



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA



**POLIMORFISMOS DAS GLICOPROTEÍNAS PLAQUETÁRIAS EM DOADORES
DE SANGUE DO AMAZONAS**

CÍNTIA NICÁCIO PORTELA

MANAUS

2015

CÍNTIA NICÁCIO PORTELA

**POLIMORFISMOS DAS GLICOPROTEÍNAS PLAQUETÁRIAS EM DOADORES
DE SANGUE DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *em Ciências Aplicadas à Hematologia* da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Simone Schneider Weber
Co-orientadora: Prof^ª Ana Flávia Alves Parente

MANAUS
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE JULGAMENTO

**POLIMORFISMOS DAS GLICOPROTEÍNAS PLAQUETÁRIAS EM DOADORES
DE SANGUE DO AMAZONAS**

CÍNTIA NICÁCIO PORTELA

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós- Graduação da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”

BANCA EXAMINADORA

**Prof. (a) Dr. (a) Simone Schneider Weber - Universidade Federal do Amazonas/ICET
Presidente**

Prof. Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque – FHMOAM

**Prof. (a) Dr. (a) Stefanie Costa Pinto Lopes
(Membro externo)**

DEDICATÓRIA

A minha mãe, mulher vitoriosa e incansável na arte de amar. Sempre colocou seus filhos acima de tudo e de todos.

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Simone Schneider Weber pela dedicação, ensinamentos, orientação e por ser a maior incentivadora na superação dos meus limites. Você me resgatou, acolheu e só então percebeu que eu era sua primogênita científica, meu muitíssimo obrigada!

Ao Professor Doutor Albert Nicolaus Schireifer pela infinita disponibilidade e impecável colaboração com seus conhecimentos estatísticos, científicos e seu olhar construtivo. Agradeço imensamente!

Aos meus familiares, obrigada por serem refúgio e fortaleza. Aos meus filhos, perdoem minha ausência necessária. Ao meu marido, prometo retribuir o incentivo, e obrigada por ter acreditado em mim.

A todos os colegas do mestrado, obrigada pela cumplicidade e companheirismo nas horas difíceis. Foi maravilhoso conviver com vocês.

Às meninas do LabGen, continuem purificando e amplificando seus conhecimentos. A metodologia fica a critério de cada uma, mas, inovem!

Ao HEMOAM, esperei tanto pela oportunidade e não deixei escapar. Em especial ao Prof. Dr. Nelson Fraiji por sonhar, acreditar e tornar possível. E por conduzir com humanidade as peculiaridades que surgem no caminho.

EPÍGRAFE

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Antígenos plaquetários humanos (HPA) são aloantígenos específicos de plaquetas resultantes de alterações pontuais (SNP) que levam a substituição de um aminoácido a nível protéico definidos por polimorfismos de glicoproteínas de superfície de plaquetas. Tais polimorfismos podem desencadear manifestações clínicas imunológicas ou não, com a ocorrência de plaquetopenia e sangramentos. O objetivo deste estudo foi determinar as frequências alélicas dos sistemas HPA-1 a -9, HPA-11 e HPA-15 em doadores de sangue do Estado do Amazonas e comparar com as frequências alélicas de outras populações estudadas. A genotipagem foi realizada através de uma técnica de PCR multiplex associada à tecnologia de microarranjo, denominada *BeadChip*[®]. Um universo de 200 doadores foi incluído no estudo sendo que 140 (70%) eram do sexo masculino e 60 (30%) do sexo feminino. A idade dos doadores ficou entre de 19 a 65 anos, com idade média de 36 anos. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre frequências genotípicas de homens e mulheres para todos os antígenos HPA. Todos os resultados foram consistentes e mostraram equilíbrio com Hard-Weinberg, exceto para o HPA-9 onde foi observado um único homocigoto HPA-9b. O alelo "b" ocorreu em baixas frequências nos sistemas HPA testados exceto para HPA-3 e -15, que mostrou maior prevalência dos genótipos heterocigotos AB (47% e 49,5%, respectivamente), ao contrário de outros sistemas em que o "AA" foi o genótipo de menor ocorrência. Além disso, nenhum alelo "b" foi encontrado para HPA-6, -7, -8 ou -11, também não foram detectados genótipos BB homocigóticos para o HPA-4, -6, -7, -8 ou -11. Ainda foram identificados cinco indivíduos (2,5%) que transportam as associações de alelos raros. As comparações entre grupos populacionais, através do teste X^2 , revelaram diferenças significativas em todos os sistemas HPA analisados, porém os resultados semelhantes nas análises estatísticas ($p > 0,005$) chamou a nossa atenção, sugerindo um nível de proximidade genética entre povos europeus. Os achados permitiram a descrição do perfil genotípico dos doadores e dessa forma prever o risco de aloimunizações para os antígenos mais comumente envolvidos na prática transfusional.

Palavras Chaves: HPA; transfusão de plaquetas; genotipagem; *BeadChip*; risco de aloimunização.

ABSTRACT

Human platelet antigens (HPA) are specific alloantigens of platelets resulting from single nucleotide polymorphism (SNP) that lead to substitution of an amino acid protein level defined by polymorphisms of platelet surface glycoproteins. These polymorphisms may trigger immune or nonimmune clinical manifestations, as occurrence of thrombocytopenia and bleeding. The aim of this study was to determine the allele frequencies of HPA-1 systems - 9, HPA-11 and HPA-15 in blood donors of Amazonas and compare with the allele frequencies of other populations studied. The genotyping was performed through a PCR multiplex technique associated with DNA Microarray Technology, *BeadChip*[®]. A universe of 200 donors was included in the study since 140 (70%) were male and 60 (30%) female. The donor's age ranged from 19 to 65 years, with an average age of 36 years. However, no significant differences were found between genotype frequencies of men and women for all antigens HPA. All results were consistent and showed balance with Hardy-Weinberg, except for the HPA-9 where it was observed a single homozygous HPA-9b. The allele "b" occurred at low frequencies in HPA systems tested except for HPA-3 and -15, which showed higher prevalence of heterozygous genotypes AB (47% and 49.5%, respectively), unlike other systems where AA was the genotype of low occurrence. In addition, no b allele was found for HPA-6, -7, -8 or -11, also not homozygous genotypes were detected BB to the HPA-4, -6, -7, -8 or -11. Five individuals have been identified yet (2.5%) that carry associations of rare alleles. Comparisons between population groups, through the χ^2 test, revealed significant differences in all systems, but the HPA similar results in statistical analysis ($p > 0.005$) drew our attention, suggesting a level of genetic proximity between European peoples. The findings allowed the description of genotypic profile of donors and thus predict the risk of alloimmunization to the antigens most commonly involved in transfusion practice.

Keywords: HPA; platelet transfusion; genotyping; *BeadChip*; risk of alloimmunization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos complexos glicoproteicos da membrana plaquetária.....	18
Figura 2. Desenho do estudo.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas de Antígenos Plaquetários Humanos (HPA) **16**

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

CD	= grupo de diferenciação (<i>Cluster Differentiation</i>)
DNA	= ácido desoxirribonucleico
dNTP's	= desoxirribunucleotídeos
fvW	= Fator von Willebrand
GP	= glicoproteína
GPIa/IIa	= Complexo glicoprotéico Ia/IIa
GPIb/IX/V	= Complexo glicoprotéico Ib/IX/V
GPIbα	= Porção alfa da glicoproteína Ib
GPIbβ	= Porção beta da glicoproteína Ib
GPIIb/IIIa	= Complexo glicoprotéico IIb/IIIa
HPA	= Antígenos plaquetário humano (<i>Human platelet antigen</i>)
PPT	= Púrpura pós-trasfusional
PTAN	= Púrpura Trombocitopênica Aloimune Neonatal
PTI	= Púrpura trombocitopênica imune
RP	= Refratariedade plaquetária
SNP	= Polimorfismo de um único nucleotídeo
SER	= Sistema retículo endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos Gerais	1
1.2 Glicoproteínas expressas na membrana plaquetária.....	3
1.3 Importância clínica dos sistemas de antígenos plaquetários humanos	5
1.4 Prevalência dos sistemas HPA em populações distintas	7
1.4.1 Revisão da literatura sobre frequência de HPA em grupos de indivíduos no Brasil	8
1.5 Conhecimento sobre a frequência na população do Norte do Brasil.....	10
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.2 Tipo de estudo	15
3.3 Recrutamento dos sujeitos e amostra do estudo.....	16
3.4 Critérios de inclusão	16
3.5 Critérios de exclusão	16
3.6 Obtenção das amostras de sangue para extração de DNA	16
3.7 Extração e quantificação de DNA	16
3.8 Genotipagem dos HPA	17
3.8.1 Processamento pré-PCR	18
3.8.2 Processamento pós-PCR.....	19
3.9 Análise estatística dos dados	19
3.10 Aspectos éticos	20
4 RESULTADOS	22
5. CONCLUSÕES E CONTRIBUIÇÕES	24

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais.

Os antígenos plaquetários humanos (HPA) são definidos como polimorfismos em glicoproteínas expressas na superfície das plaquetas, exceto aqueles codificados nos genes de Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e antígenos do Sistema ABO (1). Os Sistemas HPA ocorrem na forma bialélica (alelo *a* e alelo *b*). As bases moleculares dos antígenos HPA começaram a ser descritas no final da década de 90 (2). Para cada sistema, os alelos do par são diferenciados pela troca de nucleotídeo em uma única posição polimórfica (SNP). Essas substituições afetam posições nos alelos HPA que resultam na troca de aminoácidos na sequência da glicoproteína (GP) envolvida (1, 3).

Os polimorfismos dos sistemas HPA estão descritos no banco de dados *Immuno Polymorphism Database* (IPD), acessado em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table1.html>. O IPD reconhece 38 aloantígenos plaquetários. Os HPA são classificados numericamente de acordo com a cronologia de sua descrição (HPA-1 ao HPA-29) (**Tabela 1**). O alelo de maior frequência (alelo selvagem) é designado pela letra *a* enquanto o de menor frequência (alelo mutado) é designado pela letra *b*. A designação “w” (do inglês *weak*) é acrescentada após o nome do antígeno quando este é de baixa frequência (HPA-6bw ao 14bw, e HPA-16bw ao 29bw) (4). Os seis sistemas bialélicos e mais frequentes são HPA-1 ao HPA-5 e 15. Os 22 sistemas restantes são considerados de baixa frequência, pois mais raramente são encontrados anticorpos contra seus antígenos.

Tabela 1. Sistemas de Antígenos Plaquetários Humanos (HPA).

