



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL**

---

GENOTIPAGEM DO SISTEMA DUFFY EM PACIENTES COM PATOLOGIAS  
RELACIONADAS A MÚLTIPLAS TRANSFUSÕES DE SANGUE ATENDIDOS PELA  
FUNDAÇÃO HEMOPA - ESTADO DO PARÁ

ANDERSON SALES DE BRITO

**Belém – PA**  
**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL**

---

Anderson Sales de Brito

GENOTIPAGEM DO SISTEMA DUFFY EM PACIENTES COM PATOLOGIAS  
RELACIONADAS A MÚLTIPLAS TRANSFUSÕES DE SANGUE ATENDIDOS PELA  
FUNDAÇÃO HEMOPA - ESTADO DO PARÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em Análises  
Clínicas – Profissionalizante, como requisito  
parcial para obtenção do grau de mestre em  
Análises Clínicas Profissionalizante.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Greice de Lemos  
Cardoso Costa.

**Belém-PA  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- B862g Brito, Anderson Sales de  
GENOTIPAGEM DO SISTEMA DUFFY EM PACIENTES COM PATOLOGIAS  
RELACIONADAS A MÚLTIPLAS TRANSFUSÕES DE SANGUE ATENDIDOS PELA FUNDAÇÃO  
HEMOPA - ESTADO DO PARÁ / Anderson Sales de Brito. — 2018  
66 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas (MACPRO),  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Greice de Lemos Cardoso Costa
1. Duffy Blood-Group System. 2. Genotyping Techniques. 3. FY gene. 4. aloimunização. I.  
Costa, Greice de Lemos Cardoso, *orient.* II. Título
- 

CDD 599.935

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Anderson Sales de Brito**

### **GENOTIPAGEM DO SISTEMA DUFFY EM PACIENTES COM PATOLOGIAS RELACIONADAS A MÚLTIPLAS TRANSFUSÕES DE SANGUE ATENDIDOS PELA FUNDAÇÃO HEMOPA - ESTADO DO PARÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas – Profissionalizante, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas Profissionalizante.

Belém (PA) 23 de Maio de 2018.

**Orientadora:**

---

Profª Drª Greice de Lemos Cardoso Costa.

**Banca Examinadora:**

---

Profª Drª Isabela Guerreiro Diniz (FAMAZ)

---

Profª Drª Rita de Cassia Mousinho Ribeiro (UFPA-ICB)

---

Prof Dr José Ricardo Vieira (UFPA – ICB)

---

Prof. Dr Ney Pereira Carneiro dos Santos (suplente)

## DEDICATÓRIA

Aos pacientes que possuem a difícil jornada de múltiplas transfusões.  
Aos doadores que de forma altruísta realizam suas doações de sangue.  
Aos meus alunos dos cursos de enfermagem e biomedicina no Sul do Pará, razão principal que me motivou em busca de mais qualificação, para melhor servi-los.

## AGRADECIMENTOS

A Deus. O que coube a mim esforcei-me, todavia inúmeras situações estavam alheias ao meu controle e não aconteceram ao acaso. Dou o mérito e agradeço a essa pessoa, invisível, mas perfeitamente real na minha vida. A minha fé é o que me motiva a ser uma pessoa e um profissional melhor.

À minha esposa (agora grávida). Concordou em sair da nossa zona de conforto, mesmo quando isso significou vir para uma “terra estrangeira” e começarmos uma nova vida, longe de familiares e amigos. Se não fosse seu apoio não teria conseguido concluir este ciclo.

À minha família. Sempre me apoiando em decisões difíceis e mesmo com pesar no coração pela minha ausência, me abençoaram. Apesar de não vivenciarem a realidade acadêmica, compreendem do seu jeito a importância deste mestrado na minha vida.

A grande amiga agora mestre, Magda, sempre me ajudando com seus conhecimentos e experiências, mesmo quando solicitada de última hora.

À minha orientadora e amiga Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Greice que topou o desafio juntamente comigo. Através do seu apoio pude fazer o que desejava.

Aos colegas de laboratório Carol e Denys, que foram importantíssimos para as práticas e Aylla nas análises estatísticas.

Ao Laboratório de Genética Médica e Humana da UFPA e Fundação Hemopa pela parceria, principalmente a Dra Said e equipe pela colaboração.

Reconheço que muitas pessoas direta e indiretamente, conscientes ou não, contribuíram para que eu pudesse ter êxito nesta etapa da minha vida. Embora não cite todas, desejo registrar que possuo um sentimento de profunda gratidão e um reconhecimento que “Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”, apesar de muitos desses nunca terem cursado uma faculdade.

Muito obrigado a todos.

“Porque Esdras tinha disposto o coração para **BUSCAR** a Lei do Senhor, e para a **CUMPRIR**, e para **ENSINAR** em Israel os seus estatutos e os seus juízos.”

Esdras 7:10

## SUMÁRIO

LISTA DE QUADRO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 Breve histórico Sistema Duffy .....	17
1.2 Genética do Sistema Duffy .....	18
1.3 Genótipos e Fenótipos raros .....	21
1.4 Antígenos e anticorpos do Sistema Duffy .....	25
1.5 Função biológica do antígeno Duffy .....	28
1.6 Investigação imuno-hematológica em pacientes politransfundidos.....	29
1.7 Desafios na rotina imuno-hematológica de multitransfundidos e uso da genotipagem como ferramenta para resolução de discrepâncias .....	31
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>35</b>
2.1 Objetivo geral .....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
3.1 Local e característica da população de estudo .....	36
3.2 População e tamanho amostral .....	36
3.3 Fenotipagem dos antígenos Duffy .....	37
3.4 Genotipagem dos polimorfismos Duffy (rs12075 e rs2814778) .....	37
3.5 Aspectos éticos.....	41
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
4.1 Fenótipo Duffy.....	42

4.2 Genótipo Duffy.....	43
4.3 Correlações Fenótipo e Genótipo .....	44
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA CEP/UFPA</b>	

## LISTA DE QUADRO

	Página
<b>Quadro 01</b> – Alelos do Sistema Duffy.....	<b>22</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 01</b> – Descrição dos alelos silenciosos (nulos) do Sistema Duffy.....	<b>20</b>
<b>Figura 02</b> – Descrição dos polimorfismos do Sistema Duffy.....	<b>23</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 01</b> - Iniciadores e sondas usados para genotipagem do sistema sanguíneo Duffy por PCR em Tempo Real.....	38
<b>Tabela 02</b> - Oligonucleotídeos usados na PCR convencional para genotipagem do Sistema sanguíneo Duffy (Olsson <i>et al.</i> , 1998).....	39
<b>Tabela 03</b> - Combinações de iniciadores nas <i>PCR</i> para identificar os alelos do Sistema sanguíneo Duffy (Olsson <i>et al.</i> , 1998).....	40
<b>Tabela 04</b> – Frequências fenotípicas para Duffy dos pacientes atendidos pela Fundação Hemopa 2018.....	43
<b>Tabela 05</b> – Resultados da genotipagem dos pacientes sem fenótipo.....	43
<b>Tabela 06</b> - Frequências genotípicas para o sistema Duffy dos pacientes atendidos pela Fundação Hemopa 2018.....	44
<b>Tabela 07</b> – Discrepâncias entre os resultados de genotipagem e fenotipagem.....	45

## ABREVIATURAS

<b>ACKR1</b>	<i>Atypical Chemokine Receptor 1</i>
<b>C-X-C</b>	Classe de quimiocinas
<b>DARC</b>	<i>Duffy Antigen Receptor Chemokines</i>
<b>DHRN</b>	Doença Hemolítica do Recém Nascido
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ou Ácido Desoxirribonucléico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etileno-diaminotetracético ( <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
<b>ES</b>	<i>Erythrocyte silent</i>
<b>GATA-Box</b>	Região promotora do gene Duffy
<b>GPD</b>	Glicoproteína Duffy
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>ISBT</b>	<i>Internacional Society of Blood Transfusion</i>
<b>LISS</b>	<i>Low ionic strenght salt solution</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polymerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
<b>UFPA</b>	Universidade Federal do Pará
<b>wk</b>	<i>Weak</i> (fraco)

## RESUMO

O sistema Duffy é representado pelo símbolo FY, codificado pelo gene *FY*, localizado no cromossomo 1q22-q23, classificado pela ISBT (International Society of Blood Transfusion) como sistema sanguíneo de número 008, composto por seis antígenos: Fya, Fyb, Fy3, Fy4, Fy5 e Fy6. Na rotina, a determinação do perfil de antígenos eritrocitários em pacientes que recebem múltiplas transfusões é importante na prevenção de aloimunização. Todavia, as técnicas convencionais podem apresentar limitações que impossibilitam a determinação precisa destes antígenos, como por exemplo, transfusão recente; e para estes casos, a genotipagem pode ser uma ferramenta auxiliar na tipagem sanguínea. Neste estudo os principais alelos do sistema sanguíneo Duffy *FY\*A*, *FY\*B* e *FY\*B<sup>ES</sup>* e seus polimorfismos (rs12075 e rs2814778) foram genotipados pela técnica PCR em tempo real (Real Time PCR – metodologia TaqMan) e PCR convencional para indivíduos duplamente heterozigotos. Foram estudados cento e dois pacientes, em sua maioria portadores de hemoglobinopatias, que são atendidos pela Fundação Hemopa. Destes, 18,62% (19) são aloimunizados por diferentes antígenos, sendo o anticorpo anti-E o mais frequente (26,31%). Quinze (14,70%) pacientes apresentavam transfusão recente em intervalo inferior a 120 dias, tendo seus genótipos determinados para os alelos do sistema Duffy e seis (5,88%) pacientes não possuíam fenotipagem eritrocitária definida, mas puderam ter seus antígenos presumidos a partir da análise do seu DNA. Dentre as frequências fenotípicas e genotípicas na análise global foi encontrado predominantemente Fy(a-b+) e Fy(a+b-) em 31,4% e *FY\*A/FY\*B* em 25,5% da população, sendo o alelo mais frequente *FY\*A* (39%). Houve resultados discrepantes em 11 pacientes, quando correlacionado fenótipo versus genótipo, todavia não atribuída à técnica de análise de DNA. Ao reconhecer os portadores da variante *FY\*B<sup>ES</sup>* foi possível identificar que 21,68% do total de indivíduos analisados, podem receber sangue antígeno Fy(b+) sem produzirem anticorpos irregulares, o que aumenta a disponibilidade de hemocomponentes para este grupo, uma vez que antígenos negativos são mais raros na rotina de banco de sangue. Dois pacientes apresentaram perfil de resultados compatível com o fenótipo raro Fy<sup>x</sup>. Há inúmeros aspectos importantes relacionados à rotina imuno-hematológica destes pacientes que devem ser considerados pelos profissionais que lidam com este público, quando são associadas as rotinas convencionais e a biologia molecular. Observa-se que a genotipagem de grupos sanguíneos pode superar as limitações dos ensaios de hemaglutinação e beneficiar pacientes em ambientes hospitalares. Superar mas não substituir, pelo menos por enquanto. A genotipagem é frequentemente usada para pacientes que necessitam de transfusão crônica, como aqueles com doença falciforme ou talassemia, uma vez que a terapia transfusional pode se tornar complexa devido às altas taxas de aloimunização. Além disso, ela permite otimizar a transfusão de unidades de sangue com fenótipos menos frequentes na população. Conclui-se que o sistema de grupo sanguíneo Duffy, pelo particular interesse transfusional, focando principalmente o uso da biologia molecular como ferramenta complementar, é importante para a otimização do uso dos hemocomponentes na rotina hemoterápica e agrega maior segurança transfusional.

**Palavras-chave:** Duffy Blood-Group System; Genotyping Techniques; *FY* gene; aloimunização.

## SUMMARY

With the advent of Molecular Biology, many previously established immunohematological concepts could be reviewed and the sequencing of genes that encode blood group systems has led to progress in understanding the molecular mechanisms associated with the diversity of erythrocyte antigens, as observed by, for instance, in the Duffy system. The system is represented by the symbol FY, coded by the *FY* gene, located on the chromosome 1q22-q23, classified by ISBT (International Society of Blood Transfusion) as blood system number 008, composed by six antigens: Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Fy3, Fy4, Fy5 and Fy6. In the routine, the determination of the erythrocyte antigen profile in patients receiving multiple transfusions is important in the prevention of alloimmunization, however, through conventional techniques, there may be a number of limitations that make it impossible to accurately determine these antigens, such as, recent transfusion; for these cases, genotyping has been presented as an auxiliary tool in blood typing. In this study the main alleles of the Duffy blood system *FY\*A*, *FY\*B* and *FY\*B<sup>ES</sup>* and their polymorphisms (rs12075 and rs2814778) were genotyped in real time by PCR technique (TaqMan methodology) and conventional PCR for doubly heterozygotes individuals. One hundred and two patients, mostly hemoglobinopathies, which are served by the Hemopa Foundation were studied. From them, 18.62% (19) are alloimmunized by different antigens, with the anti-E antibody being the most frequent (26.31%). Fifteen (14.70%) patients had a recent transfusion in less than 120 days, having their genotypes determined by the Duffy system alleles and six (5.88%) patients did not have erythrocyte phenotyping defined, but they could have their antigens presumed from their DNA analysis. Among the phenotypic and genotypic frequencies in the global analysis it was found predominantly Fy(a-b+) and Fy(a+b-) in 31.4% and *FY\*A/FY\*B* in 25.5% of the population, with the *FY\*A* allele being the most frequent (39%). There were discrepant results in 11 patients, when correlated phenotype versus genotype, however not attributed to the technique of DNA analysis. There are innumerable important aspects related to the immunohematological routine of these patients that should be considered and learned by the professionals who deal with this public when associated with conventional routines and molecular biology which are discussed throughout the work. Through the research, it is noted that blood group genotyping can overcome the limitations of hemagglutination tests and benefit patients in hospital settings. Overcome but not replace, at least for now. Genotyping is often used for patients requiring chronic transfusion, such as those with sickle cell disease or thalassemia, since transfusion therapy may become complex due to high rates of alloimmunization. Moreover, it allows the best use of blood units with less frequent phenotypes in the population. In this research, we will approach the Duffy blood group system for the particular transfusion interest, focusing mainly on the use of molecular biology as a complementary tool in the hemotherapy routine.

**Keywords:** Duffy Blood-Group System; Genotyping Techniques; *FY* gene; alloimmunization.



## 1. INTRODUÇÃO

Com a descoberta dos grupos sanguíneos por um pesquisador austríaco chamado Landsteiner (1900), nascia à era moderna, dita científica, da transfusão de sangue. Passava-se a entender porque muitas transfusões provocavam reações graves, levando muitas vezes o paciente à morte. Nasceram os conceitos de compatibilidade sanguínea e a noção de que era imperativo respeitá-la para que o sangue transfundido não fosse imediatamente destruído. Isto representou uma verdadeira revolução científica na medida em que tornou possível que as transfusões pudessem ser feitas sem riscos para a vida dos receptores.

Com o advento da Biologia Molecular, muitos conceitos estabelecidos anteriormente puderam ser revistos e o sequenciamento dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos levou a um progresso no entendimento dos mecanismos moleculares associados à diversidade dos antígenos eritrocitários, como o observado, por exemplo, no sistema Duffy.

Na hemoterapia, a necessidade de haver compatibilidade para os sistemas ABO e Rh na transfusão sanguínea é tradicionalmente conhecida. Com o entendimento da genética eritrocitária, seus antígenos e anticorpos correspondentes, esse conceito tem-se estendido para outros sistemas eritrocitários como Kell, Kidd, Duffy e MNS (Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2017; Portaria 158 – MS, 2016; Portaria de consolidação nº5 – MS, 2017). No Brasil, esta tendência se faz sentir pelo enorme crescimento técnico dos profissionais e serviços de hemoterapia, bem como pelo surgimento de legislações específicas que regem os bancos de sangue, o que representou um grande avanço para o país.

