Shehata N, Denomme GA, Hannach B, Banning N, Freedman J. Mass-scale high-throughput multiplex polymerase chain reaction for human platelet antigen single-nucleotide polymorphisms screening of apheresis platelet donors. *Transfusion*. 2011 Sep;51(9):2028-33.
25. Zimring JC, Welniak L, Semple JW, Ness PM, Slichter SJ, Spitalnik SL. Current problems and future directions of transfusion-induced alloimmunization: summary of an NHLBI working group. *Transfusion*. 2011 Feb;51(2):435-41.
26. Yazdanbakhsh K. Mechanisms of sickle cell alloimmunization. *Transfus Clin Biol*. 2012 Aug;22(3):178-81.
27. Boulat C. Transfusion and sickle cell disease. *Transfus Clin Biol*. 2013 May; 20(2):68-71.
28. Roseff SD. Sickle cell disease: a review. *Immunohematology*. 2009;25(2):67-74.
29. Makroo RN, Bhatia A, Gupta R, Phillip J. Prevalence of Rh, Duffy, Kell, Kidd & MNSs blood group antigens in the Indian blood donor population. *Indian J Med Res*. 2012 Mar;137(3):521-6.
30. Hussein E, Desooky N, Rihan A, Kamal A. Predictors of red cell alloimmunization in multitransfused Egyptian patients with beta-thalassemia. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 May;138(5):684-8.
31. Miller ST, Kim HY, Weiner DL, Wager CG, Gallagher D, Styles LA, *et al*. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: prevalence in 2010. *Transfusion*. 2013 Apr;53(4):704-9.

32. Vichinsky EP, Luban NL, Wright E, Olivieri N, Driscoll C, Pegelow CH, *et al.* Prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. *Transfusion*. 2001 Sep;41(9):1086-92.
33. Aly R, El-sharnoby MR, Hagag AA. Frequency of red cell alloimmunization in patients with sickle cell anemia in an Egyptian referral hospital. *Transfus Apher Sci*. 2012 Dec;47(3):253-7.
34. Matteocci A, Pierelli L. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease and in thalassaemia: current status, future perspectives and potential role of molecular typing. *Vox Sang*. 2014 Apr;106(3):197-208.
35. Lasalle-Williams M, Nuss R, Le T, Cole L, Hassell K, Murphy JR, *et al.* Extended red blood cell antigen matching for transfusions in sickle cell disease: a review of a 14-year experience from a single center (CME). *Transfusion*. 2011 Aug;51(8):1732-9.
36. Ertel K, Al-Tawil M, Santoso S, Kroll H. Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*. 2005 Mar;45(3):366-73.
37. Beiboer SH, Wieringa-Jelsma T, Maaskant-Van Wijk PA, van der Schoot CE, van Zwieten R, Roos D, *et al.* Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion*. 2005 May;45(5):667-79.
38. Bres JC, Merieux Y, Dugas V, Broutin J, Vnuk E, Jaber M, *et al.* New method for DNA microarrays development: applied to human platelet antigens polymorphisms. *Biomed Microdevices*. 2005 Jun;7(2):137-41.
39. Bugert P, McBride S, Smith G, Dugrillon A, Kluter H, Ouwehand WH, *et al.* Microarray-based genotyping for blood groups: comparison of gene array and 5'-nuclease assay techniques with human platelet antigen as a model. *Transfusion*. 2005 May;45(5):654-9.
40. Kappler-Gratias S, Peyrard T, Beolet M, Amiranoff D, Menanteau C, Dubeaux I, *et al.* Blood group genotyping by high-throughput DNA analysis applied to 356 reagent red blood cell samples. *Transfusion*. 2011 Jan;51(1):36-42.
41. Bertrand G, Kaplan C. Genotyping applied to platelet immunology: when? How? Limits. *Transfus Clin Biol*. 2009 May;16(2):164-9.

42. Bhatti FA, Uddin M, Ahmed A, Bugert P. Human platelet antigen polymorphisms (HPA-1, -2, -3, -4, -5 and -15) in major ethnic groups of Pakistan. *Transfus Med*. 2010 Apr;20(2):78-87.
43. Castro V, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM, Soares M, Menezes RC, Goncalves MS, *et al*. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet*. 1999 Oct;26(5):355-60.
44. Murphy MF, Pamphilon DH. *Practical transfusion medicine*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2009.
45. Kaplan C. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: a 50-year story. *Immunohematology*. 2007;23(1):9-13.
46. Mandelbaum M, Koren D, Eichelberger B, Auerbach L, Panzer S. Frequencies of maternal platelet alloantibodies and autoantibodies in suspected fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia, with emphasis on human platelet antigen-15 alloimmunization. *Vox Sang*. 2005 Jul;89(1):39-43.
47. Davoren A, Curtis BR, Aster RH, McFarland JG. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2004 Aug;44(8):1220-5.
48. Peterson JA, McFarland JG, Curtis BR, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. *Br J Haematol*. 2013 Apr;161(1):3-14.
49. Turner ML, Bessos H, Fagge T, Harkness M, Rentoul F, Seymour J, *et al*. Prospective epidemiologic study of the outcome and cost-effectiveness of antenatal screening to detect neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA-1a. *Transfusion*. 2005 Dec;45(12):1945-56.
50. Liew M, Nelson L, Margraf R, Mitchell S, Erali M, Mao R, *et al*. Genotyping of human platelet antigens 1 to 6 and 15 by high-resolution amplicon melting and conventional hybridization probes. *J Mol Diagn*. 2006 Feb;8(1):97-104.
51. Curtis BR, McFarland JG. Platelet immunology and alloimmunization. In: Simon TL, Snyder EL, Stowell CP, Strauss RG, Solheim BG, Pretides M, editors. *Rossi's principles of transfusion*. 4th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009. p. 168-86.

-
52. Cameron B, Rock G, Olberg B, Neurath D. Evaluation of platelet transfusion triggers in a tertiary-care hospital. *Transfusion*. 2007 Feb;47(2):206-11.
53. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol*. 2008 Jul;142(3):348-60.
54. Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, *et al*. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood*. 2005 May 15; 105(10):4106-14.
55. Ferreira AA, Zulli R, Soares S, Castro V, Moraes-Souza H. Identification of platelet refractoriness in oncohematologic patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(1): 35-40.
56. Ferreira AA. Identificação de refratariedade plaquetária em pacientes oncohematológicos [dissertação]. Uberaba: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2009.
57. Rinder HM, Tomer A. Platelet production, kinetics, and hemostasis. In: Simon TL, Snyder EL, Stowell CP, Strauss RG, Solheim BG, Pretides M, editor. *Rossi's principles of transfusion*. 4th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009. p. 149-67.
58. Ghevaert C, Campbell K, Stafford P, Metcalfe P, Casbard A, Smith GA, *et al*. HPA-1a antibody potency and bioactivity do not predict severity of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2007 Jul;47(7):1296-305.
59. Daniels G. *Human blood groups*. Oxford: Blackwell Science; 2002.
60. Covas DT, Bordin JO, Langhi DM. *Hemoterapia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu; 2007.
61. Klein HG, Mollison PL, Anstee DJ. *Mollison's blood transfusion in clinical medicine*. Oxford: Blackwell; 2005.
62. Castilho LP, Pellegrino Jr J, Reid ME. *Fundamentos de imuno-hematologia*. São Paulo: Atheneu; 2016.
63. Anstee DJ. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood*. 2009 Jul 9;114(2):248-56.

