

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

Jóice Merzoni

**Genotipagem do sistema de antígenos plaquetários
humanos (HPA) em doadores de plaquetas do sul do Brasil**

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

Genotipagem do sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) em doadores de plaquetas do sul do Brasil

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Job Jobim

Linha de Pesquisa: Imunogenética

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Merzoni, Joice

Genotipagem dos antígenos plaquetários humanos em doadores de plaquetas do sul do Brasil / Joice

Merzoni. -- 2015.

91 f.

Orientador: Luiz Fernando Job Jobim.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Plaquetas. 2. Antígenos. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Imunogenética. I. Job Jobim, Luiz Fernando, orient. II. Título.

ATA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 270

Aos vinte dias de janeiro de dois mil e quinze, no Auditório Mário Rigatto, 4º andar da Faculdade de Medicina, ocorreu a apresentação pública da Dissertação de Mestrado intitulada "**Genotipagem do sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) em doadores de plaquetas do sul do Brasil**" da aluna **Jóice Merzoni**. A Banca foi presidida pelo orientador, Prof. Dr. Luiz Fernando Job Jobim. Compôs a banca os Professores Dr. Alessandro Bersch Osvaldt (UFRGS), Dr. Cleber Rosito Pinto Kruel (UFRGS), Dr. Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber (UFRGS) e Dra. Liane Esteves Daudt (UFRGS). A candidata dispôs de 40 minutos para expor o tema. Em seguimento, o Senhor Presidente passou a palavra aos membros da Banca para arguição, cabendo ao candidato 10 minutos para responder a cada examinador. Finalizando o Senhor Presidente anunciou os conceitos emitidos pelos Senhores Membros da Banca: Prof. Dr. Alessandro Bersch Osvaldt, conceito A; Prof. Dr. Cleber Rosito Pinto Kruel, conceito A; Prof. Dr. Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber, conceito A; Profa. Dra. Liane Esteves Daudt, conceito A. A seguir, para constar, eu, Dienes de Azeredo Bastos, Secretário, lavrei a presente ata que segue assinada pelos Professores Examinadores e pelo Professor Orientador.


Prof. Dr. Luiz Fernando Job Jobim
Orientador - Presidente da Banca


Prof. Dr. Alessandro Bersch Osvaldt


Prof. Dr. Cleber Rosito Pinto Kruel


Prof. Dr. Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber


Profa. Dra. Liane Esteves Daudt

Dedico este trabalho
aos meus pais Geraldo e Maria,
à minha irmã Lais e ao meu noivo Luciano
pelos valores ensinados e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Luiz Fernando Jobim pela oportunidade, orientação e ensinamentos.

A todos os colegas do Serviço de Imunologia que me acolheram com amizade e estimularam meu desenvolvimento científico.

À incansável colaboradora e colega Iara Fagundes pelo auxílio, disponibilidade e incentivo.

À Beatriz Chamum Gil pelas doces palavras, amizade e incentivo.

À Vanessa Guterres Dias pelo apoio e auxílio nas coletas.

À Juliana Lindenau pelo apoio estatístico e nova amizade.

À Marina Gomes M Sassi pela ajuda com a validação do método.

À Gisele Ewald Menezes pela amizade e ajuda nos cálculos matemáticos.

À Fernanda Gamio Silva pela disponibilidade e ajuda com o desenvolvimento do método.

À Sandra Webber Lumertz e Rosani Calvi Beuren pela ajuda na obtenção das amostras.

À Dra Rita F Wendel pela colaboração com o envio de amostras.

Ao Hospital Sírio Libanês pela troca de experiências.

Aos adoráveis Anna Maria, Tomás e André por trazerem alegria e felicidade aos meus dias.

Ao meu noivo Luciano Werle Lunardi pelas sábias palavras, constantes revisões, companheirismo, dedicação e amor incondicional.

Aos meus pais Geraldo e Maria e a minha irmã Lais por sempre acreditarem na minha capacidade, pelo apoio e incentivo.

RESUMO

Os antígenos plaquetários humanos são estruturas imunogênicas resultantes de alterações pontuais (SNP) que levam a substituição de um aminoácido a nível proteico. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência alélica e genotípica do sistema HPA-1 a -5 e -15 em doadores de plaquetas do Estado do RS e comparar as frequências alélicas encontradas com as observadas em outras populações. A genotipagem HPA foi realizada através do método de PCR-SSP. Um total de 201 doadores de plaquetas foram incluídos no estudo sendo 167 caucasóides e 34 não caucasóides. O alelo "a" foi o mais frequente nos sistemas HPA-1 a -5 em ambos grupos. O genótipo HPA-15AB foi predominante sobre os genótipos homocigotos para este sistema. O teste exato de Fisher revelou diferença estatisticamente significativa para o sistema HPA-5. Houve maior prevalência do alelo HPA-5B no grupo não caucasóide. Para o grupo caucasóide, o método de neighbor-joining e a PCA revelaram proximidade genética entre este grupo e as populações europeias. De um modo geral, concluímos que as frequências alélicas para os sistemas HPA-1 a -5 e -15 encontradas em nosso grupo caucasóide são similares às descritas em populações europeias. Estes dados corroboram a formação étnica da população do RS. A maior frequência do alelo HPA-5b encontrada no grupo não caucasóide de nosso estudo indica a possibilidade de alo-sensibilização para pacientes que recebem transfusões de plaquetas não compatibilizadas geneticamente.

Palavras-Chaves: **Plaquetas. Antígenos. Reação em cadeia da polimerase. Imunogenética.**

MERZONI, Joice. **Genotipagem dos antígenos plaquetários humanos em doadores de plaquetas do sul do Brasil.** Porto Alegre, 2015. 91 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

ABSTRACT

Human platelet antigens are immunogenic structures that result from single nucleotide polymorphisms (SNPs) leading to single amino acid substitutions. The present study sought to determine the allele and genotype frequencies of HPA-1 through 5 and HPA-15 in platelet donors from the state of Rio Grande do Sul, Brazil, and compare their allele frequencies to those observed in other populations. HPA genotyping was performed via the single specific primer-polymerase chain reaction (PCR-SSP) method. The study sample comprised 201 platelet donors (167 Caucasians and 34 non-Caucasians). Allele “a” was that most commonly found for HPA-1 through 5 in both groups. The HPA-15AB genotype predominated over homozygous genotypes of this system. Fisher’s exact test revealed statistically significant differences for the HPA-5 system, with a greater prevalence of the HPA-5B allele in non-Caucasians. The neighbor-joining method and principal components analysis (PCA) revealed genetic proximity between the Caucasian group and European populations. We conclude that the allele frequencies of HPA-1 through 5 and HPA-15 found in our Caucasian sample are similar to those reported for European populations. These findings corroborate the ethnic makeup of the population of Rio Grande do Sul. The higher frequency of the HPA-5b allele found in the non-Caucasian group of our sample suggests the possibility of allosensitization in patients who receive platelet transfusions from genetically incompatible donors.

Keywords: Blood platelets. Antigens. Polymerase chain reaction. Immunogenetics.

MERZONI, Joice. **Genotipagem dos antígenos plaquetários humanos em doadores de plaquetas do sul do Brasil**. Porto Alegre, 2015. 91 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

LISTA DE ABREVIATURAS

- dNTPS = desoxirribonucleotídeos livres
- DNA = ácido desoxirribonucleico
- GPIIb/IIIa = Glicoproteína IIb/IIIa
- GPIa/IIa = Glicoproteína Ia/IIa
- GPIb/IX/V = Complexo glicoproteico Ib/IX/V
- GPIb β = Porção beta da glicoproteína Ib
- GPIb α = Porção alfa da glicoproteína Ib
- MHC = complexo principal de histocompatibilidade
- MgCl₂ = Cloreto de Magnésio
- HLA = *human leucocyte antigen*
- HPA = *human platelet antigen*
- PCR = *Polimerase chain reaction*
- Primers* = oligonucleotídeos iniciadores
- SPN = *single nucleotide polymorphisms*
- SSP = *single specific primers*
- RFLP = *restriction fragment length polymorphism*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISAO DA LITERATURA.....	12
2.1 Plaquetas: origem, forma e interação	12
2.2 Antígenos do sistema ABO	13
2.3 Antígenos do sistema HLA	14
2.4 Antígenos do sistema HPA	16
2.4.1 Glicoproteína IIb/IIIa.....	17
2.4.2 Glicoproteína Ia/IIa.....	18
2.4.3 Glicoproteína Ib/IX/V	19
2.4.4 Glicoproteína CD109	20
2.5 Polimorfismo do Sistema HPA.....	21
2.6 HPA e frequências alélicas	24
2.7 Métodos de Genotipagem HPA	26
2.8 Importância clínica dos polimorfismos do sistema HPA.....	28
3. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	32
4. OBJETIVOS	36
4.1 Geral	36
4.2 Específicos	36
5. ARTIGO ORIGINAL (INGLÊS)	37
6. ARTIGO ORIGINAL (PORTUGUÊS)	54
7. APÊNDICE A: Relatório de validação da técnica de PCR-SSP	72
8. APÊNDICE B: Géis de Agarose.....	90
9. APÊNDICE C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	91
10. ANEXO A: Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	92

1. INTRODUÇÃO

A transfusão de plaquetas é um tratamento útil nas trombocitopenias e pode ser realizada em duas situações: na prevenção e no tratamento de hemorragias graves em pacientes trombocitopênicos. Pacientes onco-hematológicos são os principais representantes do grupo de pacientes que recebem múltiplas transfusões de plaquetas e estão sujeitos à refratariedade plaquetária.