O sistema de grupo sanguíneo Duffy foi descoberto em 1950, quando Cutbush *et al.* descreveram um anticorpo no soro sanguíneo de um homem hemofílico (Sr. Duffy), que havia recebido várias transfusões de sangue (Cutbush *et al.*, 1950; Cutbush & Mollison, 1950). Esse anticorpo recebeu a designação anti-Fy<sup>a</sup> e o antígeno eritrocitário por ele reconhecido passou a ser designado Fy<sup>a</sup>. Um ano depois dessa descoberta, Ikin *et al.* (1951) relataram a existência de outro anticorpo, encontrado casualmente no soro sanguíneo de uma mulher múltipara que não havia recebido transfusões e cujos filhos não tinham manifestado doença hemolítica do recém nascido (Nathalang *et al.*, 2015). As amostras de



sangue de indivíduos caucasóides que foram examinados com o anticorpo encontrado no soro dessa mulher e, principalmente, com outro anticorpo similar descoberto posteriormente indicaram que ele era antitético em relação ao anti- Fy<sup>a</sup>, passando a ser denominado Fy<sup>b</sup> (Jens *et al.*,2005; Nathalang *et al.*, 2015).

### 1.1 Breve Histórico Sistema Duffy

Em 1908 Carlo Moreschi documenta a reação da antiglobulina humana, mas somente em 1945 Coombs, Mourant e Race descreveram sua aplicação na identificação de anticorpos incompletos. A partir de então vários anticorpos antieritrocitários puderam ser descobertos. A seguir algumas datas importantes e seus respectivos acontecimentos relacionados ao sistema Duffy, sendo posteriormente descritos com mais detalhes ao longo do trabalho.

**1950** – Cutbush *et al.* – Descoberta do anti-Fy<sup>a</sup> em paciente Hemofílico que originou o nome do sistema.

**1951** – Ikin *et al.* - Descoberto anti-Fy<sup>b</sup>.

**1955** – Sanger *et al.* – Observaram que o fenótipo Fy(a-b-) era comum em negros e raros em caucasianos e sua relação com um gene nulo denominado *FY*.

**1965** – Chown *et al.*, Lewis *et al.* – Descrito o Fy<sup>x</sup> como expressão fraca do antígeno b e que se tratava de um novo alelo no locus Duffy.

**1971** - Albrey *et al.*, Behzad *et al.*, Colledge *et al.*– Descrito antígeno Fy3 a partir do anti-Fy3.

**1973** – Albrey *et al.*, Behzad *et al.*, Colledge *et al.*– Descrito antígeno Fy4 e Fy5.

**1975** – Miller *et al.* – Demonstraram a resistência dos eritrócitos Fy(a-b-) à invasão de merozoítas de *P. Knowlesi*.

**1987** – Nichols *et al.* – Descrito antígeno Fy6 a partir de um anticorpo monoclonal murino.

**1989** – Barnwell *et al.*, Chaudhuri *et al.* – Demonstrado resistência dos eritrócitos Fy(a-b-) à invasão de merozoítas de *P. vivax* e purificação da proteína Duffy.

**1993** – Chaudhuri *et al.* – Clonagem do cDNA da glicoproteína.

**1995** – Iwamoto *et al.* – Decoberta que o gene *FY* é constituído de dois exons.



## 1.2 Genética do Sistema Duffy

O loco dos genes do sistema Duffy foi o primeiro dos sistemas sanguíneos a ter sua localização determinada corretamente no cromossomo número 1 (Donahue *et al.*, 1968), foi o primeiro locus na espécie humana a ser designado para um autossomo específico. Os antígenos são herdados por alelos co-dominantes mendelianos.

O sistema é representado pelo símbolo FY, codificado pelo gene *FY* inicialmente atribuído a localização 1q21q22 (Raemaekers *et al.*, 1998), há publicações que atribuíram a localização 1q21q25 e atualmente sabemos que sua localização mais precisa, é no cromossomo 1q22-q23, classificado pela ISBT (*International Society of Blood Transfusion*) como sistema sanguíneo de número 008, composto por seis antígenos: Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Fy3, Fy4, Fy5 e Fy6. O gene *FY* possui dois éxons e um íntron, e codifica uma proteína multipasso, com 336/338 aminoácidos, que atravessa a membrana eritrocitária sete vezes (Girello, 2002; Lopez *et al.*, 2015; Nathalang *et al.*, 2015; Raeymaekers *et al.*, 1988, Salzano *et al.*, 1998).

Estudos moleculares do sistema demonstraram que para o gene *FY* há três alelos principais: *FY\*A*, *FY\*B* e *FY\*B<sup>ES</sup>*. O polimorfismo entre os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> é causado por uma simples substituição de base no nucleotídeo 125 (125G>A), resultando em substituição do aminoácido na posição 42 (Gly→Asp) respectivamente. Esta única substituição é suficiente para determinar os dois principais antígenos do sistema (Castilho *et al.*, 2000; Castilho, 2007; Jeans *et al.*, 2005).

Uma importante constatação, porém de difícil interpretação sobre o sistema Duffy, foi realizada em 1955 onde Sanger *et al.* relataram que a maior parte dos negros testados eram Fy(a-b-), um fenótipo não encontrado em brancos. O gene responsável por essa condição nula foi denominado *FY*. Embora *FY/FY* parecesse ser um genótipo comum em negros – especialmente na África – o gene era excessivamente raro em brancos. Em 1975, Miller *et al.* propuseram a explicação para esta observação, hoje bastante aceita e difundida. Os eritrócitos Fy(a-b-) são resistentes à infecção da malária por *plasmodium knowlesi* e, como se sabe atualmente, pelo *P. vivax* – um exemplo das forças de seleção natural em seres humanos.

O fenótipo negativo resultante de alelos nulos possui diferentes causas. O fenótipo Fy(a-b-) em africanos é o resultado de um alelo silencioso, associado a uma mutação pontual



(-33T>C) em GATA-Box (região promotora do gene  $FY^*B$ ), impedindo a transcrição do gene  $FY^*B$  nos eritrócitos, mas não em outros tecidos. Curiosamente, nesses casos, o gene  $FY^*B$  descrito por alguns autores como  $FY^{*ES}$  ou  $FY^*B^{ES}$  (ES, do inglês “erythrocyte silent”) se expressa normalmente em outras células, de modo que um indivíduo homocigoto  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$  apresentará antígeno  $Fy^b$  nas células endoteliais dos dutos renais e alvéolos pulmonares e nas células de Purkinje do cerebelo e demais (Nathalang *et al.*, 2015). Dois terços da população Africana com fenótipo  $Fy(a-b-)$  possuem o gene  $FY^*B$  com uma mutação do promotor eritróide (GATA-1) que leva à ausência de expressão da proteína Duffy e, consequentemente, do antígeno  $Fy^b$  na superfície das hemácias. Embora este tipo de mutação seja predominante em pessoas de descendência africana, há registros na literatura de indivíduos brasileiros com ancestrais caucasianos que apresentaram alta frequência para mutação -33T>C (Castilho *et al.*, 2004). Em ambos, o fenótipo negativo nas hemácias é resultado de uma interrupção no fator de transcrição eritróide GATA-1. Tais estudos evidenciaram que o gene  $FY$  é idêntico ao gene  $FY^*B$ , entretanto, quando ocorre uma substituição nucleotídica no promotor do gene, essa mutação faz com que o gene  $FY^*B$  não se expresse na superfície dos eritrócitos, ou seja, ele passa a ser  $FY$  (Tournamille *et al.*, 1995).

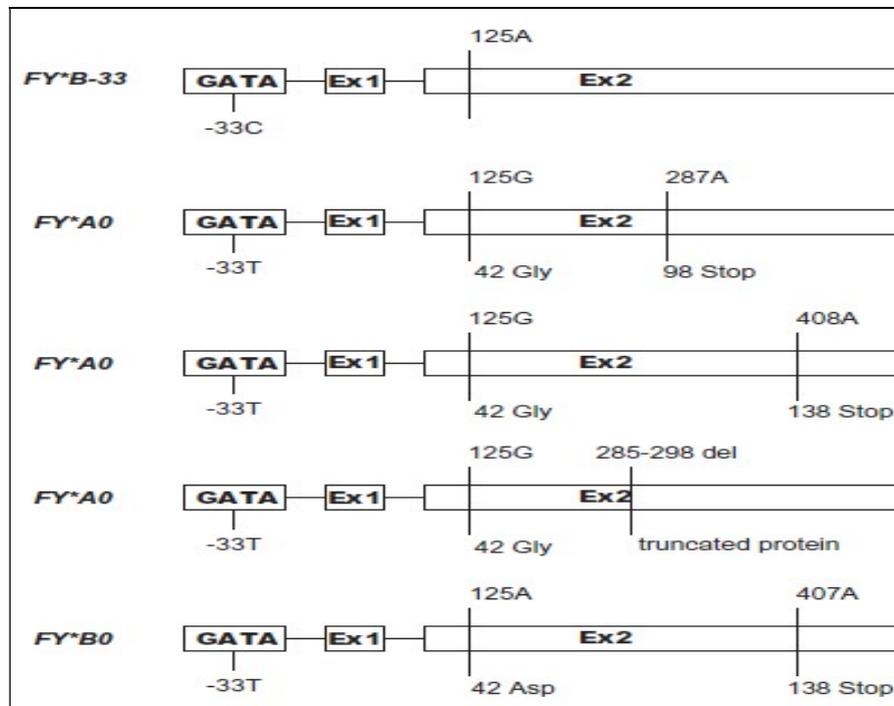
O fato de destaque observado na mutação pontual -33T>C na região promotora do gene  $FY^*B$ , o GATA-Box é que em virtude da ausência de expressão do antígeno  $Fy^b$  apenas no eritrócito, não alterando a expressão dessa proteína em outros tecidos, possibilita consequentemente, que esses indivíduos possam receber hemocomponentes de doadores que possuem o antígeno  $Fy^b$  sem risco de produzirem alo-anticorpo anti- $Fy^b$ .

Embora seja raro, há descrito na literatura mutações na região GATA-box para o alelo  $FY^*A$  resultando no alelo  $FY^*A^{nulo}$ . Ao que parece, o mecanismo que leva à ausência da expressão do antígeno é semelhante ao encontrado na mutação para  $FY^*B^{ES}$ . Fenótipo  $Fy(a-b-)$  devido a Gata-box (-33T>C) no  $FY^*A$  foi encontrado em indivíduos de Papua Nova Guiné e em pacientes com malária na região amazônica, ambas áreas endêmicas do *P. vivax* (Zimmerman *et al.*, 1999; Langhi *et al.*, 2004).

Em caucasianos o fenótipo  $Fy(a-b-)$  resulta de alelos silenciosos  $FY^*A0$  e  $FY^*B0$  gerados por quatro mecanismos moleculares diferentes, associados a um stop códon



causado por mutação de um único nucleotídeo ou por deleção no éxon 2 conforme demonstrado na figura 01 (Castilho, 2007).



**Figura 01** – Descrição dos alelos silenciosos (nulos) do Sistema Duffy.

**Fonte:** Castilho, 2007.

Há descrito outro alelo denominado *FY\*X*, este por sua vez é co-dominante para *FY\*A* e recessivo para *FY\*B*, que pode implicar em baixa expressão do antígeno  $Fy^b$  nos eritrócitos. Alguns autores atribuem o fenótipo  $Fy(a-b-)$  a este alelo, todavia é necessário compreender que *FY\*X* não produz um antígeno diferente dos outros do sistema Duffy, mas as hemácias reagem mais fracamente com soros anti- $Fy^b$ , podendo ser detectado por métodos de adsorção e eluição. Ou seja, o fenótipo negativo atribuído a estes indivíduos, deve-se a limitações técnicas dos ensaios de aglutinação rotineiramente usados.

A presença de genótipo/fenótipo nulo que pode resultar na ausência da expressão do antígeno Duffy nas células vermelhas, não implica necessariamente numa condição patológica para o indivíduo. Eritrócitos antígeno negativo mantêm suas atividades metabólicas e fisiológicas normalmente. Como será mencionado adiante, há diversos estudos que abordam a função da glicoproteína no organismo, todavia a sua ausência não caracteriza-se como doença.



O estudo molecular do sistema Duffy permite distinguir dentre os indivíduos Fy(a+b-) aqueles que são  $FY^*A/FY^*A$  e os que são  $FY^*A/FY$  do mesmo modo que permite distinguir as pessoas com genótipo  $FY^*B/FY^*B$  daquelas com genótipo  $FY^*B/FY$  dentre os indivíduos Fy(a-b+), porque os heterozigotos da mutação no promotor são também heterozigotos do gene  $FY$ . Por sua vez, os homozigotos  $FY/FY$ , isto é, os indivíduos com fenótipo Fy(a-b-), são homozigotos da substituição nucleotídica do promotor que impede a presença do antígeno Fy<sup>b</sup> nas hemácias (Sousa *et al.*, 2007).

É importante mencionar a falta de padronização na nomenclatura para referir-se ao gene – alelo – genótipo – fenótipo do sistema Duffy entre as diferentes áreas do conhecimento que fazem publicações sobre o assunto, dificultando muitas vezes a interpretação. Para facilitar o entendimento elaborou-se o quadro 01, destacando a forma adotada para este trabalho afim que padronizar o restante do texto.

### 1.3 Genótipos e Fenótipos raros

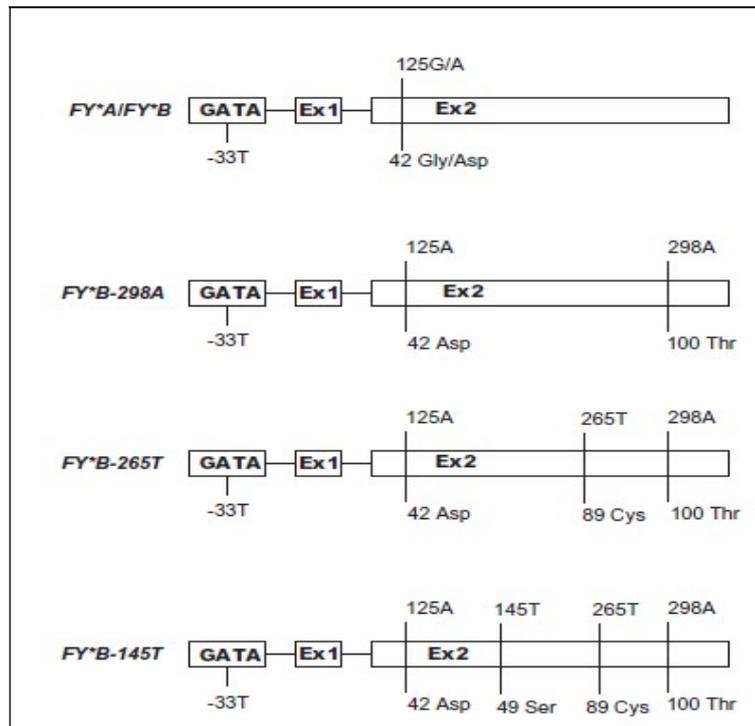
O sistema Duffy não está restrito aos alelos  $FY^*A$ ,  $FY^*B$  e  $FY$ , havendo outros mais raros (Costa *et al.*, 2016; Nathalang *et al.*, 2015). De fato, Chown *et al.* (1965) e Lewis *et al.* (1972) já haviam constatado a ocorrência de raros indivíduos cujas hemácias aglutinavam na presença de alguns anti-soros anti-Fy<sup>b</sup>, mais potentes, e davam resposta negativa na presença de outros. Inicialmente, esse fenótipo foi descrito pela notação Fy(b±). Mais tarde, porém, alguns autores passaram a representá-lo por Fy(b<sup>wk</sup>) ou Fy(b<sup>wk</sup>), para indicar que o antígeno reconhecido é fraco (wk, do inglês, *weak* = fraco), enquanto outros preferem a notação Fy<sup>x</sup>. Sua presença foi atribuída a um quarto alelo, simbolizado por  $FY^*X$ , que, atualmente, sabe-se que é uma mutação do gene  $FY^*B$  (Olsson *et al.*, 1998). Em consequência da baixa expressão dos antígenos, aproximadamente um décimo dos antígenos presentes em eritrócitos Fy<sup>b</sup> normal, há necessidade de anti-soros especiais para reconhecimento do antígeno determinado pelo gene  $FY^*X$ , os indivíduos que o apresentam são, geralmente, erroneamente classificados fenotipicamente como Fy(b-) (Castilho *et al.*, 2004; Castilho, 2007 ).