-
64. Storry JR, Olsson ML. Genetic basis of blood group diversity. *Br J Haematol*. 2004 Sep;126(6):759-71.
65. Reid ME. From DNA to blood groups. *Immunohematology*. 2008;24(4):166-9.
66. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3662-8.
67. Peyrard T, Lam Y, Saison C, Arnaud L, Babinet J, Rouger P, *et al*. Anti-U-like as an alloantibody in S-s-U- and S-s-U+(var) black people. *Transfusion*. 2012 Mar;52(3):622-8.
68. Palacajornsuk P. Review: molecular basis of MNS blood group variants. *Immunohematology*. 2006;22(4):171-82.
69. Reid ME. MNS blood group system: a review. *Immunohematology*. 2009;25(3):95-101.
70. Faria MA, Martins ML, Schmidt LC, Malta MC. Molecular analysis of the GYPB gene to infer S, s, and U phenotypes in an admixed population of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(3):212-6.
71. Daniels G. Lutheran. *Immunohematology*. 2009;25(4):152-9.
72. Kashani S, Stiller RJ. Lutheran b blood group alloimmunization: case series and literature review. *Conn Med*. 2006 Jun-Jul;70(6):363-5.
73. Boturao-Neto E, Yamamoto M, Chiba AK, Kimura EY, de Oliveira Mdo C, do Monte Barretto CL, *et al*. Molecular Basis of KELnull Phenotype in Brazilians. *Transfus Med Hemother*. 2014 Jan;42(1):52-8.
74. Meny GM. The Duffy blood group system: a review. *Immunohematology*. 2010;26(2):51-6.
75. Pagliarini T. Estudo dos polimorfismos do gene DUFFY em pacientes com hipertensão maligna e doadores de sangue [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.
76. Horn T, Castilho L, Moulds JM, Billingsley K, Vege S, Johnson N, *et al*. A novel JKA allele, nt561C>A, associated with silencing of Kidd expression. *Transfusion*. 2012 May;52(5):1092-6.

77. Toyoda C, Suzuki Y, Tsuneyama H, Onodera T, Masuno A, Yabe R, *et al.* Production of human monoclonal anti-Jk3, recognising an epitope including the Jk(a) /Jk(b) polymorphic site of the Kidd glycoprotein. *Transfus Med.* 2014 Oct; 24(5):286-91.
78. Sands JM. Molecular approaches to urea transporters. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Nov;13(11):2795-806.
79. Figueroa D. The Diego blood group system: a review. *Immunohematology.* 2013;29(2):73-81.
80. Begat C, Bailly P, Chiaroni J, Mazieres S. Revisiting the Diego blood group system in Amerindians: evidence for gene-culture comigration. *PLoS One.* 2015; 10(7):e0132211.
81. George MR. Cartwright blood group system review. *Immunohematology.* 2012;28(2):49-54.
82. Piassi FC, Santos SM, de Castilho LM, Baleotti Junior W, Suzuki RB, da Cunha DM. Dombrock genotyping in Brazilian blood donors reveals different regional frequencies of the HY allele. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;35(6):400-3.
83. Halverson GR, Peyrard T. A review of the Colton blood group system. *Immunohematology.* 2010;26(1):22-6.
84. Storry JR, Reid ME, Yazer MH. The Cromer blood group system: a review. *Immunohematology.* 2010;26(3):109-18.
85. Moulds JM. The Knops blood-group system: a review. *Immunohematology.* 2010;26(1):2-7.
86. Seltsam A, Agaylan A, Grueger D, Meyer O, Blasczyk R, Salama A. Rapid detection of JMH antibodies with recombinant Sema7A (CD108) protein and the particle gel immunoassay. *Transfusion.* 2008 Jun;48(6):1151-5.
87. Johnson ST. JMH blood group system: a review. *Immunohematology.* 2014;30(1):18-23.
88. Hillyer CD, Silberstein LE, Mess PM, Anderson KC, Roback JD. Blood banking and transfusion medicine: basic principles & practice. London: Churchill Livingstone/Elsevier; 2007.

-
89. Bianchi JV, de Azevedo MR, Jens E, Nukui Y, Chamone DA. Frequency of human platelet antigens in oncohematological patients with thrombocytopenia and the probability of incompatibility to platelet transfusions. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(3):202-5.
90. Norton A, Allen DL, Murphy MF. Review: platelet alloantigens and antibodies and their clinical significance. *Immunohematology*. 2004;20(2):89-102.
91. Hurd CM, Cavanagh G, Schuh A, Ouwehand WH, Metcalfe P. Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. *Vox Sang*. 2002 Jul;83(1):1-12.
92. Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection. *Vox Sang*. 2004 Jul;87 Suppl1:82-6.
93. Socher I, Zwingel C, Santoso S, Kroll H. Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: consequences for the diagnosis of alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*. 2008 Mar;48(3):463-72.
94. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang*. 2014 Feb;106(2):93-102.
95. Al-Subaie AM, Fawaz NA, Mahdi N, Al-Absi IK, Al-Ola K, Ameen G, *et al*. Human platelet alloantigens (HPA) 1, HPA2, HPA3, HPA4, and HPA5 polymorphisms in sickle cell anemia patients with vaso-occlusive crisis. *Eur J Haematol*. 2009 Dec 1;83(6):579-85.
96. Borzini P, Mazzucco L. The ability of HPA-5b typing to predict vascular occlusion events. *Vox Sang*. 2005 Jan;88(1):61.
97. Cardone JD, Chiba AK, Boturao-Neto E, Vieira-Filho JP, Bordin JO. Gene frequencies of the HPA-15 (Gov) platelet alloantigen system in Brazilians. *Transfus Med*. 2004;14(6):433-7.
98. Combs M, Denomme G, Grossman BJ, Haley NR. Technical manual of the American Association of Blood Bank. 15th editions / standards 1-24th editions. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2005.
99. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: fundamentos e prática. 2a. ed. São Paulo: Atheneu; 2004.