A refratariedade plaquetária é definida como a falha na obtenção de contagem satisfatória de plaquetas após transfusões de plaquetas alogênicas. A etiologia da refratariedade plaquetária pode ser de origem imunológica. Anticorpos específicos produzidos contra diferentes sistemas genéticos plaquetários são responsáveis pelo insucesso transfusional.

O sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) está entre os mais importantes sistemas genéticos plaquetários. Os antígenos HPAs são estruturas polimórficas resultantes de mutações pontuais (SNPs – *Single nucleotide polymorphism*) que não ocasionam defeitos funcionais, porém são capazes de gerar aloimunização.

Métodos moleculares de genotipagem HPA permitem o conhecimento da especificidade destes antígenos. O uso de plaquetas geneticamente compatíveis na transfusão de plaquetas pode evitar a formação de anticorpos anti-plaquetários e, conseqüentemente, a refratariedade plaquetária.

O presente trabalho tem o objetivo de determinar a frequência alélica e genotípica do sistema HPA em doadores de plaquetas do Estado do RS. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA, sob número 12-0447.

2. REVISAO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plaquetas: origem, função e interação

As plaquetas foram identificadas há 150 anos e inicialmente foram descritas como um “elemento morfológico” no sangue com funções importantes na hemorragia e trombose (1) (2). Hoje sabemos que as plaquetas são pequenas células anucleadas que derivam de megacariócitos, seu progenitor na medula óssea. Com 1-2 μm de diâmetro, as plaquetas são a segunda porção celular mais abundante na corrente sanguínea, com uma concentração normal de $150\text{-}400 \times 10^3$ células/ μL (2).

As plaquetas somam aproximadamente um trilhão de células na corrente circulatória de um adulto e renovam-se a cada 8-10 dias, mantendo uma produção de cerca de 100 bilhões de novas plaquetas por dia com o objetivo de manutenção da contagem plaquetária dentro da normalidade (1).

A principal função fisiológica das plaquetas está em aglomerar-se em sítios de injúria vascular para iniciar a coagulação do sangue com o objetivo de limitar a perda sanguínea (1). A adesão plaquetária, a ativação de fatores de coagulação e a subsequente agregação plaquetária nos sítios de injúria vascular são eventos críticos para a formação do trombo (2).

Todos estes eventos de interação plaquetária acontecem através de mediadores presentes na superfície da membrana da plaqueta, onde há uma considerável expressão de receptores de superfície. Estes receptores de superfície compreendem glicoproteínas, sendo a GPIIb/IIIa ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ integrina) e o complexo GPIba as de expressão mais abundante na plaqueta (2). Os demais complexos de

glicoproteínas incluem: o complexo receptor de colágeno-GPIa-IIa (VLA-2)($\alpha 2\beta 1$); o complexo receptor de fibronectina-GPIc-IIa ($\alpha 5\beta 1$) (VLA5), o complexo receptor de laminina-GPIc'-IIaA ($\alpha 6\beta$)(VLA6), o complexo receptor de fator de von Willebrand-GPIb-V-IX e o receptor de vitronectina ($\alpha V\beta 3$) (3).

O polimorfismo das glicoproteínas plaquetárias foi primeiramente observado em 1974, por Nurdem e Caen, que verificaram defeitos funcionais na glicoproteína GPIIb/IIIa, clinicamente designada como trombastenia de Glanzmann. Posteriormente, outros defeitos hereditários foram observados, como mutações nos genes do complexo GPIb/V/IX, causando a síndrome de Bernard-Soulier (3).

A superfície plaquetária ainda expressa uma diversidade de antígenos, como os antígenos do sistema ABO (antígenos A, B e H), antígenos do sistema HLA (*human leucocyte antigen*) classe I e antígenos do sistema HPA (*human platelet antigen*). A densidade de expressão destes antígenos é variável na superfície plaquetária (4).

2.2 Antígenos do sistema ABO

Os antígenos A, B e H estão presentes na superfície plaquetária por ancoramento intrínseco ou por transferência passiva dos glicolipídeos do plasma para a membrana plaquetária (4). A transfusão de plaquetas ABO compatíveis aumenta o incremento plaquetário (5, 6) e o uso de plaquetas ABO incompatíveis estimula o sistema imune à produção de anticorpos (7).

Carr e cols demonstraram que pacientes que receberam transfusões de plaquetas ABO incompatíveis tornavam-se mais refratários do que pacientes que recebiam plaquetas ABO compatíveis (respectivamente 69% versus 8%, $p = 0,001$).

Além da produção anticorpos anti-A e/ou anti-B, os pacientes também passavam a produzir anticorpos anti-HLA em proporções mais elevadas do que pacientes que recebiam transfusões de plaquetas ABO compatíveis. Esta produção de anticorpos anti-HLA pode ser atribuída a super estimulação do sistema imune (7).

A densidade de expressão dos antígenos A e B é heterogênea na superfície plaquetária. Níveis de expressão de antígenos A1 podem variar de 2.100 – 16.000 moléculas por plaqueta (8). Esta diversidade na expressão de antígenos pode explicar a variabilidade do incremento plaquetário após a transfusão de plaquetas ABO incompatíveis (4).

2.3 Antígenos do sistema HLA – *Human Leukocyte Antigen*

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) foi descoberto a partir da observação de rejeição de tecidos transplantados entre camundongos. No ser humano, as primeiras observações foram feitas por Jean Dausset, Jon van Rood e seus colegas em 1954. Dausset verificou a capacidade que os soros de indivíduos submetidos à transfusão sanguínea tinham de aglutinar leucócitos de outros indivíduos. Estes indivíduos frequentemente continham anticorpos circulantes que reagiam com antígenos expressos na superfície de leucócitos. Pela observação de Dausset e seus colegas, o MHC humano continha o chamado de sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA)(9).

O sistema HLA está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p 21.3) e compreende mais de 200 genes. Dentre as três regiões codificadoras, somente a de classe I e a classe II estão envolvidas na resposta imune. Estes antígenos, além de estarem presentes nos leucócitos, estão presentes em muitos outros tipos de tecidos

e células. Nas plaquetas, há somente a expressão de antígenos HLA classe I, que compreendem os locos HLA-A, -B e -C (10).

Os genes HLA são expressos de forma codominante, isto é, cada indivíduo expressa os dois alelos que são herdados dos pais. A herança é haplotípica, ou seja, cada indivíduo herda e transmite o conjunto de alelos em bloco por cromossomo (9).

A molécula de HLA classe I (figura 1) consiste de duas cadeias polipeptídicas, sendo uma cadeia α e uma β 2 microglobulina. Cada cadeia é codificada por diferentes genes: a cadeia α é codificada pelo cromossomo 6 e a cadeia β 2 microglobulina é codificada pelo cromossomo 15. Os domínios α 1 e α 2 respondem pelo polimorfismo da molécula HLA classe I. Esta porção da molécula forma uma α hélice no topo da molécula, cuja interação com peptídeos acontece nesta região. O domínio α 3 é uma região constante em todas as moléculas classe I e está ancorado na membrana celular (9, 10).

