

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MANOELA VALMORBIDA

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS  
POR MÉTODOS MOLECULARES EM DOADORES DE SANGUE  
DO ESTADO DE SANTA CATARINA**

FLORIANÓPOLIS  
2017

**MANOELA VALMORBIDA**

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS  
POR MÉTODOS MOLECULARES EM DOADORES DE SANGUE  
DO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia, apresentado ao Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para conclusão da Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

**Coorientadora:** Profa. Dra. Daiane Cobianchi da Costa

FLORIANÓPOLIS

2017

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo por ter aceitado o desafio, e me orientado em todos os momentos que necessitei. Me auxiliando com correções, sugestões e dando sempre suporte científico e emocional.

À Profa. Dra. Daiane Cobiانchi da Costa, a qual acima de tudo é uma grande amiga que o HEMOSC me presenteou, obrigada por todo apoio científico e emocional.

Ao LBMMS (Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia) local que encontrei profissionais que se tornaram grandes amigos, aprendi e aprendo muito dessa linda profissão do farmacêutico.

Ao HEMOSC e colaboradores, principalmente ao Msc Everaldo Schörner, os quais acreditaram em mim, confiaram e sempre se mostraram dispostos e colaborativos para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Aos meus pais Atílio e Odila Valmorbida, obrigada pela educação, pelo incentivo, apoio, pela presença diária mesmo com a distância física, vocês são a razão e os responsáveis por eu estar aqui, e tudo que eu faço é por vocês.

À minha irmã Bruna, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando, e me fazendo rir em todos os momentos, obrigada pelo carinho.

Ao meu noivo Gerson Junior que sempre esteve ao meu lado me dando suporte emocional, assim como assessoria científica, que sempre me incentivou e procurou mostra-me o foco em todos os momentos, obrigada pelo carinho e dedicação.

À Caroline Moreira e a Cristiane Barth, que nesses anos de “mãe” UFSC sempre estiveram presentes nos estudos e na vida, são meus presentes da faculdade, amigas que tenho um enorme carinho.

Às minhas amigas Bruna Menezes, Katherin Misura, Camila Blos, Tamires Ben, Carolina Cirne que mesmo longe sempre se fizeram presentes, e na minha mudança de cidade e universidade me incentivaram, apoiaram.

A todos que fizeram parte dessa caminhada, cada um que passou no meu caminho foi importante para eu aprender, crescer como profissional e como ser humano.

A Deus por permitir que eu pudesse trilhar esse caminho, por ter me iluminado em todos os momentos.

## RESUMO

O conhecimento e a detecção dos aloantígenos plaquetários humanos (do inglês *Human Platelet Antigen*; HPA) é essencial na prática transfusional, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos contra esses antígenos pode se tornar um grande problema clínico, principalmente nos casos de pacientes portadores de hemopatias ou outras doenças que requerem transfusões sanguíneas periódicas. A caracterização das bases moleculares dos vários sistemas de HPA, a partir de métodos moleculares, possibilita não apenas deduzir o antígeno relativo a cada sistema, mas também amplia o conhecimento sobre o desenvolvimento das aloimunizações plaquetárias. A utilização de técnicas de biologia molecular no diagnóstico tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da imunohematologia, o que aumenta a segurança e eficácia transfusional de pacientes politransfundidos. No entanto, embora existam protocolos de genotipagem de antígenos plaquetários bem estabelecidos e validados em alguns centros no Brasil, ainda não se conhece os polimorfismos dos sistemas HPA na população do estado de Santa Catarina. Diante disso, o objetivo deste estudo foi analisar a frequência dos polimorfismos responsáveis pela expressão dos antígenos plaquetários em amostras de doadores voluntários de sangue, do estado de Santa Catarina, para auxílio na identificação de doadores compatíveis para pacientes politransfundidos. Para essa finalidade, os dados de genótipos e fenótipos das amostras foram obtidos no banco de dados *Basis<sup>TM</sup>* (*BioArray Solutions<sup>TM</sup>*) e em seguida submetidos à análise estatística. Nos resultados das análises, foi possível observar que dentre os onze sistemas de HPAs analisados, a maior frequência encontrada foi para o alelo “a”, com exceção do HPA-15 que apresentou frequência bialélica. Neste estudo, foi encontrado um doador com o fenótipo para HPA-4 “AB”, o que dentro da população é raro, mostrando assim a importância da pesquisa. As pesquisas sobre os antígenos plaquetários no Brasil têm sido realizadas em pequenas populações ou em regiões pontuais. Pesquisas mais abrangentes são necessárias para que a busca de doadores compatíveis possa ser ampliada para todo o país e, dessa forma, aumentar e melhorar a segurança transfusional de pessoas politransfundidas.

**Palavras chave:** HPA. Antígenos, plaquetas.

## ABSTRACT

The knowledge about the detection of human platelet alloantigens (HPA) is essential in transfusion practice, since the development of antibodies against antigens may become a major clinical problem, especially in the cases of patients with hemopathy or other diseases that require periodic blood transfusions. The characterization of the molecular bases of the various HPA systems, based on molecular methods, allows not only to deduce the antigen relative to each system, but also to increase knowledge about the development of platelet alloimmunizations. The use of molecular biology techniques in the diagnosis has been fundamental for the insertion of new methodologies in the laboratory routine of immunohematology, which increases the safety and transfusion efficiency of multi-transfused patients. However, although there are well-defined and validated platelet antigen genotyping protocols in some non-Brazilian centers, they are not known by HPA systems in the population of the State of Santa Catarina. Therefore, the objective of this study was to analyze the frequency of polymorphisms responsible for the expression of platelet antigens in samples from volunteer blood donors in the State of Santa Catarina, to assist in the identification of compatible donors for multi-transfused patients. For this purpose, the genotype and phenotype data of the samples were obtained from the Basis<sup>TM</sup> database (BioArray Solutions<sup>TM</sup>) and then submitted to statistical analysis. In the results of the analysis, it was possible to observe that among the eleven HPA systems analyzed, the highest frequency was found for the allele "a", except for the HPA-15 which presented biallelic frequency. In this study, a donor with the HPA-4 "AB" phenotype was found, which is rare within the population, thus showing the importance of the research. Research on platelet antigens in Brazil has been carried out in small populations or in specific regions. More comprehensive research is needed so that the search for compatible donors can be scaled up across the country and thereby increase and improve the transfusion safety of multi-transfused persons.

**Keywords:** HPA. Antigens, platelets.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIS	<i>Array Imaging System</i>
BASIS	<i>BioArray Solutions Information System</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
eMAP	Análise múltipla de polimorfismos
HLA	Antígenos leucocitários humanos ( <i>Human leukocyte antigen</i> )
HPA	Aloantígenos plaquetários humanos ( <i>Human platelet antigen</i> )
ISBT	Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea
LS	<i>Low signal</i>
mAbs	Anticorpos Monoclonais
MALDI-TOF	Tecnologia <i>bead-array</i> e ionização e dessorção a <i>laser</i> assistida por matriz – tempo de voo
MAIPA	Anticorpos monoclonais específicos de antígenos plaquetários
µL	Microlitro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	PCR seguida da digestão enzimática do produto amplificado
PCR-RT	PCR em tempo real
PCR-SSP	PCR alelo-específica
PPT	Púrpura pós-transfusional
PTAN	Púrpura trombocitopênica aloimune
RFNH	Reações febris não hemolíticas
RP	Refratariedade Plaquetária
SNPs	Polimorfismos de único nucleotídeo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>9</b>
2.1	ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS HUMANOS – HPA	9
2.2	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS	15
2.3	ALOIMUNIZAÇÃO PLAQUETÁRIA	16
2.4	SISTEMA ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS HLA	17
2.5	MÉTODOS PARA TIPAGEM HPA	19
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>5</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
5.1	AMOSTRAS UTILIZADAS	27
5.1.1	Amostras de doadores de sangue	27
5.1.2	CrITÉrios de incluso e excluso	27
5.2	METODOLOGIA	28
<b>6</b>	<b>CUIDADOS ÉTICOS</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSSO</b>	<b>32</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>35</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>37</b>
	<b>ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA PARA AUTORIZAO DE PESQUISA</b>	<b>41</b>
	<b>ANEXO B – AUTORIZAO PARA REALIZAO DE TRABALHO/PESQUISA CIENTÍFICA NA HEMORREDE HEMOSC</b>	<b>42</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O uso da transfusão de plaquetas, obtidas de concentrado de plaquetas ou por plaquetaférese, é útil na prevenção e tratamento de hemorragias em pacientes plaquetopênicos em decorrência de doenças medulares ou terapias citotóxicas (FONTÃO-WENTEL, 2008). Efeitos adversos às transfusões são frequentes na rotina dos bancos de sangue, como por exemplo, as reações febris não hemolíticas (RFNH) e refratariedade plaquetária (RP) em pacientes recebendo transfusão de plaquetas.

Os dois sistemas de antígenos mais envolvidos na aloimunização plaquetária são: os antígenos leucocitários humanos (HLA), presentes na membrana das plaquetas e também em outros tecidos e células sanguíneas, e os antígenos plaquetários humanos (HPA) específicos das plaquetas (DELAFLOR-WEISS; MINTZ, 2002; TINMOUTH et al., 2006). A aloimunização a estes antígenos ocorre devido à sensibilização previa durante a gestação, transfusões ou transplantes. Outros fatores também podem estar envolvidos, como o tipo de produto plaquetário transfundido, o número de transfusões recebidas, além do estado imunológico do paciente (BAJPAI et al., 2005). O principal tipo de concentrado de plaquetas transfundido, especialmente em nosso país, são plaquetas randomizadas de doadores, não deleucocitadas, de cinco a seis doadores o que expõe os pacientes a um maior número de antígenos de doadores e aumenta o risco de aloimunização. (FONTÃO-WENTEL, 2008; BRASIL, 2010)

Existem muitos métodos sorológicos convencionais para fenotipagem de plaquetas humanas, tais como imunofluorescência, hemaglutinação passiva mista, imobilização com anticorpos monoclonais específicos de antígenos plaquetários (MAIPA) e antígenos modificados capturados por ELISA. Todos esses testes requerem anticorpos específicos contra antígenos plaquetários. Além disso, alguns antígenos não podem ser identificados devido ao baixo número de plaquetas em pacientes afetados. A fenotipagem para todos os aloantígenos plaquetários tem sido difícil e restrita a poucos laboratórios (XU et al., 2009).

