



APLICAÇÕES DA BIOLOGIA MOLECULAR
EM IMUNOHEMATOLOGIA ERITROCITÁRIA

DRA LILIAN CASTILHO

GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGÜÍNEOS

Os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados pela presença ou ausência de antígenos na membrana eritrocitária. Estes antígenos possuem características polimórficas bem definidas como parte integrante dos componentes da membrana.

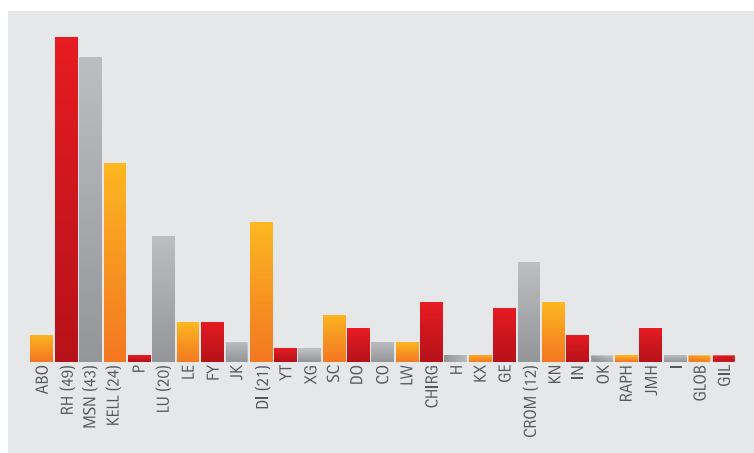
Os antígenos eritrocitários são herdados geneticamente e definidos por seqüências de aminoácidos específicas constituindo uma proteína ou por carboidratos ligados a estas proteínas ou a lipídios. A diversidade dos antígenos de grupos sanguíneos, como para qualquer outro traço biológico, encontra-se ao nível do gene.

Existem atualmente 303 antígenos eritrocitários distribuídos em 29 sistemas de grupos sanguíneos, séries e coleções, de acordo com a Nomenclatura da Sociedade Internacional de Transusão Sangüínea (ISBT). Os sistemas Rh, MNS e Kell são os mais complexos, contendo 49, 46 e 30 antígenos respectivamente (Figura 1). Os genes que codificam 28 das proteínas que contêm os antígenos de grupos sanguíneos já foram sequenciados.

O gene que codifica os antígenos do sistema P, apesar de já ter sido atribuído ao cromossomo específico, ainda não foi clonado. Os problemas que ainda não são resolvidos por testes sorológicos podem ser agora solucionados por técnicas moleculares.

Os polimorfismos de grupos sanguíneos originam-se predominantemente de mutações de ponto, principalmente os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) mas, recombinações gênicas, deleções e inserções também ocorreram ao longo da evolução dos genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos.

Figura 1: Sistemas de grupos sanguíneos (número de antígenos)



A ocorrência natural de fenótipos variantes dos antígenos eritrocitários, principalmente nos sistemas ABO, Rh e MNS, pode causar alterações qualitativas e quantitativas na expressão dos antígenos na membrana dos eritrócitos, o que contribui para aumentar a complexidade destes sistemas.

O conhecimento dos antígenos eritrocitários é essencial na prática transfusional, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos contra estes antígenos pode se tornar um grande problema na clínica, principalmente em casos onde os pacientes são portadores de hemoglobinopatias ou outras doenças que requerem transfusões sangüíneas periódicas.

A utilização das ferramentas de biologia molecular tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da Imunohematologia, 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 sangüíneos, onde as técnicas moleculares suprem as deficiências das técnicas de hemaglutinação, principalmente na fenotipagem de pacientes com transfusão recente, quando há hemácias do doador na circulação do receptor e, em pacientes com autoanticorpos.

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 este método tenha contribuído para importantes avanços na caracterização molecular dos antígenos de grupos sangüíneos, esta poderosa ferramenta só é utilizada em pequena escala, para resolução de casos isolados. Uma vez que para cada paciente ou doador analisado, dezenas de alelos diferentes devem ser pesquisados para garantir a eficiência da análise, o que desencadeia a execução de diversas técnicas de PCR para cada amostra.

A alternativa para a resolução pontual destes conflitos seria a aplicação de técnicas moleculares que permitem o trabalho em larga escala (tecnologia Microarray), ou seja, a triagem automatizada dos SNPs de grupos sangüíneos em doadores de sangue, possibilitando uma compatibilidade exata entre doadores e receptores.

O uso da tecnologia Microarray para genotipagem em larga escala, através da elucidação de SNPs, pode fornecer importantes informações sobre o perfil molecular completo dos antígenos eritrocitários de grupos sangüíneos. Uma vez que, diante do grande número de amostras analisadas, maiores serão as chances de serem encontrados novos SNPs e ou mutações nos genes que codificam estes antígenos, aumentando desta forma, o conhecimento científico das bases moleculares dos sistemas de grupos sangüíneos e o perfil destes genes nas diferentes populações.

A genotipagem de grupos sangüíneos em larga escala pode também ser útil para a criação de bancos de dados eletrônicos de doadores com características raras, o que permitiria a troca de amostras de sangue fenotipado entre os bancos de sangue associados, possibilitando a identificação de doadores mais compatíveis com os pacientes em tempo reduzido, permitindo a determinação de vários polimorfismos em uma única reação com redução de tempo e custo.

O objetivo desta apostila é apresentar os mecanismos moleculares responsáveis pelo aparecimento dos antígenos associados aos fenótipos de grupos sangüíneos; mostrar as aplicações das técnicas moleculares em Imunohematologia e discutir os problemas clínicos que potencialmente podem ser resolvidos.

INTRODUÇÃO A GENÉTICA MOLECULAR

Gene – Sequências de DNA que contém o código genético para síntese de proteínas, composto de regiões que codificam aminoácidos (exons) e regiões não traduzidas em aminoácidos (introns). O genoma humano consiste de 46 cromossomos: 22 pares de autossomos e 1 par de cromossomo sexual (XX em mulheres e XY em homens). Um cromossomo é uma longa fita de DNA que contém o código genético do indivíduo.