**Quadro 01 – Alelos do Sistema Duffy.**

	Sinônimos	Base molecular	Fenótipo eritrocitário
<b>Alelos normais</b>			
<i>FY*A</i>	-	125G - 42 (Gly)	Fy(a+)
<i>FY*B</i>	-	125A - 42 (Asp)	Fy(b+)
<b>Alelos silenciosos</b>			
<i>FY*A<sup>ES</sup></i>	<i>FY*AO, FY*A<sup>nulo</sup></i>	Gata-box (-33T>C)	Fy(a-)
<i>FY*B<sup>ES</sup></i>	<i>FY, FY*BO, FY*B<sup>nulo</sup>, FY*<sup>ES</sup>, FY<sup>ES</sup>, FY*B<sup>ES</sup></i>	Gata-box (-33T>C)	Fy(b-)
<i>FY*AO-287<sup>a</sup></i>	-	G>A	Fy(a-)
<i>FY*AO-408<sup>a</sup></i>	-	G>A	Fy(a-)
<i>FY*AO-285-298del</i>	-		Fy(a-)
<i>FY*BO-407<sup>a</sup></i>	-	G>A	Fy(b-)
<b>Alelos relacionados à baixa expressão de antígeno</b>			
<i>FY*B-298<sup>a</sup></i>	-	G>A - 100 (Alanina→Treonina)	Isoladamente não afeta a expressão do antígeno na hemácia.
<i>FY*B-265T</i>	<i>FY*X, FY*B<sup>fraco</sup></i>	C>T - 89 (Arginina →Cisteína)	Fy(b <sup>fraco</sup> ) ou Fy(b <sup>wk</sup> )
<i>FY*B-145T</i>	-	G>T - 49 (Alanina →Serina)	-

**Fontes:** Girello, 2002; Lopez *et al.*, 2015; Nathalang *et al.*, 2015; Raeymaekers *et al.*, 1988, Salzano *et al.*, 1998; Castilho *et al.*, 2000; Castilho *et al.*, 2004; Castilho, 2007; Jeans *et al.*, 2005; Tournamille *et al.*, 1995; Zimmerman *et al.*, 1999; Langhi *et al.*, 2004; Olsson *et al.*, 1998; Mollinson *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1997, 2000.

Em estudos genéticos distintos realizados por Castilho, Tournamille *et al.*, Olsson *et al.* em indivíduos que apresentavam fenótipos Fy(a+b<sup>fraco</sup>) e Fy(a-b<sup>fraco</sup>), observou-se que a baixa expressão do antígeno estava relacionada ao polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP – *single nucleotide polymorphism*). Foi descrito pelo menos três mutações que podem influenciar para a baixa expressão do antígeno Fy<sup>b</sup>: *FY\*B-298A*, *FY\*B-265T (FY\*X)* e *FY\*B-145T*. Tais alterações levam a substituição nos aminoácidos arginina por cisteína na posição 89, alanina por treonina na posição 100 e alanina por serina na posição 49, respectivamente. Apenas a mutação *FY\*B-298A* foi identificada isoladamente, diferente da alteração *FY\*B-145T* que coexiste com *FY\*B-298A* e *FY\*B-265T*, conforme demonstrado na figura 02.



**Figura 02** – Descrição dos polimorfismos do Sistema Duffy.

**Fonte:** Castilho, 2007.

Outros polimorfismos relacionados a fenótipos negativos, foram observados por Rios *et al.* (1999, 2000) ao analisar indivíduos causasóides que apresentavam aloanticorpos de especificidade anti-Fy3 e genótipo discrepante para fenótipo encontrado. Os indivíduos analisados não apresentavam a mutações 265C>T, 298G>A e -33T>C. O indivíduo com genotipagem *FY\*A/FY\*A* apresentou mutação pontual 287G>A (stop códon), com genotipagem *FY\*B/FY\*B* apresentou mutação 407G>A provocando stop códon no aminoácido de posição 136 e o terceiro com genótipo *FY\*A/FY\*A* mostrou uma mutação 408G>A, ambas substituições relacionadas à sequência de nucleotídeos do éxon 2 do *FY* (Jens *et al.*, 2005, Mollinson *et al.*, 1995).

Embora os mecanismos moleculares não tenham sido determinados, há relatos de pessoas na Tailândia, Indonésia, sudeste asiático e Oceania que apresentaram baixa expressão do antígeno Fy<sup>a</sup>, o intrigante é que os indivíduos fenotipados como Fy(a<sup>fraco</sup>b-) apresentavam genótipo *FY\*A/FY\*A* e os Fy(a-b-) apresentaram genótipo *FY\*A/FY\*A* ou *FY\*A/FY\*B*. Há inferências que em regiões endêmicas de malária fora da África, há mecanismos de defesa para infecção pelo *P. vivax* diferentes dos encontrados em indivíduos



de descendência africana, faz-se necessário estudos mais abrangentes a respeito (Shimizu *et al.*, 1997, 2000).

Mais raro, ainda, é o antígeno Fy3, descrito pela primeira vez por Albrey *et al.* (1971), ao detectarem um anticorpo (anti-Fy3) no soro sanguíneo de uma mulher australiana Fy(a-b-) caucasóide, múltipara que recebera transfusão de sangue. Os estudos moleculares explicaram a presença desse antígeno como sendo o resultado de uma mutação do gene *FY\*B*, produzindo o alelo *FY\*3*. O anticorpo anti-Fy3 não aglutina as hemácias Fy(a-b-), mas aglutina as hemácias com antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup> e Fy<sup>x</sup> isto é, as hemácias Fy (a+b-), Fy (a-b+), Fy (a+b+) e Fy(a-b<sup>wk</sup>), mesmo quando elas são tratadas com papaína (o que não acontece com os anti-soros anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup>, que não aglutinam hemácias papainizadas) (Harmening *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2017).

Outro antígeno raro, também resultante de mutação do gene *FY\*B*, produzindo o alelo *FY\*4*, é o antígeno Fy4, descrito pela primeira vez por Behzad *et al.* (1973), ao detectarem um anticorpo em uma menina negróide Fy(a+b+) com anemia falciforme que recebera uma série de transfusões sanguíneas. Esse anticorpo é capaz de aglutinar as hemácias de todos os indivíduos Fy(a-b-) e da maioria dos indivíduos com fenótipo Fy(a+b-) ou Fy(a-b+). Do mesmo modo que o anticorpo anti-Fy<sup>3</sup>, o anticorpo anti-Fy<sup>4</sup> é capaz de aglutinar hemácias papainizadas (Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2017; Jens *et al.*, 2005; Girello, 2002; Harmening *et al.*, 1992)

No sistema Duffy reconheceu-se, ainda, outro antígeno raro, o Fy5, por intermédio de um anticorpo descrito pela primeira vez por Colledge *et al.* (1973) como anti-Fy5, no soro de um menino leucêmico negróide, que recebera várias transfusões de sangue e concentrados de plaquetas, e cujas hemácias foram classificadas como Fy(a-b-3-) por terem dado reação negativa com anti-Fy<sup>a</sup>, anti-Fy<sup>b</sup> e anti-Fy3. O anticorpo anti-Fy5 aglutina as hemácias com antígeno Fy<sup>a</sup> e(ou) Fy<sup>b</sup>, mesmo papainizadas, e se distingue do anti-Fy4 porque não aglutina as hemácias Fy(a-b-) dos indivíduos que não possuem antígeno Fy3. Esse antígeno não é encontrado em hemácias Fy(a-b-) nem naquelas com o fenótipo Rh<sub>null</sub>, isto é, em hemácias que não reagem com nenhum anti-soro do sistema Rh. O anticorpo anti-Fy5 distingue-se, também do anti-Fy3 porque este último aglutina fortemente hemácias Rh<sub>null</sub>, enquanto o anti-Fy5 não é capaz de aglutiná-las. Acredita-se que o antígeno Fy5



resulta de uma interação entre produtos gênicos dos sistemas Duffy e Rh, ambos resultantes de locos presentes no cromossomo número 1 (Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2017; Jens *et al.*, 2005; Girello, 2002; Harmening *et al.*, 1992).

Por meio do uso de um anticorpo monoclonal murino em 1987 foi possível identificar o antígeno Fy<sup>6</sup>. Há pouca descrição na literatura a seu respeito e como todos os demais, foi descoberto a partir da identificação inicial do seu anticorpo correspondente anti-Fy<sup>6</sup>. Sabe-se que o antígeno está presente em todas as células Duffy positivo, mas ausente em células antígenos negativos (Fy (a- b-)). O anticorpo é resistente ao tratamento por enzima tripsina, DTT e sialidase e sensível ao tratamento com papaína, quimiotripsina e pronase (Jens *et al.*, 2005)

#### 1.4 Antígenos e anticorpos do sistema Duffy

Os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> são moderadamente imunogênicos, os anticorpos anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup> são considerados irregulares (não é de ocorrência natural), possuem importância clínica podendo causar reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias bem como podem levar à doença hemolítica do recém-nascido (DHRN). São predominantemente de classe IgG (comumente IgG1), reagem melhor na fase de antiglobulina anti-humana e podem fixar complemento acima do estágio C3 (Molisson *et al.*, 1997). Há poucos exemplos de alumininas salinas IgM, em estudos realizados evidenciaram que os anticorpos em sua grande maioria eram IgG1, 18% eram IgG2 e 25% IgM (Szymanski *et al.*, 1982). O anti-Fy<sup>a</sup> é mais frequentemente produzido a partir de sensibilização por transfusão sanguínea que por gestação, o anti-Fy<sup>b</sup> é cerca de vinte vezes menos comum que o anti-Fy<sup>a</sup> e geralmente é encontrado em associação com outros anticorpos.

Anticorpos anti-Fy<sup>a</sup> e/ou anti-Fy<sup>b</sup> se presentes no plasma materno, podem causar doença hemolítica do recém-nascido se o mesmo for antígeno positivo. Embora pouco frequente e com baixa morbidade, há relatos na literatura em que foram necessárias transfusões intra-útero e ex-sanguíneo transfusão (Castilho *et al.*, 2004; Castilho *et al.*, 2007; Girello, 2002; King *et al.* 2011).

Outros anticorpos do sistema como anti-Fy<sup>3</sup>, anti-Fy<sup>4</sup> e anti-Fy<sup>5</sup> são anticorpos raros na rotina de banco de sangue, também são imunes, IgG, reativos à globulina anti-



humana e reagem com eritrócitos pré-tratados com enzimas, algumas vezes com atividade aumentada, seus padrões de reatividade podem não ser facilmente identificados nos painéis padronizados de anticorpos. Embora nem todos tenham sido tão implicados, eles apresentam potencial para causar reações transfusionais e doença hemolítica do recém-nascido. O anti-Fy3 pode causar reação transfusional hemolítica imediata e tardia e o anti-Fy5 pode causar reação transfusional hemolítica tardia (Castilho *et al.*, 2004; Castilho *et al.*, 2002; Castilho *et al.*, 2007; Girello, 2002; King *et al.* 2011).

Anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup> não podem ser detectados empregando-se células pré-tratadas com enzimas. Esta característica pode ser um valioso instrumento na solução de problemas, quando é necessário identificar outras especificidades de anticorpo em um soro contendo anti-Fy<sup>a</sup> ou anti-Fy<sup>b</sup>. Estes anticorpos podem, ou não, apresentar efeito de dose. Esta discrepância ocorre porque é difícil determinar quais células de teste são originárias de indivíduos heterozigotos. O doador de uma hemácia Fy(a+b-) poderia ser, genotipicamente FY\*A/FY\*A ou FY\*A/FY. A variação do efeito de dose é mais facilmente observada com amostras aglutinantes salinas de anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup> que aquelas reativas para a globulina anti-humana. O efeito de dose é também mais facilmente demonstrado com técnicas mais sensíveis, com o teste de anti-globulina ligado à enzima, imunoferritina radioativa e métodos de auto-analisador (Harmening *et al.*, 1992).

Os antígenos do sistema Duffy estão presentes nos eritrócitos fetais entre 6 e 7 semanas de gestação, estando bem expressos ao nascimento. Woolley *et al.* descreveram que os reticulócitos apresentam uma quantidade maior de antígenos Duffy que os eritrócitos maduros. Esses antígenos são proteínas (glicoproteína) da membrana eritrocitária e se compõem de diferentes sub-unidades, sendo a principal delas a glicoforina D, conhecida pela sigla GPD (Hadley *et al.*, 1984; Hadley & Peiper, 1997). A partir de estudos que estabeleceram a relação entre os antígenos do sistema Duffy e receptores de quimioquinas, a GPD (Glicoproteína Duffy) passou a ser denominada DARC (Duffy Antigen Receptor Chemokines) e por último recebeu a designação de ACKR1 (atypical chemokine receptor 1) (Jens *et al.*, 2005; Mcmanus *et al.*, 2017).

Hadley *et al.* (1984) identificaram a proteína como uma faixa estreita, com um peso molecular ao redor de 40.000 dáltons, que apresenta uma extremidade difusa que se



estende até 66.000 dáltons. A quimiotripsina e a pronase destroem a glicoproteína com atividade Duffy. A neuramidase e algumas glicosidades reduzem seu peso molecular.

Muitas enzimas desnaturam Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, de modo que os antígenos não possam mais reagir com seus anticorpos. Estas incluem as enzimas comuns de banco de sangue (ficina, papaína, bromelina) e algumas menos comuns (quimiotripsina, pronase, proteinase K e a protease neutra do *Bacillus subtilis*). Embora a neuraminidase reduza o peso molecular da proteína onde reside Fy<sup>a</sup>, ela não afeta a reatividade antigênica, nem a tripsina purificada (Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2017; Jens *et al.*, 2005; Girello, 2002; Harmening *et al.*, 1992)

Os antígenos Duffy não são bem armazenados, mesmo no estado congelado. Alguma perda de Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> foi relatada em eritrócitos estocados em solução salina por 2 semanas e em meios com pH baixo e baixa força iônica. Estas alterações não são observadas em eritrócitos estocados em anticoagulantes licenciados ou em soluções reagentes utilizadas por fabricantes comerciais (Harmening, 1992).

A glicoproteína Duffy pode ser encontrada em outros tecidos e células além dos eritrócitos como o rim, baço, timo, coração, pulmão, músculo, duodeno, pâncreas, placenta, cérebro, intestino, glândula tireoide e em células de Purkinje do cerebelo, não sendo expressos em linfócitos, monócitos e plaquetas (Castilho *et al.*, 2004; Castilho, 2007; Girello, 2002; Jeans *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2017).