Os estudos utilizando técnicas moleculares possibilitaram o aumento na disponibilidade de plaquetas genotipadas para a elaboração de painéis de células para identificação de anticorpos plaquetários específicos, limitado até então pela escassez de antissoros de boa qualidade para a fenotipagem das plaquetas. Além

disso, após a análise da amostra dos pacientes e dos doadores, proporciona o fornecimento de sangue compatível para os pacientes, minimizando a aloimunização. Embora algumas técnicas moleculares já estejam validadas para determinadas populações brasileiras, é importante a implementação e validação dessas técnicas na população do estado de Santa Catarina, região sul do país, considerando a complexidade dos pacientes atendidos no estado (transplantados, leucêmicos, imunossuprimidos entre outros) (CASTILHO et al, 2000).

A origem étnica da população brasileira é altamente heterogênea, o que facilita a aloimunização. Somos um país formado por imigrantes da Europa, África e Ásia, bem como de Ameríndios, o que resultou em uma complexa miscigenação e herança genética diferenciada. Embora a população de Santa Catarina, região sul do país, ter sido formada majoritariamente por pessoas de origem europeia, é importante determinar a prevalência dos polimorfismos HPA nessa população que vem se miscigenando mais nos últimos anos com a imigração de latino-americanos, africanos entre outros povos (IBGE, 2007).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

As plaquetas são células anucleadas, são pequenos fragmentos formados pela fragmentação do citoplasma de megacariócitos, os quais são células grandes e poliplóides que se desenvolvem na medula óssea e posteriormente migram para o sangue periférico (LEEKSMÁ; COHEN, 1955; LEFRANÇAIS et al., 2017). As principais funções plaquetárias estão relacionadas à manutenção da hemostasia sanguínea pela imediata adesão à superfície endotelial lesada e à formação do agregado plaquetário estável (NEWMAN, 1991).

Por hora, são produzidas 10 milhões de plaquetas que apresentam sobrevida média de 10 dias e após esse período são retiradas da circulação pelo sistema retículo endotelial, principalmente pelo fígado e baço (LEFRANÇAIS et al., 2017). Quando ocorre um desbalanço, ou seja, queda na produção de plaquetas ou aumento de consumo ou destruição periférica, observa-se um quadro de plaquetopenia. A plaquetopenia por falência medular está relacionada a doenças hematológicas, oncológicas, oncohematológicas, e ao tipo de tratamento, como a radioterapia e/ou quimioterapia. Nesses casos, a transfusão de plaquetas é a principal terapia utilizada na prevenção e tratamento de hemorragias. Uma dose de plaquetas para transfusão pode ser constituída plaquetas randomizadas proveniente de coleta de sangue total de doadores ou por coleta em processo automatizado conhecido por aférese (FONTÃO-WENTEL, 2008; BRASIL, 2010).

Pacientes com doenças hematológicas malignas que recebem quimioterapia intensiva, muitas vezes necessitam de transfusões de plaquetas para prevenir complicações hemorrágicas. (LEVIN et al., 2004).

### 2.1 ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS HUMANOS – HPA

Os aloantígenos plaquetários humanos (do inglês *Human platelet antigen*; HPA) resultam de polimorfismos de glicoproteínas da membrana plaquetária capazes de induzir resposta imune em indivíduos susceptíveis durante a gestação, transfusão e transplantes (DE LA VEGA ELENA et al., 2008).

Essas reações imunológicas ocorrem através de mediadores presentes na superfície da membrana da plaqueta, onde há a expressão de receptores de

superfície. Estes receptores são glicoproteínas, sendo a GPIIb/IIIa e o complexo GPIba as mais abundantes na plaqueta (LI et al., 2012).

Atualmente, estão definidos 35 aloantígenos plaquetários (SULLIVAN et al., 2017). Desses, doze antígenos estão agrupados em seis grupos bialélicos (CURTIS, 2013). Inicialmente, os antígenos plaquetários receberam o nome do seu descobridor ou do paciente no qual o anticorpo foi identificado, por exemplo, Zw<sup>a</sup>, Zw<sup>b</sup>. Em 1990, a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) definiu critérios para a classificação e nomenclatura desses antígenos (VON DER BORNE; DECARY, 1990). Assim, os antígenos foram classificados dentro do Sistema imunogênico de HPA e numerados de acordo com a data da sua descrição, receberam a letra “a” e “b” os alelos de alta e baixa frequência, respectivamente. Para os sistemas que foram descritos apenas os antígenos de baixa frequência, seguidos da detecção do anticorpo correspondente, e não do seu correspondente de alta frequência, recebeu a letra w, e o sistema ainda não recebeu a numeração correspondente, até que se identifique o anticorpo que caracteriza o antígeno de alta frequência (Quadro 1).

Quadro 1: Sistemas HPA

Sistemas	Antígenos	Nomes originais	Glicoproteínas	CD
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	Zw <sup>a</sup> , PI <sup>A1</sup> Zw <sup>b</sup> , PI <sup>A2</sup>	GPIIIa	CD61
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	Ko <sup>b</sup> Ko <sup>a</sup> , Sib <sup>a</sup>	GPIIbalpha	CD42b
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	Bak <sup>a</sup> , Lek <sup>a</sup> Bak <sup>b</sup>	GPIIb	CD41
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	Yuk <sup>b</sup> , Pen <sup>a</sup> Yuk <sup>a</sup> , Pen <sup>b</sup>	GPIIIa	CD61
HPA-5	HPA-5a HPA-5b	Br <sup>b</sup> , Zav <sup>b</sup> Br <sup>a</sup> , Zav <sup>a</sup> , Hc <sup>a</sup>	GPIa	CD49b
	HPA-6bw	Ca <sup>a</sup> , Tu <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61
	HPA-7bw	Mo <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61
	HPA-8bw	Sr <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61

Sistemas	Antígenos	Nomes originais	Glicoproteínas	CD
	HPA-9bw	Max <sup>a</sup>	GP1Ib	CD41
	HPA10bw	La <sup>a</sup>	GP1IIa	CD61
	HPA11bw	Gro <sup>a</sup>	GP1IIa	CD61
	HPA12bw	Iy <sup>a</sup>	GP1Ib beta	CD42c
	HPA13bw	Sit <sup>a</sup>	GP1Ia	CD49b
	HPA14bw	Oe <sup>a</sup>	GP1IIa	CD61
HPA-15	HPA-15a HPA-15b	Gov <sup>b</sup> Gov <sup>a</sup>	CD109	CD109
	HPA-16bw	Duv <sup>a</sup>	GP1IIa	CD61
	HPA-17bw	Va <sup>a</sup>	GP1Ib/IIa	CD61
	HPA-18bw	Cab <sup>a</sup>	GP1Ia	CD49b
	HPA-19bw	Sta	GP1IIa	CD61
	HPA-20bw	Kno	GP1Ib	CD41
	HPA-21bw	Nos	GP1IIa	CD61
	HPA-22bw	Sey	GP1Ib	CD41
	HPA-23bw	Hug	GP1IIa	CD61
	HPA-24bw	Cab <sup>2a+</sup>	GP1Ib	CD41
	HPA-25bw	Swia	GP1Ia	CD49b
	HPA-26bw	Seca	GP1IIa	CD61
	HPA-27bw	Cab <sup>3a+</sup>	GP1Ib	CD41
	HPA-28bw	War	GP1Ib	CD41
	HPA-29bw	Kha <sup>b</sup>	GP1IIa	CD61

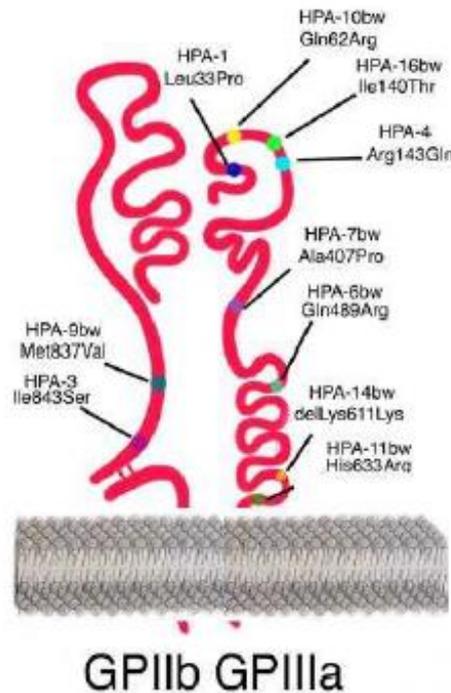
Fonte: Sistemas de antígenos plaquetários adaptado de [www.ebi.ac.uk/ipd/hpa](http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa).

O complexo glicoproteico GP1Ib/IIa (Figura 1) são os receptores mais abundantes na superfície plaquetária. Pertence à família de receptores denominados "integrinas", que são responsáveis pelas interações célula-célula e célula-proteínas. Estes receptores são moléculas heterodiméricas, constituídos de duas cadeias de

proteínas transmembrana, as subunidades a e b (CARAMORI et al., 1998; MERZONI, 2015).

Vários antígenos plaquetários estão localizados no GPIIb, como o HPA-1, HPA-4, HPA-6w, HPA-7w, HPA-8w, HPA-10w, HPA-11w e outros, na porção GPIIb como antígenos HPA-3 e HPA-9 (CARAMORI et al., 1998; MERZONI, 2015).