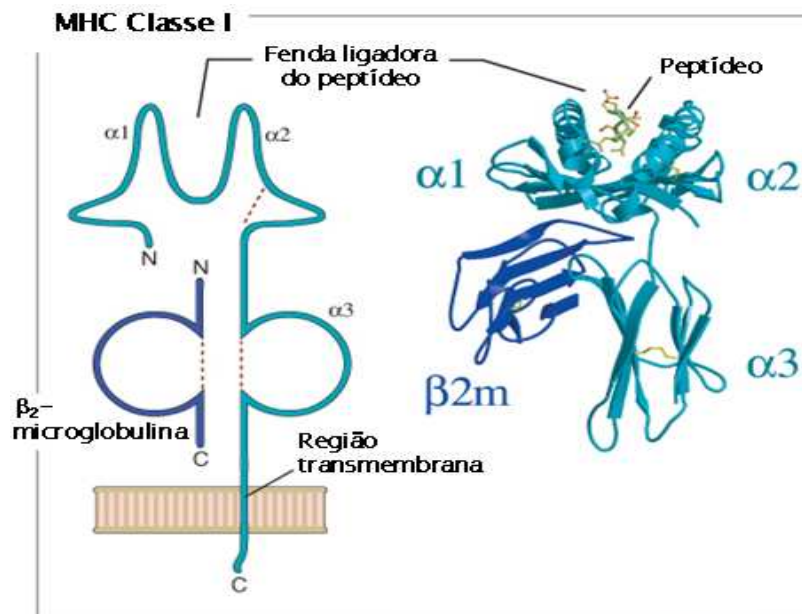


Figura 1: Estrutura da molécula do HLA classe I. Adaptado de Abbas – Cellular and Molecular Immunology, 6ª ed, 2007

A variabilidade de densidade de expressão de antígenos HLA classe I na superfície plaquetária é grande (4). A expressão de antígenos HLA-A e HLA-B é maior do que a expressão de antígenos HLA-C (4) (10). Inicialmente estudos *in vitro* sugeriram que a presença de antígenos HLA classe I nas plaquetas eram derivados da adsorção de antígenos presentes no plasma. Atualmente sabe-se que as plaquetas possuem mRNA específico que codifica para antígenos HLA. Logo, estas possuem a capacidade de sintetizar antígenos HLA classe I (4).

2.4 Antígenos do sistema HPA – *Human Platelet Antigens*

Os antígenos plaquetários humanos (HPA) são encontrados nos complexos glicoproteicos plaquetários, os quais também funcionam como receptores de membrana. Estes receptores possuem um papel muito importante na interação das plaquetas com a parede dos vasos lesionados (adesão) e na interação com outras plaquetas (agregação)(10).

Nas plaquetas, a maioria dos antígenos HPA são derivados de uma alteração de aminoácidos codificado por um polimorfismo nos genes (10). Para melhor compreensão das bases genéticas, expressão e localização dos antígenos HPA é necessário o detalhamento estrutural das glicoproteínas plaquetárias.

2.4.1 Glicoproteína IIb/IIIa

O complexo glicoproteico GPIIb/IIIa ($\alpha\text{IIb}\beta_3$) (figura 2) forma um sistema heterodimérico de subunidades α e β não covalentemente associadas. Este complexo, que é membro da família das integrinas, está envolvido no contato célula-célula e célula-vaso. Logo, com 50.000 a 80.000 cópias por plaqueta, esta é a glicoproteína mais abundante na superfície plaquetária. O gene para a GPIIIa está localizado no cromossomo 17 e parecer ser o mais polimórfico das subunidades das integrinas humanas. Um grande número de antígenos plaquetários estão localizados na GPIIIa (CD61), como o HPA-1, HPA-4, HPA-6w, HPA-7w, HPA-8w, HPA-10w e HPA-11w(3, 10). A porção GPIIb (CD41) expressa os antígenos HPA-3 e HPA-9w (10).

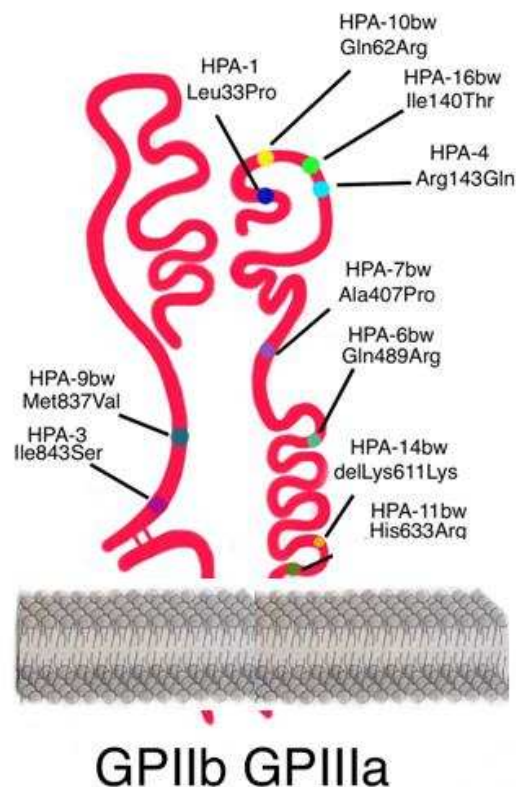


Figura 2: estrutura do complexo glicoproteico GPIIb/IIIa. Adaptado de Wintrobe MM.

Wintrobe's clinical hematology, 2009.

2.4.2 Glicoproteína Ia/IIa

O complexo glicoproteico Ia/IIa (CD49/CD29) (figura 3) consiste em um heterodímero de subunidades α (GPIa) e β (GPIIa) não covalentemente associadas. O principal ligante deste $\alpha\beta$ heterodímero é o colágeno(10). Esta glicoproteína participa da adesão e ativação plaquetária. Há aproximadamente 800 à 2.800 cópias desta molécula por plaqueta. Somente a subunidade α é polimórfica, expressando os antígenos HPA-5 e HPA-13w. O gene desta subunidade está localizado no cromossomo 5 (3, 10)

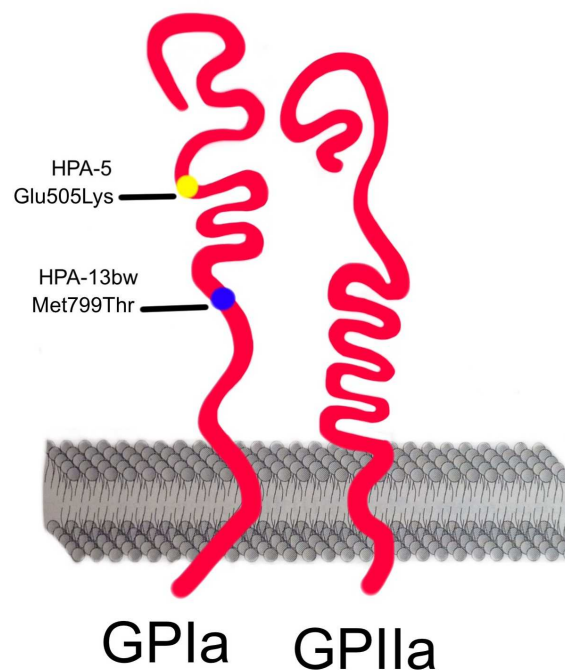


Figura 3: estrutura do complexo glicoproteico Ia/IIa. Adaptado de Wintrobe MM. Wintrobe's clinical hematology, 2009.

2.4.3 Glicoproteína Ib/IX/V

O complexo GPIb/IX/V (CD42) (figura 4) é conhecido como receptor do fator de von Willebrand. Este complexo consiste de uma ligação por ponte dissulfeto entre a GPIb α e a GPIb β associado a uma ligação não-covalente com a GPIX e GPV(3) (10). Todas as quatro glicoproteínas são membros da família das proteínas ricas em leucina e são codificadas por diferentes genes. O braço curto do cromossomo 22 contém o gene para a GPIb α e o braço longo contém o gene para a GPIb β . Os genes para a GPIX e GPV estão localizados no cromossomo 3.

O complexo GPIb/IX/V consiste de um heptamero localizado na superfície da plaqueta. A região amino terminal do domínio GPIb α funciona com o receptor do fator de von Willebrand, o qual realiza o contato e adesão plaquetária ao endotélio lesado. Há aproximadamente 25.000 cópias da GPIb/IX e 12.000 cópias da GPV por plaqueta. A subunidade GPIb α expressa o HPA-2 e a subunidade GPIb β expressa o HPA-12w(3, 10).