Polimorfismo – Mudança (substituição ou deleção) de parte do gene (nucleotídeo, codon ou sequências maiores) e conseqüente alteração da proteína para o qual codifica. No processo de tradução do código genético em proteína, o DNA é transcrito em RNA primário e os introns são removidos por um processo específico denominado “splicing” (região de cisão de intron) para gerar o RNA mensageiro (mRNA). O mRNA é então traduzido por um ribossomo em séries de aminoácidos para formar uma proteína.

Cada três bases (codon) na fita de mRNA codifica um aminoácido (ex.: AAG é o código para lisina enquanto AAC é o código para asparagina) ou um sinal de terminação (UAA, UAG, UGA).

Propriedades do DNA – O DNA é composto de 2 fitas de nucleotídeos pareadas e entrelaçadas de forma a compor a famosa dupla hélice. Cada fita de DNA é composta de apenas 4 nucleotídeos (bases), sendo duas purinas: **adenina (A)** e **guanina (G)** e duas pirimidinas: **citocina (C)** e **timina (T)**. Estas bases se alinham de forma específica e complementar: G à C e A à T. O código genético é determinado pela seqüência destas 4 bases ao longo da fita de DNA.

O estado inicial do DNA é uma fita dupla. Durante o processo biológico de duplicação do cromossomo, que antecede a divisão celular, e na transcrição do gene em RNA, que antecede a síntese protéica, as fitas de DNA se separam (desnaturação) para serem copiadas. Após este evento (transcrição ou duplicação do cromossoma) o DNA retorna ao estado nativo (as fitas se hibridizam novamente). O processo de desnaturação observado nas situações biológicas acima mencionadas, pode ser induzido in vitro, por tratamento do DNA com solução alcalina ou por aquecimento. E assim, como na situação biológica, o processo de desnaturação é revertido por correção do pH ou redução da temperatura.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – A técnica de PCR utiliza os princípios de **Hibridização** específica, **Orientação** definida, **Desnaturação** e **Restauração** ao estado nativo para aumentar uma seqüência específica de um gene. Na técnica de PCR, para amplificação de um segmento específico de DNA, primers (oligonucleotídeos sintéticos) ou sondas alelo-específicas são utilizados na reação de cadeia. Cada ciclo de amplificação consiste de: 1. **Desnaturação** da dupla fita de DNA por aquecimento; 2. **Hibridização** dos primers com a utilização de uma seqüência específica de nucleotídeos da fita de DNA complementar (anelamento); 3. **Extensão** dos primers pela ação da Taq DNA polimerase através da adição de nucleotídeos livres complementares à fita de DNA original. A seguir, a nova dupla fita de DNA formada serve como fita original para os subsequentes ciclos, gerando assim uma escala geométrica de amplificação.

MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS COM OS GRUPOS SANGÜÍNEOS

O sequenciamento dos genes que codificam os sistemas de grupos sangüíneos levou a um grande progresso no entendimento dos mecanismos moleculares associados à diversidade dos antígenos de grupos sangüíneos. Estes mecanismos são **substituições de um único nucleotídeo (SNPs); deleção; inserção; mecanismos de splicing alterados; crossing over intragênico; crossing over intergênico; conversão gênica ou outros rearranjos gênicos.**

SNPs (polimorfismos com substituição de um único nucleotídeo):

Substituição de um único nucleotídeo na região codificadora do gene (por exemplo um G para um A). Esta substituição pode determinar três efeitos: 1. nenhuma alteração no aminoácido determinado pelo codon (mutação silenciosa); 2. uma mudança na identidade do aminoácido codificado (mutação “missense”) e 3. conversão de um codon que especifica um aminoácido em um codon de terminação (mutação sem sentido de transcrição ou “nonsense”). A maioria dos antígenos de grupos sangüíneos antitéticos surge de mutações “missenses”. Exemplos de mutações “nonsenses” são os sistemas Duffy e o Colton.

Deleção: Perda de um único nucleotídeo ou um segmento de DNA. Uma deleção de nucleotídeos em múltiplos de três na seqüência do DNA (in frame) alterará o codon de tradução e resultará na ausência de um ou mais aminoácidos e, provavelmente, codificará uma proteína com características diferentes.

Uma deleção de três nucleotídeos não seqüenciais na estrutura do DNA (out of frame), ou em múltiplos outros que não três (1, 2, 4, etc.), resultará na alteração de toda a seqüência do mRNA. Uma nova seqüência de aminoácidos e um novo “stop codon” (codon de terminação) e, conseqüentemente determinará a produção de uma proteína mutante inativa. Alguns fenótipos de grupos sangüíneos “nulls” surgem em conseqüência da deleção de nucleotídeos, exons ou gene. Exemplos: Jk(a-b), U- e D--.

Inserção: Adição de um único nucleotídeo ou segmento de DNA. A semelhança da deleção a inserção de um nucleotídeo numa determinada seqüência de DNA podem causar uma alteração no codon de tradução do DNA. Exemplo: Co(a-b-).

Splicings alterados: A remoção de introns (outsplicing) é um processo bem definido. Este processo obedece sinais codificados por motivos específicos chamados de “sítios de splice”. O sítio doador de splice é sempre a seqüência GT e corresponde aos dois primeiros nucleotídeos da região 5’ de cada intron. O sítio receptor de splice é sempre a seqüência AG e corresponde aos dois últimos nucleotídeos da região 3’ de cada intron. Em alguns casos, os dois últimos nucleotídeos da região 3’ do exon também podem estar envolvidos neste processo. Uma mudança de um único nucleotídeo em um destes sítios, pode alterar o splicing de forma a gerar a retirada do exon anterior ou posterior ao sítio, dependendo se esta mutação ocorreu no sítio doador ou receptor de splice. O fenótipo Jk(a-b-) é um exemplo deste mecanismo.