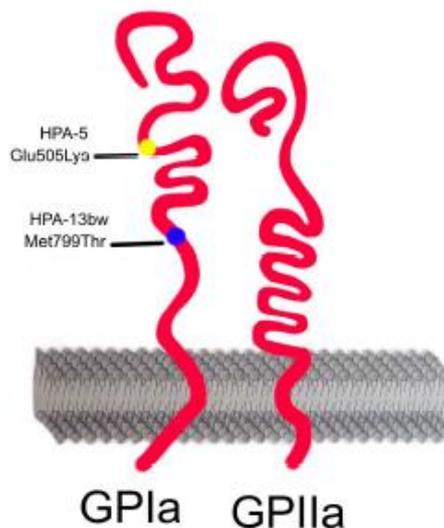
**Figura 1: Estrutura do complexo glicoproteico GPIIb/IIIa**



(WINTROBE, 2009)

O complexo glicoproteico Ia/IIa (Figura 2) é composto por um heterodímero de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo seu principal ligante o colágeno. Esta participa da adesão e ativação plaquetária. Nesse complexo são expressos os HPA-5 e HPA-13w (MERZONI, 2015).

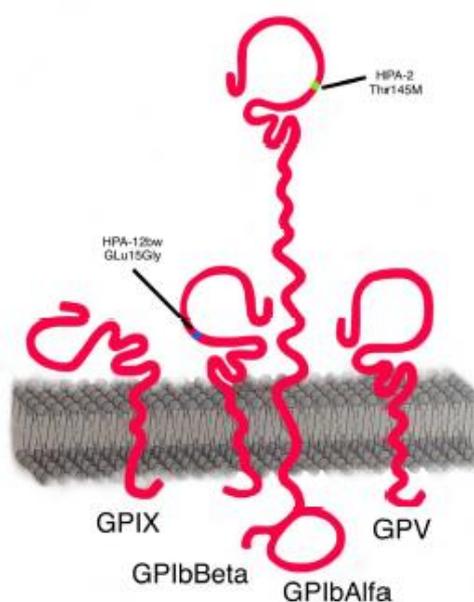
**Figura 2: Estrutura do complexo glicoproteico GPIa/GPIIa**



(WINTROBE, 2009)

O complexo GPIb/IX/V (Figura 3) é uma glicoproteína de superfície de membrana das plaquetas composta de um heterodímero, uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ , que estão unidas por uma ligação de dissulfeto. Este complexo é um heptamero e nele estão expressos os HPA-2 e HPA-12w.

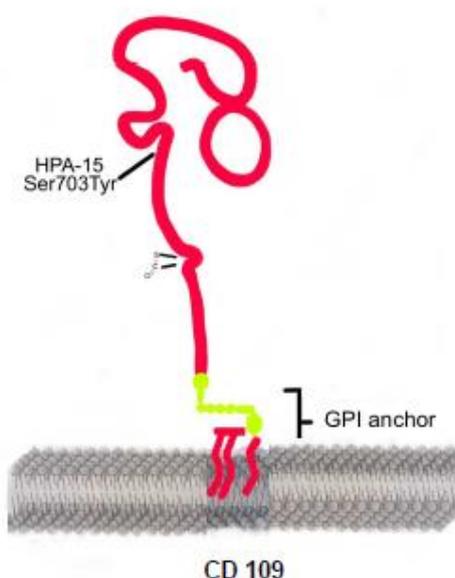
**Figura 3: Estrutura do complexo glicoproteico GPIb/IX/V**



(WINTROBE, 2009)

O HPA-15 é expresso na glicoproteína CD109 (Figura 4), que é um monômero ancorado na membrana plaquetária através da GPI e as bases genéticas dessa glicoproteína não foram completamente elucidadas (MERZONI, 2015).

**Figura 4: Estrutura da glicoproteína CD 109**



**(WINTROBE, 2009)**

As bases genéticas dos diferentes antígenos plaquetários é a substituição de um único nucleotídeo do gene, o qual leva a substituição de um aminoácido na sequência da glicoproteína envolvida. Essa descoberta permitiu o desenvolvimento de técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase para determinação de HPAs a partir de DNA genômico (HURD et al., 2002; SHEHATA et al., 2011).

Contudo, existem diversos métodos sorológicos convencionais para fenotipagem de plaquetas humanas, tais como imunofluorescência, hemaglutinação passiva mista, imobilização com anticorpos monoclonais específicos de antígenos plaquetários (MAIPA) e antígenos modificados capturados por ELISA (XU et al., 2009). Apesar disso, o valor dos testes sorológicos para fenotipagem HPA é limitado, devido ao pequeno número de plaquetas obtidas de pacientes trombocitopênicos. Além disso, é difícil a obtenção de reagentes confiáveis para fenotipagem de antígenos HPA, principalmente para HPA-5b, pois é um antígeno raro. Antissoros HPA muitas vezes contêm anticorpos HLA (*Human Leukocyte Antigen*) classe I, limitando assim a sua utilização em trabalhosos ensaios com

glicoproteínas específicas, tais como ensaios de imobilização de anticorpos monoclonais de antígenos plaquetários (MAIPA). Atualmente, anticorpos monoclonais (mAbs) são utilizados rotineiramente para fenotipagem de grupos sanguíneos, com exceção de HPA-1a, pois nenhum mAbs foi desenvolvido para fenotipagem HPA (HURD et al., 2002).

## 2.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS HPA

A investigação de aloantígenos plaquetários vem sendo investigada em diferentes populações do mundo. Esses estudos têm apresentado diferentes frequências alélicas nas populações (SIMSEK et al, 1993; DRZEWEK et al, 1998; CHIBA et al, 2000; ROZMAN, 2002; MERZONI, 2015).

As frequências HPA variam em diferentes populações, e, por essa razão, a investigação de polimorfismos alélicos de HPA é importante não somente por razões antropológicas e genéticas, mas também para melhor informação do risco de aloimunização para HPA entre distintas populações (CHIBA et al., 2000).

Estudos populacionais relataram consideráveis diferenças na distribuição de antígenos plaquetários em populações caucasianas (SIMSEK et al, 1993; DRZEWEK et al, 1998) e não caucasianas (CHIBA et al, 2000; ROZMAN, 2002).

Estudos imunogenéticos tem mostrado que há uma heterogênea diversidade de genótipos de HPA em diferentes grupos étnicos, levando a uma acentuada disparidade entre as populações sobre a frequência e especificidade dos anticorpos plaquetários específicos produzidos (ROZMAN, 2002).

Vários sistemas HPA são conhecidos e uma distribuição heterogênea dos alelos tem sido descrita em diferentes grupos étnicos. Uma similar prevalência de todos os alelos HPA (Sistemas HPA-1, -2, -3, -4 e -5) foi encontrada em brasileiros com descendência caucasiana e negra. Esses dados apresentados podem ser úteis no diagnóstico de doença plaquetária aloimune, aconselhamento genético e no desenvolvimento dos programas de rastreamento de doenças relacionadas os HPA (CASTRO et al., 1999).

Muitos autores relatam a frequência do alelo "a" para os sistemas HPA-1, -2, e -5 sendo maior que a frequência do alelo "b". Isso se observa em estudos com populações da Alemanha, Argentina, Áustria, Brasil, China, Congo, Croácia, Dinamarca, Egito, Espanha, Eslovênia, França, Indonésia, Itália, Malásia, Polinésia,

Polônia, Reino Unido (HOLENSTEINER, et al., 1995; DE LA VEJA ELENA, 2008; HAUCK-DLIMI, 2012; MERZONI, 2015). Em populações asiáticas, especialmente, a frequência do alelo “a” para o sistema HPA-3 aproxima-se da frequência encontrada para o alelo “b” (MERZONI, 2015).

É importante salientar que o Brasil recebeu a partir de 1500 imigrantes portugueses, alemães, italianos, espanhóis que deram início a colonização no país. A maioria dos indivíduos analisados em estudos brasileiros é da miscigenação desses colonizadores com índios e negros vindos da África (IBGE, 2007; GIOLO et al., 2012; MERZONI, 2015).

O sistema de colonização desenvolvida na região sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) tinha como objetivo realizar do povoamento mecanismos de conquista e manutenção do território, assim formando-se colônias homogêneas. Diferente de outras regiões do país, como São Paulo (IBGE, 2007). Contudo, a população vem miscigenando mais nos últimos anos com a imigração de latino-americanos, africanos entre outros povos.

### 2.3 ALOIMUNIZAÇÃO PLAQUETÁRIA

Na década de 80, foi introduzida a utilização de filtros para a remoção de leucócitos ainda presentes nos concentrados de plaquetas e plaquetaféreses. Este procedimento reduziu em aproximadamente 50% os casos de aloimunização plaquetária em pacientes politransfundidos (REBULLA, 2000; NOVOTNY, 1999), pois ao reduzir o número de leucócitos no componente transfundido, reduziu-se a possibilidade de ocorrer aloimunização. Porém, recentes estudos clínicos com pacientes que receberam componentes sanguíneos leucoreduzidos, mostram aloimunização nos casos estudados (SANZ et al., 2001; KIEFEL et al., 2001; LO et al., 2000, ZIM-RING et al., 2011).

Três condições clínicas podem resultar da aloimunização contra antígenos plaquetários humanos (HPA): púrpura trombocitopênica aloimune neonatal (PTAN), púrpura pós-transfusional (PPT) e refratariedade transfusional plaquetária. Nessas condições, a tipagem HPA, rápida e exata, do paciente é necessária, assim os diagnósticos podem ser confirmados, e produtos HPA compatíveis podem ser transfundidos se requeridos e, em PTAN, os pais podem ser aconselhados para futuras gestações (HURD et al., 2002).