Sistemas	Antígenos	GP ¹	SNP ²	Referências
HPA-1	HPA-1 ^a	GPIIIa	T176C	Newman et al, 1989
	HPA-1b			
HPA-2	HPA-2 ^a	GPIIa	T482C	Kuijpers et al, 1992
	HPA-2b			
HPA-3	HPA-3 ^a	GPIIb	T2621G	Lyman et al, 1990
	HPA-3b			
HPA-4	HPA-4 ^a	GPIIIa	G506A	Wang et al, 1992
	HPA-4b			
HPA-5	HPA-5 ^a	GPIa	G1600G	Santoso et al, 1993
	HPA-5b			

HPA-6	HPA-6 ^a	GPIIIa	G1544A	Wang et al, 1993
	HPA-6b			
HPA-7	HPA-7 ^a	GPIIIa	C1297G	Kuijpers et al, 1993
	HPA-7b			
HPA-8	HPA-8 ^a	GPIIIa	C1984T	Santoso et al, 1994
	HPA-8b			
HPA-9	HPA-9 ^a	GPIIb	G2602A	Noris et al, 1995
	HPA-9b			
HPA-10	HPA-10bw	GPIIIa	G263A	Peyruchaud et al., 1997
HPA-11	HPA-11bw	GPIIIa	G1976A	Simsek et al., 1997
HPA-12	HPA-12bw	GPIIa	G119A	Santoso et al., 1996
HPA-13	HPA-13bw	GPIa	C2483T	Santoso et al., 1999
HPA-14	HPA-14bw	GPIIIa	K637del	Santoso et al., 2002
HPA-15	HPA-15 ^a	CD109	C2108A	Schuh et al., 2000
	HPA-15b			
HPA-16	HPA-16bw	GPIIIa	C497T	Jallu et al, 2002
HPA-17	HPA-17bw	GPIIIa	C662T	Stafford et al, 2008
HPA-18	HPA-18bw	GP1a	G2235T	Bertrand et al, 2009
HPA-19	HPA-19bw	GPIIIa	A487C	Peterson et al, 2009
HPA-20	HPA-20bw	GPIIb	C1949T	Peterson et al, 2009
HPA 21	HPA-21bw	GPIIIa	G1960A	Peterson et al, 2009
HPA 22	HPA-22bw	GPIIb	A584C	Peterson et al, 2012
HPA 23	HPA-23bw	GPIIIa	C1942T	Peterson et al, 2012
HPA 24	HPA-24bw	GPIIb	G1508A	Jallu et al, 2011

HPA 25	HPA-25bw	GPIa	C3347T	Kroll et al., 2011
HPA 26	HPA-26bw	GPIIIa	G1818T	Sachs et al, 2012
HPA 27	HPA-27bw	GPIIb	C2614A	Jallu et al, 2012
HPA 28	HPA-28bw	GPIIb	G2311T	Poles et al, 2013
HPA 29	HPA-29bw	GPIIIa	C98T	Sullivan et al, 2015

¹GP: glicoproteína; ²SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Simples

1.2 Glicoproteínas expressas na membrana plaquetária

As glicoproteínas plaquetárias são proteínas de membrana com função de receptores celulares representadas principalmente pelo grupo das integrinas e das glicoproteínas ricas em leucina. Sua nomenclatura é determinada pelo peso molecular em ordem decrescente de tamanho, variando de GPI até GPIX. Quando essas GP apresentam peso molecular semelhante, elas recebem uma nomenclatura adicional com letras minúsculas, como GPIa e GPIb(4). As GP que definem os HPA são agrupadas em complexos (1). Fazem parte desses complexos: integrina $\alpha\beta 1$ (GPIa-IIa) (A), integrina $\alpha 2\beta 3$ (GPIIb-IIIa) (B), complexo GPIb- IX-V (C) e (1, 3) (Figura 1).

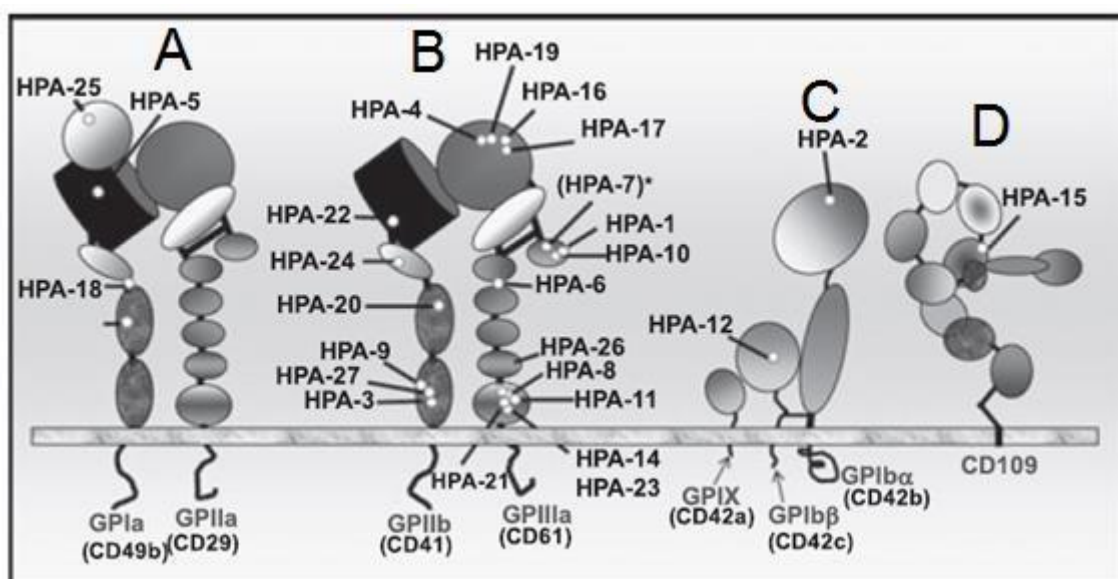


Figura 1: Distribuição dos HPA nos complexos glicoprotéicos GPIa-IIa (A), GPIIb-IIIa (B), GPIb-IX-V (C) e CD109 (D) da superfície das plaquetas humanas, além das posições dos aminoácidos afetados em cada HPA. Adaptado de Curtis & McFarland (2013).

O complexo GPIa-IIa ou integrina $\alpha 2\beta 1$ (**Figura 1 A**) é expresso na superfície de monócitos, células T, células B, células natural killer e também em plaquetas. Esse complexo é receptor do da molécula de colágeno e carrega o HPA-5 (pb G1648A, Glu505Lys) (5). A subunidade GPIa é a cadeia $\alpha 2$ de 165 kDa e a GPIIa é a cadeia $\beta 1$ de 145 kDa. Existem aproximadamente 800 a 2.800 cópias de GPIa-IIa por plaqueta e nela estão localizados quatro sistemas HPA (HPA-5, HPA-13, HPA-18, HPA-25) (3).

O heterodímero GPIIb-IIIa (**Figura 1 B**) possui aproximadamente 50.000 a 80.000 cópias por plaqueta (3, 6), sendo, portanto, a glicoproteína mais abundante na superfície plaquetária. Apresenta o maior número de polimorfismos, dentre os quais se destacam dois principais sítios polimórficos, HPA-1 (substituição: pb T196C, aminoácido Leu33Pro) e HPA-3 (pb T2622G, aminoácido Ile843Ser) (7).

O complexo GPIIb/IIIa ($\alpha \text{IIb}\beta 3$) é uma integrina heterodimérica, consistindo de subunidades α e β não covalentemente associadas. A subunidade $\text{GP}\alpha \text{IIb}$ (CD41) possui uma cadeia extracelular de 116 kDa (cadeia pesada), a qual carrega principalmente os sistemas HPA-3 e HPA-9w (8). Enquanto, a subunidade $\text{GP}\beta \text{IIIa}$ (CD61, $\beta 3$) é uma proteína glicosilada de 90 kDa (3), que carrega os sistemas HPA-1, HPA-4, HPA-6w, HPA-7w, HPA-8w, HPA-10w e HPA-11w (9).

Quando ocorre dano endotelial a glicoproteína de membrana plaquetária GPIIb-IIIa é ativada e passa a reconhecer uma sequência específica de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) (10). Tal reconhecimento desempenha papel fundamental na formação do trombo plaquetário, fazendo desse complexo glicoprotéico um receptor para proteínas adesivas circulantes como fibrinogênio, o fator von Willebrand, fibronectina, e vitronectina, fundamentais para a hemostasia (3). Deficiência ou disfunção da GPIIb-IIIa estão presentes em indivíduos com trombostenia de Glanzmann, doença autossômica recessiva causada por mutação dos genes que codificam a GPIIb ou $\text{GP}\beta \text{IIIa}$, podendo também ser adquirida por um distúrbio auto-imune, os quais predispõem distúrbios hemorrágicos (11).

O complexo glicoprotéico GPIb-IX-V ou CD42 (**Figura 1 C**) é composto por quatro componentes transmembranares. A $\text{GPIb}\alpha$ (CD42b, Mr 143kDa) e a $\text{GPIb}\beta$ (CD42c, Mr 22kDa) estão covalentemente ligadas por uma ponte dissulfeto e não covalentemente associadas com GPIX (CD42a, Mr 20 kDa) e GPV (CD42d, Mr 83 kDa). A subunidade

GPIb α expressa o sistema HPA- 2 e a GPIb β expressa o sistema HPA-12w (9). A ligação de GPIb-IX-V com o fator von Willebrand promove a adesão plaquetária e desempenha um papel importante na manutenção da hemostasia na lesão vascular. Defeitos quantitativos ou qualitativos de GPIb-IX-V ocorrem em indivíduos com síndrome de Bernard-Soulier, caracterizada por ausência de aglutinação das plaquetas em resposta a ristocetina (12). A glicoproteína GPIb-IX-V possui cerca de 25.000 cópias por célula, o que faz desse complexo o segundo mais abundante da membrana plaquetária.

A CD109 (**Figura 1 D**) é expressa em plaquetas, células T e células endoteliais (13). Essa glicoproteína expressa o HPA-15, e anticorpos contra HPA-15 têm sido associados à PTAN e PPT (14). No entanto, a detecção desses anticorpos é dificultada pela baixa expressão (400 a 1.000 cópias) e instabilidade da CD109 (15). A molécula CD109 o HPA-15 (pb C2108A, Tyr682Ser) (16, 17).