100. Hayashi T, Amakishi E, Matsuyama N, Yasui K, Furuta RA, Hori Y, *et al.* Detection of antibodies against human platelet antigens 15a and 15b by using a cell line panel. *Br J Haematol.* 2010 Nov;151(4):402-4.
101. Lomas-Francis C, DePalma H. DNA-based assays for patient testing: their application, interpretation, and correlation of results. *Immunohematology.* 2008; 24(4):180-90.
102. Denomme GA, Van Oene M. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion.* 2005 May;45(5):660-6.
103. Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel WA, Garratty G, de Haas M, *et al.* International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Cancun report (2012). *Vox Sang.* 2014 Jul;107(1):90-6.
104. Denomme GA, Westhoff CM, Castilho L, Reid ME. Consortium for Blood Group Genes (CBGG): 2008 report. *Immunohematology.* 2009;25(2):75-80.
105. Denomme GA, Westhoff CM, Castilho LM, St-Louis M, Castro V, Reid ME. Consortium for Blood Group Genes (CBGG): 2009 report. *Immunohematology.* 2010;26(2):47-50.
106. Reid ME, Westhoff C, Denomme G, Castilho L. Consortium for Blood Group Genes (CBGG): 2007 report. *Immunohematology.* 2007;23(4):165-8.
107. Reid ME, Westhoff CM, Denomme G, Castilho L. Consortium for Blood Group Genes (CBGG): Miami 2006 report. *Immunohematology.* 2007;23(2):81-4.
108. Martins FT, Ramos PZ, Svidnicki MC, Castilho AM, Sartorato EL. Optimization of simultaneous screening of the main mutations involved in non-syndromic deafness using the TaqMan(R) OpenArray Genotyping platform. *BMC Med Genet.* 2013;14:112.
109. Pomeroy R, Duncan G, Sunar-Reeder B, Ortenberg E, Ketchum M, Wasiluk H, *et al.* A low-cost, high-throughput, automated single nucleotide polymorphism assay for forensic human DNA applications. *Anal Biochem.* 2009 Dec 1;395(1):61-7.
110. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975 May 25;94(3):441-8.

111. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*. 2011 Nov;52(4):413-35.
112. Tarazona-Santos E, Castilho L, Amaral DR, Costa DC, Furlani NG, Zuccherato LW, *et al*. Population genetics of GYPB and association study between GYPB*S/s polymorphism and susceptibility to *P. falciparum* infection in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2011;6(1):e16123.
113. Guelson GA, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, de Melo FC, Hashimoto MN, *et al*. Genetic polymorphisms of Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in a population from the State of Parana, southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(1):21-5.
114. Latini FR, Gazito D, Arnoni CP, Muniz JG, de Medeiros Person R, Carvalho FO, *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 Transfus*. 2014 Jan;12 Suppl 1:s256-63.
115. McBean RS, Hyland CA, Davis AC, Condon J, Parsons K, Flower RL. Blood group genotype analysis of Australian reagent red blood cell donors across three genotyping platforms: consistent detection of 7-0% phenotype genotype nonconcordance. *ISBT Science Series*. 2014;1(9):309-14.
116. Finning K, Bhandari R, Sellers F, Revelli N, Villa MA, Muniz-Diaz E, *et al*. Evaluation of red blood cell and platelet antigen genotyping platforms (ID CORE XT / ID HPA XT) in routine clinical practice. *Blood Transfus*. 2015 Oct 29:1-8.
117. Dinardo CL, Santos HC, Vaquero AR, Martelini AR, Dallan LA, Alencar AM, *et al*. Smoking and female sex: independent predictors of human vascular smooth muscle cells stiffening. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145062.
118. Arnoni CP, Muniz JG, de Paula TA, Person RD, Gazito D, Baleotti W, Jr., *et al*. An easy and efficient strategy for KEL genotyping in a multiethnic population. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(2):99-102.
119. Kahar MA, Patel RD. Phenotype frequencies of blood group systems (Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, P, Lewis, and Lutheran) in blood donors of south Gujarat, India. *Asian J Transfus Sci*. 2014 Jan;8(1):51-5.
120. Muniz JG, Arnoni CP, Gazito D, de Medeiros Person R, Vendrame TA, Latini FR, *et al*. Frequency of Wr(a) antigen and anti-Wr(a) in Brazilian blood donors. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015 Sep-Oct;37(5):316-9.

-
121. Conti F, Bertrand G, Dezan M, Costa T, Aravechia M, Mota M, *et al.* Molecular HPA genotyping by microarray in Brazilian blood donors. *Transfusion*. 2014 Feb;54(2):405-11.

Apêndices

APÊNDICE A

1. Resultados dos SNPs analisados no Taqman Genotyper

Figura 26 - Resultados obtidos para os alelos *GYPB**S e *GYPB**s. Neste estudo não foi possível a padronização desta técnica para os polimorfismos conhecidos como *GYPB*.P2 e *GYPB*.NY, para a determinação do fenótipo deduzido.

Figura 27 – Resultados obtidos para os alelos *LU*01* e *LU*02* e seus respectivos fenótipos deduzidos Lu(a+b-), Lu(a+b+) e Lu(a-b+).

Figura 28 – Resultados obtidos para os alelos *KEL*01* e *KEL*02* e seus respectivos fenótipos deduzidos K+k-, K+k+ e K-k+. A análise para K/k foi realizada no modo manual do Taqman Genotyper, em decorrência da proximidade dos resultados homozigotos para k e heterozigotos.

Figura 29 – Resultados obtidos para os alelos *KEL**03 e *KEL**04 e seus respectivos fenótipos deduzidos Kp(a+b-), Kp(a+b+) e Kp(a-b+).

Figura 30 – Resultados obtidos para os alelos *KEL**06 e *KEL**07 e seus respectivos fenótipos deduzidos Js(a+b-), Js(a+b+) e Js(a-b+). Foi encontrado um indivíduo com ausência do alelo de alta frequência *KEL**07 (J_s^b), demonstrado em forma de círculo azul.

Figura 31 – Resultados obtidos para os alelos *FY*01* e *FY*02*. Para a determinação do fenótipo deduzido é necessário análise do *GATA-67 CC* e *Fy^x*.

Figura 32 – Resultados obtidos para o alelo *FY*02N.01* (*GATA -67 CC*), em homozigose para o alelo selvagem, representado em azul, e em homozigose para o alelo mutado, representado em vermelho. Para a determinação do fenótipo deduzido é necessário análise dos SNPs *Fy^a/Fy^b* e *Fy^x*.