A refratariedade plaquetária é caracterizada por uma resposta negativa, ou seja, ineficaz da transfusão de plaquetas. O que se espera ao transfundir um concentrado de plaquetas no paciente é a elevação da contagem dessas, contudo na condição de refratariedade isso não ocorre (FONTÃO-WENTEL, 2008).

Os pacientes politransfundidos são os que mais apresentam aloimunização, pois muitos deles encontram-se em tratamentos imunossupressores (tratamento com quimioterápicos ou radioterapia) e que devido à imunossupressão recebem em geral, uma maior dose de hemocomponentes durante o tratamento. Apesar de estes pacientes estarem com seu sistema imunológico comprometido, eles ainda apresentam aloimunização com taxas que variam de 30% a 50% para antígenos plaquetários (NOVOTNY, 1999).

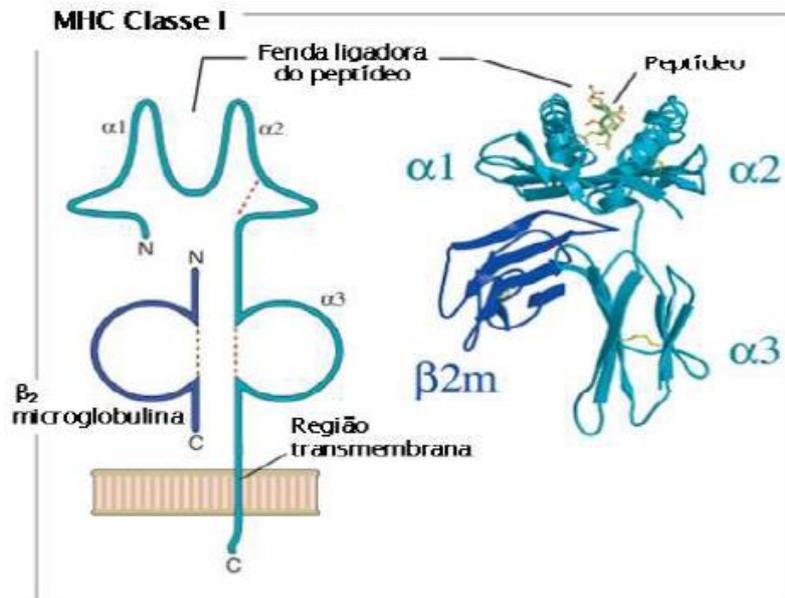
Anticorpos HPA estão presentes em pacientes com transfusão profilática de plaquetas no suporte com os anticorpos HLA, o que pode contribuir para a refratariedade clínica. Unidades de plaquetas compatíveis somente podem ser fornecidas para essa categoria de pacientes, se um grande número de doadores de aféreses forem tipadas para HPA tão bem como para HLA classe I (HURD et al., 2002), e dessa forma, seja criado um banco de doadores com HPA conhecidos.

## 2.4 SISTEMA ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS HLA

O sistema HLA são glicoproteínas presentes na superfície da membrana celular pertencem ao MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) e está envolvido diretamente na estimulação da resposta imune, sendo esta a sua principal função, através da apresentação de peptídeos antigênicos para células T auxiliaadoras (CD4+) e citotóxicas (CD8+) mediadoras da resposta imune (NAVARRETE, 2001). O HLA está classificado em três classes: I, II, III.

O HLA de classe I está presente na superfície de todas as células nucleadas e plaquetas. Consiste em antígenos presentes em glicoproteínas trans-membrana. Essas glicoproteínas são formadas por uma cadeia pesada  $\alpha$ , sendo três domínios:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  ligada a uma cadeia leve de  $\beta$  (Figura 5) (NAVARRETE, 2001).

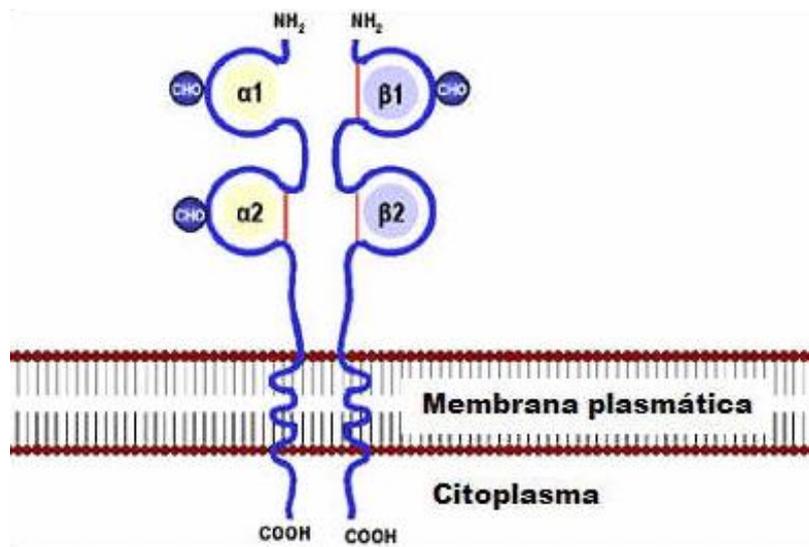
Figura 5: Estrutura da molécula do HLA Classe I



(ABBAS, 2007)

HLA de classe II são glicoproteínas trans-membrana, formados, no entanto, por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$  (Figura 6).

Figura 6: Estrutura da molécula do HLA Classe II



(MAYER, 2017)

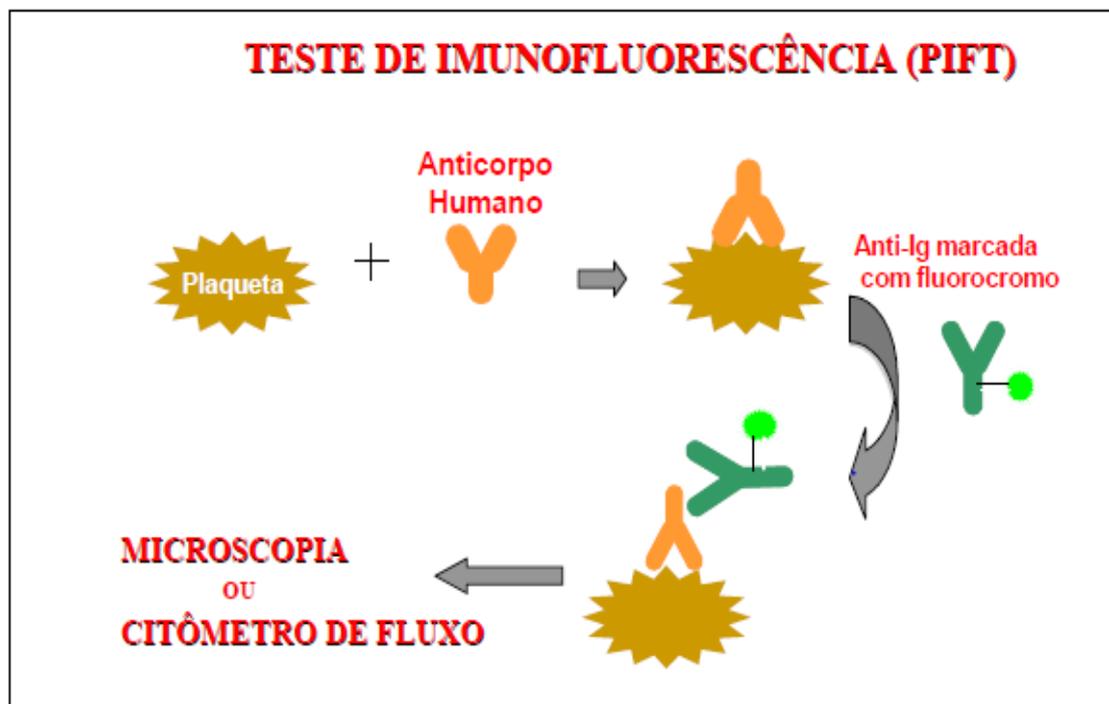
O HLA de classe III pertence a um grupo de diversas proteínas, incluindo complemento, fator de necrose tumoral, entre outras.

## 2.5 MÉTODOS PARA TIPAGEM HPA

Algumas técnicas para detecção de anticorpos contra os antígenos plaquetário têm sido utilizadas, como a Imunofluorescência, ELISA e técnicas em fase sólida como o MAIPA. (VON DEM BORNE et al., 1978; KIEFEL V, 1987; FONTÃO-WENTEL, 2008)

A imunofluorescência, desenvolvida por Von Dem Borne em 1978, foi por muito tempo a técnica padrão para detecção dos antígenos plaquetários (VON DEM BORNE et al., 1978). Como demonstrado na Figura 7, uma suspensão de plaquetas é incubada com o soro da amostra a ser testada, após é lavado com tampão apropriado, e incubado com anti-IgG marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A leitura ocorre por microscopia de fluorescência ou por citômetro de fluxo. A reação positiva apresenta fluorescência na membrana plaquetária (FONTÃO-WENTEL, 2008). Esta técnica utiliza suspensão de plaquetas como antígenos para detecção de anticorpos plaquetários, também podendo ser utilizada para detecção de anticorpos HLA e ABO. Melhorias na metodologia aumentaram a sensibilidade do método, como a utilização de citômetro de fluxo para leitura da reação. A realização desta metodologia é fácil, com duração entre três a quatro horas para sua realização, o que a torna útil quando há necessidade de resultados urgentes. Contudo, possui a desvantagem devido a presença de anticorpos HLA, o que dificulta a discriminação de outros anticorpos, necessitando assim, a utilização de um citômetro de fluxo, equipamento de alto custo, pouco presente nos serviços de hemoterapia (FONTÃO-WENTEL, 2008).