1.3 Importância clínica dos sistemas de antígenos plaquetários humanos.

O risco de aloimunização depende em grande parte das frequências de antígenos plaquetários, que variam em diferentes populações em todo o mundo (18). Os sistemas HPA mais comumente envolvidos em aloimunização plaquetária são o HPA-1 e HPA-5, seguidos pelos HPA-3, HPA-2 e, mais raramente, HPA-4 (19-21). Apesar de ser o sistema mais polimórfico, aloimunização pelo HPA-15 não é frequentemente relatada. Isso provavelmente ocorre devido à fraca imunogenicidade (16), além da baixa taxa de expressão e instabilidade da molécula CD109 (15).

A importância do estudo dos polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias esta baseada na capacidade desses antígenos em desencadear manifestações clínicas imunes (autoimune ou aloimune). São também considerados fatores de risco para doenças vasculares e oclusivas (22, 23), abortamento de repetição (24, 25), rejeição a transplantes (9, 26, 27), e ocorrência de plaquetopenia em indivíduos com vírus C da Hepatite (HCV) (28).

Dentre as manifestações clínicas imunológicas envolvendo produção de aloanticorpos, contra antígenos HPA, podemos destacar: a Púrpura Trombocitopênica Aloimune Neonatal PTAN, Púrpura Pós-transfusional e refratariedade plaquetária (29-31).

A PTAN é caracterizada pela incompatibilidade materno fetal. Os anticorpos maternos contra plaquetas do feto propagam-se durante a gravidez devido à incompatibilidade imunogenética materno-fetal, resultando na destruição das plaquetas fetais. O principal evento neonatal observado é a plaquetopenia, que pode ocorrer a partir da 16^a semana de gestação (29). A PTAN apresenta uma prevalência de 1 a 5 % entre os recém-nascidos, mas atinge 20 a 30 % entre aqueles internados em unidades de cuidados intensivos (32).

O diagnóstico de PTAN é confirmado quando a sensibilização materna contra antígenos específicos de plaquetas é detectada (33). Os anticorpos contra HPA-1a estão relacionados em cerca de 80 % dos casos de PTAN e aqueles contra HPA-5 b, em quase 15 % (34). Frequentemente as gestantes são homozigotas para o HPA-1b, o que pode levar ao desenvolvimento de anticorpos anti-HPA1a, entretanto isso só ocorre em apenas 10% dessas gestantes HPA-1b/b (33).

Em relação aos sistemas HPA de baixa frequência, estudos tem identificado casos de PTAN devido a anticorpos contra HPA-6bw (35), HPA-8bw (36), HPA-13bw (37) e, principalmente, HPA-9bw (38-40). Este último sistema foi identificado por Noris e colaboradores (1995), ao investigar um caso de PTAN em recém-nascido (39). O alelo encontrado foi primeiramente denominado de Max^a, pois não apresentava positividade para nenhum dos sistemas conhecidos (HPA-1 a HPA-7). Posteriormente, observou-se que o antígeno localizava-se na mesma região do sistema HPA-3, porém, na posição 837 da glicoproteína plaquetária GPIIb (valina/metionina). Os autores na ocasião sugeriram Max^a como um novo aloantígeno de baixa frequência, denominado de HPA-9bw, o qual estava associado aos casos de PTAN (39).

Outra importante alteração associada aos antígenos plaquetários é o quadro de plaquetopenia que ocorre de 7 a 10 dias após a transfusão de hemocomponentes, conhecida como púrpura pós-transfusional (PPT) (30). É considerada uma reação transfusional tardia rara e grave, que acomete pacientes previamente sensibilizados (por ex. mulheres múltiparas ou indivíduos politransfundidos) (41). Essa síndrome é cerca de 7 vezes mais frequentes em mulheres, e os aloanticorpos destroem tanto as plaquetas transfundidas, quanto as plaquetas do próprio indivíduo. O provável mecanismo envolve a formação de imunocomplexos, constituídos pela adesão dos anticorpos do receptor aos antígenos plaquetários presentes no sangue do doador, promovendo a destruição das plaquetas pelo Sistema Retículo Endotelial

(SER) (42). A etiologia envolve HPA-1a em 60% dos casos, seguido HPA-1b em 12%, HPA-3a em 4,6%, HPA-5b em 3,9%, HPA-5a em 3,3% e associação de mais de um sistema em 10% dos casos. A transfusão deve ser componentes compatíveis (43).

A refratariedade plaquetária (RP) é definida como baixo rendimento transfusional, após duas ou mais transfusões consecutivas de plaquetas alogênicas, com até 24h de coletadas, e ABO compatíveis (44). Na RP, a transfusão profilática deixa de ser eficaz, pois o indivíduo transfundido não apresenta aumento na contagem de plaquetas no sangue periférico. Essa condição atinge a população de pacientes onco-hematológicos politransfundidos, que apresenta uma elevada taxa de mortalidade e necessita de uma abordagem transfusional especializada (45).

As causas não-imunológicas são mais frequentes na RP, entretanto, componentes imunes estão presentes em 45% dos casos de transfusão de concentrados de plaquetas (CP) randômicos (46). Esse percentual diminui significativamente quando o CP é leucodepletado, motivo pelo qual alguns serviços usam a leucodepleção universal. A presença de aloanticorpos para o sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) é a causa imunológica mais frequente, e apenas em 10 a 20% os anticorpos anti-HPA são envolvidos (47).

A trombocitopenia imune (PTI) é um distúrbio autoimune evidenciado pela baixa contagem de plaquetas circulantes, proveniente da destruição de plaquetas sensibilizadas por anticorpos no SER do baço (48). Trata-se da principal causa de trombocitopenia em crianças e idosos (49), sendo a redução no número de plaquetas circulantes causada por anticorpos que reagem com glicoproteínas expressas nas plaquetas e megacariócitos (glicoproteína IIb-IIIa, Ib-IX) (50). A alta frequência do alelo HPA-5b é sugerido como fator de risco para essa patologia (21).

1.4 Prevalência dos sistemas HPA em populações distintas.

Polimorfismo genético é definido como a ocorrência de múltiplos alelos num *locus* (local ocupado por um gene em um cromossomo), e podem ser definidos como alterações genéticas presentes em mais de 1% da população. Destaca-se o uso de polimorfismos como

“*marcadores genéticos*” para distinguir diferentes formas hereditárias de um gene em estudos filogenéticos (51).

A frequência de aloantígenos plaquetários tem sido investigada em diferentes populações no mundo e demonstram grande heterogeneidade na prevalência dos alelos em grupos étnicos distintos. Vários estudos mostram que a frequência do alelo *a* para os sistemas HPA-1, -2 e -5 é superior à do alelo *b* em populações europeias (3, 52-54), asiáticas (55-57) e sul-americanas (16, 18, 21, 58-62).

A partir da colonização, a chegada dos europeus se destaca como o maior evento responsável pela modificação da paisagem genética no Brasil. Os colonizadores se miscigenaram com índios nativos e negros africanos, resultando numa mistura racial, sendo esses os indivíduos analisados em estudos brasileiros (63). Diante disso, dentre os estudos de prevalências dos HPA realizados com população brasileira, destacam-se aqueles em que populações ameríndias nativas foram incluídas, visto que essa população tem grande contribuição para o atual panorama genético no Amazonas.

Diferentes estudos avaliaram as frequências dos sistemas HPA-1 a -9, -11 e -15 no Brasil. Em populações de caucasóides e afrodescendentes, ambos os alelos puderam ser detectados, mas o alelo *a* foi o mais prevalente para todos os sistemas. Suas frequências foram similares às investigadas anteriormente para diversas populações européias (64) e asiáticas (65). A mesma observação foi feita para os HPA-3, -9 e -15 entre os ameríndios. Contudo, nesta população o alelo *b* mostrou-se ausente nos sistemas HPA-1, -4 e -5 (16, 59-61), o que sugere um maior risco de aloimunização para esses antígenos entre ameríndios transfundidos com hemoderivados de outras populações.

1.4.1 Revisão da literatura sobre frequência de HPA em grupos de indivíduos no Brasil.

Castro et al (1999) genotiparam 320 amostras de três grupos étnicos distintos (caucasianos, negros e índios da Amazônia) para os sistemas HPA-1, -2, -3, -4 e -5 (59). Houve semelhanças entre as prevalências do grupo de caucasianos e afrodescendentes. Enquanto que na população ameríndia, os alelos HPA-1b, HPA 4b e HPA-5b não foram observados.

Outro estudo utilizando também genotipagem verificou as frequências alélicas dos sistemas HPA-1 a -5 a partir de 95 amostras de ameríndios da Amazônia e 79 de doadores de sangue brasileiros (61). Tais populações apresentaram resultados significativamente diferentes para o HPA-1 ($p < 0,001$), HPA-2 ($p = 0,001$) e HPA-5 ($p < 0,001$). No entanto, na população ameríndia, os alelos HPA-1*b* e HPA-4*b* estiveram ausentes. As frequências observadas nos sistemas HPA-1 e HPA-5 para os ameríndios da Amazônia foram similares às relatadas nas populações asiáticas, enquanto que as observadas em doadores de sangue brasileiros para os HPA- 1*a*, -4*a* e -5*a* apresentaram semelhança às populações norte-americana e europeia (61).

Uma pesquisa adjacente foi realizada por Covas e colaboradores (2000), onde foram obtidas 65 amostras oriundas de cinco tribos da Amazônia brasileira para estudo paralelo com populações de descendentes europeus, afrodescendentes e asiáticos, seguido de genotipagem para os sistemas HPA-3 e HPA-5 (60). As análises mostraram que a frequência do HPA- 3 entre os ameríndios não difere dos valores encontrados para afrodescendentes brasileiros (HPA-3*a*/ 0.65; HPA-3*b*/ 0.35), brancos (HPA-3*a*/ 0.50; HPA-3*b*/ 0.50) ou japoneses e seus descendentes que vivem no Brasil (HPA-3*a*/0.55; HPA-3*b*/0.45). Contudo, em cinco populações ameríndias o alelo HPA-5*b* estava ausente.

Cardone e colaboradores (2004) dirigiram seu estudo para estimar a prevalência do sistema HPA-15 em uma população étnica distinta constituída por caucasianos, afrodescendentes, asiáticos, ameríndios e doadores de sangue (16). Um total de 276 amostras foram genotipadas e foi observado que as frequências alélicas para caucasianos (0.53/0.47), afrodescendentes (0.57/0.43), asiáticos (0.57/0.43) e doadores de sangue (0.52/0.48) não diferiram significativamente, apresentando similaridade com outras já reportadas em populações européias, asiáticas e canadenses. Entretanto, os alelos HPA-15*a* (0.78) e 15*b* (0.22) diferiram entre as outras populações do grupo estudado.