Figura 33 – Resultados obtidos para os alelos *FY*02W.01* em homozigose para o alelo selvagem, representado em vermelho, e em heterozigose para o alelo mutado, representado em verde. Para a determinação do fenótipo deduzido é necessário análise de *Fy^a/Fy^b* e *GATA-67 CC*.

Figura 34 – Resultados obtidos para os alelos *JK*01* e *JK*02* e seus respectivos fenótipos deduzidos *Jk(a+b-)*, *Jk(a+b+)* e *Jk(a-b+)*.CORRIGIR FIGURA (VERMELHO)

Figura 35 – Resultados obtidos para os alelos DI^*01 e DI^*02 e seus respectivos fenótipos deduzidos $Di(a+b-)$, $Di(a+b+)$ e $Di(a-b+)$.

Figura 36 – Resultados obtidos para os alelos $DI^*02.03$ e $DI^*02.04$ e seu respectivo fenótipo deduzido $Wr(a-b+)$.

Figura 37 – Resultados obtidos para os alelos YT^*01 e YT^*02 e seus respectivos fenótipos deduzidos $Yt(a+b-)$, $Yt(a+b+)$ e $Yt(a-b+)$.

Figura 38 – Resultados obtidos para os alelos DO^*01 e DO^*02 e seus respectivos fenótipos deduzidos $Do(a+b-)$, $Do(a+b+)$ e $Do(a-b+)$.

Figura 39 – Resultados obtidos para o alelo *DO*02.04* e seu respectivo fenótipo deduzido Hy+, em homozigose, representado em azul, e heterozigose, representado em verde.

Figura 40 – Resultados obtidos para o alelo *DO*01.05* e seu respectivo fenótipo deduzido Jo(a+), em homozigose, representado em azul, e heterozigose, representado em verde. A análise para Jo(a) foi realizada no modo manual do Taqman Genotyper, em decorrência da proximidade dos resultados homozigotos e heterozigotos.

Figura 41 – Resultados obtidos para os alelos CO^*01 e CO^*02 e seus respectivos fenótipos deduzidos $Co(a+b-)$, $Co(a+b+)$ e $Co(a-b+)$. Foi encontrado um indivíduo com ausência do alelo de alta frequência CO^*01 ou CO^*A (Co^a), demonstrado em forma de círculo azul.

Figura 42 – Resultados obtidos para o alelo $XK^*N.28$ e seu respectivo fenótipo deduzido Kx^+ , em homozigose, observados em azul.

Figura 43 – Resultados obtidos para os alelos *CROM*01.02* e *CROM*01.03* e seus respectivos fenótipos deduzidos Tc(a+b-) e Tc(a+b+).

Figura 44 – Resultados obtidos para o alelo *CROM*01* e seu respectivo fenótipo deduzido Cr(a+), em homozigose, representado em vermelho.

Figura 45 – Resultados obtidos para o alelo *CROM*01.05* e seu respectivo fenótipo deduzido Dr(a+), em homozigose, representado em vermelho.

Figura 46 – Resultados obtidos para os alelos *KN*01* e *KN*02* e seus respectivos fenótipos deduzidos Kn(a+b-), Kn(a+b+) e Kn(a-b+).

Figura 47 – Resultados obtidos para os alelos *KN*01.03* e *KN*01.06* e seus respectivos fenótipos deduzidos McC(a+b-) e McC(a+b+).

Figura 48 – Resultados obtidos para os alelos *KN*01.04* e *KN*01.07* e seus respectivos fenótipos deduzidos Sl(a)+Vil-, Sl(a)+Vil+ e Sl(a)-Vil+.

Figura 49 – Resultados obtidos para o alelo *JMH*01.03* e seu respectivo fenótipo deduzido JMH+, em homozigose, observados em vermelho.

Figura 50 – Resultados obtidos para os alelos *HPA-1a* e *HPA-1b*.

Figura 51 – Resultados obtidos para os alelos *HPA-2a* e *HPA-2b*.

Figura 52 – Resultados obtidos para os alelos *HPA-3a* e *HPA-3b*.

Figura 53 – Resultados obtidos para os alelos *HPA-4a* e *HPA-4b*.

Figura 54 – Resultados obtidos para os alelos *HPA-5a* e *HPA-5b*.

Figura 55 – Resultados obtidos para os alelos *HPA-15a* e *HPA-15b*.

Apêndice B - Publicação: Bianchi JVS, Dinardo CL, Niewiadonski V, Mota M, Mendrone-Junior A, Sabino EC. Comparison of two high-throughput platforms for red blood cell and platelet antigens genotyping. International Society of Blood Transfusion ISBT Science Series 2015;10:45-51.

ISBT Science Series

An affiliated publication to Vox Sanguinis

ISBT Science Series (2015) 10, 45-51

© 2015 International Society of Blood Transfusion

ORIGINAL PAPER

Comparison of two high-throughput platforms for red blood cell and platelet antigens genotyping

J. V. S. Bianchi,¹ C. L. Dinardo,^{2,3} V. Niewiadonski,¹ M. Mota,⁴ A. Mendrone-Junior² & E. C. Sabino^{1,5}

¹Tropical Medicine Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brazil

³Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

⁴Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil

⁵Department of Infectious Disease, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Background Red blood cells (RBC) and platelet (PLT) antigens genotyping is a useful tool applied to solve complex immunohaematologic cases, perform alloimmunization prophylaxis and search for rare blood donors. There are different high-throughput platforms available for RBC and PLT genotyping, which differ in terms of comprised antigens, length of reaction, result interpretation and cost. The objective of this study was to compare the performance of two high-throughput platforms designed for RBC and PLT genotyping: OpenArray (customized Real-time platform) and BLOODchip (Luminex technology).

Materials and Methods Blood samples of 242 blood donors were simultaneously tested using OpenArray and BLOODchip (ID-Core XT and ID-HPA XT) platforms. The methodologies were compared in terms of accuracy, duration of reaction, percentage of no-calls, number of samples processed per reaction and interpretation software. The designed OpenArray assay comprised 37 single nucleotide polymorphisms (SNPs) encoding 31 RBC antigens and six PLT antigens, while the BLOODchip comprised 29 SNPs encoding erythrocyte antigens (ID-Core XT) and 12 SNPs encoding PLT antigens (ID-HPA XT).

Results The OpenArray accuracy was 99.93%, and BLOODchip accuracy, 100%. The percentage of no-calls did not differ between the methodologies. OpenArray was less time-consuming when performing both RBC and PLT genotyping, whereas BLOODchip presented proper software for results interpretation and allowed the evaluation of individuals samples per reaction.