Figura 7: Técnica de PIFT ("Platelet Immunofluorescence Test")



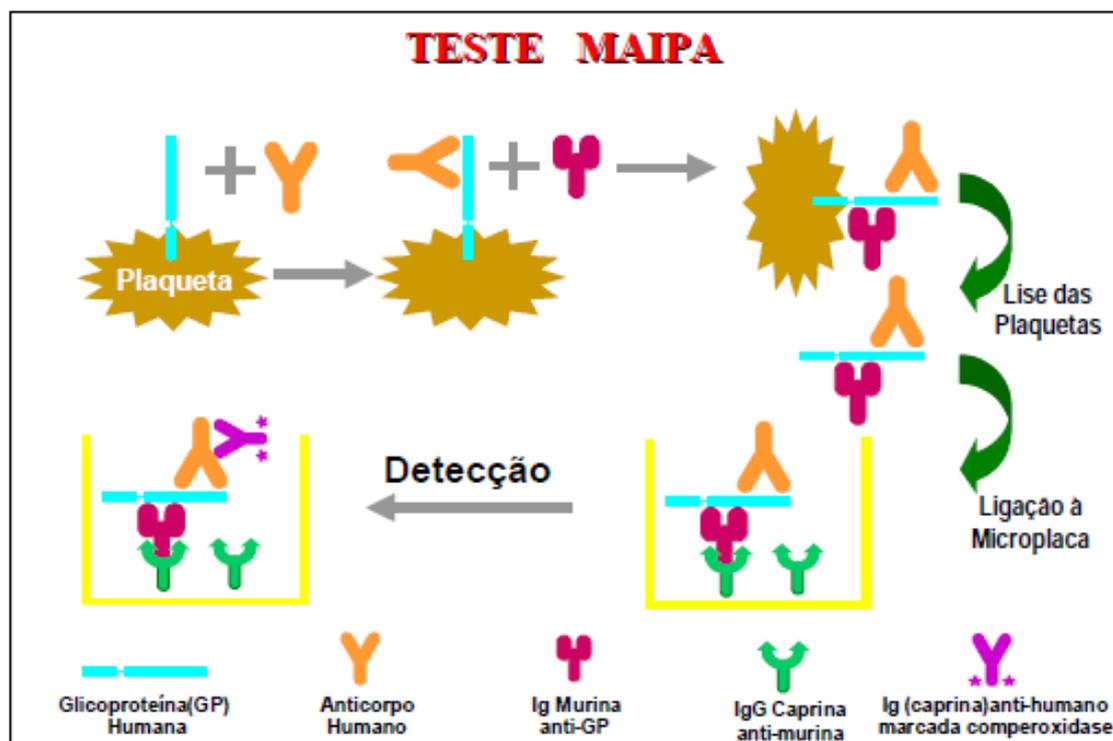
(FONTÃO-WENTEL, 2008).

Outra técnica com melhor sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos plaquetários foi desenvolvida por Kiefel et al. em 1987, o MAIPA (Imobilização de Anticorpos Monoclonais contra antígenos Plaquetários) (KIEFEL V, 1987). Como demonstrado na figura 8 um concentrado de plaquetas é incubado com soro a ser estudado, após são realizadas lavagens com tampão apropriado, novamente incubado, mas com anticorpo monoclonal específico. Depois novamente é lavado, então as plaquetas sensibilizadas são lisadas liberando o imunocomplexo formado. O lisado é pipetado em placas sensibilizadas com IgG caprina anti-humana para fixar o anticorpo monoclonal utilizado. Após uma IgG anti-humana marcada com peroxidase é adicionada, essa vai ligar-se ao anticorpo humano, e a revelação é realizada com a adição da 1,3 fenilenediamina dihidroclorida (OPD, 2 HCl). A 492 nm é realizada a leitura. Absorbâncias acima do "cut-off" são consideradas positivas. (FONTÃO-WENTEL, 2008). Essa metodologia utiliza anticorpos monoclonais específicos contra a glicoproteína carreadora dos antígenos que se deseja pesquisar, tendo assim maior especificidade. Para estudo dos HPA-1 e o HPA-3, por exemplo, utiliza-se um anticorpo monoclonal contra glicoproteína IIb/IIIa, e assim com os demais HPAs. Ao combinar a utilização de anticorpos monoclonais com painel de

plaquetas de doadores de com genotipagem conhecida permite a esta técnica ter boa sensibilidade e especificidade (FONTÃO-WENDEL, 2008).

Todavia, essa técnica possui alto custo e uso limitado com pacientes que possui algum anticorpo plaquetário contra um antígeno presente em outra proteína ainda não estudada e além disso, demora na obtenção do resultado, por volta de nove horas. (FONTÃO-WENDEL, 2008).

Figura 8: Técnica MAIPA



(FONTÃO-WENDEL, 2008).

Diante das limitações métodos baseados na tipagem do DNA têm sido amplamente usados para genotipagem HPA. Estes incluem PCR alelo-específico (PCR-SSP), PCR seguido da digestão enzimática do produto amplificado (PCR-RFLP), PCR em tempo real (PCR Real-Time), *Microarray*, Tecnologia *Bead-array* e Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de voo (MALDI - TOF) (XU et al., 2009; CURTIS, 2013).

Para metodologia de *microarray* o DNA genômico é extraído a partir dos leucócitos de sangue periférico de forma automatizada ou manual. É realizado a reação de PCR multiplex para amplificar as sequências alvo do DNA de todos os polimorfismos avaliados (COSTA, 2011). Após a amplificação algumas etapas são realizadas para que ocorra a hibridização da amostra ao HPA *Beadchip<sup>tm</sup>*.

Primeiramente, é removido todo o excesso de reagentes do produto da reação de PCR com a adição do reagente *Clean Up*, seguido de incubação. Após a limpeza do produto do PCR multiplex, as fitas simples de DNA de cada amostras são obtidas através da digestão enzimática do produto do PCR multiplex com reagente lambda exonuclease, seguido de incubação. Para hibridização do DNA alvo no HPA *Beadchip<sup>tm</sup>* uma alíquota de produto do PCR multiplex (DNA em fita simples) é adicionada uma enzima que adiciona dNTP (dCTP marcada com fluoróforos), em cada HPA *BeadChip<sup>TM</sup>*, é adicionado um volume desta mistura. As lâminas contendo os chips são incubadas para que ocorra ou não a hibridização do DNA alvo amplificado às sondas pré-existentes no HPA *BeadChip<sup>TM</sup>*. Diante da hibridização, segue-se a extensão das fitas de DNA pela técnica “elongation-mediated multiplex analysis of polymorphisms” (eMAP), que através da enzima adiciona dNTPs a nova fita de DNA formada. Depois de completado o período de incubação, todos os HPA *BeadChip<sup>TM</sup>* são lavados com água destilada para remover todo e qualquer excesso de dNTP, a fim de, minimizar a emissão indesejada de sinal (COSTA, 2011).

Ao término da hibridização, as lâminas contendo o *BeadChip<sup>TM</sup>* são levadas à um sistema de captura de imagem (Figura 9), o *AIS Data Acquisition Basis<sup>TM</sup>* (BioArray Solutions Information System), responsável pela captura e decodificação da fluorescência. Este sistema é composto por um leitor óptico de código de barras (lâminas) e um microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera fotográfica interligada a um *software*, o HPA *BeadChip<sup>TM</sup>* kit que possibilita a identificação e interpretação do alelo hibridizado através da comparação dos valores de fluorescência obtidos com os valores de fluorescência dos polimorfismos depositados no Banco de Dados *Basis<sup>TM</sup>* (BioArray Solutions) (COSTA, 2011).

Na plataforma HPA *BeadChip<sup>TM</sup>*, cada polimorfismo é representado por um par de sondas contendo um alelo normal e um alelo mutado. Durante a hibridização, somente as sequências de DNA que hibridizaram totalmente com as sondas de oligonucleotídeos tem suas sequências complementadas (processo de extensão do DNA) e são capazes de emitir intensos sinais de fluorescência. A intensidade da fluorescência produzida por um par de sondas, uma contendo o alelo “a” e a outra, o alelo “b”, forneceram a base para a discriminação dos alelos (COSTA, 2011).

Figura 9: Sistema de captura de imagem - BioArray Solutions Information System



(Immucor Acquires Sentilus)

A caracterização das bases moleculares dos vários sistemas HPA possibilitou não apenas a identificação molecular relativo a cada sistema, mas também trouxe importantes informações ao conhecimento do desenvolvimento das aloimunizações plaquetárias (KUNICKI; NEWMAN, 1992). Uma das vantagens desses métodos é que é necessário o uso de pouco volume de sangue ou de plaquetas circulantes, o que poderia ser um fator limitante nos casos de trombocitopenias. Além disso, os vários sistemas HPA podem ser avaliados utilizando-se “*primers*” específicos, o que é fundamental para a análise de outros sistemas para os quais não há anticorpos comercialmente disponíveis.

Os métodos moleculares para a identificação dos antígenos plaquetários já são utilizados em muitos países, onde também já foi determinada a prevalência desses antígenos. No Brasil, embora alguns centros de referência em Imunohematologia já tenham validado seus protocolos e métodos de genotipagem de antígenos plaquetários (CASTRO et al., 1999), outras regiões, ainda não implementaram essa metodologia, e desconhecem os polimorfismos do sistema HPA prevalentes em sua região.

### 3 JUSTIFICATIVA

O conhecimento e detecção dos antígenos plaquetários é essencial na prática transfusional, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos contra esses antígenos pode se tornar um grande problema clínico, principalmente em casos nos quais os pacientes necessitam de transfusões sanguíneas periódicas.

A utilização de técnicas de biologia molecular como ferramentas de diagnóstico tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da imunohematologia, o que aumenta a segurança e eficácia transfusional de pacientes que requerem transfusões sucessivas. Além disso, os métodos moleculares podem ser uma alternativa importante para superar as limitações das técnicas sorológicas para a determinação do perfil antigênico dos pacientes, e, portanto, é imprescindível a identificação de alelos na população para determinar as frequências genotípicas nas diferentes regiões do Brasil e dessa forma aumentar a segurança transfusional.