A partir do uso de anti-soros anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup> é possível determinar a presença de dois antígenos do sistema. Em algumas populações são observados pelo menos um deles, enquanto em outras é possível observar o fenótipo negativo para ambos. Estudos de Race e Sanger (1975) e Mourant *et al.* (1976) observaram que em caucasóides, esquimós, indígenas sul-americanos e em algumas populações da Índia e do Paquistão encontram-se grupos fenotípicos Fy(a+b-), Fy(a+b+) e Fy(a-b+), enquanto que nas populações negróides predominam os indivíduos Fy(a-b-), sendo algumas delas compostas exclusivamente por pessoas com esse fenótipo duplamente negativo. Altas frequências de Fy(a-b-), embora menores quando comparadas as frequências em negróides, foram encontradas nas



populações do Iraque, Irã e Iemen e em judeus de Israel oriundos desses países. Já a grande maioria dos japoneses, coreanos, aborígenes australianos, da Melanésia, e da Nova Guiné apresentam apenas o antígeno Fy<sup>a</sup> em suas hemácias.

Hemácias fenótipo Fy(a+b-) carregam em torno de 13.000 sítios antigênicos, enquanto hemácias Fy(a-b+) em torno de 14.000, eritrócitos Fy (a+b+) possuem a metade do número de sítios Fy<sup>a</sup> que nas hemácias de fenótipo Fy (a+b-) (Castilho, 2007; Jeans *et al.*, 2005; Yazdanbakhsh *et al.*, 2000).

A conduta transfusional a ser adotada quando é identificado o anticorpo irregular do sistema Duffy no paciente ou quando o mesmo, embora apresente títulos de aloanticorpos indetectáveis, tenha histórico progresso de aloimunização, é administrar sangue antígeno-negativo (Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2017; Jens *et al.*, 2005; Girello, 2002; Harmening *et al.*, 1992).

### 1.5 Função Biológica do antígeno Duffy

Nas últimas décadas houve grandes avanços no entendimento, análise estrutural, funcional e biológica dos antígenos de grupos sanguíneos tanto em tecidos eritróides quanto em tecidos não eritróides. Por exemplo, atribui-se aos antígenos eritrocitários Duffy a função biológica de atuar como receptores para merozoítos de *Plasmodium* (*P. knowlesi* e *P. vivax*) sendo que indivíduos Duffy negativo (mais comumente encontrado entre negros) apresentam resistência à invasão do parasito. Apesar de esta ter sido a primeira atribuição dada a glicoproteína, a maioria dos estudos avaliam a relação ausência/presença do antígeno Duffy a resistência/susceptibilidade ao *plasmodium*, mas não explicam de forma detalhada os mecanismos envolvidos. Limitam-se ainda apenas aos antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> do sistema e não exploram a relação para com os demais antígenos que podem estar envolvidos, como por exemplo o antígeno Fy4 que pode estar presente em negros que apresentam fenótipo Fy(a-b-) (Behzad *et al.*, 1973, Harmening *et al.*, 1992). O Fy6 está presente em todas as células Duffy-positivo, mas ausente em células Fy(a-b-), sendo outro epítipo importante nos estudos de estrutura e função do sistema Duffy (Nichols *et al.*, 1987; Jens *et al.*, 2005, Harmening *et al.*, 1992).



Estudos posteriores evidenciaram outra importante função fisiológica atribuída a essa glicoproteína, a atuação como receptora para citocinas (quimicocinas) (Cavasini *et al.*, 2001; Farawela *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012; Mattos, 2005). Há estudos da relação entre a expressão dos antígenos Duffy e processos inflamatórios pós transplante de órgãos, onde observaram aumento da expressão do DARC em pacientes que apresentavam rejeição celular e humoral após o transplante renal e diminuição da função renal após o transplante em indivíduos Fy(a-b-). Há outras atribuições da proteína Duffy descritas na literatura como, a capacidade de eritrócitos transmitirem HIV-1 a células mononucleadas no sangue periférico depois que o vírus se liga as hemácias através do DARC e o envolvimento dos receptores DARC na angiogênese do câncer. Embora não totalmente elucidado, a relação da proteína na ação de quimicocinas C-X-C, como a IL-8, demonstrou contribuir para processo de angiogênese tumoral (Jeans *et al.*, 2005).

Embora a ausência de DARC nos eritrócitos não caracterize um quadro patológico, alguns estudos associaram polimorfismos Duffy com susceptibilidade ou resistência a doenças. Há ainda estudos que associaram sua ausência a menores contagens de neutrófilos (Anste *et al.*, 2009; Anste *et al.*, 2010 Reich *et al.*, 2009).

Existe um crescente interesse de diversos campos da ciência, incluindo além da hemoterapia, genética, imunologia, antropologia entre outras, demonstrando tratar-se se um campo vasto para estudo e que novos estudos se fazem necessário.

### **1.6 Investigação Imuno-hematológica em pacientes politransfundidos**

A terapia transfusional utilizando principalmente concentrado de hemácias para o tratamento de pacientes com hemoglobinopatias ou demais patologias que demandam uso crônico deste hemocomponente, acarreta riscos imunológicos tais como a aloimunização a antígenos eritrocitários (Yazdanbakhsh, 2015). Em torno de 50% destes indivíduos recebem transfusão em algum momento da vida, sendo que em torno de 5% a 10% são submetidos a um esquema de transfusão crônica. Embora seja relativamente comum e bem descrito na literatura, a aloimunização é uma complicação séria que contribui para aumentar a comorbidade da doença. Isso ocorre quando o paciente desenvolve anticorpos direcionados contra os antígenos das hemácias do doador (Pinto *et al.*, 2011). A incidência mundial é



bastante variada, entre 18 e 36%, e essas taxas oscilam significativamente porque a resposta imune do receptor pode variar de acordo a etnia, idade, número de transfusões e o gênero, (Kangiwa *et al.*, 2015). Alves *et al.* (2012), mencionaram que à medida que aumenta o número de transfusões, mais o organismo torna-se sensível a produzir anticorpos. Giblett (1961) estimou que a probabilidade de um paciente produzir um ou mais anticorpos irregulares a cada unidade de sangue transfundido gira em torno de 1%, e uma vez produzidos podem durar por longo tempo na circulação sanguínea, até 5 anos como já observado com anti-Kell (Schonewille *et al.*, 1999 e 2006; Spielmann, 1974; Bauer *et al.*, 2007; Haeltege *et al.*, 1993).

Os testes imuno-hematológicos utilizados na rotina dos bancos de sangue para estes pacientes e doadores de um modo geral, baseiam-se na interação de antígenos eritrocitários com anticorpos que reconhecem os respectivos antígenos. Esta interação pode ser visualizada macroscopicamente sob a forma de aglutinação. A hemoaglutinação é considerada um fenômeno complexo, no qual as hemácias possibilitam a formação de grumos na presença de anticorpos específicos. A fim de facilitar esta interação antígeno anticorpo e aproximar as hemácias, potencializadores de hemoaglutinação podem ser adicionados, favorecendo e encurtando o tempo da reação. As substâncias potencializadoras de reação mais utilizadas na rotina assistencial são enzimas (papaína, bromelina e fiscína), meios de baixa força iônica (*LISS – low ionic strenght salt solution*) e macromoléculas (PEG – polietilenoglicol e dextrano) (Brasil MS, 2013).

Para visualizar a reação há diferentes metodologias disponíveis no mercado, que variam de sistemas manuais a automatizados: técnica em coluna de aglutinação/gel, técnica em tubo e técnica em microplaca. A intensidade de reação é expressa em cruzeiros, podendo variar de 1 a 4 (Brasil MS, 2013).

Todo o arsenal de técnicas e reagentes disponíveis para os testes de rotina na hemoterapia são bem estabelecidos e confiáveis, todavia apresentam uma série de limitações quando utilizados em pacientes aloimunizados e/ou com múltiplas transfusões. A presença constante de células do doador na circulação do receptor torna muitas vezes o resultado sorológico inválido e, na maioria dos casos, incorreto mesmo quando o teste é



executado adequadamente (Martins *et al.*, 2009.; Jens *et al.*, 2005; Girello, 2002; Harmening *et al.*, 1992).

### **1.7 Desafios na rotina imuno-hematológica de multitransfundidos e uso da genotipagem como ferramenta para resolução de discrepâncias**

Em certas ocasiões o manejo de hemocomponentes para transfusão em pacientes politransfundidos aloimunizados pode tornar-se difícil à medida que os anticorpos irregulares limitam a disponibilidade de sangue compatível. Em um levantamento retrospectivo realizado por Cruz *et al.* (2011), aloanticorpos eritrocitários clinicamente significantes se desenvolveram em mais de 30% dos pacientes que recebem múltiplas transfusões, e na prática transfusional não é incomum encontrar pacientes que se enquadram nesse perfil (Helman, 2011). Diante disso, pacientes que estão ou poderão entrar em esquema de transfusão crônica a legislação vigente recomenda a utilização de concentrado de hemácias fenotipadas para os principais sistemas mais imunogênicos dentre eles, o sistema Duffy. De rotina, os doadores não costumam apresentar problemas na determinação de seus fenótipos eritrocitários, todavia para que haja transfusão fenótipo compatível é necessário conhecer também o perfil eritrocitário do receptor. Em situações de discrepâncias no fenótipo do receptor ou quando é necessária realização de prova de compatibilidade ampliada, a legislação não é específica ao determinar a conduta para resolução das discordâncias para o sistema Duffy, sugerindo de modo generalizado que as amostras do paciente devem ser encaminhadas para um serviço de imuno-hematologia eritrocitária de referência para completar a investigação laboratorial. Em situações onde não é possível determinar as características eritrocitárias do receptor e o mesmo não pode aguardar resolução do caso, o paciente poderá ser avaliado clinicamente e quando possível optar por transfusão incompatível (Portaria 158 – MS, 2016; Portaria de consolidação nº5 – artigo 181 – MS, 2017).

Embora a legislação atual não defina nem delimita quais são os pacientes cronicamente transfundidos ou politransfundidos, o conceito no âmbito da hemoterapia tem sido intuitivamente atribuído de maneira restrita apenas a pacientes com hemoglobinopatias, principalmente portadores de anemia falciforme, todavia a “população”



de pacientes politransfundidos tem extrapolado para além desses. Pacientes nefropatas crônicos, com aplasia medular e pacientes oncológicos tem sido um público que tem demandado transfusões de grandes quantidades de hemocomponentes com maior probabilidade para desenvolver aloanticorpos. Por vezes nesses pacientes a investigação imuno-hematológica só é realizada depois que o paciente já está aloimunizado, inviabilizando a determinação do perfil fenotípico eritrocitário completo devido à transfusão recente ou presença de alo e/ou auto-anticorpos que podem interferir nos testes de rotina (Martins *et al.*, 2009.; Jens *et al.*, 2005; Girello, 2002; Harmening *et al.*, 1992; Hoeltge *et al.*, 1995).

Como mencionado, através dos anti-soros comerciais anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup> é possível determinar os fenótipos Fy(a+b-), Fy(a+b+), Fy(a-b+) e Fy(a-b-), todavia anti-soros para identificação de outros antígenos como FY3 e Fy5 são raros e não existem comercialmente (Martins *et al.*, 2009.; Jens *et al.*, 2005; Girello, 2002; Harmening *et al.*, 1992).

Através de alterações genéticas alguns antígenos do sistema podem apresentar baixa expressão eritrocitária. Em um estudo realizado por Tournamille *et al.* (1998), descobriram que uma mutação específica no nucleotídeo 265C>T do alelo FY\*X, provocando uma mudança do aminoácido Arginina por uma Cisteína na posição 89 do gene FY levava a uma baixa expressão do antígeno b na hemácia, o indivíduo apresentava um fenótipo Fy(b<sup>fraco</sup>). Outros autores demonstraram sorologicamente que os antígenos Fy3 e Fy5 também têm suas expressões enfraquecidas em eritrócitos.

Técnicas de adsorção e eluição são utilizadas para determinar a presença do fenótipo Fy(b<sup>fraco</sup>) mas nem sempre essas técnicas são eficazes. Antígenos fracamente expressos na membrana eritrocitária como Fy<sup>x</sup>, dentre outros podem ser seguramente determinados pela genotipagem (Harmening *et al.*, 1992; Parasol *et al.*, 1998; Tournamille *et al.*, 1998; Olsson, 1998).

Em situações em que as hemácias estão revestidas com anticorpos na grande maioria de classe IgG, o que denomina-se de Teste direto da antiglobulina positivo, a genotipagem tem um papel importante na determinação dos antígenos de grupos sanguíneos, pois a maioria dos anti-soros utilizados para a fenotipagem são reativos pelo teste da antiglobulina. A análise molecular nestes casos pode auxiliar na determinação do perfil antigênico do



paciente e possibilitar a seleção de hemocomponente correspondente (Martins *et al.*, 2009; Vichinsky, 2001).

Na rotina imuno-hematológica determinar a fenotipagem em pacientes com transfusão recente nem sempre é possível, sendo necessário aguardar em média 120 dias após a última transfusão para realizar o teste. A transfusão recente, independente da quantidade de hemocomponentes a que o paciente tenha sido submetido, não inviabiliza a análise molecular. Embora haja estudos mostrando que a presença de leucócitos nos produtos de sangue transfundidos não interferem na genotipagem de grupos sanguíneos (Castilho *et al.*, 1998; Cavasini *et al.*, 2007; Girello, 2002; Liu *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2015; Mattos, 2005; Nathalang *et al.*, 2015), os pacientes que se enquadram no perfil de múltiplas transfusões no estado do Pará recebem hemocomponentes leucorreduzidos e fenotipados, obtidos através de coleta em bolsas quádruplas em sistema convencional ou *top and bottom*, ambas com filtros *in line*. Estas bolsas possuem um filtro de leucócitos acoplado que permite a desleucocitação durante o processo de fracionamento do sangue total. Assim, pacientes politransfundidos com transfusão recente podem ser genotipados para determinação do seu perfil antigênico, possibilitando transfusões fenótipo compatível. A determinação do perfil de antígenos eritrocitários em doadores de sangue e pacientes que recebem transfusão sanguínea é importante na prevenção de reações transfusionais e aloimunização (Martins *et al.*, 2009.; Jens *et al.*, 2005; Girello, 2002; Harmening *et al.*, 1992).

Pacientes com anemia hemolítica autoimune também podem apresentar limitações ou discrepâncias na fenotipagem eritrocitária em virtude da presença de auto anticorpos circulantes ou adsorvidos à membrana dos eritrócitos, e para estes casos a análise molecular vem se apresentando como uma ferramenta auxiliar na tipagem sanguínea. Estudos demonstram que a genotipagem também pode ser útil na identificação de anticorpos irregulares, sejam eles alo ou auto-anticorpos (Harmening *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 2005).

Através da genotipagem do sistema Duffy em líquido amniótico é possível a detecção de fetos em risco de desenvolver DHRN. Na Identificação de risco na DHRN os testes de hemaglutinação, incluindo a titulação de anticorpos anti-eritrocitários maternos, dão apenas uma indicação indireta da possibilidade de ocorrência da doença, enquanto a genotipagem pode fornecer informações diretas quanto à presença ou ausência de



determinado antígeno eritrocitário no feto (Martins *et al.*, 2009.; Jens *et al.*, 2005; Girello, 2002; Harmening *et al.*, 1992).