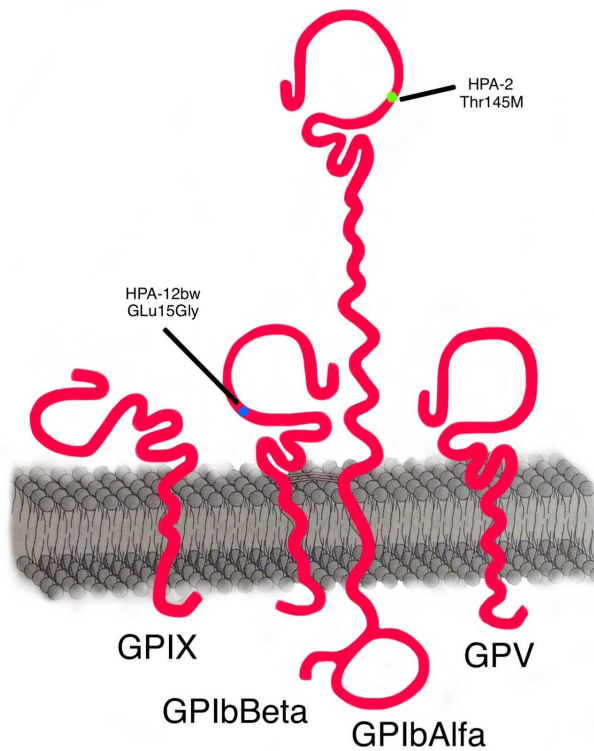


Figura 4: estrutura do complexo glicoproteico GPIb/IX/V. Adaptado de Wintrobe MM. Wintrobe's clinical hematology, 2009.

2.4.4 Glicoproteína CD109

A glicoproteína CD109 é um monômero ancorado na membrana plaquetária através da GPI. O HPA-15 é expresso através desta glicoproteína. As bases genéticas para a sua expressão ainda não foram completamente elucidadas (3, 10).

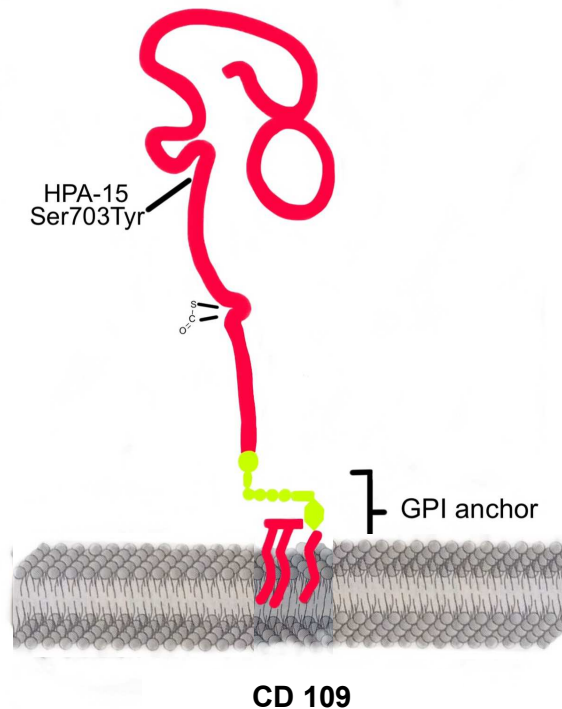


Figura 5: estrutura da glicoproteína CD109. Adaptado de Wintrobe MM. Wintrobe's clinical hematology, 2009

2.5 Polimorfismo do Sistema HPA

Os polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias são expressos sob a forma de aloantígenos plaquetários. Estas variações polimórficas não ocasionam defeitos funcionais nas glicoproteínas; porém podem induzir à formação de anticorpos que ocasionam situações clinicamente relevantes, como a trombocitopenia neonatal aloimune, purpura pós transfusional e refratariedade plaquetária (8).

O polimorfismo HPA foi identificado através da presença de aloanticorpos maternos dirigidos contra as plaquetas do feto, ocasionando a trombocitopenia neonatal aloimune. A trombocitopenia neonatal aloimune ocorre pela sensibilização

da mãe contra aloantígenos presentes nas plaquetas do feto, originando aloanticorpos com capacidade de atravessar a placenta e ocasionar a trombocitopenia neonatal (11).

A maioria destes polimorfismos foi descoberta por observações de aloanticorpos policlonais formados durante a gestação ou após múltiplas transfusões de sangue. O primeiro aloantígeno plaquetário foi descrito em 1959 por van Loghem e este foi designado “Zw”, hoje nomeado por HPA-1 (3). Anticorpos anti HPA-1a são a principal causa (aproximadamente 85%) de trombocitopenia neonatal aloimune. Gestantes com genótipo HPA-1b/b são aquelas passíveis de sensibilização e formação de anticorpos anti HPA-1a (8).

Foram definidos, até o momento, 33 diferentes HPAs expressos em seis diferentes glicoproteínas plaquetárias codificadas por diferentes cromossomos. No entanto, somente 6 grupos HPA apresentam relevância clínica e reatividade sorológica (HPA-1, -2, -3, -4, -5 e -15) (figura 6) (8, 12).

SISTEMA HPA			
Nome	Antígeno	Glicoproteína	Cromossomo
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	GP1IIa	17
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	GP1b α	17
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	GP1IIa	17
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	GP1IIa	17
HPA-5	HPA-5a HPA-5b	GP1a	5
HPA-6	HPA-6bw	GP1IIa	17
HPA-7	HPA-7bw	GP1IIa	17
HPA-8	HPA-8bw	GP1IIa	17
HPA-9	HPA-9bw	GP1Ib	17
HPA-10	HPA-10bw	GP1IIa	17
HPA-11	HPA-11bw	GP1IIa	17
HPA-12	HPA-12bw	GP1b β	22
HPA-13	HPA-13bw	GP1a	5
HPA-14	HPA-14bw	GP1IIa	17
HPA-15	HPA-15a HPA-15b	CD109	6

Figura 6: Bases moleculares do sistema HPA. Adaptado de Metcalfe, 2003.

Os HPAs são numerados em ordem de descoberta. A designação “w” é adicionada após o nome do antígeno quando ainda não foi reportado um aloanticorpo dirigido contra a porção do antígeno capaz de gerar imunogenicidade. Estes são denominados de "antígenos de baixa frequência" (12).

As bases moleculares do sistema HPA indicam que os aloantígenos são resultantes de mutações pontuais (SNP) ocasionadas pela substituição de um aminoácido ao nível proteico. A substituição de um aminoácido gera uma troca na estrutura terciária na membrana da glicoproteína resultando em diferentes epítomos que podem causar reconhecimento aloimune (3).

De acordo com a nomenclatura HPA, o alelo de maior frequência é representado pela letra “a” e o de menor frequência pela letra “b”. As variantes “b”

dos antígenos HPA -1, -2, -3, -5 e -15 são relativamente frequentes, enquanto que as variantes “b” dos antígenos HPA 4 e 6 a 13 são extremamente raros (13) (3).

A análise da frequência de cada um destes sistemas revela diferenças importantes, especialmente no que diz respeito à distribuição do alelo b, entre as populações, inclusive no Brasi (13).

2.6 HPA e frequências alélicas

A frequência de aloantígenos plaquetários tem sido investigada em diferentes populações do mundo permitindo inferência sobre a transferência de genes. Estes estudos tem revelado frequências alélicas distintas entre diferentes populações estudadas.

Segundo diversos autores, a frequência alélica para o alelo “a” dos sistemas HPA -1, -2, e -5 foi maior do que a frequência alélica dos alelos “b” para estes sistemas em populações da Alemanha (14), Argentina (15), Áustria (16), Brasil (13, 17, 18), China (19), Congo (20), Coreia (21), Croácia (22), Dinamarca (23), Egito (24), Espanha (25), Eslovênia (26), França (27), Indonésia (28), Itália (29), Malásia(30) , Polinésia(31) ,Polônia (32) e Reino Unido (33). Para o sistema HPA-3, especialmente nas populações asiáticas(19, 21, 28, 30), a frequência dos alelos “a” tende a se aproximar mais da frequência encontrada para o alelo “b” (aproximadamente 0,5).