Translocação cromossômica: Transferência de segmento de um cromossomo para outro cromossomo não homólogo. Isto, pode ocorrer em certas doenças (leucemia, linfoma e fibrose mieloproliferativa), onde partes de um cromossomo são realocadas em outro cromossomo. Exemplos de antígenos de grupos sanguíneos que podem ser alterados por este mecanismo são: A, B, H, D, M e N.

Crossing over: Troca recíproca de partes de um gene entre cromossomos homólogos. Isto, pode ocorrer durante a meiose, se o mesmo gene tiver áreas homólogas alinhadas (crossover intragênico) ou se dois genes altamente homólogos desalinham (crossover intergênico).

O crossing over intragênico foi descrito no gene GYPC que pode apresentar um gene com dupla cópia do exon 2 ou um gene com duas cópias do exon 3. Os produtos recíprocos são genes que perdem o exon 2 ou o exon 3.

O crossing over intergênico ocorre nos sistemas de grupos sanguíneos MNS, Rh e Ch/Rg, que são codificados por 2 genes homólogos adjacentes num mesmo cromossomo. Vários exemplos no sistema MNS aparecem em arranjos Lepore e anti-Lepore. Genes Lepore tipo híbridos surgem em um cromossomo sem a presença dos genes nativos. Ao contrário, os genes anti-Lepore híbridos ocorrem num cromossomo entre uma cópia dos genes pais. Em ambos os casos, novas seqüências de aminoácidos na junção das proteínas híbridas são reconhecidas como antígenos de grupos sanguíneos discretos.

Conversão gênica e outros rearranjos: Processo de reparo do DNA que ocorre durante a primeira divisão da meiose. Na fase de recombinação, fitas duplas de DNA são formadas como uma consequência de pareamento e recombinação entre alelos não idênticos nos dois cromossomos. A conversão gênica ocorre quando o sistema de reparo do DNA remove uma das fitas de uma região não apropriadamente pareada e a corrige de acordo com a fita de DNA restante. Uma vez que somente uma fita de DNA é envolvida neste processo, o produto não tem um parceiro recíproco. Em grupos sanguíneos, a conversão gênica foi descrita nos sistemas Lu, MNS e Rh. Outros rearranjos incluem complexos híbridos nos quais os mecanismos envolvidos não foram ainda determinados.

ANÁLISES MOLECULARES

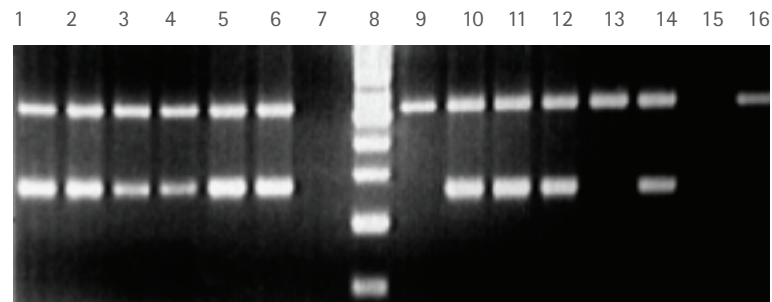
A genotipagem molecular pode ser realizada sempre que a seqüência de um gene for conhecida e que as mutações responsáveis por um antígeno ou fenótipo de grupo sanguíneo tenham sido determinadas. Os protocolos de PCRs comumente utilizados na determinação de antígenos de grupos sanguíneos são: primers alelo-específicos (AS-PCR) e PCR seguido por análises dos fragmentos com enzimas de restrição (PCR-RFLP).

Atualmente tem merecido destaque também a técnica de Microarray ou tecnologia Chip, por possuir uma plataforma rápida de genotipagem (diversas amostras ao mesmo tempo) com excelente discriminação alélica, redução no número de procedimentos isolados (execução de um único PCR multiplex) e resultado altamente automatizado.

TÉCNICA DE PCR ALELO-ESPECÍFICA

A técnica de PCR alelo-específica utiliza dois diferentes primers, requerendo assim duas amplificações independentes. Devido a isto, torna-se importante monitorar a eficiência da amplificação, realizando-se uma co-amplificação de uma seqüência não relacionada como um controle interno. A amplificação de um controle interno indica a ausência de substância inibidora no tubo da reação (Figura 2). Os protocolos alelo-específicos necessitam de cuidado e atenção. Eles podem não ser eficientes quando dois alelos diferem em apenas um nucleotídeo. Este método tem grande aplicação na tecnologia Chip.

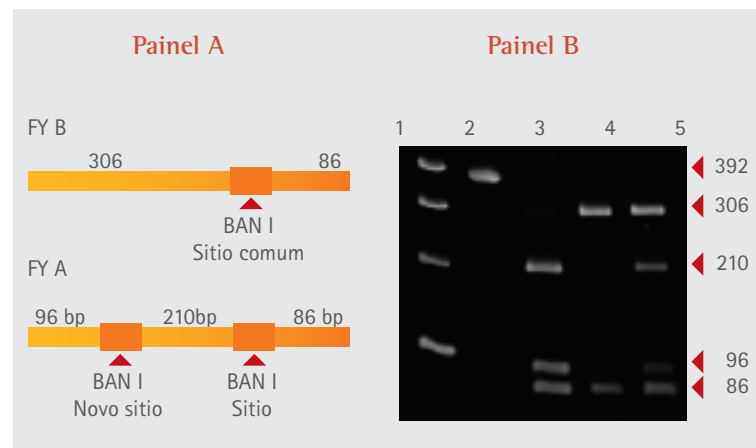
Figura 2: Produto de PCR alelo específico após eletroforese em gel de agarose



TÉCNICA DE PCR-RFLP

A técnica de PCR-RFLP só pode ser realizada quando a mutação polimórfica estiver associada com a alteração (produção ou remoção) de um sítio de enzima(s) de restrição. A vantagem deste procedimento é possibilitar a amplificação concomitante de ambos alelos com um único par de primers. Assim, uma reação positiva (produto de PCR amplificado) é observada com ambos os alelos, que servem como um controle interno. A diferenciação dos alelos é feita depois da digestão do produto de PCR com uma enzima de restrição, capaz de identificar a mutação de ponto e, após eletroforese, para a melhor visualização do tamanho dos fragmentos (Figura 3).