Para todas as situações descritas acima, pacientes politransfundidos sensibilizados, são os que mais demandam esforços e tempo na detecção e identificação de anticorpo de grupo sanguíneo e seleção de hemocomponentes compatíveis. Quando a titulação de anticorpos irregulares diminuem tornando-se indetectáveis pelo testes sorológicos convencionais, os pacientes possuem o risco de receber equivocadamente transfusão de hemácias incompatíveis e desenvolver reações transfusionais tardias, já que os testes de compatibilidade podem apresentar-se normal devido a baixa concentração de anticorpos na amostra (Cruz *et al.*, 2011).



## 2. OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar genotipagem do grupo sanguíneo Duffy em amostras biológicas de pacientes politransfundidos ou com diagnóstico de doenças que necessitam de transfusões recorrentes atendidos no Hemocentro Coordenador no estado do Pará (Fundação Hemopa), aplicando a técnica para uso corrente na prática transfusional quando a fenotipagem eritrocitária for indeterminada pelos métodos sorológicos convencionais, possibilitando com isso transfusão fenótipo compatível e consequentemente evitando reações transfusionais, aloimunizações e uso de hemocomponentes fenótipos raros de forma desnecessária.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar análise molecular do Sistema Duffy para os seguintes genes/alelos:

*FY\*A*, *FY\*B*, *FY\*A<sup>ES</sup>* e *FY\*B<sup>ES</sup>* (-33T>C).

Comparar resultados da genotipagem com os resultados da fenotipagem eritrocitária verificando compatibilidade ou discrepâncias entre fenótipo – genótipo.

Determinar as frequências alélicas/genotípicas do sistema Duffy na população estudada.

Analisar o uso da biologia molecular como ferramenta complementar para soluções de discrepâncias na tipagem convencional do sistema Duffy.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e característica da população de estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Médica da Universidade Federal do Estado do Pará (UFPA) em parceria com a Fundação Hemopa, do tipo transversal, descritivo em pacientes que necessitam de politransusão, independente de sexo, idade, histórico transfusional e presença de alo/auto-anticorpos anti-eritrocitários.

Para este trabalho o que caracterizou um paciente politransfundido ou com potencial à politransfusões, não foi a quantidade de Hemocomponentes que o mesmo tenha recebido ou possa receber, mas, a patologia que pode atribuir ao paciente grande probabilidade de necessitar de transfusões recorrentes independente da quantidade.

#### 3.2 População e tamanho amostral

A amostra populacional estudada foi constituída de 102 pacientes na grande maioria portadores de hemoglobinopatias (SS, SF, SD,  $\beta$ -Talassemia), politransfundidos, atendidos pela Fundação Hemopa no estado do Pará, destes dois pacientes atendidos pelo ambulatório da instituição participaram do estudo sendo um portador de Policitemia Vera outro da Doença de Gaucher tipo 1. Dos participantes 47 eram do sexo masculino e 55 do sexo feminino, com intervalo de idade entre 05 e 65 anos (media de idade 22,82, moda 16, mediana 20). Destes, 97 possuíam fenotipagem eritrocitária e exames imuno-hematológicos previamente realizados.

Foram obtidos de cada indivíduo, amostras de sangue total periférico, colhidas em tubos com EDTA (Ácido Etileno-diaminotetracético), através do sistema a vácuo em quantidade proporcional ao preconizado pelo fabricante no período de Outubro de 2017 a Fevereiro de 2018.



### 3.3 Fenotipagem dos antígenos Duffy

Os testes imuno-hematológicos foram executados pela Fundação Hemopa. Sendo a fenotipagem eritrocitária para os antígenos do sistema Duffy, realizada pela metodologia de aglutinação em coluna-gel-teste (BioRad®) utilizando soro monoclonal anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup> humanos e antiglobulina poliespecífica humana.

Para identificação de anticorpos irregulares, também utilizou-se a metodologia de aglutinação em coluna-gel-teste, empregando-se hemácias fenotipadas com ou sem enzima conforme a necessidade, todos da BioRad®.

Quando aplicável, foram realizados testes diretos de antiglobulina humana poliespecífica ou monoespecífica, testes de adsorção e eluição de anticorpos e testes indiretos da antiglobulina humana.

Os resultados foram obtidos através dos sistemas de gerenciamento laboratorial do banco de sangue, sendo compilados para as devidas análises.

### 3.4 Genotipagem dos polimorfismos Duffy (rs12075 e rs2814778)

A extração do DNA foi realizada pelo método clássico fenol-clorofórmio com adaptações. A discriminação dos alelos *FY\*A*, *FY\*B* e *FY\*B<sup>ES</sup>* do sistema sanguíneo Duffy foram identificados pela técnica da PCR em tempo real (Real Time PCR), através da metodologia TaqMan, utilizando iniciadores e sondas desenvolvidos pelo software File Builder 3.1 da Applied Biosystems, previamente padronizados via genbank.

Por não se tratar do objetivo deste estudo, não foi necessária a padronização do protocolo nem uso de amostras controles genotipicamente conhecidas. A técnica já vem sendo utilizada de rotina pelo Laboratório de Genética Médica da Universidade Federal do Pará em estudos populacionais em diferentes comunidades, inclusive afro-descendentes, estando bem estabelecida e validada, amparada pela literatura técnica – científica atual, garantindo sensibilidade, reprodutibilidade e resultados altamente confiáveis, conforme descrito a seguir.



Foram realizadas duas reações, uma para identificar o polimorfismo da região promotora (T>C) e a outra o polimorfismo do sítio que especifica o alelo *FY\*A* ou *FY\*B* (G>A). As sequências dos iniciadores e das sondas para cada polimorfismo foram identificadas na Tabela 1.

**Tabela 01** - Iniciadores e sondas usados para genotipagem do sistema sanguíneo Duffy por PCR em Tempo Real.

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIA
REGIÃO PROMOTORA	
Iniciador <i>Forward</i>	5' CTGATGGCCCTCATTAGTCCTT 3'
Iniciador Reverso	5' GCTGGGACGGCTGTCA 3'
Sonda 1: Gata-ativo	5' TGCTCCAAGATAAGAGC 3' - VIC
Sonda 2: Gata-inativo	5' CTTCCAAGGTAAGAGC 3' - FAM
FY*A/FY*B	
Iniciador <i>Forward</i>	5' CTATGGTGTGAATGATTCTTCCC 3'
Iniciador Reverso	5' CAGAGTCATCCAGCAGGTTACAG 3'
Sonda FY*A	5' TGGAGACTATGGTGCCAAC 3'
Sonda FY*B	5' TGGAGACTATGATGCCAAC 3'

Para realização das reações foram usados 2µL de DNA, 5µL de *MasterMix (Applied Biosystems)*, 0,18µL das sondas (40X) e 4,82µL de água, completando um total de 12µL de reagentes. Estes foram colocados na Placa de leitura óptica que foi ao *Real Time PCR System* da *Applied Biosystems* para realizarem ciclos de 10 minutos à 95°C, 15 minutos à 92°C (40X) e 1 minuto à 60°C (40X).

Nos casos em que os indivíduos foram heterozigotos para a região promotora e para a região alélica *FY\*A/FY\*B*, foi necessário a realização de PCR convencional para



confirmação dos genótipos. Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em sistema convencional, utilizou-se quatro conjuntos de primers (iniciadores) alelo-específicos distintos, técnica descrita por Olsson *et al.* (1998) (Tabela 02). Os iniciadores utilizados são FY\*AB2 e GATA FY2 que são iniciadores sense da região promotora do gene *FY* que apresenta o polimorfismo T-33C que define qual desses dois iniciadores irá se anelar. Os iniciadores antisense da região polimórfica do FY\*A/FY\*B são denominados de FY\*AREV e FY\*BREV2.

**Tabela 02** - Oligonucleotídeos usados na PCR convencional para genotipagem do Sistema sanguíneo Duffy (Olsson *et al.*, 1998).

PRIMER	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA
GATAFY2	5'- CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAC -3'
FY*AB2	5'- CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAT -3'
FY*AREV	5'- AGCTGCTTCCAGGTTGGCAC -3'
FY*BREV2	5'- AGCTGCTTCCAGGTTGGCAT -3'

Na PCR convencional os primers foram combinados para a detecção de quatro possíveis alelos: *FY\*A<sup>ES</sup>*, *FY\*B<sup>ES</sup>*, *FY\*A* e *FY\*B* (Tabela 03). Isso quer dizer que para cada indivíduo foram feitas quatro reações em cadeia da polimerase (PCR) distintas, ou seja, com quatro combinações de primers.



Para cada PCR o DNA e os reagentes constituintes completaram um volume final de 24  $\mu\text{L}$ , dos quais 2,5  $\mu\text{L}$  era de tampão (PCR buffer II, Roche), 1,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM, Roche), 2  $\mu\text{L}$  de dNTP (1mM, GIBCO BRL), 4  $\mu\text{L}$  de cada *primer* alelo-específico (5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ), 0,1  $\mu\text{L}$  de AmpliTaqGold (5U/ $\mu\text{L}$  – Biosystems Roche) e 1,0  $\mu\text{L}$  de DNA (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). A PCR foi realizada em termociclador (MiniCycler™, PTC-150/MJ Research).

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados eletroforéticamente por 60 minutos sob uma corrente elétrica de 110 volts em gel de agarose a 2% com tampão TAE 1X acrescido de brometo de etídio (10 mg/mL), e visualizados em transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

**Tabela 03** - Combinações de iniciadores nas PCR para identificar os alelos do Sistema sanguíneo Duffy (Olsson *et al.*, 1998).

Combinações de <i>primers</i>	Primer sense	Primer antisense	Alelo detectado
A	GATA FY <sub>2</sub>	FY*A VER	FY*A <sup>ES</sup>
B	GATA FY <sub>2</sub>	FY*B REV <sub>2</sub>	FY*B <sup>ES</sup>
C	FY*AB <sub>2</sub>	FY*A VER	FY*A
D	FY*AB <sub>2</sub>	FY*B REV <sub>2</sub>	FY*B

As frequências fenotípicas, genotípicas e alélicas foram estimadas por simples contagem. As informações obtidas foram processados em planilhas do Microsoft Excel e exportados para o programa SPSS 20.0 (*Statistical Package for Social Sciences*) para comparações entre as frequências fenotípicas e genotípicas, utilizando o método de  $\chi^2$ .



### 3.5 Aspectos éticos

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE 79445017.1.0000.0018 sendo aprovado através do parecer de número 2.372.950 de 2017. A execução foi realizada com financiamento próprio em parceria com o Laboratório de Genética Médica e Humana da Universidade Federal do Estado do Pará sem que houvesse conflito de interesse. Para o presente estudo houve dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



#### 4. RESULTADOS

Dos 102 pacientes analisados apenas três não possuíam história de transfusão sanguínea, os demais já haviam recebido em algum momento derivados de hemácias. Os pacientes analisados haviam recebido concentrado de hemácias fenotipados e filtrados e/ou concentrado de hemácias pobre em leucócitos. Destes, 15 haviam sido transfundidos em intervalo inferior a 120 dias.

Em relação à aloimunização, 18,62% (19/102) dos indivíduos apresentaram anticorpos irregulares, predominantemente de especificidade Anti-E (26,31%), cinco destes apresentaram múltiplos aloanticorpos. Este valor é estatisticamente significativo quando aplicado o teste do qui-quadrado de aderência obtendo resulta de  $p < 0,014$ . Outras especificidades encontradas foram: Anti-C (10,52%), Anti-K (10,52%), Anti-Di(a) (10,52%), Anti-c (0,52%), Anti-S (0,52%), Anti-Le(a) (0,52%) e Anti-Fy(a) (0,52%). Todos os pacientes que apresentaram o auto controle positivo também apresentaram o teste da antiglobulina direta positiva, embora apenas em um paciente tenha sido identificado a especificidade para auto anti-e. Entre os que apresentaram exames imuno-hematológicos alterados totalizaram o número de 23 pacientes.

##### 4.1 Fenótipo Duffy

Para as frequências fenotípicas e genotípicas, os pacientes foram agrupados por categoria baseado na cor de pele conforme autodefinição dos mesmos (Tabela 4).

No presente estudo os indivíduos analisados não apresentaram discrepâncias nos resultados dos testes imuno-hematológicos por interferência de anticorpos irregulares em virtude de já possuírem seus exames realizados antes de iniciar os esquemas de múltiplas transfusões. Ressalta-se que isto não reflete a rotina de um laboratório de imuno-hematologia, onde se depara diariamente com demandas muitas vezes complexas que somente através da sorologia não é possível resolver.



**Tabela 04** – Frequências fenotípicas para o sistema Duffy dos pacientes atendidos pela Fundação Hemopa 2018.

Fenótipo	Pacientes (N = 102)					
	Pardos (N=90)		Branco (N=12)		Geral	
	Frequência %	N	Frequência %	N	Frequência %	N
Fy(a-b-)	100	07	0,0	00	6,9	7
Fy(a-b+)	90,6	29	9,4	03	31,4	32
Fy(a+b-)	87,5	28	12,5	04	31,4	32
Fy(a+b+)	83,9	26	16,1	05	30,4	31

Seis pacientes não possuíam fenotipagem eritrocitária definida, mas puderam ter seus antígenos presumidos a partir dos genótipos encontrados conforme apresentado na tabela 05.

**Tabela 05** – Resultados da genotipagem dos pacientes sem fenótipo.

Genótipo	N	Fenótipo Presumido
<i>FY*A/FY*A</i>	02	Fy(a+b-)
<i>FY*A/FY*B</i>	03	Fy(a+b+)
<i>FY*BES/FY*BES</i>	01	Fy(a-b-)

#### 4.2 Genótipo Duffy

A genotipagem para os SNPs rs12075 e rs2814778 por PCR em tempo real e convencional (quando aplicável) foi realizada de acordo os métodos previamente descritos. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.



**Tabela 06** - Frequências genotípicas para o sistema Duffy dos pacientes atendidos pela Fundação Hemopa 2018.

Genótipo	Pacientes (N = 102)					
	Pardos (N=90)		Branco (N=12)		Geral	
	Frequência %	N	Frequência %	N	Frequência %	N
<i>FY*A/FY*A</i>	94,4	17	5,6	01	17,6	18
<i>FY*A/FY*B</i>	76,9	20	23,1	06	25,5	26
<i>FY*A/FY*B<sup>ES</sup></i>	88,2	15	11,8	02	16,7	17
<i>FY*B/FY*B</i>	78,6	11	21,4	03	13,7	14
<i>FY*B/FY*B<sup>ES</sup></i>	100	18	0,0	00	17,6	18
<i>FY*B<sup>ES</sup>/FY*B<sup>ES</sup></i>	100	09	0,0	00	8,8	09

As frequências alélicas encontradas na população estudada foram de *FY\*A* (0,39), *FY\*B* (0,35) e *FY\*B<sup>ES</sup>* (0,26).

#### 4.3 Correlações Fenótipo e Genótipo

Noventa e um pacientes (89,21%) apresentaram concordância entre os fenótipos previstos a partir da análise do DNA.

As amostras que apresentaram discrepância entre fenótipo e o genótipo, tiveram suas análises moleculares realizadas em duplicatas a fim de confirmar os resultados. Por razões de ordem técnica, não foi possível realizar novos testes para confirmação do fenótipo destes pacientes.

Onze pacientes (10,79%) apresentaram resultados divergentes quando correlacionado genótipo com fenótipo. A Tabela 7 mostra os resultados dos antígenos presentes identificados na fenotipagem eritrocitária e o fenótipo esperado a partir dos resultados das análises de DNA.