O alelo “b” do sistema HPA-4 é extremamente raro em populações caucasoides. Toralles-Pereira (34) relatou a primeira observação do alelo “b” do sistema HPA-4 em um homem brasileiro cujos ascendentes eram de origem italiana

e indígena. O seu genótipo era HPA-4a/b. A herança do alelo “b” provavelmente era devido aos seus ascendentes indígenas. Isto revela a grande miscigenação da população brasileira que iniciou com a chegada dos portugueses ao Brasil.

No trabalho de Castro *et al* a população brasileira foi investigada (13), através da genotipagem de 100 caucasoides da cidade de Campinas, estado de São Paulo, em 150 negros do estado da Bahia e em 70 índios amazônicos. Este estudo revelou que as frequências alélicas para os sistemas de antígenos plaquetários humanos HPA-1, -2, -3, -4 e -5 entre os caucasoides e negros foram similares. Já entre os índios amazônicos, não foram observados os alelos “b” nos sistemas HPA -1, -4 e -5 (13).

Outro estudo utilizando somente a genotipagem HPA -15 verificou as frequências alélicas em 15 indivíduos caucasoides, 15 descendentes de africanos, 15 descendentes de orientais, 106 índios amazônicos Xikrin, 31 índios amazônicos Gaviões e 94 doadores de sangue. A frequência observada entre a população brasileira estratificada e as frequências reportadas por estudos com indivíduos de origem asiática, canadense e européia foi similar. Já entre os índios amazônicos, as frequências observadas foram significativamente diferentes das encontradas em descendentes de africanos e doadores de sangue (35).

Importante lembrar que a partir de 1500 o Brasil passou a receber portugueses, italianos, alemães e espanhóis que deram início a colonização do Brasil. Parte substancial dos colonizadores se miscigenou com índios e negros vindos da África (36). A maioria dos indivíduos analisados em estudos brasileiros são provavelmente fruto da miscigenação (34) (37).

A região sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) foi destinada ao povoamento com colonos. Este sistema de colonização é muito

diferente do sistema adotado na província de São Paulo. No sistema de colonização desenvolvido na Região Sul, o objetivo era fazer do povoamento mecanismos de conquista e de manutenção do território. Colônias homogêneas de povoamento surgiram no Sul a partir do empenho dos colonos em adquirir terras visando assegurar a proximidade geográfica com seus filhos e netos. A concentração de colonos de mesma origem étnica resultou na formação de grupos relativamente homogêneos(36) .

2.7 Métodos de Genotipagem HPA - PCR-SSP

Com o advento da biologia molecular e com a identificação das bases moleculares dos polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias, a genotipagem do sistema HPA por métodos moleculares tornou-se o método de escolha.

Os métodos moleculares utilizam a PCR (*polimerase chain reaction*) para amplificar segmentos específicos do DNA. Na PCR, o processo consiste na utilização de uma mistura composta de uma DNA-polimerase termoestável, dois oligonucleotídeos iniciadores (primers), desoxirribonucleotídeos livres (dNTPS – Adenina, Timina, Citosina e Guanina), tampão de reação, concentração adequada de $MgCl_2$ e o DNA com a sequência-alvo (38).

A reação de amplificação é composta por três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A desnaturação ocorre pelo aquecimento (95 à 96°C) da mistura dos componentes da reação. Este processo permite a separação da dupla fita de DNA, gerando fitas unifilamentares de DNA. Na segunda etapa, ocorre o anelamento dos primers iniciadores às sequências de DNA complementares através da diminuição da temperatura (45-65°C). Por fim, ocorre um aumento de

temperatura (68-72 °C) para que haja a polimerização da nova fita de DNA, com o consumo da taq polimerase, MgCl₂ e dos dNTPS (38).

Os métodos moleculares utilizados para a genotipagem HPA são: RFLP (13, 35), PCR-SSP (13-15, 22, 24, 32, 33, 39), microarranjos (18) e sequenciamento de DNA (40). O método mais comumente utilizado é o PCR-SSP. Suas vantagens são a robustez e o baixo custo quando comparado aos demais métodos.

O método de PCR-SSP (*Polimerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*) se baseia no princípio de que, sob condições de PCR estritamente controladas, o anelamento dos pares de primers com pareamento traduzem-se na amplificação de sequências alvo. Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados são separados em gel de agarose corado por um intercalante de DNA (p.ex. brometo de etídeo) e visualizados sob luz ultravioleta. A interpretação dos resultados de PCR-SSP baseia-se na presença ou ausência de um fragmento específico de DNA amplificado. O tamanho dos fragmentos amplificados é comparado a um padrão de peso molecular (Figura 7).

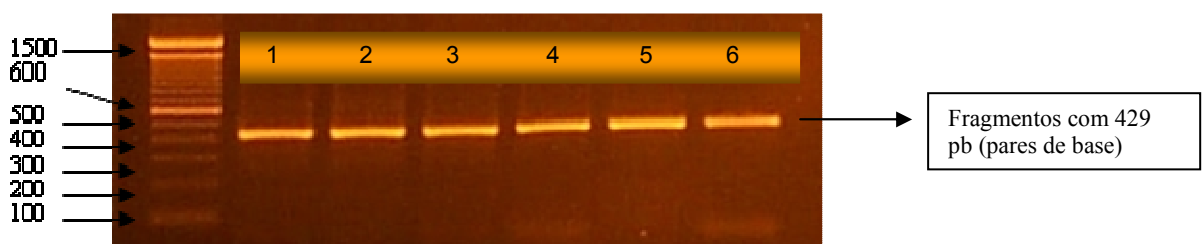


Figura 7: Fragmentos de DNA amplificados de 6 amostras comparados a um padrão de peso molecular de 100 bp

2.8 Importância clínica dos polimorfismos do sistema HPA

Os antígenos HPA são estruturas imunogênicas(10). A exposição a estes antígenos durante a gestação(10) ou após múltiplas transfusões de plaquetas(41) estimula o sistema imune à produção de anticorpos.

Os aloantígenos do sistema HPA-1 tem sido associados com as trombocitopenias aloimunes e são a primeira causa de trombocitopenia neonatal aloimune e trombocitopenia pós transfusional em caucasoides. A aloimunização por antígenos do sistema HPA-1 é importante pela sua frequência (> 75%) e pela severidade da trombocitopenia (10). A mais severa consequência da trombocitopenia neonatal aloimune é a hemorragia intracraniana que ocorre em cerca de 10% dos neonatos afetados, sendo que a maioria ocorre intra-utero. Dez por cento destas hemorragias são fatais e 20% deixam sequelas neurológicas. As taxas de recorrência em gestações subsequentes com fetos incompatíveis são próximas de 100%, com gravidade maior que a observada na primeira gestação (42).

Pacientes onco-hematológicos são os principais representantes do grupo de pacientes que recebem múltiplas transfusões de plaquetas e estão sujeitos a refratariedade plaquetária (41) (43).

A refratariedade plaquetária é definida como a falta de resposta do paciente na obtenção de contagem satisfatória de plaquetas após duas ou mais transfusões consecutivas de plaquetas alogênicas. Este termo designa uma situação clínica na qual a transfusão profilática deixa de ser eficaz, isto é, não há aumento na contagem de plaquetas no sangue periférico dos pacientes que recebem transfusões (44). A esta situação clínica associam-se diversos desfechos adversos como o maior

período de internação e custo hospitalar (45), menor sobrevivência dos pacientes (46) e risco aumentado de sangramentos fatais (47). Slichter e cols verificaram que 27% dos pacientes que receberam múltiplas transfusões de plaquetas desenvolveram refratariedade plaquetária (48).

Em relação a aloimunização aos sistemas genéticos expressos na membrana plaquetária, a maior parte dos episódios de refratariedade plaquetária de origem imunológica estão associados à presença de anticorpos anti-HLA (80-90%), ao passo que aloimunização anti-HPA é descrita em 10-20% dos casos (49).

A presença de anticorpos anti-HLA-A e anti-HLA-B é especialmente observada nos casos de refratariedade plaquetária pela produção de anticorpos anti-HLA (43). Já para casos de aloimunização plaquetária por anticorpos anti-HPA, o anti-HPA-5b foi o mais frequente anticorpo encontrado em pacientes politransfundidos (50).

Embora a aloimunização contra antígenos do sistema HLA seja mais comum do que a aloimunização por anticorpos anti-HPA (41), os antígenos HPA já demonstraram imunogenicidade e importância clínica. Lucas e cols verificaram que a presença de anticorpos anti-HPA-1a ocasiona prolongada dependência de transfusões de plaquetas e complicações hemorrágicas importantes (51).