Figura 3: Diferenciação dos alelos pelo tamanho dos fragmentos em gel de poliacrilamida após digestão enzimática



Painel A – Representação esquemática das seqüências amplificadas dos alelos FY B e FY A. Os tamanhos dos fragmentos obtidos na diferenciação dos dois alelos após digestão com a enzima de restrição Ban I. As localizações dos sítios comuns presentes apenas no alelo FY A estão representadas por uma caixa sobre a barra representando a seqüência.

Painel B – Fotografia de um gel de poliacrilamida após eletroforese do produto de PCR submetido a digestão enzimática.

Pista 1 – Marcador molecular (100 pb ladder).

Pista 2 – O produto amplificado não tratado com a enzima Ban I.

Pista 3 – Padrão observado do produto amplificado de amostra homocigota para FY A (FY A/FY A) tratado com a enzima Ban I.

Pista 4 – Padrão observado do produto amplificado de amostra homocigota para FY B (FY B/FY B) tratado com a enzima Ban I.

Pista 5 – Padrão observado do produto amplificado de amostra heterocigota (FY A/FY B) tratado com a enzima Ban I.

TÉCNICA DE MICROARRAY

A técnica de Microarray utiliza um PCR multiplex que possibilita a análise de vários polimorfismos simultaneamente e sondas de oligonucleotídeos depositadas em uma placa (vidro, sílica ou outros suportes) marcadas com fluorescência e hibridizadas com DNAs alvo (amplificados através do PCR multiplex), gerando um espectro de cor (caso haja a hibridização) que é detectado e interpretado por um sistema automatizado capaz de avaliar a intensidade das hibridizações e fornecer resultados que podem ser visualizados na forma de gráficos ou tabelas de genótipos (Figuras 4 e 5).

A rapidez e a confiabilidade de resultados proporcionados por esta tecnologia aumentarão a exatidão da compatibilidade entre doador e receptor, bem como a segurança das transfusões.

Figura 4: Esquema do Microarray (BeadChip™, Bioarray Solutions)

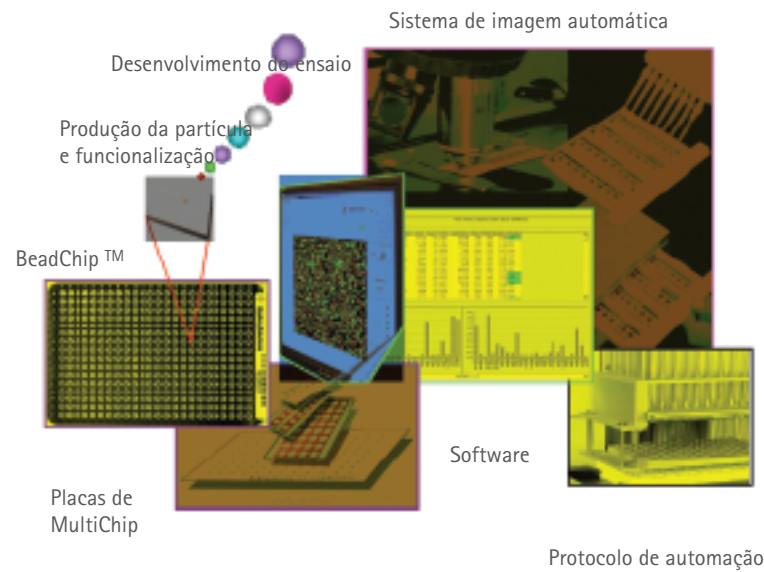
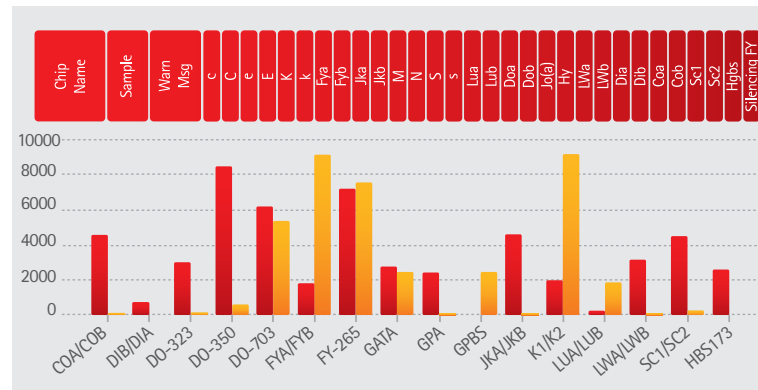


Figura 5: Análise dos dados (BeadChip™, Bioarray Solutions)

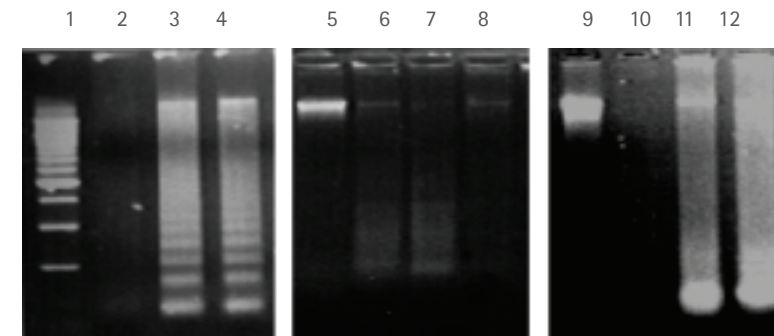


EFICIÊNCIA DA AMPLIFICAÇÃO DO DNA

A eficiência da amplificação do DNA pode ser afetada por dois fatores: a. qualidade e quantidade de DNA; b. Condições físico-químicas.

a. Qualidade e quantidade de DNA – Considerando que a qualidade e a quantidade do DNA são críticas para a amplificação é extremamente importante realizar análises qualitativas e quantitativas dos DNA(s) extraídos. A quantidade de DNA é determinada pela leitura de densidade óptica seguido do seguinte cálculo: concentração de DNA = absorvância a 260nm x diluição x 50 (fator para DNA) em µg/ml. Alternativamente, a quantidade de DNA pode ser estimada através da comparação com padrões de concentrações conhecidas após eletroforese em agarose, enquanto que a qualidade pode ser avaliada através da corrida do DNA em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Figura 6).