Foi evidenciada na literatura a frequência em que os alelos HPA-3*b* e HPA-9*b* foram observados simultaneamente por Kuniyoshi e colaboradores (66). A partir deste dado realizaram um estudo de prevalência onde obtiveram 1.073 amostras de doadores de sangue e 120 amostras de ameríndios seguidas de genotipagem para os sistemas HPA 3 e HPA 9. As frequências alélicas de HPA-3*a*/3*b* (0.645/0.355) e HPA-9*a*/9*b* (0,999/0.001) para a população de doadores e HPA-3*a*/3*b* (0.679/0.321) e HPA-9*a*/9*b* (1.0/0.0) para os ameríndios

não apresentaram significância estatística, porém todos os indivíduos transportavam os dois alelos, sugerindo a possibilidade de conexão entre os sistemas.

Em São Paulo, um estudo conduzido por Conti e colaboradores (2014) com 158 doadores destacou pela primeira vez o alelo HPA-9*abw* na população brasileira (18). As amostras foram genotipadas através da mesma tecnologia de microarranjo utilizada no presente estudo. O alelo *a* mostrou-se predominante para os sistemas HPA-1 a -9, -11 e -15. Para os sistemas HPA-6, -7, -8 e -11 o alelo *b* estava ausente, entretanto a maior prevalência dos genótipos heterozigotos *ab* foi observada nos sistemas HPA-3 (0,76) e HPA-15(0,45) e para os outros sistemas o genótipo *aa* prevaleceu. Heterozigosidade inesperada foi encontrada em apenas um doador no sistema HPA-4 e em dois indivíduos para o alelo HPA-9*abw*. Para o sistema HPA-2 foi observada uma discrepância que posteriormente foi identificada como uma nova mutação silenciosa. Com os achados e a validação da plataforma molecular, foi sugerido que a mesma poderia ser aplicada em larga escala na detecção de polimorfismos HPA, bem como para rastrear novos SNP.

No estudo de Mangerona e cols (2015), a população brasileira foi investigada através de genotipagem em 337 doadores da cidade de Uberaba em Minas Gerais (62). Este estudo revelou maior frequência alélica do alelo *a* para os sistemas HPA-1 (0.852), HPA-2 (0.845), HPA-5 (0.860) e HPA-15 (0.570). Entretanto, ao comparar seus resultados com a população ameríndia de outros relatos, o alelo *b* apresentou alta prevalência ($p < 0.001$) apontando para maior incompatibilidade e risco de aloimunização entre essas duas populações.

1.5 Conhecimento sobre a frequência na população do Norte do Brasil.

As frequências alélicas HPA variam muito entre grupos populacionais, e, portanto, a seleção de doadores genotipados para os principais polimorfismos dos antígenos plaquetários humanos representa um benefício na transfusão de plaquetas compatível. No entanto, até o momento, não há relatos na literatura de descrição dos polimorfismos dos sistemas HPA na região norte do Brasil. Nesse sentido, o presente trabalho propôs investigar as frequências de vinte e dois alelos HPA em doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM), comparando essas frequências alélicas com dados relatados para outras populações em todo o mundo.

Este estudo aplicou uma técnica de PCR multiplex associada à tecnologia de microarranjo, denominada *BeadChip*[®], metodologia capaz de detectar 11 principais sistemas de antígenos plaquetários humanos (HPA-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 e 15) e seus alelos: selvagem (*a*) e mutado (*b*). Os resultados de análise comparativa das frequências alélicas mostram a diversidade da população estudada, destacando sua proximidade com os países da Europa. Os doadores de sangue do Amazonas mantiveram uma relação de proximidade com os doadores de São Paulo, mas mostram uma distância hierárquica dos brasileiros caucasianos, afrodescendentes e ameríndios descritos em estudos prévios. Os achados permitiram a descrição do perfil genotípico dos doadores para os antígenos mais comumente envolvidos em casos de aloimunização plaquetária na prática transfusional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever as frequências alélicas dos antígenos plaquetários em doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Genotipar onze sistemas HPA em doadores de sangue da FHEMOAM;
- ❖ Comparar as frequências alélicas obtidas neste estudo com dados de diferentes países do mundo;
- ❖ Prever a probabilidade do risco de aloimunização para cada um dos sistemas HPA, considerando o perfil dos doadores da FHEMOAM.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Desenho do Estudo

O estudo foi realizado com amostra constituída por 200 doadores voluntários de sangue que concordaram com o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). As amostras de sangue foram encaminhadas para o laboratório de genômica onde foram processadas e armazenadas em freezer à - 80 °C. A extração de DNA foi realizada por um extrator automático e, em seguida, essas amostras de DNA obtidas foram quantificadas pelo *nanodrop*. A PCR *multiplex* foi realizada para obter os produtos que foram genotipados por *Microarray BeadChip*[®]. As frequências alélicas obtidas foram analisadas pelo teste de Fisher e comparadas às outras populações.

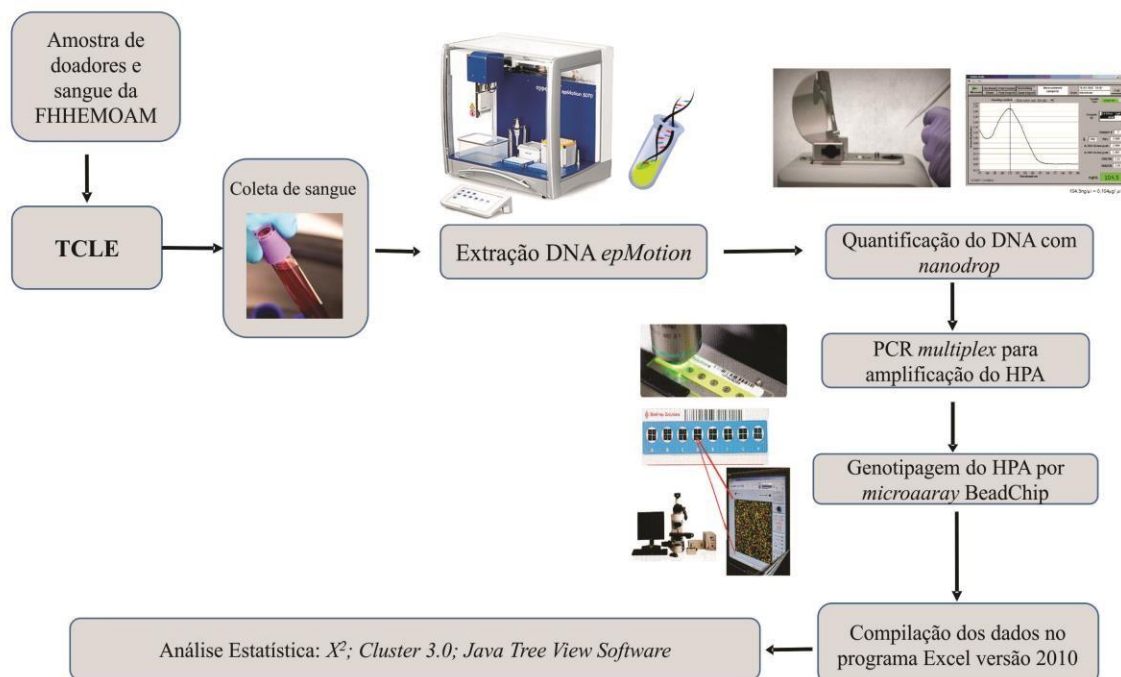


Figura 2. Fluxograma metodológico do estudo. A figura esquematiza a sequência de etapas da metodologia realizada neste trabalho, incluindo coleta das amostras de sangue total, extração de DNA, genotipagem *Beadchip* e análise estatística dos dados.

3.2 Tipo de estudo.

Este é um estudo do tipo observacional descritivo transversal.

3.3 Recrutamento dos sujeitos e amostra do estudo.

Foram coletadas amostras de 200 doadores de sangue saudáveis e voluntários na FHEMOAM em Manaus, estado do Amazonas, Brasil, entre outubro de 2014 e março de 2015. No ato da doação, os indivíduos foram convidados e informados sobre o objetivo do estudo e em seguida, foi aplicado o TCLE (**ANEXO 1**) e posterior coleta das amostras de sangue periférico.

3.4 Critérios de inclusão

Todos os doadores de sangue da FHEMOAM que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE.

3.5 Critérios de exclusão

Foram excluídas da pesquisa amostras que coagularam e/ou que a concentração e pureza do DNA extraído não estiveram dentro dos parâmetros exigidos pela tecnologia do *BeadChip*[®], conforme descrito no protocolo de genotipagem HPA. Foram excluídas também as amostras de doadores que não foram aprovadas na triagem sorológica e/ou teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAT), conforme RDC 57 de 16 de dezembro de 2010.

3.6 Obtenção das amostras de sangue para extração de DNA.

Foram coletados 05 mL de sangue total de cada indivíduo, em tubo contendo anticoagulante EDTA (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*) e encaminhadas ao Laboratório de Genômica para a realização dos testes moleculares.

3.7 Extração e quantificação de DNA.

As amostras de sangue total foram submetidas à extração de DNA com a utilização do Kit QIAamp DNA BloodBioRobot MDx (Qiagen), usando o equipamento *epMotion* (Eppendorf), conforme instruções do fabricante. Trata-se de um sistema de extração e purificação automatizado de DNA, que utiliza a tecnologia de colunas de sílica à vácuo em um processo totalmente automatizado com a capacidade de extração simultânea de até 96 amostras/hora.

As amostras foram armazenadas em biorepositório (- 80 °C), ao longo do período de execução do projeto, sob a responsabilidade da Instituição e gerenciamento do pesquisador responsável (Art. 1º da CNS 441 de 12 de maio de 2011).

Todos os DNAs obtidos foram submetidos à leitura nas absorvâncias (A) de 230nm, 260nm e 280nm, resultando nas razões A260/280 e A260/230 que representam a qualidade (ausência de RNA e proteínas) e a pureza (ausência de resíduos de extração) das amostras, respectivamente (67). As leituras da densidade óptica foram realizadas em espectrofotômetro (Nanodrop modelo 2000 Spectrophotometer), usando 2 µL do DNA extraído no compartimento indicado pelo fabricante. O software gerou um gráfico com a absorvância do DNA, além de um relatório com a concentração, qualidade e pureza da amostra.

O valor ideal para as amostras de DNA foi $A_{260/280} \geq 1,8$ e $A_{260/230} \geq 1,8$, conforme preconizado por Green & Sambrook (2012). As concentrações variaram de ≥ 20 e ≤ 150 ng/µL de DNA genômico, exigência da metodologia *Beadchip*. Quando necessário, as amostras foram diluídas com água ultrapura livre de nucleasse para atender a concentração exigida, descrita acima (67).