Conclusion Both OpenArray and BLOODchip methodologies are accurate and suitable for RBC and PLT genotyping. The choice between the platforms relies on the service genotyping goals.

Key words: blood group system, genotyping, platelet, red blood cell

Introduction

The blood group systems comprise antigens which are present in red blood cells (RBC) membrane and that can be serologically detected by specific antibodies through

haemagglutination. These structures may be proteins, glycoproteins or glycolipids, or glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins. Since the discovery of the ABH blood group at the beginning of the 20th century, more than 300 blood group antigens have been characterized, composing 35 blood group systems, which have been described on the molecular level [1-5].

The Rh, MNS, Kell, Duffy and Kidd blood group systems are the most immunogenic and relevant in transfusion medicine. These groups are biallelic and most of

Correspondence: Juliana V. S. Bianchi, Department of Virology IMT-USP, Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 Pinheiros, 05403-000 São Paulo, Brazil.
E-mail: julianavds@hotmail.com

their antigens differ from the antithetic partner by one single nucleotide polymorphism (SNP) [6]. Until recently, blood group antigens were only detected using serologic methods, which were broadly available. However, there are major limitations to the exclusive use of serologic techniques, especially regarding the lack of serum for the detection of some RBC antigens and the high cost of commercial serum for the detection of rare RBC antigens. In such cases, the genotyping method is the best alternative [7–9].

The molecular methods currently available for RBC and platelet (PLT) genotyping can be divided into two categories: (1) low- to medium-throughput and (2) high-throughput [10]. Modern methods of high-throughput genotyping can be applied within blood donors, enabling the organization of a group of extensively genotyped donors, which can meet the needs of prophylactic transfusion for sickle cell patients and also identify a group of rare blood donors. High-throughput RBC and PLT genotyping of blood donors can be designed to screen for multiple antigens using a single assay, representing a much faster strategy than serologic and conventional genotyping methods [2, 6, 11–15].

There are some high-throughput assays designed for RBC and PLT antigen genotyping available, and of those, HEA Beadchip platform (BioArray solutions) was the most extensively studied one [16]. Based on that, the objective of this study was to compare the performance of two novel high-throughput platforms designed for the genotyping of RBC and PLT antigens: the research-developed OpenArray (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and the commercially available BLOODchip (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company, Bilbao, Spain).

Materials and methods

Donor recruitment

Blood samples of 242 repeat blood donors were evaluated in this study. Donors were selected sequentially as they came to our blood centre (Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo) between 24 October and 8 November 2011. All donors were informed about the study objectives and signed the informed consent term approved by the Ethical Committee of the University São Paulo Medical School (CEP-FMUSP -233/11). Samples were collected in EDTA tubes and stored at $4 \pm 2^\circ\text{C}$ until DNA extraction.

DNA extraction

The DNA was isolated from 200 μL of whole blood using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany),

according to manufacturer instructions. DNA quantity and quality was determined by spectrophotometry method using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). All DNA samples evaluated presented high purity (260/280 nm ratio 1.8–2.1) and a proper concentration for both evaluated assays.

Study design

All DNA samples were evaluated using a research-developed OpenArray assay and the commercially available BLOODchip method (ID-Core XT and ID-HPA XT). Platforms were compared in terms of

- (1) Accuracy: calculated as the percentage of correctly identified alleles within all analysed alleles. In case of discrepant results between the methodologies, samples were analysed using conventional Sanger sequencing, as described below. All samples with low signal were excluded from this analysis, irrespective of their results.
- (2) Percentage of no-calls: calculated as the percentage of no-calls exhibited by the equipment within all analysed alleles. Methods will be compared using chi-squared test (SPSS, 17th version Laerd statistics), and a P -value < 0.05 will be considered significant.
- (3) Total duration of reaction: the same technician executed the 242 samples using both methodologies. The time to process 96 samples was computed. The time required to interpret the results was not included in this analysis.
- (4) Number of samples evaluated per experiment: minimum and maximum number of samples.
- (5) Software for result analysis: the software containing the results was evaluated regarding the presence of proper tools for converting the genotype into predicted phenotype.
- (6) Possibility of assay customization.

OpenArray assay

OpenArray is a customized, Real-time polymerase chain reaction, high-throughput genotyping platform. In this study, the designed OpenArray hybridization plate comprised 37 SNPs encoding 31 RBC antigens and six PLT antigens (Table 1). The OpenArray plate evaluated was designed by our team and met our service's need. Initially, the plate was prevalidated using samples with known genotype (over 150 samples, previously genotyped using different molecular techniques). The assays consisted of primers and probes marked with VIC and FAM fluorophores, each probe designed for one allele type. They were disposed in a platform composed of 48 through-holes each containing 64 subarrays disposed in matrices of 8 by 8,

Table 1 Comparison of the antigens evaluated in OpenArray and BLOODchip (ID-Core XT and ID-HPA XT) platforms

	OpenArray	BLOODchip
RHCE, V, VS		X
Ss	X	X
MN		X
U, U variant, Mi ^a , Mur		X
Lu	X	X
Kell, Kp, Js	X	X
Fy ^a , Fyb ^a , Fy null	X	X
Jk	X	X
Jkb null		X
Di	X	X
Wzr	X	
Yt	X	X
Do	X	X
Hy	X	X
Jo ^a	X	X
Co	X	X
KX	X	
Tc, Dr ^a , Cr ^a	X	
Kn, McC, Si ^b /Vi	X	
JMH	X	
HPA1 – HPA5 + HPA15	X	X
HPA6		X
HPA7		X
HPA8		X
HPA9		X
HPA10		X
HPA11		X

allowing the performance of multiple samples each time. DNA samples (previously diluted to 35 ng/ μ l) and the master mix (TaqMan OpenArray Genotyping Master Mix) were incorporated into the array by the OpenArray AccuFill™ System (Life Technologies) and genotyped according to the manufacturer's recommendations.

A non-template control consisting of DNase-free water was introduced within each assay. The DNA and the master mix were transferred to the chip, which was filled with an immersion fluid and sealed with glue. The multiplex TaqMan assay reactions were carried out in GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies) with the following PCR cycle: an initial step at 93°C for 10 min followed by 50 cycles of 45 s at 95°C, 13 s at 94°C and 2 min and 14 s at 53°C; followed by a final step during 2 min at 25°C and holding at 4°C.

Fluorescence results were read at BioTrove OpenArray SNP genotyping platform (Life Technologies, São Paulo, Brazil). The genotyping analysis was made with the TaqMan GENOTYPER software version 1.3, using autocalling as the call method. The results were considered valid when the call rate for quality value is 90% or higher.

Samples could be classified as homozygous for allele 1 or 2, or heterozygous. The reproducibility was tested with 10 samples in triplicate in different plates, with 100% of accuracy.