Figura 6 – Análise qualitativa de DNA em gel de agarose a 1%



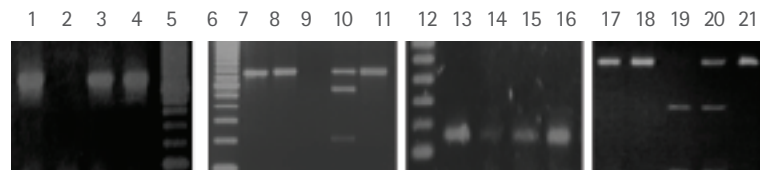
Pista 1 - marcador molecular
 Pista 2 - DNA extraído de célula bucal
 Pista 3 e 4 - DNA degradado
 Pista 5 - Padrão 100 ng
 Pista 6 e 7 - Pobre em DNA
 Pista 8 - DNA em baixa concentração
 Pista 9 - DNA em boas condições
 Pista 10 - DNA em baixa concentração
 Pista 11 e 12 - DNA degradado

A eficiência de amplificação de seqüências longas é mais vulnerável em amostras de DNA degradado do que a amplificação de seqüências mais curtas. O balanço da quantidade de DNA é importante pois DNA em excesso pode resultar em amplificação inadequada. Em amostras contendo DNA degradado é aconselhável a comparação da intensidade da banda correspondente ao DNA genômico na estimativa da quantidade de DNA a ser usada por reação.

b. Condições físico-químicas: A eficiência da amplificação de DNA pelo PCR é diretamente influenciada por fatores como a concentração dos reagentes (MgCl₂, primers, enzima e seu tampão) e pelo número e condições dos ciclos de amplificação. Portanto, há necessidade da inclusão de um controle interno na realização deste procedimento. A otimização das condições do PCR é ainda mais crítica quando as amostras de DNA a serem analisadas apresentarão concentrações baixas e/ou qualidade inadequada.

A Figura 7 mostra a eficiência da amplificação comparada com a qualidade de DNA e o tamanho do produto amplificado para determinação de antígenos Kell (K/k). Nos géis 1 (PCR) e 2 (RFLP), o produto amplificado é de 720 pares de base (bp). Nos géis 3 (PCR) e 4 (RFLP) o produto amplificado é de 156 bp. A mesma amostra de DNA (pobre em qualidade) foi utilizada nas pistas 2 (PCR), 9 (RFLP), 14 (PCR) e 19 (RFLP). O efeito da qualidade do DNA na amplificação foi amenizado pela redução do tamanho do produto amplificado.

Figura 7: Eficiência da amplificação comparada com a qualidade de DNA e o tamanho do produto amplificado



APLICAÇÕES CLÍNICAS DA GENOTIPAGEM MOLECULAR

1. Identificação de risco na Doença Hemolítica Peri-Natal (DHPN) – Testes de hemaglutinação, incluindo a titulação de anticorpos anti-eritrocitários, dão apenas uma indicação indireta da possibilidade de ocorrência da DHPN. Este fato, ocorre particularmente nos casos de mães com anticorpos dirigidos à antígenos do sistema Kell. Apesar do genótipo fornecer informações diretas, os critérios para obtenção dos amniócitos devem ser bem estabelecidos. A genotipagem é indicada nos casos em que a mãe possui um anticorpo da classe IgG clinicamente significativa e o pai heterozigoto para o antígeno em questão ou desconhecido. Atualmente é possível realizar a genotipagem fetal através da amostra de plasma materno (método não invasivo para o feto), pois foi demonstrado que o DNA fetal livre encontrado na circulação materna, cuja concentração aumenta durante a gestação, pode ser utilizado para realização da genotipagem de grupos sanguíneos.

A possibilidade de realizar genotipagem RHD fetal através do plasma materno terá um grande impacto na identificação das gestantes RhD-negativo que necessitam de imunoglobulina Rh e também no monitoramento da gestação de mães sensibilizadas pelo antígeno RhD que estão gerando um feto RhD positivo.

2. Teste direto da antiglobulina positivo – Nas situações em que as hemácias estão revestidas com anticorpos da classe IgG, a genotipagem tem um papel importante na determinação dos antígenos de grupos sanguíneos, pois a maioria dos antissoros utilizados para a fenotipagem são reativos pelo teste da antiglobulina. A utilização da genotipagem nestes casos pode auxiliar na determinação do perfil antigênico do paciente e possibilitar a realização de transfusão fenótipo compatível.

3. Pacientes com transfusão recente – Estudos mostram que a presença de leucócitos nos produtos de sangue transfundidos não interfere na genotipagem de grupos sanguíneos. Assim, pacientes politransfundidos com transfusão recente podem ser genotipados para determinação do seu perfil antigênico, possibilitando transfusões fenótipo compatível.

4. Processo de identificação de anticorpos – A genotipagem pode ser um método de auxílio na identificação de anticorpos de pacientes politransfundidos, pois através dela é possível deduzir o fenótipo e confirmar a suspeita do aloanticorpo presente.

5. Confirmação de discrepâncias ABO e Rh – Algumas situações clínicas e a utilização de diferentes anti-soros nas rotinas de Imunohematologia podem levar a discrepâncias nos fenótipos ABO e Rh. Estas discrepâncias podem atualmente ser facilmente solucionadas através dos testes moleculares que independem da disponibilidade de soros para a confirmação do fenótipo presente.

6. Determinação da zigozidade do antígeno RhD – A zigozidade do antígeno RhD, impossível de ser determinada sorologicamente, pode ser realizada por técnicas moleculares. Esta genotipagem tem sido de grande auxílio na identificação da zigozidade RhD em pais de fetos gerados por mães RhD-negativo e na constituição dos painéis de hemácias.

7. Determinação de antígenos fracos – Antígenos fracamente expressos na membrana eritrocitária como Fyx, evar e outros podem ser seguramente determinados pela genotipagem.