O tratamento da refratariedade plaquetária é difícil, oneroso e geralmente ineficiente (43). Políticas públicas que possam prevenir a aloimunização são necessárias para melhorar as medidas de suporte ao tratamento de pacientes onco-hematológicos.

A seleção de doadores de plaquetas baseada na especificidade dos sistemas plaquetários ABO, HLA e HPA tem ganhado força. Xia e cols criaram um registro de doadores de plaquetas com o objetivo de oferecer transfusões de plaquetas

geneticamente compatíveis. Este estudo demonstrou que a transfusão de plaquetas HLA compatíveis aumentou significativamente o incremento plaquetário. Pacientes sensibilizados aos antígenos HPA também se beneficiaram desta prática. Transfusões com plaquetas HLA e HPA compatíveis também resultaram em aumento significativo do incremento plaquetário quando comparado a compatibilização exclusiva HLA (52).

Duquesnoy (53) propôs um protocolo de seleção de doadores de plaquetas baseado na compatibilização por epítomos HLA. O algoritmo criado por Duquesnoy considera sequências lineares de eplets de aminoácidos na molécula HLA que são acessíveis à ligação do anticorpo específico. Estes *eplets* de aminoácidos são elementos chave na formação de anticorpos anti-HLA e são compartilhados por diferentes especificidades de moléculas HLA (figura 8). Os antígenos HLA do paciente apresentam um repertório de *self-eplets* que podem ser acessíveis a ligação e formação de anticorpos. Em uma mesma molécula HLA, o paciente também apresenta outro repertório distinto de *self-eplets* que não são acessíveis a formação de anticorpos anti-HLA. Estes *eplets* determinam o grau de compatibilidade estrutural entre moléculas HLA. O software criado por Duquesnoy chama-se HLAMatchmaker e tem sido utilizado pelo EuroTransplante nos transplantes de rim, com o mesmo propósito de compatibilização baseada em epítomos HLA (53).

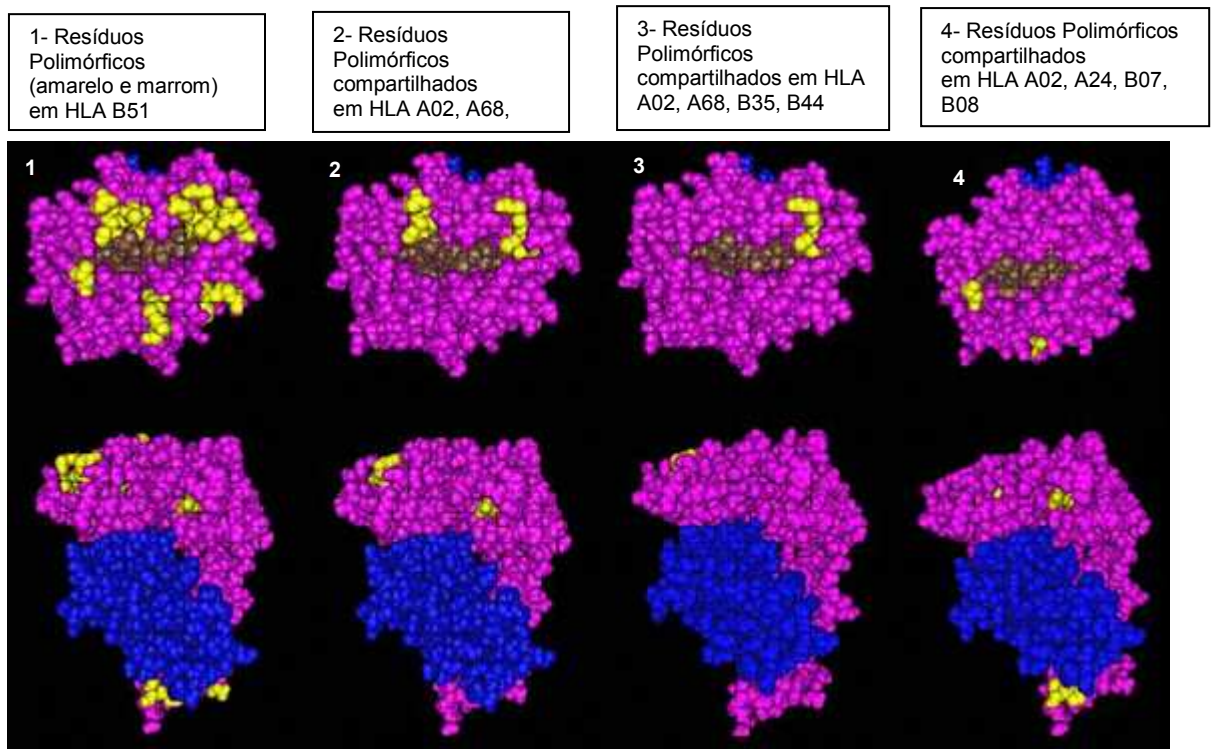


Figura 8: Resíduos de aminoácidos compartilhados por diferentes alelos HLA. Adaptado de Rene J Duquesnoy em <http://www.hlamatchmaker.net> acessado em 03/09/2014

3. Referências da Revisão da Literatura

1. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(4):264-74. Epub 2011/03/26.
2. 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;2012:384685. Epub 2012/09/26.
3. Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transplant immunology*. 2002;10(2-3):165-81. Epub 2002/09/10.
4. Santoso S. Human platelet alloantigens. *Transfusion and Apheresis Science*. 2003;28(3):227-36.
5. Shehata N, Tinmouth A, Naglie G, Freedman J, Wilson K. ABO-identical versus nonidentical platelet transfusion: a systematic review. *Transfusion*. 2009;49(11):2442-53. Epub 2009/11/12.
6. Pavenski K, Warkentin TE, Shen H, Liu Y, Heddle NM. Posttransfusion platelet count increments after ABO-compatible versus ABO-incompatible platelet transfusions in noncancer patients: an observational study. *Transfusion*. 2010;50(7):1552-60. Epub 2010/03/10.
7. Carr R, Hutton JL, Jenkins JA, Lucas GF, Amphlett NW. Transfusion of ABO-mismatched platelets leads to early platelet refractoriness. *British journal of haematology*. 1990;75(3):408-13. Epub 1990/07/01.
8. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox sanguinis*. 2014;106(2):93-102. Epub 2013/10/10.
9. Abbas AKL, A. H.; Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*: Elsevier Inc.; 2007.
10. Wintrobe MM. *Wintrobe's clinical hematology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
11. Risson DC, Davies MW, Williams BA. Review of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Journal of paediatrics and child health*. 2012;48(9):816-22. Epub 2012/09/14.
12. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox sanguinis*. 2003;85(3):240-5. Epub 2003/10/01.
13. 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. Epub 1999/12/20.
14. 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. Epub 2012/06/12.
15. De La Vega Elena CD, Noguez N, Fernandez Montoya A, Chialina S, Blanzaco PD, Theiller E, et al. Human platelet-specific antigens frequencies in the Argentinean population. *Transfus Med*. 2008;18(2):83-90. Epub 2008/04/11.
16. 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. Epub 1995/05/01.
17. 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. *Transfus Med*. 2000;10(3):207-12. Epub 2000/09/06.

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. Epub 2013/06/15.
19. 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. *Transfus Med*. 2010;20(6):376-82. Epub 2010/07/30.
20. 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. Epub 2005/02/26.
21. Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata K, Ueno I, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med*. 1998;8(2):129-32. Epub 1998/07/24.
22. Pavic M, Zadro R, Herak DC, Antolic MR, Dodig S. Gene frequencies of platelet-specific antigens in Croatian population. *Transfus Med*. 2010;20(2):73-7. Epub 2009/09/26.
23. Steffensen R, Kaczan E, Varming K, Jersild C. Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. *Tissue antigens*. 1996;48(2):93-6. Epub 1996/08/01.
24. 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. Epub 2013/06/06.
25. 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. Epub 1993/08/01. Frecuencia de los aloantigenos de las plaquetas en poblacion espanola.
26. 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. Epub 1999/08/24.
27. 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. Epub 1998/04/16.
28. Asmarinah, Dharma R, Ritchie NK, Rahayu S, Putricahya E, Santoso S. Human platelet-specific antigen frequencies in Indonesian population. *Transfus Med*. 2013;23(4):250-3. Epub 2013/04/27.
29. Bontadini A, Tazzari PL, Manfroi S, Ruscitto MC, Fruet F, Conte R. Human-platelet-antigen and neutrophil-antigen gene frequency in the Italian population determined by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *Haematologica*. 2000;85(4):430-1. Epub 2000/04/11.
30. 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. Epub 2012/06/12.
31. Edinur HA, Dunn PP, Lea RA, Chambers GK. Human platelet antigens frequencies in Maori and Polynesian populations. *Transfus Med*. 2013. Epub 2013/07/12.
32. Drzewek K, Brojer E, Zupanska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transfus Med*. 1998;8(4):339-42. Epub 1999/01/09.
33. 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. Epub 2003/12/17.