**Tabela 07** – Discrepâncias entre os resultados de genotipagem e fenotipagem.

<b>DISCREPANCIA GENÓTIPO VS FENÓTIPO</b>			
<b>Pacientes (N = 11 )</b>			
<b>Genótipo</b> (BIOLOGIA MOLECULAR)	<b>FENÓTIPO ENCONTRADO</b> (FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA – SOROLOGIA)	<b>N</b>	<b>FENÓTIPO ESPERADO</b> (FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA – SOROLOGIA)
<i>FY*A/FY*A</i>	Fy(a+b+)	04	Fy(a+b-)
<i>FY*A/FY*B</i>	Fy(a+b-)	02	Fy(a+b+)
<i>FY*A/FY*B<sup>ES</sup></i>	Fy(a+b+)	02	Fy(a+b-)
<i>FY*B/FY*B<sup>ES</sup></i>	Fy(a+b-)	01	Fy(a+b+)
<i>FY*B<sup>ES</sup>/FY*B<sup>ES</sup></i>	Fy(a+b+)	01	Fy(a-b-)
<i>FY*B<sup>ES</sup>/FY*B<sup>ES</sup></i>	Fy(a-b+)	01	Fy(a-b-)



## 5. DISCUSSÃO

Os testes de hemaglutinação detectam o produto do gene e a genotipagem molecular detecta o código genético, podendo ser uma excelente alternativa para os casos onde os testes de hemaglutinação não apresentam eficiência (seja devido à ausência de anti-soros comerciais de baixa incidência ou à presença de hemácias do doador ainda circulantes no receptor).

Embora seja algo recente no estado do Pará convergir imuno-hematologia e as ferramentas de biologia molecular a fim de resolver questões práticas na rotina transfusional, observa-se limitações em virtude das variadas nomenclaturas utilizadas para falar sobre o sistema Duffy (antígenos, anticorpos e principalmente os alelos), tornando a interpretação muitas vezes complexas quando é realizado a busca do conteúdo técnico-científico nas diferentes áreas do conhecimento: imunologia, hematologia, hemoterapia e genética. Cada segmento possui designações próprias para abordar o mesmo assunto. Embora as ênfases possam ser diferentes de acordo cada segmento é necessário adequação de um padrão único de nomenclatura para que facilite o intercâmbio de informações.

Atualmente os reagentes produzidos a partir de hemácias humanas trazem informações referentes aos principais antígenos eritrocitários expressos de interesse na rotina, todavia em nenhum reagente há informação se o antígeno presente é decorrente de um indivíduo homocigoto ou heterocigoto. Essa informação pode ser útil na pesquisa de anticorpos que sofrem efeito de dose, como pode ocorrer com os anticorpos anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup>. Através na biologia molecular, numa perspectiva futura, além do perfil fenotípico seria possível conhecer as características genéticas das hemácias utilizadas pela indústria na produção de reagentes.

As informações de prontuários ou solicitações de exames, nem sempre são confiáveis, geralmente pode omitir que houve transfusão recente. Só ao realizar os testes e visualizar uma reação em dupla população é possível identificar a possibilidade de transfusão recente. A omissão de informações pode levar a interpretações equivocadas dos testes de rotina.



Ao destacar as discrepâncias ocorridas entre fenótipo e o genótipo (n=11), é importante compreender diversos aspectos da rotina. Na rotina sorológica de grupo sanguíneo em situações de reações fracas ou duvidosas, adota-se uma regra geral visando maior segurança para o receptor. Quando a reação fraca ou duvidosa for observada em amostra de paciente opta-se por registrar como uma reação negativa. Caso seja identificado na amostra do doador opta-se registrar como positiva. Uma reação em campo misto por exemplo, torna o fenótipo indeterminado, pois há mistura de mais de uma população de células de glóbulos vermelhos, e portanto uma reação positiva e negativa são observadas no mesmo tubo da reação.

Embora haja descrito na literatura que o anticoagulante comercial não prejudica os antígenos Duffy na amostra (Haermening, 1992), Williams *et al.* (1981) relatam que o antígeno Duffy enfraquece quando os glóbulos vermelhos são armazenados a 4°C. As amostras muito raramente são analisadas no dia da coleta. Como há apenas um laboratório de referência em imuno-hematologia no estado, as amostras são encaminhadas para o Hemocentro Coordenador para as devidas análises, muitas provenientes inclusive do interior do Estado. Enquanto para a fenotipagem a amostra deve ser apenas refrigerada por tempo limitado antes de iniciar a hemólise; para a genotipagem a mesma pode ser congelada por longo período de tempo sem prejudicar a análise. Faz-se necessário estudos que avaliem a influência do tempo na conservação e transporte da amostra correlacionado a baixa intensidade da reação durante a execução dos testes, se estes aspectos podem contribuir para gerar reações fracas ou duvidosas durante a fenotipagem para os antígenos Duffy. Nesta pesquisa embora não tenha sido realizado este tipo de análise, trata-se de um aspecto importante que pode influenciar na análise da fenotipagem e deve ser considerado ao interpretar os resultados discrepantes desta pesquisa.

Para uma bolsa de sangue ser rotulada com seus respectivos fenótipos eritrocitários a AABB (*Advancing Transfusion And Cellular Therapies Worldwide*) e ABHH (Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular) em seu manual de Padrões para Bancos de Sangue ou Serviços de Transfusão recomenda que haja previamente pelo menos duas fenotipagens realizadas em momentos distintos e concordantes. Com base nos



resultados obtidos do fenótipo-genótipo, há possibilidade de falsa atribuição de um fenótipo durante a análise da hemaglutinação, outrossim, que não pode ser descartado é a manipulação incorreta durante a execução do teste gerando resultados falsos positivos ou falsos negativos.

Há estudos que atribuem altas taxas de inexatidão da fenotipagem a digitação de resultados errados, onde mesmo que o teste tenha sido realizado corretamente e tenha obtido resultados fidedignos, o teste não é confiável em virtude da falha no registro (Castilho *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2009; Reid *et al.*, 2000; Razman, 2000; Guelsin *et al.*, 2010). Em contrapartida, a técnica que é aplicada na análise molecular pode ser totalmente automática e os resultados podem ser analisados, interpretados e documentados por computador, reduzindo o erro de entrada de dados quando comparados aos processos manuais. No entanto a interpretação ainda assim deve ser realizada com cuidado, pois uma determinação genotípica pode não estar associada à expressão do antígeno na membrana do eritrócito, como observado no sistema Duffy a mutação GATA-box.

Entre os resultados divergentes, 02 pacientes com genótipo  $FY^*A/FY^*B$  e fenótipo  $Fy(a+b-)$ , apresentam perfil compatível com um tipo raro, denominado  $Fy^x$  ( $FY^*X$ ). Para confirmação seriam necessários testes sorológicos adicionais como adsorção e eluição e sequenciamento dos genes na tentativa de identificar os polimorfismos de nucleotídeos nas posições 145, 265 e 298, citados por estarem envolvidos à baixa expressão do antígeno b nos eritrócitos. Para os demais alelos raros não foi encontrado descrições detalhadas sobre sua genética, a maioria desses antígenos  $Fy3$ ,  $Fy4$ ,  $Fy5$  e  $Fy6$ , foram descobertos a partir da identificação primária de seus anticorpos através dos métodos sorológicos, o que dificulta estabelecer alguma correspondência com as demais amostras discrepantes encontradas. Sugere-se que para maior elucidação, inicialmente confirmar os resultados da fenotipagem (já mencionado que por motivos técnicos até a finalização deste trabalho não havia sido possível), permanecendo as inconsistências destes pacientes, buscar identificar possíveis alelos raros ou polimorfismos que tenham contribuído para não equivalência entre genótipo e o fenótipo seria outra possibilidade.



Outros estudos também encontraram discrepâncias quando correlacionaram fenótipo com genótipo (Rios *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 1997, 2000; Osman *et al.*, 2017). Apesar das discrepâncias encontradas, a metodologia empregada demonstrou alta sensibilidade permitindo uma análise otimizada e perfeitamente aplicável quando comparada ao método convencional de análise. As discordâncias de resultados entre PCR e sorologia não foi atribuída a falha e/ou limitação da metodologia de análise do DNA.

Osman *et al.* (2017) observou que 47 pacientes *FY\*A/FY\*A* apresentaram fenótipo *Fy(a+b+)*, nesta pesquisa a mesma discrepância foi encontrada em 04 indivíduos (tabela 7).

Um perfil de resultados no presente estudo chamou a atenção por divergir do que foi encontrado descrito na literatura por Sousa *et al.* (2007). Os autores afirmam que **TODOS** os indivíduos homocigotos da mutação no promotor do gene são homocigotos da região do éxon (página 20), nesta pesquisa estes totalizaram o número de 07 pacientes (Fenótipo *Fy(a-b-)*). Todavia nem **TODOS** os heterocigotos da mutação no promotor o são na região do éxon como afirmam Sousa *et al.* Na população estudada apenas 06 pacientes são heterocigotos para região promotora e do éxon, enquanto 30 pacientes são heterocigotos na região promotora e homocigotos para éxon.

Uma vez aloimunizado, o manejo do paciente pode ser complicado à medida que restringe a disponibilidade de hemocomponentes compatíveis (George, 2013). No entanto, nem todos os pacientes desenvolvem anticorpos irregulares após uma exposição aos antígenos do doador. No presente estudo 81,38% dos analisados não produziram anticorpos irregulares, mesmo sendo submetidos às múltiplas transfusões. Há diversos fatores envolvidos: imunogenicidade do antígeno, duração da terapia transfusional, fatores genéticos e ambientais que podem influenciar no processo de sensibilização (George *et al.*, 2003, Bauer *et al.*, 2007). A taxa de aloimunização difere muito em diferentes coortes de pacientes e grupos étnicos, mas há na literatura que mais de 30% dos pacientes que recebem múltiplas transfusões acabam desenvolvendo aloanticorpos eritrocitários clinicamente significativos (Murao *et al.*, 2005; Natukunda *et al.*, 2010; Ugwu *et al.*, 2015, Elenka *et al.*, 2015, Chou *et al.*, 2013; Dhawan *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2011; Kangiwa *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 2011).



Ao aplicar o teste estatístico para análise dos pacientes deste estudo que estão aloimunizados, o resultado obtido difere significativamente do esperado ( $p < 0,014$ ), ou seja, a quantidade de pacientes que desenvolveram anticorpos irregulares estão abaixo do esperado de acordo o que está descrito na literatura, atribui-se estes resultados positivos do ponto de vista clínico à eficácia do programa de hemácias fenotipadas adotado pela Fundação Hemopa em sua rotina transfusional (Pinto *et al.*, 2011, Ugwu *et al.*, 2015; Lasaele-Williams *et al.*, 2010; Vichinsky, 2001). É válido salientar que embora estatisticamente o número encontrado esteja abaixo do esperado, do ponto de vista individual (clínico), mesmo que um único paciente dentre milhares seja sensibilizado para um antígeno eritrocitário, este poderá ter suas chances de transfusão de sangue compatível comprometida, agravando-se mais ainda se o anticorpo desenvolvido for dirigido para um antígeno público.

Embora os testes sorológicos de rotina sejam considerados o padrão-ouro para identificação dos antígenos eritrocitários e apresente um melhor custo-benefício quando comparado à biologia molecular, na maioria dos pacientes em esquema de múltiplas transfusões, é necessário repetir os testes antes de cada transfusão ou até resolver as inconsistências, o que pode tornar o processo dispendioso e oneroso (Reid *et al.*, 1998 e 2009; Castilho *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2009).

A plataforma para análise molecular permite a análise de um grande número de amostras simultaneamente e uma vez determinado o genótipo o mesmo não sofrerá mudanças. Soma-se o fato que pacientes que receberam concentrados de hemácias compatíveis com antígenos baseados no genótipo, mostraram uma melhor sobrevida das hemácias *in vivo*, aumento dos níveis de hemoglobina e diminuição da frequência de transfusões (Castilho *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2009).

Embora haja alguma discussão sobre a contaminação por DNA de leucócitos residuais dentro dos concentrados de hemácias transfundidos, a análise das amostras pós transfusão, de pacientes que haviam recebido sangue no prazo inferior a 120 dias ( $n=15$ ) não afetaram os resultados da genotipagem, destes apenas 03 apresentaram divergências entre genótipo versus fenótipo e não foi detectado microquimerismo (Reid *et al.*, 2000, Castilho *et al.*, Wenk *et al.*, 1997). Não há interferência provavelmente devido ao excesso abrupto do



DNA dos pacientes. Além disso, os pacientes que necessitam de politransusão no estado do Pará, recebem bolsas desleucocitadas (às vezes duplamente filtradas) (Reid *et al.*, 2000; Castilho *et al.*, 2002; Rozman *et al.*, 2000; Wenk *et al.*, 1997). Se houver uma preocupação com contaminação pelo DNA do doador nas amostras de sangue do paciente, outras fontes para análise podem ser consideradas, como por exemplo, a saliva (Adams *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1997; Moulds, 2011; Rio *et al.*, 1999). Esta alternativa se torna bastante útil frente a impossibilidade de obtenção da amostra de sangue periférico, como observado frequentemente em recém-nascidos.

Durante o levantamento bibliográfico, pôde ser identificado alguns estudos intitulos como sendo realizados na região Amazônica o que pode levar os leitores a falsa idéia de homogeneidade (cultural, geográfica e genética) em toda região, todavia esses trabalhos principalmente do estado do Pará não refletem o perfil da população que é atendida pelos bancos de sangue (paciente e doador). No estado do Pará, este é o primeiro trabalho que estabelece a frequência alélica e genotípica de grupo sanguíneo dentro do contexto hemoterapico. Ao realizar levantamento de dados de frequência das mutações relacionadas aos sistemas sanguíneos eritrocitários, especificamente sistema Duffy, é possível verificar a baixa quantidade de informações epidemiológicas atuais e representativas da região Norte, especialmente no estado do Pará, uma vez que o uso da biologia molecular como ferramenta complementar na classificação sanguínea de doadores ou pacientes ainda não é realizado de forma corrente pelos bancos de sangue do estado. Os dados publicados em trabalhos esporádicos diferem quando comparados a outras regiões do país e do mundo e são voltados em sua maioria para pesquisa e não para prática transfusional.

Como esperado, fenótipo e genótipo negativos foram menos frequentes em relação aos demais,  $Fy(a-b-)$  6,9% e  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$  8,8%. Em contrapartida antígenos positivos foram mais frequentes, destacando-se o genótipo  $FY^*A/FY^*B$  em 25,5% do total. Ao agrupar as frequências com base na cor da pele e comparar as taxas entre brancos e pardos, o fenótipo negativo  $Fy(a-b-)$  foi encontrado exclusivamente entre os pardos. O número total auto-intitulos como brancos foi baixo (n=12) para que fosse possível ter uma avaliação mais precisa de frequência em base na cor/raça, por isso optou-se por acrescentar a frequência



global da população analisada. Entre as possíveis combinações genotípicas, o alelo mais frequente foi  $FY^*A$  (0,39) compatível com outros estudos realizados no estado do Pará.