A vantagem desses métodos reside no fato de que não há necessidade de grande volume de sangue ou de plaquetas circulantes, o que poderia ser um fator limitante nos casos de trombocitopenias. Os métodos moleculares para a identificação dos antígenos plaquetários já são utilizados em muitos países, nos quais também já foi determinada a prevalência desses antígenos.

No Brasil, embora alguns Centros de Referência em Imunohematologia já tenham validado seus protocolos de genotipagem de antígenos plaquetários (CASTRO et al, 1999), e determinado as frequências na população, outras regiões, como o estado de Santa Catarina ainda desconhecem os polimorfismos do sistema HPA prevalentes na região. Diante disso, esse trabalho visa a determinação da frequência de polimorfismos responsáveis pela expressão dos antígenos plaquetários na população do estado de Santa Catarina. Essa frequência foi identificada pela técnica molecular *HPA BeadChip<sup>TM</sup>* que é um ensaio que analisa 22 antígenos plaquetários para identificar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que afetam a expressão dos HPAs.

A tecnologia *Microarray* analisa os SNPs a partir de uma reação de PCR-multiplex. Além da redução do consumo de reagentes, essa técnica apresenta a vantagem da detecção simultânea de múltiplos alvos em tempo reduzido (PETRIK, 2009).

Uma vez que poucos profissionais da área da saúde possuem expertise com essa metodologia e com a área de imunohematologia, faz-se necessárias parcerias com profissionais especialistas nessas áreas.

## 4 OBJETIVOS

Determinar a frequência de polimorfismos responsáveis pela expressão de antígenos plaquetários em amostras de doadores voluntários de sangue, do estado de Santa Catarina.

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as frequências genotípicas e fenotípicas dos antígenos plaquetários nos doadores de sangue de Santa Catarina;
- Auxiliar na construção de um banco de plaquetas genotipadas para utilização em pacientes politransfundidos, entregando uma planilha com os dados da análise ao HEMOSC.

## **5 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Este trabalho é uma análise de resultados a partir de dados de genotipagem de HPA fornecidos pelo HEMOSC e que compõem o sistema Basis<sup>TM</sup>. Esse sistema foi alimentado pela doutorando, no momento, Daiane Cobianchi da Costa, coorientadora deste trabalho, que em sua tese Investigação do polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no estado de Santa Catarina, e aprovada no comitê de ética da UFCS sob número CEPESH n°2270/2011 em 28 de novembro de 2011 e do Hemosc sob número n° 06/11 emitido em 26 de dezembro de 2011, defendida em 30 de março de 2016 tinha como objetivo realizar a análise dos sistemas HPA. Embora a genotipagem tenha integrado inicialmente os objetivos da tese, os dados não foram analisados, sendo neste trabalho analisados de forma cegada.

### **5.1 AMOSTRAS UTILIZADAS**

#### **5.1.1 Amostras de doadores de sangue**

Para a realização da genotipagem, foram utilizadas amostras de sangue anticoaguladas com EDTA de doadores voluntários de sangue, atendidos no HEMOSC no período de janeiro de 2015 a janeiro de 2016. Essas amostras foram processadas no período descrito e as amostras dos doadores de sangue foram selecionadas atendendo aos critérios descritos a seguir.

#### **5.1.2 Critérios de inclusão e exclusão**

Neste estudo foram incluídos doadores voluntários de sangue que tenham doado mais que três vezes, procedentes das sete regiões do estado de Santa Catarina (Florianópolis, Lages, Blumenau, Joaçaba, Criciúma, Chapecó e Joinville) e que não possuíam resultados prévios de genotipagem para antígenos plaquetários. Foram excluídos doadores voluntários de sangue que não tenham doado por aférese.

## 5.2 METODOLOGIA

Os dados dos genótipos e fenótipos das amostras foram obtidos a partir do banco de dados *Basis<sup>TM</sup>* (*BioArray Solutions*) sendo submetidos a determinação da frequência alélica, genotípica e análise estatística. O banco de dados com os resultados de genotipagem foi acessado por um bioquímico autorizado do HEMOSC que gerou uma planilha cegada com os resultados de 93 amostras genotipadas.

As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta em planilhas do programa Excel (Microsoft® Office Excel 2010). Foi realizada a comparação das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos plaquetários entre a população de doadores voluntários de sangue do presente estudo e de doadores de sangue e pacientes de outros estados.

## **6 CUIDADOS ÉTICOS**

Respeitando o item IV.8 da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. A cópia da carta de anuência para autorização de pesquisa encontra-se no anexo A deste. No anexo B encontra-se a carta de autorização para realização de trabalho/pesquisa científica na Hemorrede HEMOSC.

## 7 RESULTADOS

A frequência alélica de HPA-1 a HPA-9, HPA-11 e HPA-15 foi determinada a partir dos dados obtidos do banco de dados *Basis<sup>TM</sup>* (*BioArray Solutions*), que estão descritas na Tabela 1. As frequências alélicas foram obtidas por contagem direta em planilhas do programa Excel, o alelo *a* foi o mais frequente encontrado nos sistemas HPA-1 a -5, sendo que nos sistemas HPA-6 a -9 e HPA-11 o alelo *a* foi o único encontrado. Para o sistema HPA-15 o alelo *a* foi ligeiramente predominante (0,54) em relação ao alelo *b* (0,46), para o sistema HPA-4 foi encontrado um antígeno raro o alelo *b*, essa amostra apresentou os dois alelos *a* e o alelo *b*.

**Tabela 1: Frequência alélica das amostras de doadores de sangue do estado de Santa Catarina**

<b>Sistema</b>	<b>Frequência do alelo a</b>	<b>Frequência do alelo b</b>
HPA-1	0,86	0,14
HPA-2	0,89	0,11
HPA-3	0,68	0,32
HPA-4	0,99	0,01
HPA-5	0,89	0,11
HPA-6	1,00	0,00
HPA-7	1,00	0,00
HPA-8	1,00	0,00
HPA-9	1,00	0,00
HPA-11	1,00	0,00
HPA-15	0,54	0,46

Legenda: HPA (Antígenos Plaquetários Humanos)

As frequências genotípicas, assim como as fenotípicas deduzidas do genótipo, foram obtidas por contagem direta em planilhas do programa Excel. Houve concordância entre genótipo e fenótipo, desta forma será apresentado apenas o genótipo. A tabela 2 apresenta os resultados obtidos. O genótipo de maior frequência encontrado nas amostras analisadas foi o AA para os sistemas HPA-1, -2, -3, -4, -5. Para os sistemas HPA -6, -7, -8, -9, -11 o genótipo AA foi o único encontrado. O sistema HPA-15 apresentou maior frequência com o genótipo AB. No sistema HPA-4 uma amostra apresentou um genótipo raro AB.

**Tabela 2: Frequência genotípica das amostras de doadores de sangue do estado de Santa Catarina**

Sistema	Frequências genotípicas das amostras do estado de SC		
	AA	AB	BB
HPA-1	0,75	0,22	0,03
HPA-2	0,78	0,22	0,00
HPA-3	0,51	0,35	0,14
HPA-4	0,99	0,01	0,00
HPA-5	0,80	0,19	0,01
HPA-6	1,00	0,00	0,00
HPA-7	1,00	0,00	0,00
HPA-8	1,00	0,00	0,00
HPA-9	1,00	0,00	0,00
HPA-11	1,00	0,00	0,00
HPA-15	0,29	0,51	0,20

## 8 DISCUSSÃO

Estudos de frequência de antígenos plaquetários têm sido feitos em várias populações do mundo, mostrando as diferenças alélicas entre populações. Na população brasileira, essa investigação ainda é restrita, limitando-se a poucos grupos populacionais (FONTÃO-WENTEL, 2008). O presente estudo traz um panorama geral das frequências alélicas do estado de Santa Catarina. E considerando-se as características populacionais fez-se uma comparação entre as frequências dos estados do Rio Grande do Sul e do Amazonas, sendo que no primeiro encontramos uma população semelhante à do presente grupo, enquanto o segundo apresenta algumas variações, que podem ser explicadas considerando-se as diferenças étnicas, assim como a influência da imigração na constituição populacional dos estados brasileiros citados (IBGE, 2007).

Nas amostras analisadas foi encontrada maior frequência do alelo “a”, demais autores também relatam essa frequência para os HPA estudados (HOLENSTEINER, et al., 1995; DE LA VEJA ELENA, 2008; HAUCK-DLIMI, 2012; MERZONI, 2015). Para HPA-4 o alelo “b” é raro em caucasianos, neste estudo foi encontrado um doador com genótipo HPA-4a/b. Toralles-Pereira et al. (2005) que fizeram o primeiro relato desse alelo no sistema HPA-4 em brasileiros, atribuíram o achado à probabilidade do portador ter herdado o alelo de ancestrais indígenas, pois o indivíduo possuía ascendentes de origem italiana e indígena (TORALLES-PEREIRA et al., 2005). Contudo, no presente estudo não foi possível saber a origem do portador do genótipo HPA-4a/b, já que se trata de um estudo cegado, todavia, o estado de Santa Catarina vem se miscigenando mais nos últimos anos com a imigração de latino-americanos, africanos entre outros povos, o que pode explicar o surgimento de um alelo raro (IBGE, 2007).