BLOODchip (Luminex platform) – ID-Core XT and ID-HPA XT

BLOODchip (Progenika Biopharma SA, a Grifols Company) is a commercially available array designed for the genotyping of RBC (ID-Core XT) and PTL (ID-HPA XT) antigens (Table 1), using the Luminex system. In brief, the Luminex system is a modified flow cytometer that uses, in BLOODchip assay, specific oligonucleotide probes attached to microspheres of different colours for DNA hybridization. The multiplex nature of the assay is a result of the use of multicoloured beads. In this technique, DNA (previously diluted to 20 ng/ μ l) was amplified by PCR using Hot Star Taq polymerase (Qiagen), and the obtained amplification product was hybridized to multiplex beads. After 30 min of hybridization, streptavidin was added for labelling and the reaction product was analysed in the Luminex 100/200 system with xPONENT 3.1 software (Luminex, Austin, TX, USA) using the ID-Core XT template. The Luminex raw data were analysed using BMS XT Software (Progenika Biopharma, Bizkaia, Spain). The reproducibility was evaluated by testing three samples in all batches, with 100% of accuracy.

Sanger sequencing

Results in disagreement between OpenArray and BLOODchip were evaluated using conventional Sanger sequencing methodology, in which the specific amplified PCR products were tested with the ABI Prism BigDye terminator kit v3.1 (Life Technologies), as described elsewhere [17, 18]. Primers were designed using the online software PRIMER3 (v 0.4.0). Positive and negative control samples were analysed for each discrepant SNP. The reactions were run on the 3500 Genetic Analyzer for Resequencing (Life Technologies), and the results were analysed using SEQUENCHER[®] DNA Sequencing Analysis Software 4.1.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

Results

Of 242 DNA samples evaluated, one was excluded due to low signal of fluorescence in all alleles in both methodologies and three alleles were not analysed due to low signal of fluorescence only in BLOODchip platform.

Of 9992 analysed alleles, we detected six discrepancies between the methodologies, comprising the alleles *LU^aA*, *LU^aB*, *KEL^aO3*, *YT^aA* and *HPA-4B* (Tables 2–4). The other

Table 2 Comparison of results obtained from OpenArray and BLOODchip (R9C and P1J antigens)

Blood group system	Gene	Single nucleotide polymorphism	Target allele	Number of samples genotyped using OpenArray	Number of samples genotyped using BLOODchip	Number of discordant results	Predicted phenotype – frequency (%)			
002 MNS	GYPB	S/s	148M (143 C>T)	239	242	0	S+s + 35.7	S-s + 51.5	S-s- 0.8	
005 Lutheran	LU	Lu ^a /Lu ^b	R77H (230A>G)	238	233	2	Lu(a-b-) 0	Lu(a-b-) 93.3		
006 Kell	KEL	K/k	M193T (578 T>C)	237	242	0	K+k- 0	K-k + 94.2		
		Kp ¹ /Kp ²	W281R (841 T>C)	242	242	1	Kp(a-b-) 0	Kp(a-b+) 99.2		
		Js ¹ /Js ²	P597L (1790C>T)	239	242	0	Js(a-b-) 0.4	Js(a-b+) 93.4		
008 Duffy	DARC	Fy ^a /Fy ^b	G42D (125G>A)	242	242	0	Fy(a-b-) 22.1	Fy(a-b+) 40.4		
		Fy null erythroid	P-67T>C	242	242	0				Fy(a-b-) 10.4
		Fy ^a /Fy ^b	R89C (265C>T)	240	242	0				
009 Kidd	SLC7A41, HUH1	Jk ^a /Jk ^b	D280N (838G>A)	242	242	0	Jk(a-b-) 31.4	Jk(a-b+) 50		
010 Diego	SLC7A1, AE1	D ^a /D ^b	P854L (2561T>C)	236	242	0	D(a-b-) 0	D(a-b+) 96.3		
011 Yt	ACHE	Yt ^a /Yt ^b	H353N (1057C>A)	240	242	2	Yt(a-b-) 87.9	Yt(a-b+) 12.1		
014 Donbrook	ARF4	Dc ^a /Dc ^b	N285D (733A>G)	239	242	0	Dc(a-b-) 12.5	Dc(a-b+) 43.8		
		Hv	G108V (323G>T)	241	242	0	Hv+ 100			
		Jc ^a	T1171 (359C>T)	235	242	0	Jc ^a + 100			
015 Collon	AGP1	Co ^a /Co ^b	A45T (134C>T)	242	242	0	Co(a-b-) 94.6	Co(a-b+) 5		
HPA	GP3A	HPA 1a/1b	L59P (176 T>C)	242	236	0	HPA 1a/1b 22.7	HPA 1b/1b 2.5		
	GP15A	HPA 2a/2b	T161M (482 C>T)	241	241	0	HPA 2a/2b 77.4	HPA 2b/2b 4.2		
	GP2B	HPA 3a/3b	B745 (262 T>G)	239	218	0	HPA 3a/3b 40.6	HPA 3b/3b 45.6		
	GP3A	HPA 4a/4b	R169Q (506 G>A)	240	242	1	HPA 4a/4a 100	HPA 4b/4b 0		
	BR (GP1A)	HPA 5a/5b	E534K (1600 G>A)	238	241	0	HPA 5a/5a 77.8	HPA 5b/5b 1.3		
	CD109	HPA 15a/15b	S703Y (2108 C>A)	242	242	0	HPA 15a/15a 28.0	HPA 15b/15b 48.1		

PLT, platelet; RBC, red blood cells.

Table 3 Final comparison between OpenArray and BLOODchip platforms

	OpenArray	ID-Core XT	ID-HPA XT
Accuracy, %	99.93	100	100
Number of incorrect results (%)	6 (0-12)	0	0
Number no-call (%)	61 (1-2)	43 (0-85)	Computed together with ID-Core XT
Possibility of customization	Yes	No	No
Total duration of reaction (96 samples)	5 h 30 min	5 h	5 h
Number of samples processed per experiment	48 samples for 64 SNPs or 96 samples for 32 SNPs	1 96	1 96
Proper software for the conversion of genotype into presumed immunohaematological phenotype	Not include (the results are reported with VIC/MC or VIC/FAM or FAM/FAM)	Included	Included

SNP, single nucleotide polymorphism.