Soter *et al* (2018) em seu trabalho em comunidades quilombolas, nos municípios de Abaetetuba, Cametá, Concórdia, Inhangapi, Óbidos, Oriximiná e Salvaterra, onde foram analisados amostras de 1.324 indivíduos, observaram que o genótipo mais frequente foi  $FY^*A/FY^*B^{ES}$  (28,2%) seguido de  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$  (19,1%). Perna (2012) observou que entre 615 pacientes no município de Anajás o genótipo mais frequente foi  $FY^*A/FY^*B$  (29,30%) e o menos frequente  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$  (3,4%). Em Goianésia  $FY^*A/FY^*B$  (33,71%) sendo o mais frequente e  $FY^*A/FY^*B^{ES}$  (10,11%) como menos ocorrências entre 89 pacientes. Em todos os locais de estudo houve predominância do alelo  $FY^*A$  41,6%, 47,15% e 38,76% respectivamente. Todos esses municípios citados pertencem ao estado do Pará, a mesma unidade federativa onde foi executado o presente estudo, todavia com alguns resultados bem distintos quando comparados com a tabela 06. Em virtude da grande diversidade de distribuição dos determinantes antigênicos Duffy, nos diversos grupos étnicos dentro do território nacional e mundial, evitou-se estabelecer correlações de frequências fenotípicas e genotípicas com diferentes estudos, optando por informar as encontradas na presente pesquisa. É consensual entre a maioria dos autores nacionais que as frequências encontradas em seus estudos corroboram para demonstrar a miscigenação e a diversidade étnica racial do Brasil, não havendo um padrão único. Algumas vezes estabelecer se o encontrado está fora do esperado não é tão simples.

Outro aspecto interessante é que após a genotipagem, observou-se que todos os pacientes  $Fy(a-b-)$  e 46,87% dos  $Fy(a+b-)$  avaliados podem receber transfusões de sangue positivo para o antígeno  $Fyb$  sem risco de aloimunização porque são portadores da variante  $FY^*B^{ES}$ , que impede expressão do antígeno exclusivamente nos eritrócitos, ou seja há possibilidade de aumentar a disponibilidade de hemocomponentes antígeno positivo compatível para 21,68% do total de indivíduos analisados. A transfusão de concentrado de hemácias  $Fy(b+)$  em indivíduos  $FY^*B^{ES}$  foi observado por Castilho (2007), onde cada paciente acompanhado por um período de seis meses a 1 ano após a transfusão, havia recebido em média 6,5 unidades de sangue sem desenvolverem anti- $Fy^b$  ou anti- $Fy3$ . Este aspecto torna-



se relevante no manejo do estoque de bolsas no banco de sangue, uma vez que bolsas antígeno negativo são mais raras e através dos métodos convencionais de classificação sanguínea essa identificação não é possível. Porém é importante lembrar que há outros mecanismos que podem dar origem ao sangue Fy(b-) que não a mutação  $FY^*B^{ES}$ , neste caso somente através da biologia molecular é possível estabelecer quem não terá capacidade de desenvolver anticorpo irregular (anti-Fy3) se receber uma bolsa antígeno positivo.

Mesmo diante de pacientes que não tenham realizado fenotipagem é possível através da análise molecular prever o antígeno do grupo sanguíneo com um alto grau de precisão testando seu DNA (Westhoff., 2006; Moulds, 2010), como foi realizado em seis pacientes deste estudo, apresentado na tabela 05.

Até o momento, não existem Kits de SNPs comerciais dedicados como “painéis” para a genotipagem de eritrócitos, isso proporciona a oportunidade de abordar diretamente as limitações, discrepâncias e incertezas no perfil de antígenos encontradas na sorologia convencional.

Em relação à metodologia empregada na análise do DNA, a PCR em tempo real apresenta vantagens quando comparada ao método convencional, como a ausência de manipulação da amostra pós-PCR, economia de tempo e custos de minimização da potencial contaminação cruzada, redução dos efeitos mutagênicos e tóxicos do brometo de etídio usados para visualizar os fragmentos no método convencional (Padhoradecka *et al.*, 2012; Schnabel *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2015, Nathalang, 2015).

Embora a padronização e validação da técnica não tenha sido objetivo deste estudo, as análises realizadas contribuem para aumentar a confiabilidade e demonstrou a eficiência das técnicas realizadas no Laboratório de Genética Médica e Humana da Universidade Federal do Pará, uma vez que foi o primeiro estudo que analisou não apenas o genótipo (biologia molecular), mas estabeleceu as devidas correlações com o fenótipo (sorologia de grupos sanguíneos) da população estudada.

Por sua precisão, facilidade de execução e viabilidade de custo, as técnicas para tipagem de DNA para sistemas sanguíneos já foram implantadas em vários Hemocentros



públicos e particulares do país, sendo usadas rotineiramente na prática transfusional, contribuindo para aumento da segurança dos pacientes cronicamente transfundidos. Além disso, permitindo o melhor uso de unidades de sangue com fenótipos menos frequentes na população de doadores de sangue.

Na prática transfusional, determinar corretamente o grupo sanguíneo tem como objetivo não apenas evitar problemas resultantes de transfusão incompatível, mas sobretudo possibilitar melhor aproveitamento de hemocomponentes com fenótipos raros ou menos frequentes, permitindo melhor manejo e controle do estoque de sangue.

Através de uma abordagem informal entre os profissionais da saúde médicos e não médicos, que trabalham em banco de sangue ou que possuam vivência com a rotina transfusional, observa-se conhecimento e experiência restritos em relação à dinâmica laboratorial imuno-hematológica de grupos sanguíneos que não ABO e Rh, provavelmente atribuído a pouca literatura nacional publicada sobre a temática.

Novos estudos moleculares para classificação dos antígenos eritrocitários devem ser realizados, numa escala maior de amostras, envolvendo um maior número de regiões e grupos específicos para uma real determinação das frequências encontradas para esses antígenos na população brasileira, bem como validar processos que viabilizem a implementação da rotina molecular nos laboratórios de imuno-hematologia do estado.

O reconhecimento das bases moleculares dos genes relacionados a grupos sanguíneos é importante para desenvolver métodos de biologia molecular, identificar novas mutações, compreender polimorfismos, descobrir novos alelos e até mesmo novos sistemas.

As limitações atuais que devem ser superadas antes da utilização de unidades genotipadas são a necessidade de uma tecnologia mais econômica, a necessidade de entender o efeito da transfusão genótipo versus fenótipo compatível no paciente transfundido. Um objetivo a longo prazo é identificar a causa da predisposição à aloimunização eritrocitária, desenvolver um programa de doadores raros usando doadores genotipados para suportar as necessidades de transfusão de pacientes sob esquema crônico de transfusão sanguínea.



## 6. CONCLUSÃO

Todos os pacientes analisados tiveram seus genótipos determinados independente das possíveis limitações existentes quando aplicada a metodologia de sorologia de grupo sanguíneo.

Dos noventa e nove pacientes com história transfusional, 15 haviam recebido transfusão de concentrado de hemácias em período menor que 120 dias. Da população estudada 19 pacientes apresentaram anticorpos irregulares, alguns auto-anticorpos e testes da antiglobulina humana direta positiva. Todos estes aspectos podem contribuir como fatores limitantes ao tentar determinar a fenotipagem eritrocitária pelos métodos convencionais.

Em relação às frequências dos resultados encontrados entre os fenótipos e genótipos, destacaram-se:

- Fenótipo negativo (Fy(a-b-)) foi encontrado exclusivamente em indivíduos pardos;
- Fenótipos positivos foram mais frequentes destacando-se dois perfis com frequências idênticas Fy(a-b+) e Fy(a+b-) ambos com 31,4%;
- Genótipo mais frequente  $FY^*A/FY^*B$  com 25,5% e menos frequente  $FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}$  com 8,8%;
- O alelo predominante foi o  $FY^*A$  com 39%.

Ao cruzar as informações entre genótipo e fenótipo 89,21% dos pacientes apresentaram concordância em suas correlações. Os resultados divergentes encontrados em 11 pacientes não foi implicado à metodologia de análise de DNA empregada.

Ao reconhecer os portadores da variante  $FY^*B^{ES}$  foi possível identificar que 21.68% do total de indivíduos analisados, podem receber sangue antígeno Fy(b+) sem produzirem anticorpos irregulares, o que aumenta a disponibilidade de hemocomponentes para este grupo, uma vez que antígenos negativos são mais raros na rotina de banco de sangue.



Dois pacientes apresentaram perfil de resultados compatível com o fenótipo raro  $Fy^x$ , para confirmação do resultado fazem-se necessários outros testes não contemplados pela presente pesquisa.

Diante do exposto conclui-se que a utilização das ferramentas de biologia molecular tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da imuno-hematologia, aumentando a segurança e eficácia transfusional de pacientes politransfundidos, como os talassêmicos e portadores de anemia falciforme. Isto pode ser facilmente visualizado durante os procedimentos de genotipagem de grupos sanguíneos realizados durante a presente pesquisa, onde as técnicas moleculares puderam suprir as deficiências das técnicas de hemaglutinação, principalmente na fenotipagem de pacientes com transfusão recente, quando há hemácias do doador na circulação do receptor e pacientes com alo e/ou autoanticorpos.

Frente às novas e complexas abordagens na hemoterapia, a Imuno-hematologia associada à biologia molecular representa um importante papel no suporte transfusional da medicina moderna.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS PT, Davenport RD, Reardon DA, MS R. Detection of circulating donor white blood cells in patients receiving multiple transfusions. *Blood* 1992;80:551–5.
- ANSTEE D.J., The relationship between blood groups and disease, *Blood* 115 (2010) 4635e4643, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-261859>.
- ANSTEE DJ. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood*. 2009;114(2):248-56. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-11-146860>.
- ALVES VM, Martins PRJ, Soares S, Araújo G, Schmidt LC, Costa SSM, et al. Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(3):206-11. <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20120051>.
- BAUER Martijn P, Wiersum-Osselton J, Schipperus M, Vandenbroucke Jan P, Briët E. Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion. *Transfusion* 2007;47:2066-71.
- BEHZAD O., Lee, C.L., Gavin, J. & Marsh, W.L. A new anti-erythrocyte antibody in the Duffy system: anti-Fy4. *Vox Sang*. 24: 337-342, 1973.
- BRASIL Ministério da Saúde, Portaria 158: Estabelece o regulamento técnico de procedimentos Hemoterápicos. 2016.
- BRASIL Ministério da Saúde, Portaria de Consolidação nº5, de 28 de Setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde – Anexo IV.
- BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão do Trabalho na Saúde. Técnico em hemoterapia: livro texto / Ministério da Saúde, Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde, Departamento de Gestão da Educação na Saúde – Brasília : Ministério da Saúde, 2013.292 p.:il.
- CHAUDHURI A, Polyakova J, Zbrzezna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10793-7.
- CASTILHO *et al*. Molecular genotyping of blood groups In: congress of the International society of Blood Transfusion, 1998, Oslo.



- CASTILHO L., Rios M., Pellegrino J., Carvalho M. H. M., Alberto F. L., Saad S. T., Costa F. F. Genotyping of Kell, Duffy, Kidd and RHD in patients with  $\beta$  Thalassemia. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, 2000, 22(2): 69-76.
- CASTILHO L., Rios M, Pellegrino Jr J. S TOS, and F FC. Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. *J Clin Lab Anal* 2002;16:216–20.
- CASTILHO, L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. Volume 47, July 2007. Supplement TRANSFUSION 29S.
- CASTILHO L. Rios, M., Pellegrino Jr, J., Saad, S. T. O., Costa, F. F. & M. E. Reid. A novel FY allele in Brazilians. 2004 Blackwell Publishing Ltd. *Vox Sanguinis* (2004) 87, 190–195.
- CASTILHO L, Rios M, Bianco C, Pellegrino J, Alberto Fernando L, Saad Sara TO, et al. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion* 2002;42:232–8.
- CAVASINI C.E., Pereira, F.J.T., Ribeiro, W.L., Wunderlich, G. & Ferreira, M.U. Duffy blood group genotypes among malaria patients in Rondônia, Western Brazilian Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34: 591-595, 2001.
- CAVASINI C.E., Mattos L.C., Couto A.A.D., Bonini-Domingos C.R., Valencia H.S., Neiras W.C.S., Alves R.T., Rossit A.R.B., Castilho L., Machado R.L.D. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2007) 101, 1042-1044. Doi:10.1016/j.trstmh.2007.04.011.
- CHOWN B., Lewis, M. & Kaita, H. The Duffy blood group system in Caucasians: evidence for a new allele. *Amer. J. Hum. Genet.* 17: 384-389, 1965.
- CHOU ST Jackson T, Vege S, Smith-Whitjey K, Friedman DF, Westhoff CM. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood.* 2013;122(6):1062-71. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-03-490623>.
- COSTA D.C., Schinaidera A. A., Santos T. M., Schörner E. J., Simonc D., Malufa S. W., Moraes A. C. R., Silva M. C. Frequencies of polymorphisms of the Rh, Kell, Kidd, Duffy and Diego systems of Santa Catarina, Southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2016;38(3):199–205.
- CRUZ R. de O., Mota, M. A., Conti F. M., Pereira R. A. d’A., Kutner J. M., Aravechia M. G., Castilho L. Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes poli transfundidos. *Einstein.* 2011; 9(2 Pt 1):173-8.
- CUTBUSH M. & Mollison, P.L. The Duffy blood group. *Heredity* 4: 383-389, 1950.



- CUTBUSH M., Mollison, P.L. & Parkin D.M. A new human blood group. *Nature* 165:188, 1950.
- DHAWAN HK, Kumawat V, Marwaha N, Sharma RR, Sachdev S, Bansal D, et al. Alloimmunization and autoimmunization in transfusion dependent thalassemia major patients: Study on 319 patients. *Asian J Transfus Sci* 2014;8:84–8.
- ELENGA N, Niel L. Alloimmunization in patients with sickle cell disease in French Guiana. *J Blood Transfu.* 2015;2015:3. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/812934>.
- FARAWELA H. M., El-Ghamrawy, M., Farhan, M. S., Soliman R., Yousry S. M., AbdelRahman H. A. Association between Duffy antigen receptor expression and disease severity in sickle cell disease patients. *Hematology* 2016 VOL. 21 N. 8.
- GEORGE E. HbE B-Thalassaemia in Malaysia: revisited. *J Hematol Thromb Dis* 2013;1:101.
- GIRELLO A.L & KUHN. *Fundamentos da Imunohematologia eritrocitária*. São Paulo: Editora Senac, 2002.
- GIBLETT ER. A critique of theoretical hazard of inter vs. intra-racial transfusion. *Transfusion.* 1961;1:233-8.
- GUELSIN GA, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, et al. Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. *J Clin Lab Anal* 2010;24:311–6.
- HADLEY T.J., David, P.H., McGinniss, M.H. & Miller, L.H. Identification of an erythrocyte component carrying the Duffy blood group Fy-a antigen. *Science* 223: 597-599, 1984.
- HARMENING, Denise; CALHOUN, Loni; POLESKY, Herbert. *Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1992.
- HELMAN R., Cançado, R. D., Olivatto C. Incidence of alloimmunization in sickle cell disease: experience of a center in São Paulo. *Einstein.* 2011; 9(2 Pt 1):160-4.
- HOELTGE GA, Domen RE, Rybicki LA, Schaffer PA. Multiple red cell transfusions and alloimmunization: Experience with 6996 antibodies detected in a total of 159,262 patients from 1985 to 1993. *Arch Pathol Lab Med.* 1995;119(1):42-5.
- IKIN E.W., Mourant, A.E., Pettenkofer, H.J. & Blumenthal, G. Discovery of the expected haemagglutinin anti-Fyb. *Nature* 168: 1077, 1951.
- IWAMOTO S., T. Omi, E. Kajii, S. Ikemoto, Genomic organization of the glyco-protein D gene: duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue, *Blood* 85 (1995) 622e626.