Nas amostras testadas, a maior frequência encontrada foi do alelo “a” para os HPA-1, -2, -3, -4, -5, sendo que de HPA-6, -7, -8, -9 o único alelo encontrado foi o “a”; já para o HPA-15 a maior frequência encontrada foi para ambos alelos “a” e “b”. Muitos autores relatam a frequência do alelo “a” em populações caucasianas para os HPA-1, -2, -3, -4, -5, já para o HPA-15 a frequência maior é a bialélica “ab” (HOLENSTEINER, et al., 1995; DE LA VEJA ELENA, 2008; HAUCK-DLIMI, 2012). No estudo de Merzoni (2015), que estudou a frequência dos antígenos plaquetários na população do Estado do Rio Grande do Sul, a maior diferença significativa

encontrada foi a comparação com populações asiáticas. A população da região sul do Brasil possui características genéticas semelhantes às populações europeias, estando de acordo com a formação étnica dessa região (MERZONI, 2015).

As frequências alélicas encontradas neste estudo também foram encontradas no estudo de Merzoni (2015), sendo os dois estudos semelhantes. Aplicando o teste de Qui-quadrado corrigido de Yates ou Exato de Fisher nas amostras de Santa Catarina para comparação com o estudo realizado no estado do Rio Grande do Sul, foi encontrada similaridade nas frequências dos sistemas HPA testados. Essa análise confirma também a congneridade da população entre os dois estados. Através dos dados obtidos dos dois estudos podem-se observar as semelhanças genéticas dos dois estados analisados. O sul do Brasil apresenta muita semelhança na sua população, devido à colonização (MERZONI, 2015).

Ao comparar o presente estudo a um estudo semelhante no estado do Amazonas, região norte do Brasil, não foi possível aplicar um teste estatístico, contudo, podemos verificar algumas diferenças. A frequência alélica para doadores do estado de Santa Catarina para o sistema HPA-1 é de 0,86 para o alelo "a", e 0,14 para alelo "b", enquanto o estudo do estado do Amazonas apresentou frequência alélica 0,94 para o alelo "a" e 0,06 para o alelo "b". Essas diferenças ocorrem também no sistema HPA-3. A frequência alélica encontrada em Santa Catarina para o sistema HPA-3 é de 0,68 para o alelo "a" e 0,32 para o alelo "b" no Amazonas as frequências para esses alelos são de 0,55 para "a" e 0,44 para "b", para os demais sistemas HPAs estudados os dois estados apresentaram frequência alélica numericamente semelhante. As diferenças destacadas são, provavelmente, devido à colonização dessas regiões do Brasil. O país apresenta um espaço territorial extenso, o que promove a diferenciação entre regiões, e assim a diferença cultural, racial (IBGE, 2007; PORTELA et al., 2016)

Embora, Castro et al. (1999) com um estudo da população brasileira, classificado em caucasoide, negra e indígena, demonstraram que os indígenas são o único grupo com diferença genotípica significativa, neste estudo não foi possível a classificação dos doadores de acordo com a etnia, porque visando a ética do estudo os resultados dos sistemas HPAs vieram de um banco de dados cegado.

Um segundo estudo realizado com doadores de sangue no estado do Amazonas, com a utilização da mesma técnica de genotipagem, Portela e colaboradores (2016) destacaram o sistema HPA-9, no qual apresentou uma

frequência alélica de 0,997 para o alelo “a”, e frequência alélica de 0,005 para o alelo “b”, em nosso estudo foi encontrado para esse sistema apenas o alelo “a”. (PORTELA et al., 2016) O alelo “b” do sistema HPA-9 foi primeiramente relatado em brasileiros por Conti et al. (2013), e seu achado tem sido raro na população brasileira (CONTI et al., 2013).

## 9 CONCLUSÃO

O conhecimento proveniente do estudo e a análise da frequência dos HPAs tem sido cada vez mais relevante para a triagem de hemocomponentes compatíveis, devido ao aumento da demanda para transfusões de plaquetas, especialmente nos indivíduos politransfundidos. Pacientes em tratamento de doenças onco-hematológicas, com aplasia medular, dano endotelial causado pelo tratamento quimioterápico estão associados à trombocitopenia intensa e persistente, tendo à necessidade de transfusões frequentes de concentrado de plaquetas. Neste estudo, a análise genotípica dos HPAs ocorreu em amostras de sangue obtidas de doadores de concentrado de plaquetas, e os dados gerados da análise do perfil genotípico em relação aos HPA ampliam o conhecimento da variabilidade da população e auxiliam na busca de concentrados de plaquetas compatíveis. Quanto mais parecido (compatíveis) forem os sistemas HPAs entre o doador e o receptor, melhor será o aproveitamento transfusional e menor a refratiedade.

A frequência alélica deste estudo foi predominantemente “aa”, com exceção do HPA-15, que apresentou a maior frequência alélica “ab”. Demonstrando similaridade com outros estudos. Além disso, foi observado que as frequências dos sistemas HPA da população deste estudo é bastante similar à do Rio Grande do Sul que pode ser devido à similaridade na composição da colonização destes, assim como a formação das colônias étnicas.

Neste estudo foi encontrado uma amostra com genótipo “AB” para o sistema HPA-4, o genótipo “B” é raro em populações caucasianas, fato que corrobora com o objetivo de estudar mais a população brasileira, pois a colonização e miscigenação da população é alta.

O Brasil é um grande país e, portanto, há a necessidade de mais estudos para determinar a frequência dos HPAs, e desta forma criar um banco de dados para o auxílio na busca de concentrado de plaquetas compatíveis para pacientes. Embora a refratariedade plaquetária não seja, exclusivamente, decorrente de fatores imunológicos, existe a exposição a antígenos plaquetários humanos incompatíveis nas transfusões de concentrados de plaquetas. Pacientes onco-hematológicos plaquetopênicos refratários ou aloimunizados podem beneficiar-se da genotipagem plaquetária em doadores de concentrado de plaquetas como um instrumento adicional para compatibilidade transfusional, já que essa metodologia requer pouca

amostra para teste, e apresenta grande sensibilidade e especificidade o que faz dela uma ferramenta valiosa na busca e formação desses bancos de dados com genótipo da população, assim auxiliando a maior compatibilidade minimizando as reações transfusionais. A genotipagem plaquetária, associada ao uso de hemocomponentes leucorreduzidos e ABO compatíveis, poderia diminuir a refratariedade de causa imunológica.

## 10 REFERÊNCIAS

ABBAS A.K.L., LICHTMAN A.H. Cellular and Molecular Immunology. 6° Edição. 2007.

BAJPAI M, KAURA B, MARWAHA N, KUMARI S, SHARMA RR, AGNIHITRI SK. Platelet alloimmunization in multitransfused patients with haematooncological disorders. Nat Med J India. 2005;18:134-136.

BioArray Solutions, BioArray™ HPA BeadChip™. Disponível em: [http://www.immucor.com/en-us/Products/Documents/BioArray\\_HPA\\_SalesSheet.pdf](http://www.immucor.com/en-us/Products/Documents/BioArray_HPA_SalesSheet.pdf) acessado em 6 de maio de 2017.

BRAY R.A. Flow Cytometry in Human Leukocyte Antigen Testing. Seminars in Hematology; v.38, p.194-200, 2001.

CASTRO V, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM, Soares M, Menezes RC, Goncalves MS, et al. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. Eur J Immunogenet. 1999;26(5):355-60

CASTILHO L, RIOS M, BIANCO C, ANGELINI MT, ALBERTO FL, SAAD STO et al. High prevalence of FYB-RBC-silent alleles among sickle cell disease patients in Brazil. In: Annual Meeting of the American Association of Blood Banks. 2000: 116S (abstract).

CHIBA AK, BORDIN JO, KUWANO S T, FIGUEIREDO MS, CARVALHO KI, VIEIRA-FILHO JPB, KERBAUY J. Platelet alloantigen frequencies in Amazon Indians and Brazilian blood donors Transfusion Medicine. 2000; 10: 207-212

CONTI F, BERTRAND G, DEZAN M, COSTA T, et al. Molecular HPA genotyping by microarray in Brazilian blood donors. Transfusion. Vol 54, 2013.

COSTA DC. Genotipagem de grupos sanguíneos no suporte transfusional de sangue compatível para pacientes com anemia falciforme [Dissertação de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Ciências Básicas; 2011.

CURTIS BR. Human platelet antigens. Vox Sanguinis. ISBT. 2014 106, 93-102.

DE LA VEJA ELENA CD, MONTOYA AF, CHIALINA S, BLANZACO PD, THEILLER E, RAILLON MA, ARANCEGUI N, SOLIS E, OYONARTE S, FERRER VC, CAMPOS MUÑOZ A, DÍAZ EM. Human platelet-specific antigens frequencies in the Argentinean population. Transfusion Medicine. 2008; 18: 83–90.

DELAFLOR-WEISS E, MINTZ P D. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. Transfus Med Rev. 2002; 14: 180-96.

DRZEWEK K, BROJER E, ZUPANSKA B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transf Med.* 1998; 8: 399-342.

FONTÃO-WENDEL R. Avaliação de diferentes metodologias laboratoriais para detecção de aloanticorpos plaquetários. Determinação da prevalência e importância clínica destes aloanticorpos em pacientes transfundidos [Tese Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Departamento de Análises Clínicas; 2008.

GIOLO SR, SOLER JM, GREENWAY SC, et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *European journal of human genetics.* 2012

IBGE. Brasil 500 anos de Povoamento 2007. Acessado em 03/11/2017.

HAUCK-DLIMI B, et al. Human platelet antigen genotypes in Turkish and Caucasian blood donors in Germany. *Tissue antigens.* 2012; 80 (3):214-8.

HOLENSTEINER A, et al. Human platelet antigen gene frequencies in the Austrian population. *Haemostasis.* 1995; 25(3): 133-6. 1995.

HURD CM, CAVANAGH G, SCHUH A, OUWEHAND WH, METCALFE P. Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. *Vox Sanguinis.* 2002;83: 1-12.

KIEFEL V, KONIG C, HARTMUT K, SANTOSO S. Platelet alloantibodies in transfusion patients. *Transfusion.* 2001; 41: 766-770.