Table 4 Confirmation of discrepant results using Sanger sequencing

Single nucleotide polymorphism	RS	OpenArray	BLOODchip	Discrepant alleles	Sequencing	Correct results
Lu(a)/Lub	28399653	Lu(a+b+)	Lu(a-b+)	LU* <i>A</i>	Lu(a-b+)	ID-Core XT
		Lu(a+b-)	Lu(a+b+)	LU* <i>B</i>	Lu(a+b+)	ID-Core XT
Kpa/Kpb	8176059	Kp(a-b+)	Kp(a+b+)	KELL* <i>03</i>	Kp(a+b+)	ID-Core XT
Yta/Ytb	1799805	Yt(a-b+)	Yt(a+b+)	YT* <i>A</i>	Yt(a+b+)	ID-Core XT
		Yt(a-b+)	Yt(a+b+)	YT* <i>A</i>	Yt(a+b+)	ID-Core XT
HPA 4a/4b	5917	4AA	4AB	HPA* <i>4B</i>	4AB	ID-HPA XT

alleles presented no results in disagreement. The calculated accuracy for OpenArray platform was 99.93%, and for BLOODchip, 100% (Table 3). Statistical analyses were not performed due to the low number of discrepant results, which hampered the tests.

The number of no-calls did not differ between the two methodologies ($P = 0.0947$). The time to process 96 samples was 5 h 30 min for OpenArray and 5 h for ID-Core XT and 5 h for ID-HPA XT. Considering that the OpenArray plate comprised both RBC and PLT alleles, it was a less time-consuming methodology. The number of samples evaluated using Open Array per experiment corresponded to the maximum number available in the plate (96 samples for 32 SNP). The assay did not allow the processing of individual samples. In contrast, BLOODchip allowed the evaluation of sample batches ranging from 1 to 96 per experiment, without loss of inputs. Finally, OPENARRAY analysis software presented the results considering VIC and FAM fluorescence and the user interpreted the signals to determine a genotype and then a predicted phenotype. BLOODchip had proper software that converted the resulting genotype into predicted phenotype

(Table 3). Three donors considered as rare in our country were identified within the studied sample: two S-s- (one due to *GYPB* deletion), and one Co(a-b+).

Discussion

Our study demonstrated that both OpenArray and BLOODchip (ID-Core-XT and ID-HPA XT) high-throughput genotyping platforms are highly accurate in determining RBC and PLT antigens genotype (99.93% accuracy for OpenArray and 100% for BLOODchip). The evaluated methodologies differed in terms of antigens comprised within the assays, duration of reaction, minimum number of processed samples and presence of phenotype interpretation software for immunohaematologic analyses. The choice between the platforms depends on the genotyping goal and the characteristics of the user service, as it will be explained below.

OpenArray is a flexible high-throughput genotyping assay. The main advantage of its application on the immunohaematology field is the possibility of changing the design of the hybridization plates to meet the needs

of rare blood donor searching. As the Taqman assays are singleplex, adding new assays does not require revalidation of the existing ones. Considering the wide ethnic variation of RBC antigens, the assay designed to meet the needs of a certain geographical region may be unsuitable for another one. In this regard, the plate designed for this study comprised the most interesting antigens for Brazilian population, such as Dia and Dib, and excluded others, such as Mia, due to their rarity in our population.

The high accuracy of OpenArray® in genotyping RBC antigens has already been demonstrated [12]. The present manuscript confirms its high accuracy and extends it to the genotyping of HPA antigens. We have faced problems regarding the inclusion RhD, C, c, E and e in the assay, which were not included in this study. Those problems were due to the presence of masked (homologous) regions within their sequence and were overcome elsewhere changing the primer design strategy [12]. The absence of software designed to convert the genotype into presumed phenotype is a drawback of the platform. As the assay requires the gathering of 96 samples (for genotyping 32 SNP) before the beginning of the routine, it represents a useful strategy for donor genotyping and alloimmunization prophylaxis routine, but less attractive for solving single immunohaematological cases.

The BLOODchip platform is commercially available for the genotyping of RBC and PLT antigens. Since the assay was designed to attend immunohaematological purposes, the plate includes a wide range of antigens and their most important expression variants, such as the null genotype of JKB and GYB. This product includes software that converts genotype to predicted phenotype, making it easier for the operator to interpret the results. Since the platform allows the testing of single samples, there is the possibility of genotyping single patients, which is interesting in the case of patients' routine. Its accuracy in determining both RBC and PLT genotyping was high, representing this first report in literature evaluating the methodology. The major drawback of this methodology is the inability to customize the assay design.

This study has some limitations. As OpenArray is an open platform, it can be customized according to needs of each study and the plate designed for this study did not allow the comparison of all alleles with the BLOODchip platform. However, the frequencies found for those specific alleles *WR*A* allele and *WR*B* (RS 45568837), *KX* (RS 28933690), *CROM*01* (RS 60822373), *CROM*01.05* (RS 56283594), *CROM*01.03* (RS 28371588), *KN*03* and *KN*06* (RS 17047660) and *JMH*01* (RS 55637216 and RS 56367230) are in line with frequency found in the scientific literature [19]. Similarly, it was not possible to compare some alleles present in ID-Core XT but absent in the OpenArray: *RHCE* and variants, *JK*B* null(IVS5-1a),

*JK*B* null(871C) *GYPA*M*, *GYPA*N*, *GYPB*S* null(IVS5+50), *GYPB*S* null(230T), *GYPB*deletion* and *GYPB*-Mur HPA-6*, 7, 8, 9, 10, 11. Finally, a cost analysis could not be performed properly and was excluded from this study.

Conclusion

Both OpenArray and BLOODchip high-throughput genotyping methodologies are accurate for RBC and PLT antigens genotyping.

Acknowledgements

We thank Cecilia Alencar, Silvia Bonifácio and Vitor Medeiros for technical assistance and additional discussions. We also thank Marcia Dezan, who supplied us with control samples.

Conflict of interest

Grifols Company supplied the inputs for the assays ID-Core XT and ID-HPA XT.