- JENS E., Pagliarini T., Novaretti M. C. Z. Sistema de grupo sanguíneo Duffy: Biologia e prática transfusional. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2005;27(2):110-119.
- KANGIWA U, Ibegbulam O, Ocheni S, Madu A, Mohammed N. Pattern and prevalence of alloimmunization in multiply transfused patients with sickle cell disease in Nigeria. *Biomarker Res.* 2015;3(26):1-6. <http://dx.doi.org/10.1186/s40364-015-0050-3>.
- KING Christopher L., Adams J.H. , Xianli J., Grimberg B.T. , McHenry A.M., Greenberg L.J., Siddiqui A., Howes R.E., Nunes M.S., Ferreira M.U., Zimmerman P. A. Fya /Fyb antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to Plasmodium vivax malaria. *PNAS.* December 13, 2011, vol. 108, no. 50, 20113–20118.
- LANGHI DM, Albuquerque S, Covas DT, Perez CA, Bordin JO. Presença do alelo FYAnull, do sistema de grupo sanguíneo Duffy, em habitantes de região endêmica para malária e doadores de sangue no Brasil [The presence of FYA null allele in inhabitants of an endemic region and in blood donors from Brazil]. *Rev Bras Hemat Hemot* 2004;26(S):268-9.
- LASALLE-WILLIAMS M, Nuss R, Le T, Cole L, Hassel 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;51(8):1732-39. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.03045.x>.
- LEE TH, Donegan E, Slichter S, Busch MP. Transient increase in circulating donor leukocytes after allogeneic transfusions in immunocompetent recipients compatible with donor cell proliferation. *Blood* 1995;85:1207–14.
- LIU X.F., Li L.F., Ou Z.L., Shen R., Shao Z. M. Correlation between Duffy blood group phenotype and breast cancer incidence. *BMC Cancer* 2012, 12:374.
- LOPEZ G. H., Morrison J., Condon J. A., Wilson B., Martin J. R, Liew Y.-W., Flower R. L. & Hyland C. A. Duffy blood group phenotype–genotype correlations using high-resolution melting analysis PCR and microarray reveal complex cases including a new null FY\*A allele: the role for sequencing in genotyping algorithms. *Vox Sanguinis* (2015) 109, 296–303.
- MALLINSON G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a–b–) phenotype. *Br J Haematol* 1995;90:823-9.
- MARTINS M.L., Cruz, K.V.D., Silva, M.C.F., Vieira, Z.M. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31(4):252-259.
- MATTOS L. C. Duffy: um sistema de grupos sanguíneos com considerável complexidade. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2005;27(2):79-82.



- MCMANUS Kimberly F, Taravella A. M., Henn B. M., Bustamante C. D., Sikora M., Cornejo O. E. Population genetic analysis of the DARC locus (Duffy) reveals adaptation from standing variation associated with malaria resistance in humans. *PLoS Genetics*. 13.3 (Mar. 10, 2017): pe1006560.
- MILLER LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy blood group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976;295:302.
- MOURANT A.E., Kopec, A.C. & Domaniewska-Sobezak, K. The distribution of the human blood groups and other polymorphisms. Oxford University Press, London, 1976.
- MOULDS JM. Future of molecular testing for red blood cell antigens. *Clin Lab Med* 2010;30:419–29.
- MOULDS JJ. An overview of the classic serological methods: limitations and benefited of serology and DNA testing. In: Ness Paul M, Sloan Steve R, Moulds JM, editors. *BeadChip molecular immunohematology*. New York: Springer; 2011. p. 1–7.
- MURAO M, Viana MB. Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(5):675-82. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2005000500004>.
- NATUKUNDA B, Schonewille H, Van de Watering L, Brand A. Prevalence and specificities of red blood cell alloantibodies in transfused Ugandans with different diseases. *Vox Sang*. 2010;98(2):167-71.
- NATHALANG O., Intharanut K., Siriphanthong K., Nathalang S., Kupatawintu S. Duffy Blood Group Genotyping in Thai Blood Donors. *Ann Lab Med* 2015;35:618-623.
- NICHOLS ME, Rubinstein P, Barnwell J, Rodriguez de Cordoba S, Rosenfield RE: A new human Duffy blood group specificity defined by a murine monoclonal antibody. Immunogenetics and association with susceptibility to *Plasmodium vivax*. *J Exp Med* 1987; 166:776 –785.
- OLSSON M.L., Smythe, J.S., Hansson, C., Poole, J., Mallinson, G., Jones, J. Avent, N.D. & Daniels, G. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br. J. Haematol*. 103: 1184-1191, 1998.
- OLSSON ML, Smythe JS, Hansson C, et al. The Fyx phenotype is associated with a missense mutation in the Fyb allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol* 1998;103:1184-91.
- OSMAN N. H., Jameela Sathar, Chooi Fun Leong, Noor Fadzilah Zulkifli, Raja Zahratul Azma Raja Sabudin, Ainoon Othman, Asral Wirda Ahmad Asnawi. Importance of extended blood group genotyping in multiply transfused patients. *Transfusion and Apheresis Science* 56 (2017) 410–416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2017.03.009>.



PODHORODECKA A.K. , O. Knap, A. Drozd, M. Kaczmarczyk, M. Parafiniuk, M. Parczewski, A. Ciechanowicz, Analysis for genotyping Duffy blood group in inhabitants of Sudan, the fourth cataract of the Nile, *Malar. J.* 11 (2012) 115, <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-115>.

PARASOL N, Reid M, Rios M, Castilho L, Harari I, Kosower NS. A novel mutation in the coding sequence of the FY\*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. *Blood* 1998;92:2237-43.

PINTO PCA, Braga JAP, Santos AMN. Fatores de risco para aloimunização em pacientes com anemia falciforme. *Rev Assoc Méd Bras.* 2011;57(6):668-73.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302011000600014>.

RAEYMAEKERS P., Van Broeckhoven, C., Backhovens, H., Wehnert, A., Muylle, L., De Jonghe, P., Gheuens, J. & Vandenberghe, A. The Duffy blood group is linked to the alpha-spectrin locus in a large pedigree with autosomal dominant inheritance of Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Hum. Genet.* 78: 76-78,1988.

REICH D., M.A. Nalls, W.H. Kao, E.L. Akyzbekova, A. Tandon, N. Patterson, J. Mullikin, et al., Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene, *PLoS Genet.* 5 (2009) e1000360,  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000360>.

REID ME, Yazdanbakhsh K. Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusion. *Curr Opin Hematol* 1998;5:93–102.

REID ME, Rios M, Powell D, Charles-Pierre D. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000;40:1–6.

RIBEIRO KR, Guarnieri MH, Da Costa DC, Costa FF, Pellegrino Jr J, 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 Sanguinis* 2009;97:147–52.

RIOS M, Cash K, Strupp A, Uehlinger J, Reid M. DNA from urine sediment or buccal cells can be used for blood group molecular genotyping. *Immunohematology* 1999;15:61–5.

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

ROZMAN P, Dovc T, Gassner C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion* 2000;40:936–42.

SANGER R, Race RR, Jack J: The Duffy blood groups of New York negroes: The phenotype Fy(a–b–). *Br J Haematol* 1955; 1:370 –374.



- SALZANO F.M., Weimer, T.A., Franco, M.H.L.P., Callegari-Jacques, S.M., Mestriner, M.A., Hutz, M.H., Santos, R.V. & Coimbra Jr., C.E.A. Protein genetic studies among the Tupi-Mondé Indians of the Brazilian Amazonia. *Am. J. Hum. Biol.* 10: 711-722, 1998.
- SCHNABEL R.B., J. Baumert, M. Barbalic, J. Dupuis, P.T. Ellinor, P. Durda, A. Dehghan, et al., Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) poly-morphism regulates circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators, *Blood* 115 (2010) 5289e5299, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-05-221382>.
- SCHONEWILLE H, van de Watering LM, Loomans DS, Brand A. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. *Transfusion.* 2006;46(2):250-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00708.x>.
- SCHONEWILLE H, Haak HL, van Zijl AM. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion.* 1999;39(7):763-71.
- SHIMIZU Z., M. Liu, W. An, X. Liang, W. Yu, F. Piao, A new method for analyzing the duffy blood group genotype by TaqMan minor groove binding probes, *J. Clin. Lab. Anal.* 29 (2015) 203e207, <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.21751>.
- SOUSA T. N., Sanchez, B. A. M., Cerávolo, I. P., Carvalho, L. H. & Brito, C. F. A. Real-time multiplex allele-specific polymerase chain reaction for genotyping of the Duffy antigen, the Plasmodium vivax invasion receptor. *Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd., Vox Sanguinis* (2007) 92, 373–380.
- SPIELMANN W, Seidl S. Prevalence of irregular red cell antibodies and their significance in blood transfusion and neonatal care. *Vox Sang.* 1974;26(6):551-9.
- TOURNAMILLE C., Colin, Y., Cartrom, J.P.&Kim, C.L.V. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nature Genet* 10:224-228, 1995.
- TOURNAMILLE C, Le Van Kim C, Gane P, et al. Arg89Cys sub-stitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fyx individuals (erratum in 95:2753). *Blood* 1998;92:2147-56.
- UGWU NI, Awodu OA, Bazuaye GN, Okoye. Red cell alloimmunization in multi-transfused patients with sickle cell anemia in Benin City, Nigeria. *Niger J Clin Pract.* 2015;18(4):522-6. <http://dx.doi.org/10.4103/1119-3077.154204>.
- VICHINSKY EP. Current issues with blood transfusions in sickle cell disease. *Semin Hematol* 2001;38:14–22.
- WILLIAMS D, Johnson CL, Marsh WL: Duffy antigen changes on red blood cells stored at low temperature. *Transfusion* 1981; 21:357–359.



WESTHOFF CM. Molecular testing for transfusion medicine. *Curr Opin Hematol* 2006;13:471–5.

WENK RE, Chiafari PA. DNA typing of recipient blood after massive transfusion. *Transfusion* 1997;37:1108–10.

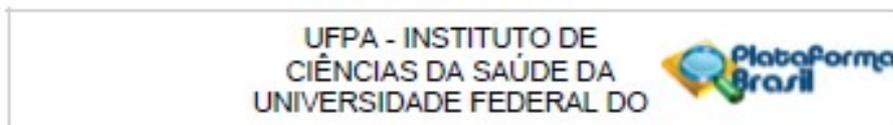
YAZDANBAKHS K., Rios, M., Storry, J.R., Kosower, N., Parasol, N., Chaudhuri, A., and Reid, M.E. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *TRANSFUSION* Volume 40, March 2000.

YAZDANBAKHS K. Mechanisms of sickle cell alloimmunization. *Transfus Clin Biol.* 2015;22(3):178-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.traci.2015.05.005>.

ZIMMERMAN PA, Woolley I, Masinde GL, et al. Emergence of FY\*Anull in a Plasmodium vivax endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13973-7.



## ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA CEP/UFPA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Genotipagem do sistema eritrocitário Duffy em pacientes que necessitam de politransusão atendidos no Hemocentro Coordenador no Estado do Pará.

**Pesquisador:** ANDERSON SALES DE BRITO

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 79445017.1.0000.0018

**Instituição Proponente:** Laboratório de Genética Humana e Médica - UFPA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.372.950

#### Apresentação do Projeto:

O estudo será desenvolvido no Laboratório de Genética Médica da Universidade Federal do Estado do Pará (UFPA), do tipo transversal, descritivo em pacientes que necessitam ou podem necessitar de politransusão, independente de sexo, idade, histórico transfusional e presença de alo/auto-anticorpos antieritrocitários.

#### Objetivo da Pesquisa:

Realizar genotipagem do grupo sanguíneo Duffy em amostras biológicas de pacientes politransfundidos ou com diagnóstico de doenças que necessitam de transfusões recorrentes de modo a permitir transfusões fenótipo compatíveis e consequentemente evitar reações transfusionais, aloimunizações e uso de hemocomponentes fenótipos raros de forma desnecessária.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

##### Riscos:

A descrição apresentada pelo proponente em seu projeto de pesquisa indica como risco que, em decorrência da punção venosa para obtenção da amostra poderá ocorrer dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmalo ou infecções no local de punção podem

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-Sí do ICS 13 - 2º and.  
Belém: Campus Universitário do Guamá CEP: 66.075-110  
UF: PA Município: BELEM  
Telefone: (91)3201-7735 Fax: (91)3201-8026 E-mail: cepcc@ufpa.br

Página 01 de 03



## ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA CEP/UFPA

Continuação

UFPA - INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 2.572.850

ocorrer. Todavia o procedimento, segundo afirma o proponente, não será realizado pelos pesquisadores, pois será realizado pela Instituição parceira durante o atendimento ambulatorial que prevê coleta da amostra biológica de rotina.

**Benefícios:**

Através das análises realizadas, será possível validar e aplicar a técnica de biologia molecular na rotina Imuno-hematológica, permitindo transfusão fenótipo compatível, evitando reações transfusionais, aloimunizações e uso de hemocomponentes fenótipos raros de forma desnecessária de futuros receptores.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Serão incluídos na pesquisa os pacientes que preencherem os critérios de elegibilidade atendidos no Hemocentro Coordenador do Pará (Fundação Hemopa), cujas amostras tenham sido encaminhadas para o laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Estado do Pará.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Atende às exigências para esse tipo de pesquisa.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto somos pela aprovação do protocolo. Este é nosso parecer, SMJ.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1001777.pdf	24/10/2017 22:27:57		Aceito
Outros	AUTORIZACAO_LABORATORIO.pdf	24/10/2017 22:25:25	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito
Outros	CARTA_ENCAMINHAMENTO.jpg	24/10/2017 22:25:26	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_COMPLETO.pdf	03/10/2017 20:19:35	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito
Outros	ANEXOIII_FLUXOGRAMA.pdf	03/10/2017 20:07:49	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito

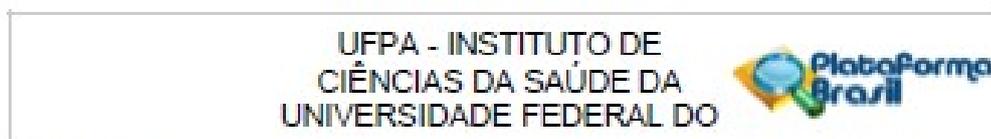
Endereço: Rua Augusto Correa nº 01-SI do ICS 13 - 2ª and.  
Belém: Campus Universitário do Guamá CEP: 66.075-110  
UF: PA Município: BELÉM  
Telefone: (91)3201-7735 Fax: (91)3201-8025 E-mail: cepce@ufpa.br

Página 02 de 03



**ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA CEP/UFPA**

**Continuação**



Continuação do Parecer: 2-373-893

Outros	ANEXOII_FLUXOGRAMA.pdf	03/10/2017 20:07:20	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito
Outros	TERMO_ACEITE.pdf	03/10/2017 20:05:18	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito
Outros	AUTORIZACAO_NEPES.pdf	03/10/2017 20:04:23	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOI_DISPENSA.pdf	03/10/2017 20:03:03	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_COMPROMISSO.pdf	03/10/2017 20:01:52	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biobanco	AMOSTRA_BIOLOGICA.pdf	03/10/2017 20:01:30	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	03/10/2017 20:00:58	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO.pdf	03/10/2017 20:00:04	ANDERSON SALES DE BRITO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 09 de Novembro de 2017

Assinado por:

Wallace Raimundo Araujo dos Santos  
(Coordenador)

Endereço: Rua Augusto Correa nº 01-61 do ICS 13 - 2º and.  
 Bairro: Campus Universitário do Guamá CEP: 66.075-110  
 UF: PA Município: BELEM  
 Telefone: (91)3201-7736 Fax: (91)3201-8028 E-mail: cepcos@ufpa.br

Página 03 de 03