3.8 Genotipagem dos HPA.

A determinação dos polimorfismos dos HPA foi feita por meio da metodologia *BeadChip*[®] ou “*microarray*” (68). Trata-se de uma plataforma molecular de diagnóstico capaz de determinar vinte e duas variantes alélicas dos seguintes antígenos plaquetários: HPA-1 ao HPA-9, HPA-11 e HPA-15.

A técnica denominada *BeadChip*[®] utiliza PCR *multiplex*, que identifica a presença ou ausência dos alelos associados a um fenótipo, além de amplificar, simultaneamente, fragmentos de DNAs dos *loci* onde ocorrem os polimorfismos. Após amplificação e digestão com Lambda Exonuclease, as cadeias únicas de DNA foram incubadas com a matriz do *BeadChip*[®], onde ocorreu o anelamento com as sondas correspondentes. A próxima reação promoveu a alongação, extensão e incorporação de moléculas de dNTPs. Os amplicons foram analisados por meio de sondas de oligonucleotídeos depositadas em uma placa que, quando

hibridizadas, com os fragmentos de DNAs alvos, emitiram fluorescência. A fluorescência emitida foi detectada e interpretada por um sistema de imagem (AIS400) automatizado capaz de avaliar a intensidade da fluorescência para cada tipo de sonda e os resultados fornecidos foram facilmente visualizados em tabelas de genótipos (69).

Este procedimento é indicado para a genotipagem em larga escala por ser uma plataforma rápida de genotipagem simultânea de diversas amostras, com excelente discriminação alélica (68).

O Kit HPA *BeadChip*[®] (*BioArray Solutions*) utilizado neste estudo, contém os seguintes reagentes: HPA eMAP PCR Mix, reagente *Clean Up*, Lambda Exonuclease e Elongation mix. Os reagentes do KIT HPA *BeadChip*[®] permaneceram resfriados em rack térmica por um período de 5 a 10 minutos antes de serem utilizados (exceto o *Clean Up*, que permaneceu mantido no freezer até a hora do uso). A técnica foi realizada em duas etapas, ou seja, pré e pós-PCR, conforme descrição a seguir e protocolo detalhado em anexo (**ANEXO 2**).

3.8.1 *Processamento pré-PCR*

Para cada teste foram avaliadas oito amostras (sete doadores e um controle negativo). A combinação do mix de reagentes da PCR Master Mix (PMM) constituída por 156 µL de HPA eMAP PCR Mix e 9 µL de HotStarTaq DNA polimerase, 17 µL do PCR Master Mix (PMM) foram dispensados em cada um de oito microtubos devidamente identificados. Então foram acrescentados 8 µL de DNA genômico, na concentração de 100ng/µL (20 - 150 ng/µL), em cada microtubo com a PMM. Para o controle negativo foi utilizada água ultrapura (livre de *nuclease*).

As reações de PCR foram amplificadas em termociclador (Veriti 96-well ThermalCycler, AppliedBiosystems, CA, USA). Os ciclos da PCR foram os seguintes: desnaturação inicial por 15 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos (seg), 62 °C por 30 seg, 72 °C por 50 seg. e um ciclo final de extensão a 72 °C por 08 minutos (min) e 04 °C até retirada das amostras do termociclador.

As amostras amplificadas e o controle negativo foram submetidos ao processamento pós-PCR.

3.8.2 *Processamento pós-PCR*

Os produtos de PCR foram tratados com *Clean Up* para remoção de *primers* e dNTPs. Para cada teste foram transferidos 6,5 µL de cada produto de PCR e adicionados 2 µL do reagente *Clean Up* em tira de oito microtubos e colocados no termociclador por 15 min a 37°C, seguido por 08 min a 85 °C, finalizando a 04 °C.

Na reação seguinte foram adicionados 2 µL do reagente Lambda Exonuclease em cada microtubo para a obtenção de fita simples DNA. No termociclador foi programado o seguinte ciclo: 15min a 37 °C, seguido por 08 min a 85 °C, finalizando a 04 °C.

Para o anelamento e extensão dos amplicons foram adicionados 10 µL do reagente Elongação eMAP[®] em cada teste. Após transferir 18 µL do Mix para a cada área na lâmina HPA *BeadChip*[®] correspondente, a lâmina foi incubada a 55 °C por 20 min. Posteriormente, as lâminas foram retiradas do forno e lavadas com água ultrapura. As lâminas *BeadChip*[®] foram lidas utilizando o equipamento *BioArray Solutions AIS400 Array Imaging System*.

3.9 **Análise estatística dos dados**

Os dados da genotipagem HPA dos doadores incluídos no estudo, com gênero, idade, tipo sanguíneo, genótipo e fenótipo para os polimorfismos avaliados, foram compilados numa planilha do *Excell* (Microsoft Office 2010).

As frequências genótípicas e alélicas foram estimadas pela contagem direta e os resultados comparados com os valores publicados para doadores de sangue e / ou indivíduos saudáveis em todo o mundo (http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/freqs_1.html). O qui quadrado (X^2) ou teste exato de Fisher foi realizado para comparar as frequências alélicas entre doadores de

sangue do Amazonas e outras 38 populações (3, 18, 53, 55, 56, 58, 59, 65, 70-95). O equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada sistema HPA foi avaliado com base na heterozigosidade, usando a calculadora de Hardy-Weinberg disponível em <http://www.koonec.com>. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos para todos os testes estatísticos. Foi estimada a probabilidade de incompatibilidade pós-transfusão usando a fórmula $2ab(1-ab)$, onde a e b são as respectivas frequências alélicas (85).

3.10 Aspectos éticos.

O protocolo de pesquisa foi cadastrado no Sistema CEP/CONEP via Plataforma Brasil e submetido à análise no Comitê de Ética em Pesquisa com seres Humanos da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-FHEMOAM) sob o número CAAE 32008514.9.0000.0009 e aprovado por unanimidade em 26/09/2014, conforme parecer consubstanciado (**ANEXO 3**).

4 RESULTADOS

O manuscrito intitulado “**Human platelet alloantigen profile in blood donors from Amazonas, Brazil**”, a ser submetido ao periódico *Blood Transfusion* (Fator de impacto de 2.37), como artigo original (vide instruções aos autores no link <http://www.bloodtransfusion.it/Index.aspx>), compõe os resultados desta dissertação de mestrado.

Conclusão

5. CONCLUSÕES E CONTRIBUIÇÕES

- Para todos os sistemas testados o alelo *a* foi o mais prevalente, porém risco de aloimunização são mais elevados para os sistemas HPA-15 e HPA-3, seguido HPA-1, HPA-2 e HPA-5. As frequências de HPA-1 entre doadores de sangue Amazonas não foram diferentes daqueles relatados para São Paulo, Áustria, Croácia, Noruega e Macedônia.
- Há uma distribuição homogênea do sistema HPA-15, entre Argentina, Áustria, Dinamarca, Noruega e doadores de sangue do Amazonas. Frequências semelhantes de HPA-15b sugerem uma estreita relação entre doadores de sangue argentinos, europeus e do Amazonas, mas diferem dos orientais e ameríndios relatados.
- A descrição das frequências dos diferentes aloantígenos plaquetários em doadores da população do Amazonas preenche uma lacuna no conhecimento e poderá ser explorada em favor da segurança transfusional na região.
- Este estudo contribuiu para a implantação de uma ferramenta de genotipagem por PCR multiplex associada à tecnologia de microarranjo, denominada *BeadChip*[®], que será explorada na montagem de um registro de doadores de plaquetas no Hemocentro do Amazonas e na compatibilização entre plaquetas de doadores e receptores.
- Os achados de alelos raros de HPAs e das diferenças nas frequências de alelos de HPA entre subpopulações da região amazônica evidenciam a necessidade e benefício de se criar um amplo banco de doadores genotipados na FHMOAM. O método de genotipagem em larga escala empregado neste estudo torna possível a construção deste banco, que servirá para prevenir refratariedade plaquetária e casos de púrpura pós-transfusional, bem como possibilitar o tratamento da púrpura trombocitopênica aloimune neonatal.

Referências Bibliográficas

1. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox sanguinis*. 2014;106(2):93-102.
2. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, P1A1 and P1A2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *The Journal of clinical investigation*. 1989;83(5):1778-81.
3. Rozman P, Drabbels J, Schipper RF, Doxiadis I, Stein S, Claas FH. Genotyping for human platelet-specific antigens HPA-1, -2, -3, -4 and -5 in the Slovenian population reveals a slightly increased frequency of HPA-1b and HPA-2b as compared to other European populations. *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. 1999;26(4):265-9.
4. Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection. *Vox sanguinis*. 2004;87 Suppl1:82-6.
5. Unkelbach K, Kalb R, Santoso S, Kroll H, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw(P1A), Ko, Bak and Br (HPA-1, 2, 3, 5). *British journal of haematology*. 1995;89(1):169-76.
6. Landau M, Rosenberg N. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. *Transfusion*. 2011;51(3):558-69.
7. Lyman S, Aster RH, Visentin GP, Newman PJ. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Baka/Bakb alloantigen system. *Blood*. 1990;75(12):2343-8.
8. Santoso S, Kiefel V. Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox sanguinis*. 1998;74 Suppl 2:249-53.
9. Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transplant immunology*. 2002;10(2-3):165-81.
10. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987;238(4826):491-7.
11. Nurden AT, Pillois X, Wilcox DA. Glanzmann thrombasthenia: state of the art and future directions. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2013;39(6):642-55.
12. Li R, Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013;11(4):605-14.
13. Sutherland DR, Yeo E, Ryan A, Mills GB, Bailey D, Baker MA. Identification of a cell-surface antigen associated with activated T lymphoblasts and activated platelets. *Blood*. 1991;77(1):84-93.
14. Smith JW, Hayward CP, Horsewood P, Warkentin TE, Denomme GA, Kelton JG. Characterization and localization of the Gova/b alloantigens to the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein CDw109 on human platelets. *Blood*. 1995;86(7):2807-14.
15. Berry JE, Murphy CM, Smith GA, Ranasinghe E, Finberg R, Walton J, et al. Detection of Gov system antibodies by MAIPA reveals an immunogenicity similar to the HPA-5 alloantigens. *British journal of haematology*. 2000;110(3):735-42.
16. Cardone JD, Chiba AK, Boturao-Neto E, Vieira-Filho JP, Bordin JO. Gene frequencies of the HPA-15 (Gov) platelet alloantigen system in Brazilians. *Transfusion medicine*. 2004;14(6):433-7.
17. Hwang SM, Kim MJ, Chang HE, Hong YJ, Kim TS, Song EY, et al. Human platelet antigen genotyping and expression of CD109 (human platelet antigen 15) mRNA in various human cell types. *Biomed Res Int*. 2013;2013:946403.
18. Conti F, Bertrand G, Dezan M, Costa T, Aravechia M, Mota M, et al. Molecular HPA genotyping by microarray in Brazilian blood donors. *Transfusion*. 2014;54(2):405-11.