References

- Daniels G: The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet* 2009; 126:729-742
- Denomme GA, Johnson ST, Pietz BC: Mass-scale red cell genotyping of blood donors. *Transfus Apher Sci* 2011; 44:93-99
- Storry JR, Castilho L, Daniels G, et al.: International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Berlin report. *Vox Sang* 2011; 101:77-82
- Storry JR, Joud M, Christophersen MK, et al.: Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype. *Nat Genet* 2013; 45:537-541
- Cvejic A, Haer-Wigman L, Stephens JC, et al.: SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. *Nat Genet* 2013; 45:542-545
- Veldhuisen B, van der Schoot CE, de Haas M: Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang* 2009; 97:198-206
- Reid ME: Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 7:171-177
- Hillyer CD, Shaz BH, Winkler AM, et al.: Integrating molecular technologies for red blood cell typing and compatibility testing into blood centers and transfusion services. *Transfus Med Rev* 2008; 22:117-132
- Liu Z, Zeng R, Chen Q, et al.: Genotyping for Kidd, Kell, Duffy, Scianna, and RHCE blood group antigens polymorphisms in Jiangsu Chinese Han. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125:1076-1081

- 10 Moulds JM: Future of molecular testing for red blood cell antigens. *Clin Lab Med* 2010; 30:419–429
- 11 Drago F, Karpasitou K, Poli F: Microarray beads for identifying blood group single nucleotide polymorphisms. *Transfus Med Hemother* 2009; 36:157–160
- 12 Hopp K, Weber K, Bellissimo D, *et al.*: High-throughput red blood cell antigen genotyping using a nanofluidic real-time polymerase chain reaction platform. *Transfusion* 2010; 50:40–46
- 13 Jungbauer C, Hobel CM, Schwartz DW, *et al.*: High-throughput multiplex PCR genotyping for 35 red blood cell antigens in blood donors. *Vox Sang* 2012; 102:234–242
- 14 Finning K, Daniels G: Molecular blood grouping. *Transfus Apher Sci* 2014; 50:146–147
- 15 Shehata N, Denomme GA, Hannach B, *et al.*: Mass-scale high-throughput multiplex polymerase chain reaction for human platelet antigen single-nucleotide polymorphisms screening of apheresis platelet donors. *Transfusion* 2011; 51:2028–2033
- 16 Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, *et al.*: DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang* 2009; 97:147–152
- 17 Sanger F, Coulson AR: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; 94:441–448
- 18 Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A: Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet* 2011; 52:413–435
- 19 Daniels G: *Human Blood Groups*. Oxford, Blackwell Science, 2002

Anexos

Anexo A - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA**

1. NOME: :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1 TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “GENOTIPAGEM DOS GRUPOS SANGUÍNEOS EM DOADORES DE SANGUE ATRAVÉS DE MICRO ARRANJOS LÍQUIDO”

2 DADOS DO INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Investigador Principal: Ester Cerdeira Sabino

Cargo / Função: Chefe de Departamento

Unidade: Fundação Pró Sangue Hemocentro de São Paulo, FPS/HSP, Brasil.

Dados para contato: 3061-5544 ramal 334

3 AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

☒ - RISCO MÍNIMO - RISCO MÉDIO - RISCO BAIXO - RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4 DURAÇÃO DA PESQUISA:

Aproximadamente 48 meses

1– Essas informações estão sendo fornecidas para que você avalie sua participação voluntária neste estudo. Para a realização de uma transfusão de sangue segura é importante fazer a tipagem dos doadores, evitando assim uma reação à transfusão. A Dr(a): Ester Cerdeira Sabino está fazendo uma pesquisa que visa determinar os principais grupos sanguíneos nas bolsas de sangue e a frequência dos mesmos na população de doadores.

2– *Caso você aceite participar, será coletado 5 ml de sangue os quais serão distribuídos em 1 tubo. O tubo se destina a análise fenotípica e para extração de DNA e análise genotípica. O sangue para realização destes exames será retirado da mesma veia em que será feita a doação de sangue, portanto, não será necessário fazer outra punção venosa.*

VOCÊ TAMBÉM RESPONDERÁ UM QUESTIONÁRIO PADRONIZADO SOBRE A SUA SAÚDE, SEU HISTÓRICO DE DOAÇÕES DE SANGUE E SEUS HÁBITOS DE VIDA. DURANTE A APLICAÇÃO DESTES QUESTIONÁRIO, VOCÊ PODERÁ DEIXAR DE RESPONDER QUALQUER PERGUNTA FORMULADA OU DESISTIR DE VEZ DE RESPONDÊ-LO, CASO ASSIM DESEJE. O SANGUE PARA REALIZAÇÃO DESSES EXAMES SERÁ RETIRADO DE UMA VEIA DO SEU ANTEBRAÇO.

O resultado dos exames sorológicos realizados na sua doação serão consultados pelo grupo de pesquisa. No caso de você apresentar algum teste reagente para uma ou mais das doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue cuja realização é obrigatória por lei, automaticamente sua participação na pesquisa será encerrada e os exames de genotipagem não serão realizados.

3- DESCONFORTO E RISCOS ESPERADOS: O DESCONFORTO E O RISCO ESPERADOS COM A SUA PARTICIPAÇÃO SERÃO MÍNIMOS, SENDO OS MESMOS DA COLETA DE SANGUE PARA EXAMES.

4- BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS COM A MINHA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO: Você não terá nenhum benefício direto pela participação no estudo. Trata-se de um estudo experimental que testa a frequência dos antígenos presentes nas hemácias e nas plaquetas de uma população de doadores. Apenas no final do estudo poderemos concluir a presença deste benefício. Os resultados da genotipagem estarão disponíveis no Hemocentro ao final do estudo. Além disso, sua participação contribuirá muito com o aumento do conhecimento sobre a determinação dos antígenos presentes nas hemácias e nas plaquetas.

5- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. O principal investigador é a Dra. Ester Cerdeira Sabino que pode ser encontrado no endereço Av Dr Eneas de Carvalho Aguiar 155, Cerqueira Cesar Telefone(s) 3061-5544 ramal 399, e-mail: sabinoec@gmail.com.

6- É garantido à você a liberdade de retirar este consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu atendimento nesta Instituição.

7- As informações obtidas com o estudo serão analisadas em conjunto com os doadores participantes. Em nenhuma circunstância será divulgada a identificação de qualquer um dos doadores participantes do estudo.

8 – Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Não haverá nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que me foram lidas descrevendo o estudo **“GENOTIPAGEM DOS GRUPOS SANGUÍNEOS EM DOADORES DE SANGUE ATRAVÉS DE MICRO ARRANJOS LÍQUIDO”**.

Ficou claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, se necessário e decorrente da pesquisa. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Eu receberei uma cópia assinada e datada deste termo de consentimento.

Autorizo que a amostra do meu sangue coletada para este estudo seja armazenada e utilizada em outro estudo que venha a ser desenvolvido pelo Hemocentro com a finalidade de aumentar a segurança transfusional, desde que esse estudo tenha sido previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição.

SIM

NÃO

Assinatura do participante

São Paulo, ____ / ____ / ____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

São Paulo, ____ / ____ / ____

Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

APROVAÇÃO

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **29.07.2011**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **233/11**, intitulado: "**Genotipagem dos grupos sanguíneos em doadores de sangue através de micro arranjos líquido.**", apresentado pela **Fundação Pró-Sangue**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Ester Cerdeira Sabino

Pesquisador (a) Executante: Juliana Vieira dos Santos Bianchi

CEP-FMUSP, 29 de julho de 2011.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br