KIEFEL V, SANTOSO S; WEISHEIT M; MUELLER-ECKHARDT C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*, v.70, p. 1722-1726, 1987.

KUNICKI TJ, NEWMAN PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood.* 1992 Sep 15;80(6): 1386-404.

LEEKSMAN CH, COHEN JA. Determination of the life of human blood platelets using labeled isopropylfluorophosphate. *Nature.* 1955 Mar 26; 175(4456): 552-3.

LEFRANÇAIS E, ORTIZ-MUÑOZ G, CAUDRILLIER A, MALLAVIA B, LIU F, SAYAH DM, THORNTON EE, HEADLEY MB, DAVID T, COUGHLIN SR, KRUMMEL MF, LEAVITT AD, PASSEGUÉ E, LOONEY MR. The lun gene is a site of platelet and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 544, 105-109. 2017.

LEVIN M-D, VAN DER HOLT B, DE VELD JC, GRATAMA JW, DE VRIES W, VAN'T VEER. The value of crossmatch tests and panel tests as a screening tool to predict the outcome of platelet transfusion in a nonselected haematological population of patients. *Vox Sang.* 2004 Nov;87(4): 291-8.

LI C, LI J, LI Y, LANG S, YOUGBARE I, ZHU G, et al. Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. *Advances in hematology.* 2012.

LO SC, LIN DT, LIN SWS, CHANG J-S. Frequency and Characterization of platelet specific antibodies in patients who received J Formos. *Med Assoc.* 2000;99: 902-905.

MAYER G. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e Receptores de Célula T – Papel nas Respostas Imunes. *Microbiologia e Imunologia on-line*. Capítulo 10. Universidade de Medicina da Carolina do Sul. Acessado em 14 de outubro de 2017.

MERZONI J. Genotipagem do sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) em doadores de plaquetas do sul do Brasil. *Dissertação de mestrado*. Porto Alegre. 2015.

BRASIL. Guia para uso de Hemocomponentes. Ministério da Saúde. 1º Edição. Brasília, 2010.

NAVARRETE CV. Human leukocyte antigens. *Practical Transfusion Medicine*. Oxford: Blackwell Science, 2001. Cap.4, p36-50.

NEWMAN PJ. Platelet GPIIb-IIIa: Molecular variations and alloantigens. *Tromb Haemost.*1991;66:111-118.

NOVOTNY VM. Prevention and management of platelet transfusion refractoriness. *Vox Sang.*1999;76(1):1-13.

PETRIK J. Microarray blood testing: Pros e cons. *The International Association for Biologicals*. Elsevier. 2009.

PETRIK J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sanguinis*. 2000; 80: 1-11.

PORTELA CN, SCHRIEFER A, ALBUQUERQUE ARL, et al. The human platelet alloantigen profile in blood donors from Amazonas, Brazil. *Transfusion Medicine*. Vol 26. 2016.

ROZMAN P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transpl Immunol*. 2002 Aug;10(2-3): 165-81.

SANZ C, FREIRE C, INAKI A, ORDENAS A, PEREIRA A. Platelet specific antibodies in HLA immunized patients receiving chronic support. *Transfusion*. 2001;41: 762-770.

SHEHATA N, DENOMME GA, HANNACH B, BANNING N, FREEDMAN J. Mass-scale high-throughput multiplex polymerase chain reaction for human platelet antigen single-nucleotide polymorphisms screening of apheresis platelet donors. *Transfusion*. 2011.

SIMSEK S, FABER NM, BLEEKER PM, VLEKKE ABL, HUISKES E, GOLDSCHMEDING R, VON DEM BORNE AEGKR. Determination of platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood*. 1993; 81: 835-840.

SULLIVAN MJ, KUHLMANN R, PETERSON JA, CURTIS BR. Severe neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by maternal sensitization against a new low-frequency alloantigen (Domb ) located on platelet glycoprotein IIIa. *Transfusion*. 2017.

TINMOUTH AT, SEMPLE E, SHEHATA N, BRANCH DR. Platelet immunopathology and therapy: a Canadian Blood Services Research and Development Symposium. *Transfusion Medicine Reviews*. 2006;20: 294-314.

TORALLES-PEREIRA C, PARDINI MI M C, DEFFUNE E, MACHADO PE. The first report of the human platelet alloantigen 4b allele in a Brazilian. *International Journal of Immunogenetics*. 2005. Volume 32: 165-166.

VON DEM BORNE AE, DÉCARY F. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Hum Immunol*. 1990 Sep;29(1): 1-2.

VON DEM BORNE AEG; VERNEUGHT FWA; OOSTERHOF F; VON RIESZ E; DE LA RIVIERE AB; ENGELFRIET CP. A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *British Journal of Haematology*, v.39, p.195-207, 1978.

WINTROBE MM. *Wintrobe's clinical hematology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.

XU X, ZHU F, YING Y, TAO S, LIU Y, HONG X, YAN L. Simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to 17w by polymerase chain reaction sequence-based typing. *Vox Sanguinis*. 2009. 97: 330–337.

ZIMRING, J.C., WELNIAK, L., SEMPLE, J.W., NESS,P.M., SLICHTER, S.J., SPITALNIK, S.L. & GROUPN.A.W Current problems and future directions of transfusion-induced alloimmunization: summary of an NHLBI work-ing group. *Transfusion*, 2011 51, 435–441.

## ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA PARA AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA

	SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE FUNDAÇÃO DE APOIO AO HEMOSC E CEPON – FAHECE CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE SANTA CATARINA – HEMOSC CENTRO DE ESTUDOS MÁRIO ROBERTO KAZMIKOWSKI – CEMARK COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DE SERES HUMANOS/ HEMOSC – CNPJ 72.347.962/0001-61 E-mail: <a href="mailto:cep_hsu@hemosc.sc.br">cep_hsu@hemosc.sc.br</a> Telefone: (48) 3251-9826	
--	---	---

### Anexo I Carta de Anuência para Autorização de Pesquisa

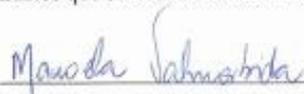
Prezado(a) Diretor(a):

Solicitamos autorização institucional para realização da pesquisa intitulada *ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS POR MÉTODOS MOLECULARES EM DOADORES DE SANGUE DO ESTADO DE SANTA CATARINA*, pelo(a) acadêmico(a)/pesquisador(a) Manoela Valmorbida sob orientação do(a) *Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo* com o seguinte objetivo geral: *Determinar a frequência de polimorfismos responsáveis pela expressão de antígenos plaquetários em amostras de doadores voluntários de sangue, do estado de Santa Catarina*. Assim, solicita-se acesso aos dados do setor *imunohematologia do hemocentro coordenador*, dessa instituição. Oportunamente, pedimos autorização para que o nome desta instituição possa constar no relatório final bem como em futuras publicações científicas.

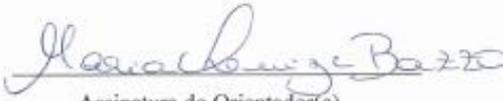
Ressaltamos que os dados coletados serão mantidos em absoluto sigilo de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS/MS) que trata de pesquisa envolvendo seres humanos. Salientamos ainda que os dados serão utilizados somente para a realização deste estudo.

Na certeza de contarmos com a colaboração e empenho desta Diretoria, agradecemos antecipadamente a atenção, ficando à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Manoela Valmorbida  
Nome do Pesquisador(a)/Acadêmico(a)

  
Assinatura do Pesquisador(a)/Acadêmico(a)

Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo  
Nome do orientador(a)

  
Assinatura do Orientador(a)  
Professora Maria Luiza Bazzo  
Dep. de Análises Clínicas CCS UFSC  
CPF 521.035.019-34  
CRF-SC 1493

Florianópolis, 15/08 de 2017

## ANEXO B – AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE TRABALHO/PESQUISA CIENTÍFICA NA HEMORREDE HEMOSC

	SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE FUNDAÇÃO DE APOIO AO HEMOSC E CEPON – FAHCE CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE SANTA CATARINA – HEMOSC CENTRO DE ESTUDOS MARIO ROBERTO KAZMIAROWSKI – CEMARIK COMISSÃO CIENTÍFICA-CCHEMOSC – CNPJ 71.347.982/0001-01 E-mail: ccq.hemosc@hemosc.org.br TELEFONE: (41) 3251-9826	
--	--	---

### Autorização para Realização de Trabalho/Pesquisa Científica na Hemorrede HEMOSC - Anexo I

**Comissão Científica**  
Protocolo – 0023/17

#### IDENTIFICAÇÃO DO (S) PESQUISADOR (ES)

Nome (s): Manoela Valmorbida	
Telefones para contato: 48 99671-7502	e-mail: manaelavalmorbida@hotmail.com
Formação/ Local: Graduada do Curso de Farmácia da UFSC	
Orientador: Prof. Maria Luiza Bazzo	
Telefones para contato: 48 37212066 / 48 37218148 / 48 37214562	e-mail: marialuizabazzo@gmail.com

#### TRABALHO

Título: ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS POR MÉTODOS MOLECULARES EM DOADORES DE SANGUE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

*Eu Manoela Valmorbida comprometo-me com o sigilo dos dados, bem como assumo a responsabilidade pelos dados coletados e publicados. Comprometo-me com a entrega de cópia física e eletrônica dos resultados da pesquisa.*

Ass. do solicitante: Manoela Valmorbida  
Data: 15/08/2017

#### PARECER DA DIREÇÃO DO HEMOCENTRO REGIONAL DE \_\_\_\_\_

( ) Autorizado    ( ) Não autorizado

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura e carimbo: \_\_\_\_\_

#### PARECER DA DIREÇÃO DO HEMOCENTRO COORDENADOR

Autorizado    ( ) Não Autorizado

Data: 16/10/2017

Assinatura e carimbo: 

Denise Pinheiro Gerent  
Direção Geral - HEMOSC