19. Castro V, Alberto FL, Costa RN, Lepikson-Neto J, Gualandro SF, Figueiredo MS, et al. Polymorphism of the human platelet antigen-5 system is a risk factor for occlusive vascular complications in patients with sickle cell anemia. *Vox sanguinis*. 2004;87(2):118-23.
20. Xu X, Zhu F, Ying Y, Tao S, Liu Y, Hong X, et al. Simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to 17w by polymerase chain reaction sequence-based typing. *Vox sanguinis*. 2009;97(4):330-7.
21. Bianchi JV, de Azevedo MR, Jens E, Nukui Y, Chamone DA. Frequency of human platelet antigens in oncohematological patients with thrombocytopenia and the probability of incompatibility to platelet transfusions. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2012;34(3):202-5.
22. Al-Subaie AM, Fawaz NA, Mahdi N, Al-Absi IK, Al-Ola K, Ameen G, et al. Human platelet alloantigens (HPA) 1, HPA2, HPA3, HPA4, and HPA5 polymorphisms in sickle cell anemia patients with vaso-occlusive crisis. *European journal of haematology*. 2009;83(6):579-85.
23. Abboud N, Amin H, Ghazouani L, Ben Haj Khalifa S, Ben Khalafallah A, Aded F, et al. Polymorphisms of human platelet alloantigens HPA-1 and HPA-2 associated with severe coronary artery disease. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2010;19(5):302-7.
24. Parveen F, Tuteja M, Agrawal S. Polymorphisms in MTHFR, MTHFD, and PAI-1 and recurrent miscarriage among North Indian women. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2013;288(5):1171-7.
25. Al Sallout RJ, Sharif FA. Polymorphisms in NOS3, ACE and PAI-1 genes and risk of spontaneous recurrent miscarriage in the Gaza Strip. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2010;19(2):99-104.
26. Gorgi Y, Sfar I, Ben Abdallah T, Aouadi H, Abderrahim E, Bardi R, et al. Human platelet antigens: HPA-1, -2, -3, -4, and -5 polymorphisms in kidney transplantation. *Transplantation proceedings*. 2007;39(8):2568-70.
27. Lucas G, Culliford S, Green F, Sidra G, Calvert A, Green A, et al. Recipient-derived HPA-1a antibodies: a cause of prolonged thrombocytopenia after unrelated donor stem cell transplantation. *Transfusion*. 2010;50(2):334-9.
28. Verdichio-Moraes CF, Toralles-Pereira C, Grotto RM, Silva GF, Pardini MI. Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in patients infected with hepatitis C virus. *Journal of medical virology*. 2009;81(4):757-9.
29. Kalman DA, Albuquerque Diniz EM, Grossman T, Alfano J, Ventura GAB, Melo AMAGP, et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: report of two cases and review of the literature. *Rev Med (São Paulo)*. 2010;89(2):5.
30. Woelke C, Eichler P, Washington G, Flesch BK. Post-transfusion purpura in a patient with HPA-1a and GPIIb/IIIa antibodies. *Transfusion medicine*. 2006;16(1):69-72.
31. Jia Y, Li W, Liu N, Zhang K, Gong Z, Li D, et al. Prevalence of platelet-specific antibodies and efficacy of crossmatch-compatible platelet transfusions in refractory patients. *Transfusion medicine*. 2014;24(6):406-10.
32. Roberts I, Stanworth S, Murray NA. Thrombocytopenia in the neonate. *Blood reviews*. 2008;22(4):173-86.
33. Peterson JA, Kanack A, Nayak D, Bougie DW, McFarland JG, Curtis BR, et al. Prevalence and clinical significance of low-avidity HPA-1a antibodies in women exposed to HPA-1a during pregnancy. *Transfusion*. 2013;53(6):1309-18.
34. Ghevaert C, Campbell K, Walton J, Smith GA, Allen D, Williamson LM, et al. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2007;47(5):901-10.

35. McFarland JG, Blanchette V, Collins J, Newman PJ, Wang R, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to a new platelet-specific alloantibody. *Blood*. 1993;81(12):3318-23.
36. Kroll H, Kiefel V, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. Sra, a private platelet antigen on glycoprotein IIIa associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1990;76(11):2296-302.
37. Santoso S, Amrhein J, Hofmann HA, Sachs UJ, Walka MM, Kroll H, et al. A point mutation Thr(799)Met on the alpha(2) integrin leads to the formation of new human platelet alloantigen Sit(a) and affects collagen-induced aggregation. *Blood*. 1999;94(12):4103-11.
38. Peterson JA, Balthazor SM, Curtis BR, McFarland JG, Aster RH. Maternal alloimmunization against the rare platelet-specific antigen HPA-9b (Max a) is an important cause of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2005;45(9):1487-95.
39. Noris P, Simsek S, de Bruijne-Admiraal LG, Porcelijn L, Huiskes E, van der Vlist GJ, et al. Max(a), a new low-frequency platelet-specific antigen localized on glycoprotein IIb, is associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1995;86(3):1019-26.
40. Kaplan C, Porcelijn L, Vanlieferinghen P, Julien E, Bianchi F, Martageix C, et al. Anti-HPA-9bw (Maxa) fetomaternal alloimmunization, a clinically severe neonatal thrombocytopenia: difficulties in diagnosis and therapy and report on eight families. *Transfusion*. 2005;45(11):1799-803.
41. Christie DJ, Pulkrabek S, Putnam JL, Slatkoff ML, Pischel KD. Posttransfusion purpura due to an alloantibody reactive with glycoprotein Ia/IIa (anti-HPA-5b). *Blood*. 1991;77(12):2785-9.
42. Shulman NR, Aster RH, Leitner A, Hiller MC. Immunoreactions Involving Platelets. V. Post-Transfusion Purpura Due to a Complement-Fixing Antibody against a Genetically Controlled Platelet Antigen. A Proposed Mechanism for Thrombocytopenia and Its Relevance in "Autoimmunity". *The Journal of clinical investigation*. 1961;40(9):1597-620.
43. MacFarland T, Barkema GT, Marko JF. Equilibrium phase transitions in a porous medium. *Physical review B, Condensed matter*. 1996;53(1):148-58.
44. Kekomaki S, Volin L, Koistinen P, Koivunen E, Koskimies S, Ruutu T, et al. Successful treatment of platelet transfusion refractoriness: the use of platelet transfusions matched for both human leucocyte antigens (HLA) and human platelet alloantigens (HPA) in alloimmunized patients with leukaemia. *European journal of haematology*. 1998;60(2):112-8.
45. Thiagarajan P, Afshar-Kharghan V. Platelet transfusion therapy. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2013;27(3):629-43.
46. Holbro A, Infanti L, Sigle J, Buser A. Platelet transfusion: basic aspects. *Swiss medical weekly*. 2013;143:w13885.
47. Kumawat V, Sharma RR, Malhotra P, Marwaha N. Prevalence of risk factors for platelet transfusion refractoriness in multitransfused hemato-oncological patients at tertiary care center in North India. *Asian journal of transfusion science*. 2015;9(1):61-4.
48. Blanchette V, Bolton-Maggs P. Childhood immune thrombocytopenic purpura: diagnosis and management. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2010;24(1):249-73.
49. Kistangari G, McCrae KR. Immune thrombocytopenia. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2013;27(3):495-520.
50. Kayal L, Jayachandran S, Singh K. Idiopathic thrombocytopenic purpura. *Contemporary clinical dentistry*. 2014;5(3):410-4.
51. Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2004;30(6):593-601.

52. Hauck-Dlimi B, Hammon K, Eckstein R, Ott S, Zimmermann R, Dengler T, et al. Human platelet antigen genotypes in Turkish and Caucasian blood donors in Germany. *Tissue antigens*. 2012;80(3):214-8.
53. Muniz-Diaz E, Arilla M, Ibanez M, Bosch MA, Pastoret C, Madoz P. [Frequency of platelet alloantigens in the Spanish population]. *Sangre*. 1993;38(4):289-93.
54. Salem AH, Abdel Hamed AE, Abdalla EM, Almawi W. Gene frequencies of human platelet alloantigens 1-5 in two Arab populations. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2014;12 Suppl 1:s281-5.
55. Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata K, Ueno I, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfusion medicine*. 1998;8(2):129-32.
56. Tan JY, Lian LH, Nadarajan VS. Genetic polymorphisms of human platelet antigens-1 to -6, and -15 in the Malaysian population. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2012;10(3):368-76.
57. Nie YM, Zhou HJ, Fu YS, Wang CX, Ma JP. The allele frequencies of HPA 1-16 determined by PCR-SSP in Chinese Cantonese donors. *Transfusion medicine*. 2010;20(6):376-82.
58. De La Vega Elena CD, Nogues N, Fernandez Montoya A, Chialina S, Blanzaco PD, Theiller E, et al. Human platelet-specific antigens frequencies in the Argentinean population. *Transfusion medicine*. 2008;18(2):83-90.
59. Castro V, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM, Soares M, Menezes RC, Goncalves MS, et al. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. 1999;26(5):355-60.
60. Covas DT, Biscaro TA, Nasciutti DC, Guerreiro JF, Santos SE, Zago MA. Gene frequencies of the HPA-3 and HPA-5 platelet antigen alleles among the Amerindians. *European journal of haematology*. 2000;65(2):128-31.
61. Chiba AK, Bordin JO, Kuwano ST, Figueiredo MS, Carvalho KI, Vieira-Filho JP, et al. Platelet alloantigen frequencies in Amazon Indians and Brazilian blood donors. *Transfusion medicine*. 2000;10(3):207-12.
62. Mangerona CM, Garcia FB, Moraes-Souza H. Frequency of human platelet antigens (HPA)-1, -2, -5 and -15 in Brazilian blood donors and establishment of a panel of HPA-typed donors. *Transfusion medicine*. 2015;25(3):189-94.
63. Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmuller de Araujo A, Leite Goes Gitai D, Aparecida da Silva D, et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PloS one*. 2013;8(9):e75145.
64. Simsek S, Faber NM, Bleeker PM, Vlekke AB, Huiskes E, Goldschmeding R, et al. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood*. 1993;81(3):835-40.
65. Shih MC, Liu TC, Lin IL, Lin SF, Chen CM, Chang JG. Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-13, Oe and Gov platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, Filipino and Thai populations. *International journal of molecular medicine*. 2003;12(4):609-14.
66. Kuniyoshi AM, Chiba AK, Vieira Filho JP, Castro BS, Bordin JO. HPA-9 and HPA-3 allelic frequencies in Brazilian blood donors and Amazon Indians. *Transfusion medicine*. 2010;20(5):354-5.
67. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Fourth Edition ed: Press; 2012.
68. Edelmann L, Hashmi G, Song Y, Han Y, Kornreich R, Desnick RJ. Cystic fibrosis carrier screening: validation of a novel method using BeadChip technology. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2004;6(5):431-8.
69. Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox sanguinis*. 2001;80(1):1-11.

70. Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF. Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, white, and Korean populations. *Transfusion*. 1995;35(10):863-7.
71. Halle L, Bigot A, Mullen-Imandy G, M'Bayo K, Jaeger G, Anani L, et al. HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies. *Tissue antigens*. 2005;65(3):295-8.
72. Ferrer G, Muniz-Diaz E, Aluja MP, Arilla M, Martinez C, Nogues R, et al. Analysis of human platelet antigen systems in a Moroccan Berber population. *Transfusion medicine*. 2002;12(1):49-54.
73. Mojaat N, Halle L, Proulle V, Hmida S, Ben Hamed L, Boukef K, et al. Gene frequencies of human platelet antigens in the Tunisian population. *Tissue antigens*. 1999;54(2):201-4.
74. Holensteiner A, Walchshofer S, Adler A, Kittl EM, Mayr WR, Panzer S. Human platelet antigen gene frequencies in the Austrian population. *Haemostasis*. 1995;25(3):133-6.
75. Pavic M, Zadro R, Herak DC, Antolic MR, Dodig S. Gene frequencies of platelet-specific antigens in Croatian population. *Transfusion medicine*. 2010;20(2):73-7.
76. Korinkova P, Suttner J, Vytiskova J, Stehlikova M. [Fetomaternal alloimmune thrombocytopenia--possibilities of diagnosis and exchange transfusion]. *Ceska gynekologie / Ceska lekarska spolecnost J Ev Purkyne*. 1999;64(1):28-31.
77. Steffensen R, Kaczan E, Varming K, Jersild C. Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. *Tissue antigens*. 1996;48(2):93-6.
78. Merieux Y, Debost M, Bernaud J, Raffin A, Meyer F, Rigal D. Human platelet antigen frequencies of platelet donors in the French population determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Pathologie-biologie*. 1997;45(9):697-700.
79. Carlsson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C. Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the platelet receptors for fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand factor (GPIb/IX), and collagen (GPIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1997;28(7):1392-5.
80. Drzewek K, Brojer E, Zupanska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transfusion medicine*. 1998;8(4):339-42.
81. Pavkovic M, Petlichkovski A, Strezova A, Arsov T, Trajkov D, Spiroski M. Gene frequencies of human platelet antigens in the Macedonian population. *Tissue antigens*. 2006;67(3):241-6.
82. Boehlen F, Bulla O, Michel M, Reber G, de Moerloose P. HPA-genotyping and antiplatelet antibodies in female blood donors. *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association / EHA*. 2003;4(6):441-4.
83. Jones DC, Bunce M, Fuggle SV, Young NT, Marshall SE. Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. 2003;30(6):415-9.
84. Sellers J, Thompson J, Guttridge MG, Darke C. Human platelet antigens: typing by PCR using sequence-specific primers and their distribution in blood donors resident in Wales. *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. 1999;26(6):393-7.
85. Feng ML, Liu DZ, Shen W, Wang JL, Guo ZH, Zhang X, et al. Establishment of an HPA-1 to -16-typed platelet donor registry in China. *Transfusion medicine*. 2006;16(5):369-74.
86. Santoso S, Santoso S, Kiefel V, Masri R, Mueller-Eckhardt C. Frequency of platelet-specific antigens among Indonesians. *Transfusion*. 1993;33(9):739-41.
87. Nogues N, Subirana L, Garcia Manzano A. Human platelet alloantigens in a Mexican population: a comparative gene frequency study *Vox sanguinis*. 2000;78:60.

88. Kekomaki S, Partanen J, Kekomaki R. Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. *Transfusion medicine*. 1995;5(3):193-8.
89. Mazzucco L, Santini R, Contino L. Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5: 6th European Symposium on platelet, Granulocyte and Red Cell Immunobiology (Abstract book) 2000.
90. Randen I, Sorensen K, Killie MK, Kjeldsen-Kragh J. Rapid and reliable genotyping of human platelet antigen (HPA)-1, -2, -3, -4, and -5 a/b and Gov a/b by melting curve analysis. *Transfusion*. 2003;43(4):445-50.
91. Bennett JA, Palmer LJ, Musk AW, Erber WN. Gene frequencies of human platelet antigens 1-5 in indigenous Australians in Western Australia. *Transfusion medicine*. 2002;12(3):199-203.
92. Halle L, Bach KH, Martageix C, Bianchi F, Le TKT, Morel-Kopp MC, et al. Eleven human platelet systems studied in the Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations. *Tissue antigens*. 2004;63(1):34-40.
93. Kulkarni B, Mohanty D, Ghosh K. Frequency distribution of human platelet antigens in the Indian population. *Transfusion medicine*. 2005;15(2):119-24.
94. Bhatti FA, Uddin M, Ahmed A, Bugert P. Human platelet antigen polymorphisms (HPA-1, -2, -3, -4, -5 and -15) in major ethnic groups of Pakistan. *Transfusion medicine*. 2010;20(2):78-87.
95. Tanaka S, Taniue A, Nagao N, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, et al. Simultaneous DNA typing of human platelet antigens 2, 3 and 4 by an allele-specific PCR method. *Vox sanguinis*. 1995;68(4):225-30.

Apêndices (ANEXOS)

ANEXO 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: ``Polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias em doadores de plaquetaférese do Hemocentro do Amazonas``.

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você é doador de plaquetaférese e/ou sangue total e está sendo convidado (a) a participar do estudo ``Polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias em doadores de plaquetaférese do Hemocentro do Amazonas``.

Os avanços na área da hemoterapia ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é tão importante. O objetivo deste estudo é validar uma nova técnica para aumentar a segurança dos procedimentos empregados na transfusão de plaquetas, especialmente oferecer um melhor tratamento ao paciente que irá receber a transfusão.

Ao concordar com a proposta, serão coletados alguns dados de identificação, além da coleta de 5 mL de sangue para a análise de fatores relacionados à compatibilidade entre doador e receptor de plaquetas. Dessa forma, será possível no futuro, a criação de um banco de dados para auxiliar na seleção de doadores compatíveis com o paciente que necessitará de uma transfusão.

Você poderá ter algum desconforto quando receber a picada para colher o sangue, desconforto que não traz nenhum risco pra sua saúde e será coletado por pessoa qualificada.

Você terá o direito de não participar, ou caso aceite participar poderá obter informações sobre a pesquisa ou solicitar ser retirado do estudo a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento neste Hemocentro. Caso você não concorde em participar, isso não mudará a sua condição de doador nesta Instituição.

Para a participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, e as despesas com a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois o tubo com a sua amostra será identificado com código de barras.

Você poderá fazer todas as perguntas que julgar necessárias, antes e durante o andamento da pesquisa.

Sua participação é totalmente voluntária.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

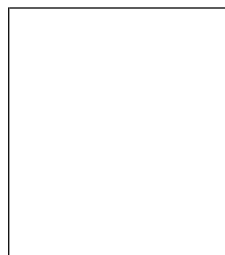
Título do Projeto: ``Polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias em doadores de plaquetaférese do Hemocentro do Amazonas``.

Eu, _____,
li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que irá servir o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre pra interromper a minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar da pesquisa. Eu concordo em participar do estudo.

Manaus, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Documento de identidade



Digital do voluntário

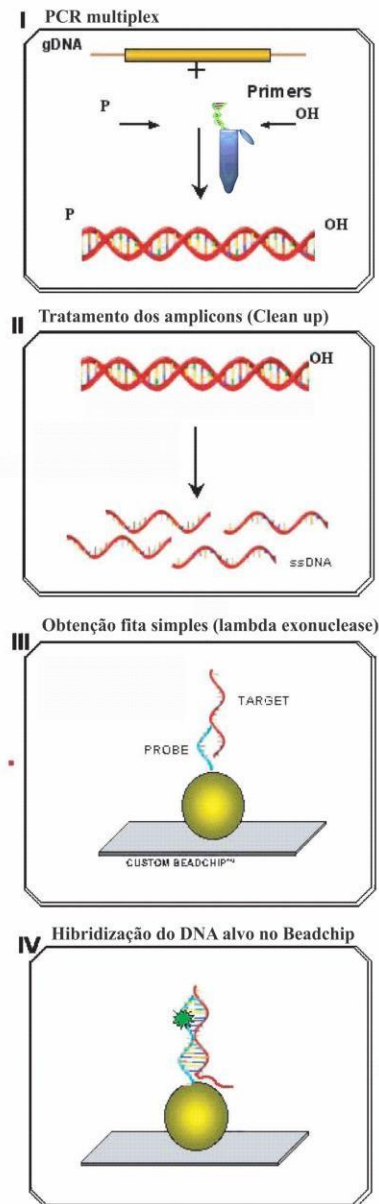
Assinatura do pesquisador responsável

Telefone de contato do pesquisador
Simone Schneider Weber - (92) 82089902 ou 3655 0231

Em caso de dúvida deste documento, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM, pelo telefone (92) 3655-0100.

ANEXO 2. Protocolo de Genotipagem *BeadChip*[®] HPA

Metodologia *Beadchip*



I. PROCESSAMENTO da PCR MULTIPLEX

A. PREPARO DOS REAGENTES

1. Determinar o número de amostras e controles que devem ser testados.
2. Verificar o nome dos reagentes, lotes, validade e fabricante.
3. Comparar o lote do kit de reagentes com o lote das lâminas a serem utilizadas. Os lotes devem ser os mesmos.

4. Os reagentes devem permanecer resfriados (gelo) por um período de 5 a 10 minutos antes de serem utilizados (exceto o *Clean Up* que deverá ser mantido no freezer até a hora do uso).
5. Após descongelados, todos os reagentes devem ser agitados (vortex e spin), armazenar imediatamente o restante que não foi utilizado.
6. Utilizar a tabela abaixo para preparar os reagentes. A tabela é uma diretriz, com acréscimo de 10% do volume necessário para a realização dos ensaios (o volume para 1 amostra é exato sem reagente em excesso).
7. Preparar o PCR Master Mix de acordo com a tabela abaixo e manter em gelo (rack térmica) até o momento de ser utilizado. Quando calcular o número de testes, lembrar de incluir os controles.