34. Toralles-Pereira C, de MCPMI, Deffune E, Machado PE. The first report of the human platelet alloantigen 4b allele in a Brazilian. *International journal of immunogenetics*. 2005;32(3):165-6. Epub 2005/06/04.
35. Cardone JD, Chiba AK, Boturao-Neto E, Vieira-Filho JP, Bordin JO. Gene frequencies of the HPA-15 (Gov) platelet alloantigen system in Brazilians. *Transfus Med*. 2004;14(6):433-7. Epub 2004/12/01.
36. Estatística IBdGe. Brasil 500 anos de Povoamento 2014 [22/08/2014].
37. Giolo SR, Soler JM, Greenway SC, Almeida MA, de Andrade M, Seidman JG, et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *European journal of human genetics : EJHG*. 2012;20(1):111-6. Epub 2011/08/25.
38. Zaha AF, H. B.; Passaglia, L. M. P. *Biologia Molecular Básica: Artmed*; 2012.
39. 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. Epub 2000/08/31.
40. Brouk H, Halle L, Bertrand G, Neche FZ, Ouelaa H, Kaplan C. Human platelet antigen allele frequencies in different Algerian populations. *Tissue antigens*. 2010;75(6):673-8. Epub 2010/02/13.
41. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *British journal of haematology*. 2008;142(3):348-60. Epub 2008/05/31.
42. Arinsburg SA, Shaz BH, Westhoff C, Cushing MM. Determination of human platelet antigen typing by molecular methods: Importance in diagnosis and early treatment of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *American journal of hematology*. 2012;87(5):525-8. Epub 2012/02/22.
43. Thiagarajan P, Afshar-Kharghan V. Platelet transfusion therapy. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2013;27(3):629-43. Epub 2013/05/30.
44. Delaflor-Weiss E, Mintz PD. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfus Med Rev*. 2000;14(2):180-96. Epub 2000/04/27.
45. Meehan KR, Matias CO, Rathore SS, Sandler SG, Kallich J, LaBrecque J, et al. Platelet transfusions: utilization and associated costs in a tertiary care hospital. *American journal of hematology*. 2000;64(4):251-6. Epub 2000/07/27.
46. Kerkhoffs JL, Eikenboom JC, van de Watering LM, van Wordragen-Vlaswinkel RJ, Wijermans PW, Brand A. The clinical impact of platelet refractoriness: correlation with bleeding and survival. *Transfusion*. 2008;48(9):1959-65. Epub 2008/06/20.
47. Toor AA, Choo SY, Little JA. Bleeding risk and platelet transfusion refractoriness in patients with acute myelogenous leukemia who undergo autologous stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2000;26(3):315-20. Epub 2000/09/01.
48. Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood*. 2005;105(10):4106-14. Epub 2005/02/05.
49. Pavenski K, Freedman J, Semple JW. HLA alloimmunization against platelet transfusions: pathophysiology, significance, prevention and management. *Tissue antigens*. 2012;79(4):237-45. Epub 2012/03/06.
50. Kiefel V, Konig C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion*. 2001;41(6):766-70. Epub 2001/06/16.
51. 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. Epub 2009/10/31.

52. Xia WJ, Ye X, Tian LW, Xu XZ, Chen YK, Luo GP, et al. Establishment of platelet donor registry improves the treatment of platelet transfusion refractoriness in Guangzhou region of China. *Transfus Med.* 2010;20(4):269-74. Epub 2010/02/09.
53. Duquesnoy RJ. Structural epitope matching for HLA-alloimmunized thrombocytopenic patients: a new strategy to provide more effective platelet transfusion support? *Transfusion.* 2008;48(2):221-7. Epub 2007/11/17.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Determinar frequência alélica de antígenos do sistema HPA em doadores de plaquetas.

4.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver método molecular *in house* para genotipagem HPA.
- Determinar a frequência alélica e genotípica para o sistema HPA -1, -2, -3, -4, -5 e -15 em doadores de plaquetas do sul do Brasil.
- Comparar as frequências alélicas encontradas em nossa amostra de estudo com as frequências reportadas por outros estudos.

5. Artigo Original (Inglês)

Human platelet antigen genotyping of platelet donors in Southern Brazil

Abstract

Human platelet antigens are immunogenic structures that result from single nucleotide polymorphisms (SNPs) leading to single amino acid substitutions. The present study sought to determine the allele and genotype frequencies of HPA-1 through 5 and HPA-15 in platelet donors from the state of Rio Grande do Sul, Brazil, and compare their allele frequencies to those observed in other populations. HPA genotyping was performed via the single specific primer-polymerase chain reaction (PCR-SSP) method. The study sample comprised 201 platelet donors (167 Caucasians and 34 non-Caucasians). Allele "a" was that most commonly found for HPA-1 through 5 in both groups. The HPA-15AB genotype predominated over homozygous genotypes of this system. Fisher's exact test revealed statistically significant differences for the HPA-5 system, with a greater prevalence of the HPA-5b allele in non-Caucasians. The neighbor-joining method and principal components analysis (PCA) revealed genetic proximity between our Caucasian group and European populations. We conclude that the allele frequencies of HPA-1 through 5 and HPA-15 found in our Caucasian sample are similar to those reported for European populations. These findings corroborate the ethnic makeup of the population of Rio Grande do Sul. The higher frequency of the HPA-5b allele found in

the non-Caucasian group of our sample suggests the possibility of allosensitization in patients who receive platelet transfusions from genetically incompatible donors.

Introduction

Human platelet antigens (HPAs) are polymorphic structures located in the platelet membrane (1). The molecular bases of the HPA system show that platelet antigens are the result of single nucleotide polymorphisms (SNPs) leading to single amino acid substitutions. These modifications alter the tertiary structure of the membrane glycoproteins, resulting in different epitopes, which can allow alloimmune recognition (2). To date, 33 different HPAs expressed in different platelet glycoproteins have been identified. Six biallelic HPA systems – HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, and HPA-15 – have been identified by serologic reactivity and recognized as clinically important (2). These polymorphic variations do not give rise to functional defects, but are immunogenic (3).

Most of these polymorphisms were discovered by observation of polyclonal antibodies formed during pregnancy or after multiple transfusions (4). Oncology/hematology patients are the main recipients of multiple platelet transfusions, and are vulnerable to platelet refractoriness. The presence of anti-HPA antibodies has been associated with prolonged platelet transfusion dependence and significant hemorrhagic complications (5). Anti-HPA-1a antibodies are the leading cause of serologically confirmed fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia (2).

The allele frequencies of HPA systems differ across ethnic groups. These population genetic characteristics are major determinants of the occurrence of

alloimmunization against platelets and its attendant clinical entities (6). The present study sought to determine the allele and genotype frequencies of HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, and HPA-15 in platelet donors from the state of Rio Grande do Sul, Brazil, and compare these allele frequencies to those reported in other populations.

Materials and Methods

Study Population

The study population comprised 201 platelet donors recruited between December 2013 and June 2014 from the Hemotherapy service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Peripheral blood samples were collected after written informed consent had been obtained. Subject ethnicity was self-reported using the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) classification scheme. For statistical purposes, the 201 subjects (156 men and 45 women), with a mean age of 40.7 years, were stratified into two groups: 167 (83.9%) Caucasians and 34 (16.1%) non-Caucasians.

This cross-sectional study was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Ethics Committee (n° 12-0447).

Methods

Peripheral blood samples were collected by venipuncture into EDTA-containing tubes. Genomic DNA was extracted by the salting-out method. DNA

samples were genotyped by single specific primer-polymerase chain reaction (PCR-SSP). PCR primers and conditions were adapted from protocols published elsewhere (7) (8). The PCR reagent mix consisted of 2 μL genomic DNA (optimally at 100 ng/ μL , range 2-250 ng/ μL), 0.2 μL dNTP mix (2.5 μM), 0.3 μL MgCl_2 (1.5 mM), 1.0 μL 10x buffer, 0.07 μL Taq polymerase (Platinum, Invitrogen), 1.8 μL ultrapure water, and 5.0 μL of HPA system-specific primer mix, to a final reaction volume of 10 μL . Primer sequences and final concentrations are listed in Table 1.