8. Confirmação dos antígenos D fraco e D parcial – A genotipagem tem sido de grande auxílio na confirmação dos antígenos D fraco e D parcial, bem como na determinação dos tipos de D fraco e tipos e categorias de D parcial, muitas vezes impossível de identificar sorologicamente.

9. Determinação de microquimerismo em pacientes transplantados – É possível selecionar um marcador genético de grupos sanguíneos através da genotipagem eritrocitária em doadores e receptores de transplante de medula óssea e avaliar o quimerismo após o transplante.

10. Testes em medicina legal – Paternidade e testes forenses podem ser realizados através da genotipagem molecular com maior chance de resolução.

11. Disponibilidade de sangue para pacientes dependentes de transfusão – A genotipagem molecular tem sido utilizada para identificar pacientes com fenótipo Fy(b-) que podem ser transfundidos com hemácias Fy(b+) sem o risco de desenvolverem anticorpos anti-Fyb. Dois terços da população Africana com fenótipo Fy(a-b-) possuem o gene FYB com uma mutação no promotor eritróide (GATA-1) que leva a ausência de expressão da proteína Duffy e, conseqüentemente, do antígeno Fyb na superfície das hemácias. No entanto, a proteína é expressa em outros tecidos, como por exemplo, nas células do endotélio de vasos sanguíneos.

LIMITAÇÕES

Apesar da genotipagem complementar os testes de hemaglutinação, o genótipo de uma pessoa pode não correlacionar com o fenótipo. Portanto, os resultados devem ser cuidadosamente interpretados, principalmente na aplicação clínica. Existem situações onde a genotipagem detecta a presença de um gene que não é expresso e, portanto, a proteína não vai para a superfície das hemácias. Exemplos:

1. Fenótipos nulls de grupos sanguíneos como Rhnull, K0, Fy(a-b-), Jk(a-b-), LW(a-b-) e o fenótipo Leach possuem um gene aparentemente normal, mas a proteína que carrega o antígeno não é expressa. Há também alguns antígenos de grupos sanguíneos que só são expressos se uma proteína de interação codificada por outro gene for co-expressa. Neste caso, as proteínas estão ausentes das membranas das hemácias como uma conseqüência de uma mutação no gene que codifica uma proteína de interação. Mudanças no gene XK enfraquecem a expressão dos antígenos do sistema Kell; mudanças no gene que codifica a glicoproteína Rh (Rh50) impedem RhD e RhCE de interagirem na membrana da hemácia e assim, os antígenos Rh não são expressos; mudanças no gene que codifica a Proteína 4.1 resultam na perda da Glicoforina C da membrana e, conseqüentemente, no enfraquecimento dos antígenos Ge (Figura 8).
2. Existem também proteínas que são expressas em baixo número de cópias e portanto são difíceis de detecção como por exemplo o antígeno Fyx (Figura 9).
3. Moléculas híbridas formadas a partir de genes idênticos que desalinham durante a meiose podem levar a resultados falso-positivos ou falso-negativos se os primers selecionados hibridizarem a área envolvida. A análise por PCR demonstra a presença de uma pequena parte do gene e não necessariamente informa se o gene inteiro está presente ou se o antígeno é expresso. A Figura 10 mostra a formação de um gene híbrido no sistema MNS.

Figura 8: interação de proteínas na membrana do eritrócito

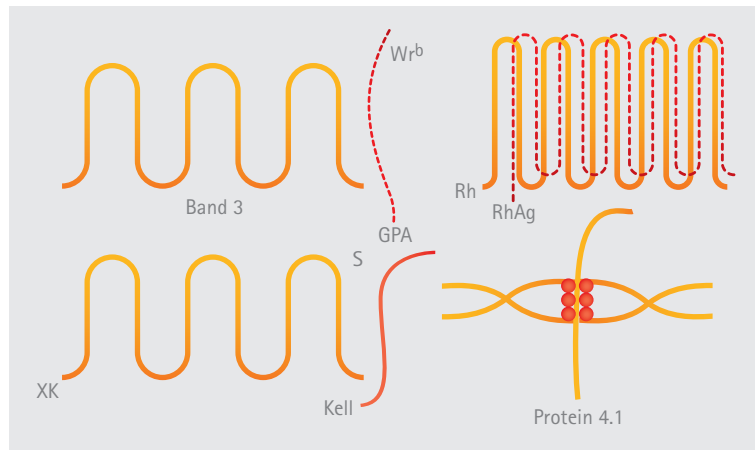


Figura 9: interação de proteínas na membrana do eritrócito

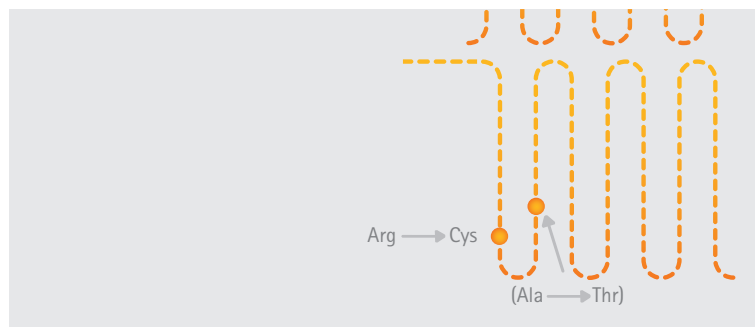
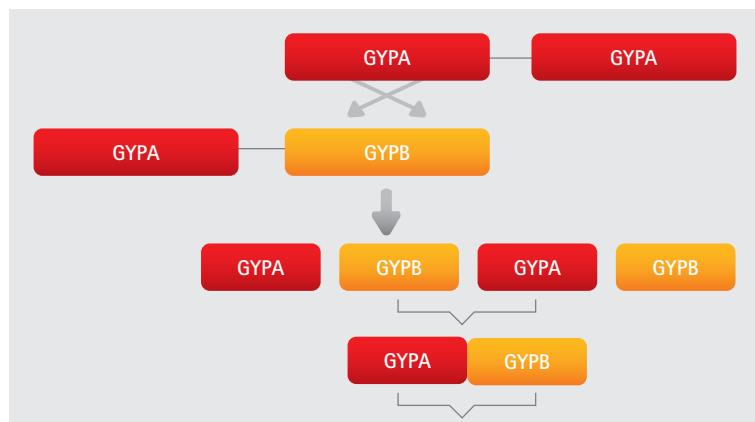