Reagentes /Anostras		1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
HPA eMAP PCR Mix μL	Adicionar em um flaconete	16	150	384	432	592	720	880	1008	1168	1296	1456	1584	1744
HotStar Taq DNA polymerase (U/ μL)		1	9	19	27	37	45	55	63	73	81	91	99	109

8. De acordo com a tabela abaixo, aliquotar o PCR Master Mix numa tira de 8 tubos.

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volume μL por tubo na tira	Ir para etapa 9	38	56	76	92	112	128	148	164	188	200	224

9. Dispensar 17 μL do PCR Master Mix em cada microtubo apropriadamente identificado. Sempre utilizar ponteiras com filtros.
10. Selar o microtubo e transferir para área específica para a adição do DNA, fora da área pré-PCR.
11. Pipetar 8 μL de DNA em cada microtubo de PCR e homogeneizar 3 vezes com a pipeta ou utilizar vortex
12. Para o controle negativo dispensar 8 μL de H Odd (*nuclease free*) no microtubo apropriado e homogeneizar 3 vezes com a pipeta utilizando sempre ponteira com filtro.
13. Selar cuidadosamente os microtubos, agitar levemente (vortex) e centrifugar (spin).

14. Colocar os microtubos no termociclador de acordo com o protocolo de cada PCR.

Ciclos no termociclador (Modelo Applied Biosystems – Modelo Veriti)

94°C - 15 min

94°C - 30 seg, rampa de 60%
62°C - seg, rampa 50%
72°C - 50 seg, rampa 35%

30 ciclos

72°C – 8 min

4°C até a retirada das amostras.

Após o término da reação, retirar os produtos de PCR do termociclador e centrifugar.

II. PROCESSAMENTO PÓS-PCR (Tratamento Amplicons)

1. Agitar os produtos de PCR vigorosamente e centrifugar (vortex e spin – segurar o botão de spin até a velocidade máxima da centrífuga e soltar).
2. Preparar e identificar uma nova tira
3. Transferir 6,5µL de cada produto de PCR para a nova tira. Utilizar **somente ponteiras com filtro**.
4. Aliquotar o reagente *Clean Up* para a realização dos testes numa tira de 8 ou 16 tubos utilizar pipeta monocanal, e adicionar reagentes conforme tabela abaixo:

Amostras		1	8	16
Clean Up Stock solução de trabalho µL	Flaconetes	2	18	36

Se for realizar teste > 16 amostras utilizar pipeta multicanal conforme tabela abaixo:

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volume (µL) do reagente Clean up por tubo na tira	Ir para a etapa 5	6	9	12	14	16	18	20	22	24	26	28

5. Adicionar 02µL de reagente *Clean Up* a cada poço e homogeneizar 3 vezes com pipeta. Descartar o reagente que não foi utilizado..
6. Selar cuidadosamente o microtubo, agitar levemente (vortex) e centrifugar (spin).

7. Colocar a microtubo no termociclador e executar o seguinte protocolo:

37 °C 15 min.

85°C 8 min.

4 °C até à remoção das tiras. O tempo não deve ultrapassar a 3 horas

III. PROCESSAMENTO PÓS-PCR - OBTENÇÃO DA FITA SIMPLES (LAMBDA EXONUCLEASE)

1. Homogeneizar (vortex) e centrifugar (spin) os microtubos contendo os produtos de PCR limpos.
2. Aliquotar o reagente, Lambda Exonuclease, para realização dos testes numa tira de 8 ou 16 microtubos. Se for utilizar pipeta monocanal, adicionar reagentes conforme tabela abaixo:

Amostras		1	8	16
Volume µL Lambda Exonuclease	Flaconetes	2	18	36

Se for realizar teste > 16 amostras utilizar pipeta multicanal conforme tabela abaixo

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Volume (µL) do reagente Lambda Exonuclease por tubo na tira	Ir para a etapa 5	6	9	12	14	16	18	20	22	24	26	28

3. Adicionar a cada microtubo 02µL da solução de Lambda Exonuclease e homogeneizar 3 vezes com uma pipeta
4. Selar cuidadosamente o microtubo, agitar levemente (vortex) e centrifugar (spin).
5. Colocar os microtubos no termociclador e executar o seguinte protocolo:

37 °C 15 min.

85°C 8 min.

4 °C até à remoção das tiras.

6. Ligar e preparar a incubadora Boekel Scientific (colocar papel toalha umedecido com H₂O destilada estéril). Deixar atingir a temperatura de **55°C**.
7. Ligar o sistema de captura de imagem (X-Cite e o Opti Scan II) e abrir o programa AISR3.0VI.
8. Identificar as lâminas contendo os *BeadChip*[®] e deixá-las à temperatura ambiente por 15 minutos.
9. Transferir os dados do CD para o computador. Esta etapa deve ser realizada na abertura de cada kit.

IV. HIBRIDIZAÇÃO DO DNA ALVO NO *BeadChip*[®]

1. Verificar se o forno de hibridização está na temperatura de 55°C.
2. Assegurar que as lâminas do *BeadChip*[®] estão em temperatura ambiente.
3. Agitar os produtos de PCR vigorosamente e centrifugar (vortex e spin).
4. Aliquotar o reagente, Elongação eMAP[®] para realização dos testes numa tira de 8 ou 16 microtubos. Ter cuidado para evitar a formação de espuma. Se for utilizar pipeta monocal, adicionar reagentes conforme tabela abaixo:

Amostras		1	8	16
Volume µL eMAP elongase	Flaconetes	10	90	180

Se for realizar teste > 16 amostras utilizar pipeta multicanal conforme tabela abaixo:

Até a amostra	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
eMAP elongase (µL) por tubo na tira	Ir para a etapa 5	25	38	47	59	70	80	90	100	114	125	135

5. Adicionar 10µL do reagente eMAP[®] em cada amostra e homogeneizar 3 vezes com a pipeta. Utilizar somente **ponteiras com filtro**. Descartar o reagente não utilizado.
6. Transferir 18µL do Mix para o HPA *BeadChip*[®] correspondente. Utilizar somente **ponteiras com filtro**.
7. Colocar as lâminas *BeadChip*[®] no forno de hibridização e incubar durante 20 minutos a 55°C.
8. Retirar as lâminas do forno e lavar com água destilada mantendo a lâmina na vertical segurando nas laterais.
9. Enxaguar cada *BeadChip*[®] individualmente com H₂O sob um fluxo de pressão constante. O fluxo de água deve ser perpendicular à face da lâmina e a

aproximadamente 2,5cm de distância. Enxaguar cada *BeadChip*[®] durante aproximadamente 3 segundos

10. Remover o excesso da água da lâmina utilizando ar comprimido. Não agitar a embalagem de ar comprimido. Remover o excesso de água da parte traseira da lamina com papel toalha.

11. Ler as lâminas *BeadChip*[®] utilizando o BioArray Solutions AIS400 Array Imaging System. Processar as imagens utilizando o software HPA Analysis no BioArray Solutions Information System (BASIS).

Anexo 3. Parecer Consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: POLIMORFISMOS DAS GLICOPROTEÍNAS PLAQUETÁRIAS EM DOADORES DE PLAQUETAFÉRESE DO HEMOCENTRO DO AMAZONAS

Pesquisador: SIMONE SCHNEIDER WEBER

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 32008514.9.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Ministério da Saúde

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 809.126

Data da Relatoria: 28/07/2014

Apresentação do Projeto:

A seleção de doadores de plaquetas por aférese (plaquetaférese) genotipados para os principais polimorfismos dos antígenos plaquetários humanos representa um benefício na transfusão de plaquetas HPA compatível com o receptor. A compatibilidade entre doador e receptor, previne a produção de aloanticorpos contra aloantígenos das plaquetas transfundidas, ou seja, previne a aloimunização. Nesse sentido, esse trabalho propõe a

aplicação de uma técnica de PCR multiplex associada à tecnologia de Microarranjo, denominada Beadcheap. Essa metodologia é capaz de detectar os 11 principais sistemas de antígenos plaquetários humanos (HPA-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 e 15) e seus alelos: selvagem (a) e mutado (b). A tipagem molecular proposta nesse estudo visa à criação de uma base de dados com o perfil genotípico dos doadores para os antígenos mais comumente envolvidos em casos de aloimunização plaquetária.

Este é um estudo do tipo observacional descritivo transversal, que se caracteriza por descrever uma situação (neste caso, o polimorfismo das glicoproteínas de membrana das plaquetas) na população estudada (doadores de plaquetas por aférese).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo PRIMÁRIO

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq

Bairro: Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 809.126

Descrever a frequência dos polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias em doadores de plaquetaférese no Amazonas.

Objetivo Secundário:

Validar a técnica de genotipagem de HPAs em doadores, visando construir um banco de doadores genotipados para os principais antígenos plaquetários humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos previsto para este estudo estão associados a coleta de amostra de sangue dos doadores, que poderá ocasionar algum desconforto durante a punção. Porém, o procedimento será realizado por uma equipe de coleta treinada e preparada para tal procedimento. Outra hipótese de risco é referente a metodologia aplicada para a genotipagem, a qual poderá ser invalidada pela contaminação com amplicons (fragmentos de DNA amplificados pela técnica de PCR). Para minimizar esse risco, a pesquisadora e sua equipe irá tomar as medidas de boas prática em laboratório de biologia molecular e implementar controles negativos durante a execução da técnica, os quais visam detectar tal contaminação.

Benefícios:

A seleção de doadores de plaquetas por aférese (plaquetaférese) genotipados para os principais polimorfismos dos antígenos plaquetários humanos representa um benefício na transfusão de plaquetas HPA compatível com o receptor. A compatibilidade entre doador e receptor, previne a produção de aloanticorpos contra aloantígenos das plaquetas transfundidas, ou seja, previne a aloimunização. Portanto, essa iniciativa representa uma inovação para à assistência à população do estado do Amazonas, uma vez que propõe o uso de biologia molecular aplicada ao diagnóstico das alterações nas glicoproteínas de membrana plaquetárias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande relevância científica, bem descrita de execução viável.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados e de acordo com a resolução 196/96.

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq

Bairro: Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 809.126

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Apresentou todas as alterações solicitadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 26 de Setembro de 2014

**Assinado por:
Adriana Malheiro
(Coordenador)**