Figura 10: Formação de gene híbrido (GYPA/GYPB) após crossing over



COMENTÁRIOS

Pelo fato dos antígenos de grupos sanguíneos estarem presentes na parte externa da membrana eritrocitária eles são extremamente importantes na medicina transfusional, uma vez que a perda de um antígeno pode levar à aloimunização de um indivíduo após transfusão de hemácias com o respectivo antígeno e aumentar seu risco transfusional nas transfusões subsequentes. Os testes pré-transfusionais têm historicamente evitado estas reações transfusionais, que podem variar de moderada a fatal. Recentemente, os avanços tecnológicos em diagnóstico molecular têm permitido identificar a presença ou ausência de uma determinada sequência gênica que codifica para uma proteína específica.

As fontes de DNA alternativas aos leucócitos, tais como: células epiteliais do trato urinário e da mucosa bucal são de grande valor em pacientes dos quais não se consegue coletar sangue. No entanto, é importante lembrar que se um paciente tiver sido transplantado com células alogênicas ou stem cells, pode ocorrer discrepância entre os resultados dos genótipos realizados em DNAs obtidos de diferentes fontes. Por exemplo, o resultado da genotipagem com DNA de leucócitos pode ser diferente do daquele obtido com o DNA de células bucais ou sedimento urinário. Portanto, é fundamental obter a história clínica do paciente antes de selecionar adequadamente a fonte de DNA para a genotipagem.

A técnica de PCR é extremamente sensível, por isso, o risco de contaminação é grande e cuidados para evitar a contaminação devem ser rigorosamente observados. A área designada para preparo da amostra e pré-amplificação deve ser separada da área de análise pós-amplificação. Estantes, pipetas, ponteiras, tubos e soluções não devem ser transportados de uma área para outra. Os reagentes utilizados no PCR devem ser armazenados congelados em alíquotas. Quando há suspeita de contaminação deve-se desprezar os reagentes em uso e iniciar o procedimento com novas alíquotas. Recomenda-se também desinfetar periodicamente as estantes, pipetas, centrifugas. A possibilidade de realizar genotipagem em conjunto com hemaglutinação muda a gama de possibilidades nos procedimentos transfusionais, aumentando assim a segurança dos pacientes transfundidos. No entanto, é importante lembrar que a detecção de um gene através das técnicas de genotipagem molecular não significa necessariamente que a proteína carregando o antígeno será expressa. Assim, resultados falso-negativos e falso-positivos podem ocorrer. Resultados falso-negativos (com híbridos) são problemas: 1. na análise pré-natal, uma vez que a mãe pode não receber o acompanhamento necessário, o feto de risco não ser identificado; 2. na determinação de grupo sanguíneo de doador e um sangue positivo para o antígeno pode ser selecionado para um paciente que possui o anticorpo correspondente.

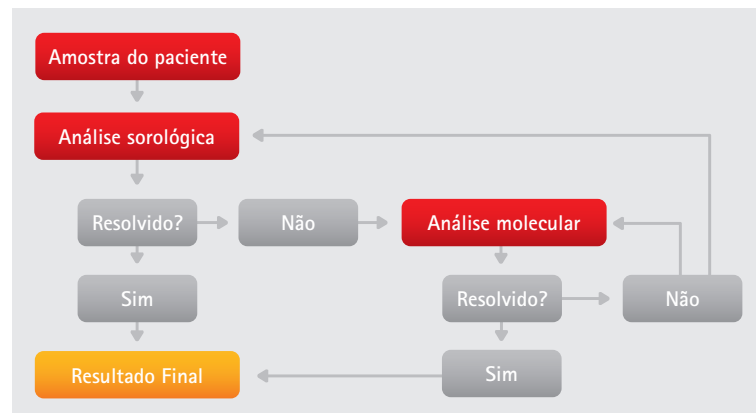
Os resultados falso-positivos são problemas na determinação de grupos sanguíneos de pacientes, uma vez que eles podem receber sangue contendo o antígeno.

A genotipagem de grupos sanguíneos pode contribuir, substancialmente, na qualidade da transfusão de sangue fenotipado, sobretudo em pacientes politransfundidos. No entanto, para se estabelecer protocolos seguros de genotipagem de grupos sanguíneos é importante realizar uma triagem sistemática dos alelos e variantes de uma determinada população. Um dos principais objetivos deste estudo é substituir com segurança as técnicas sorológicas atualmente empregadas nas rotinas de bancos de sangue. Embora muitos pesquisadores estejam trabalhando neste contexto, poucos dados foram publicados e várias populações ainda permanecem um mistério quanto a sua diversidade genética de grupos sanguíneos. A tecnologia baseada em microarrays tem sido avaliada para detecção de polimorfismos de grupos sanguíneos.

A esperança é que esta metodologia permita a realização da genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala de forma automatizada e rápida e que possa ser utilizada nas rotinas dos bancos de sangue. Embora seja pouco provável que a genotipagem molecular venha substituir a hemaglutinação nos próximos anos. Estas técnicas utilizadas em conjunto têm um valor potencial importante na segurança transfusional e materno-fetal (Figura 11).

Apesar da genotipagem complementar os testes de hemaglutinação, o genótipo de uma pessoa pode não correlacionar com o fenótipo. Portanto, os resultados devem ser cuidadosamente interpretados, principalmente na aplicação clínica. Existem situações onde a genotipagem detecta a presença de um gene que não é expresso e, portanto, a proteína não vai para a superfície das hemácias. Exemplos:

Figura 11: Testes moleculares caminham lado a lado com a hemaglutinação



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSTEE, D.J. Goodbye to agglutination and all that? *Transfusion*, 45:652-3, 2005

AVENT ND: Human erythrocyte antigen expression: its molecular bases. *British Journal of Biomedical Science* 54:16-37,1997

BALEOTTI JR W, RIOS M, REID ME, FABRON JR A, PELLEGRINO JR J, SAAD STO, CASTILHO L. A novel DI A allele without the band 3-Memphis mutation in Amazonian Indians. *Vox Sanguinis*, 84:326-330, 2003

BALEOTTI JR W, RIOS M, REID ME, FABRON JR A, PELLEGRINO JR J, CASTILHO L. Dombrock gene analysis in Brazilian people reveals novel alleles. *Vox Sang.* 91:81-87, 2006

BEIBOER, S.H.W; WIERINGA-JELSMA, T.; MAASKANT-VON WIJK, P.A.; van der SCHOOT, C.E.; van ZWIETEN, R.; ROOS, D.; den DUNNEN, J.T.; HAAS, M. Rapide genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion*, 45:667-79, 2005

CASTILHO L, PELLEGRINO Jr J, COSTA FF, MOTA M, HASHMI G, SEUL M, SHARIFF T, SONG Y, REID ME. BeadChip typing of blood groups and hemoglobinopathies in a population of highly diverse ancestry. *Transfusion*, 45(S):SP330, 2005

CARTRON JP, BAILLY P, LE VAN KIM C, CHERIF-ZAHAR B, MATASSI G, BERTRAND O, COLIN Y. Insights into the structure and function of membrane polypeptide carrying blood group antigens *Vox Sang* 1998; 74(suppl-2):29-64

CASTILHO L, RIOS M, PELLEGRINO JJR, CARVALHO MH, ALBERTO FL, SAAD STO, COSTA FF. Genotyping of Kell, Duffy, Kidd and RHD in patients with thalassemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 22: 69-76, 2000

CASTILHO L, RIOS M, BIANCO C, PELLEGRINO JJR, ALBERTO FL, SAAD STO, COSTA FF. DNA based typing of blood groups for the management of polytransfused sickle cell disease patients. *Transfusion*, 42:232-238, 2002

CASTILHO L, RIOS M, PELLEGRINO JJR, SAAD STO, COSTA FF. Blood group genotyping facilitates transfusion of thalassemia patients. *Journal of Clinical and Laboratory Analysis*, 16:216-20, 2002

CASTILHO L, RIOS M, PELLEGRINO JR J, SAAD STO, COSTA FF, REID ME. A Novel FY allele in Brazilians. *Vox Sanguinis*, 87:190-195, 2004

CASTILHO L, PELLEGRINO JR J. Blood Group Genotyping. *Rev Bras Hematol e Hemoter*, 26:135-140, 2004

CASTILHO L. Blood Group Genotyping. *Ency of Genomics and Proteomics*, 130-134; 2004

CASTILHO L, RIOS M, RODRIGUES A, PELLEGRINO JR J, SAAD STO, COSTA FF. High frequency of partial D DIIIa and DARfound in SCD patients suggests increased risk of alloimmunization to RhD. *Transfusion Medicine*, 15:49-55, 2005

DANIELS, G.L.; ANSTEE, D.J.; CARTRON, J.P.; DAHR, W. et al. Blood group Terminology. *Vox Sang*, 69:265-79, 1995

DANIELS, G. Human Blood Groups. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2002

DENOMME, G.A.; VAN OENE, M. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion*, 45:660-6, 2005

FLUIT, C.R.; KUNST, V.A.; DRENTH-SHONK, A.M. Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. *Transfusion*, 30:532-5, 1990

HACIA, J. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nature Genetics*, 21:42-7, 1999

HASHMI, G.; SHARIFF, T.; SEUL, M. et al. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion*, 45:680-8, 2005

JUNQUEIRA PC & CASTILHO L. The History of the Diego Blood Group System. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 24: 15-23, 2002

LO, Y.M. Fetal DNA in maternal plasma: application to non-invasive blood group genotyping of the fetus. *Tranfusion Clinique Biological*, 8:306-10, 2001

MACHADO IN, CASTILHO L, PELLEGRINO JR J, BARINI R. Fetal RHD genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse background. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 52:232-5, 2006

MOTA M, FONSECA NL, RODRIGUES A., KUTNER JM, CASTILHO L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang*, 88:130-135, 2005

MOTA M, FONSECA NL, RODRIGUES A., KUTNER JM, CASTILHO L. Are weak D RBCs really immunogenic? (Reply). *Transfusion* 46:1062-1063, 2006

MOTA M, SAKASHITA A, KUTNER JM, CASTILHO L. Applications of Blood Group Genotyping. *Revista Einstein*, 4: 27-31, 2006

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* 92: 2237-2243, 1998

PELLEGRINO JJR, CASTILHO L, RIOS M, DE SOUZA C. Blood Group Genotyping in a Population of Highly Diverse Ancestry. *Journal of Clinical and Laboratory Analysis*, 15:8-13, 2001

REID ME, YAZDANBAKHS K: Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusions. *Current Opinion in Hematology* 5:93-102, 1998

REID ME, Rios M: Applications of molecular genotyping to immunohaematology. *British Journal of Biomedical Science* 56:1-8, 1999

REID M, RIOS M, Yazdanbakhsh K. Applications of Molecular Biology Techniques to Transfusion Medicine. *2000 Seminars in Hematology* 37:166-176

REID ME, RIOS M, POWELL VI, CHARLES-PIERRE D, MALAVADE V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 40(1):48-53. 2000

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*, 15:61-65. 1999.

RODRIGUES A, RIOS M, PELLEGRINO JJR, COSTA FF, CASTILHO L. The Presence of the RHD pseudogene and the hybrid RHD-CE-Ds gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35:767-73, 2002

RODRIGUES A, RIOS M, PELLEGRINO Jr J, SAAD STO, VOSTA FF, CASTILHO L. Concomitant occurrence of Cys16 and Val245 (VS antigen) is associated with expression of weakened e in sickle cell disease patients. *Vox Sanguinis*. 86:136-40, 2004

ROZMAN, P.; DOVE, 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*, 40:936-42, 2000