PCR reactions were amplified in an Applied Biosystems Veriti® thermal cycler, using the following program: initial denaturation at 96°C for 1 min, followed by five cycles at 96°C for 25 sec, 70°C for 45 sec, and 72°C for 30 sec; 20 cycles at 96°C for 25 sec, 65°C for 45 sec, 72°C for 30 sec; eight cycles at 96°C for 25 sec, 55°C for 45 sec, and 72°C for 30 sec; and a final extension cycle at 72°C for 3 min. The resulting fragments were visualized under UV light on a 2.5% agarose gel with ethidium bromide.

The PCR-SSP method was validated in our laboratory by interlaboratory comparison of DNA samples (9). Seven DNA samples of known HPA genotype were kindly provided by Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil, and used to generate 84 genotyping assays. An additional three DNA samples were genotyped in parallel with the commercially available ThromboType sequence-specific method (Lifecodes) to generate a further 36 validation assays.

Statistical Analysis

Allele and genotype frequencies were estimated by direct counting. *Chi-square* analysis was used to test HPA genotypes for deviation from *Hardy–Weinberg*

equilibrium using the Court Lab calculator. Fisher's exact test was used to compare the allele frequencies observed in our sample to those reported in different populations, in WinPepi 2.75. The significance level was set at $p < 0.05$.

Genetic distances between populations were estimated using the modified Cavalli-Sforza method (10). The neighbor-joining method was used to construct a tree based on genetic distance matrices, using POPTREE software (11) (12). The tree was constructed with five loci (HPA-1 through 5) using the population frequencies reported in the scientific literature and available on the European Bioinformatics Institute website (<http://www.ebi.ac.uk>). Principal components analysis (PCA) was performed to summarize the allele frequency distribution of HPA-1 through 5 in distinct populations, using SPSS 18. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) was carried out in ARLEQUIN 3.5 (13).

Results and Discussion

Allele and genotype frequencies – Immunological aspects

PCR-SSP validation analyses yielded 100% agreement, with a kappa coefficient of 1. The allele and genotype frequencies observed in our sample are described in Table 2. Genotyping results for all tested HPA systems were consistent with *Hardy–Weinberg* equilibrium.

Allele *a* was that most frequently found for HPA systems 1 through 5 in the overall study sample (Caucasians and non-Caucasians). For the HPA-15 system, alleles *a* and *b* were equally distributed in the Caucasian group, whereas HPA-15b (0.539) was slightly predominant over HPA-15a (0.471) in the non-Caucasian group;

overall, the HPA-15AB (0.471) genotype predominated over homozygous genotypes for this system (AA=0.235 and BB=0.294). The HPA-4b allele, which is exceedingly rare in Caucasian populations, did not occur in our sample (Table 2).

Comparison of allele and genotype frequencies between the Caucasian and non-Caucasian groups of the sample by means of Fisher's exact test revealed no statistically significant differences for systems HPA-1 through 4 or HPA-15. There was, however, a significant difference in system HPA-5 with a higher prevalence of the HPA-5b allele in the non-Caucasian group (0.191 *versus* 0.097, $p < 0.05$) (Table 2).

Allele 5b is more prevalent in African populations, as reported in the Congo, for example (14). Our non-Caucasian group was composed largely of subjects who self-identified as black and brown (91.2%). Interestingly, the African Brazilian population is mostly of Congolese, Angolan, and Mozambican descent (15). The most clinically relevant aspect of this finding is the possibility of allosensitization to platelets represented by the HPA-5b allele.

Platelet refractoriness is associated with the presence of antibodies against platelet surface antigens. Although alloimmunization against human leukocyte antigen (HLA) system antigens is more common than anti-HPA antibody alloimmunization (16), HPA system antigens have demonstrated immunogenicity and clinical relevance. Kiefel et al (17) found that anti-HPA-5b antibodies were those most commonly produced by multi-transfused patients with hematological malignancies who presented with sensitization to the HPA system. Treatment of platelet refractoriness is challenging, costly, and usually ineffective (18). The higher prevalence of the HPA-5b allele in the non-Caucasian group of our sample may pose a risk of allosensitization in platelet recipients who are not carriers of the 5b allele.

Population Genetics

Table 3 shows the allele frequencies observed in the Caucasian group of our sample (n=167) and those reported in other populations elsewhere in the literature. The Caucasian group was selected for comparison purposes because it was most representative of the population of Rio Grande do Sul, and because it accounted for the majority of our sample (83%).

No significant differences in allele frequencies were observed between our study population and the populations of Argentina (6) (HPA-1 through 5 and 15), Italy (19) (HPA-1 through 5), Germany (19) (HPA-1 through 3 and 5), Croatia (20) (HPA-1 through 3 and 5), the United Kingdom (21) (HPA-1 through 5), Slovenia (22) (HPA-1 through 5), France (23) (HPA-1 through 5), Denmark (24) (HPA-1 through 5), Austria (25) (HPA-1 through 3 and 5), Poland (26) (HPA-1 through 5), or Spain (27) (HPA-2 through 5 and 15) (Table 3). For HPA-1, we found a significant difference between our sample and the Spanish population (HPA1a=0.867 and 1b=0.133 *versus* HPA1a=0.810 and 1b=0.190, respectively, $p < 0.05$). Spanish population was found to carry HPA-1b more frequently than other European populations. The population of Rio Grande do Sul is primarily of German (28), Italian (29), Spanish (30), and Portuguese (31) descent.

On comparison to other studies carried out with the Brazilian population, we found no significant differences between our sample and the Caucasian group studied by Castro et al (32) (HPA-1 through 5), a group of platelet donors studied by Conti et al (33) (HPA-1 through 5 and 15), and the sample blood donors analyzed by Chiba et al (34) (HPA-1 through 4) (Table 3). Regarding HPA-5, we found a significant difference between our study and the group of blood donors assessed by

Chiba et al (34) (HPA5a=0.903 and 5b=0.097 *versus* HPA5a=0.823 and 5b=0.177, respectively, $p < 0.05$). This finding may be explained by the ample genetic diversity of the sample studied by Chiba et al. During colonization of the state of Rio Grande do Sul, settlements arose from an effort by European settlers to acquire land that would ensure geographic proximity to their children and grandchildren. This high concentration of settlers of similar ethnic origin led to the formation of relatively homogeneous population groups across the state (28).

Comparison of the HPA frequencies observed in the present study with those reported in Asian (35) (36) (37) (38), Oceanic (39), Amazonian Indians (32), and Toba Amerindian (6) populations yielded significant differences. These differences may be explained by the negligible participation of these demographic and ethnic groups in the population of Rio Grande do Sul.

Figure 1 shows a neighbor-joining tree for the HPA-1 through HPA-5 loci. This tree clearly shows three distinct ancestry groups, wherein the Maori group has no ancestry relationships with any of the other populations. The second group mostly comprises European and African populations, which are genetically closer to each other. Finally, the third group comprises Asian and Amerindian populations, which share greater genetic proximity. Our study population was genetically closest to the European populations of Italy and Spain and farthest from the Amerindian and Asian populations (first and second groups). This phylogeny is consistent with the ethnic makeup of Rio Grande do Sul, and corroborates the human migration patterns observed in the state. PCA yielded a similar distribution (Figure 2).

PCA revealed a division of the study populations into two major groups: one comprising Asian and Oceanic populations and one comprising European and

African populations. Our study population was included into the latter group, which is consistent with its close genetic proximity to European populations (Figure 2).

To assess the ability of HPA alleles to describe intercontinental genetic divergence, we conducted an AMOVA, which quantifies separation between populations. Toward this end, we divided the assessed populations into two groups: one comprising the populations of Asia and Oceania, as well as native ethnic groups – Toba Amerindians (6), Parakanã Indians (32), Native Brazilians, Maori people (39), Korea (20), Malaysia (37), Indonesia (38), China (36), and Polynesia (39) – and one comprising the populations of European and African origin: Poland (26), Denmark (24), Italy (19), Spain (27), the United Kingdom (21), Slovenia (22), Argentina (6), the Congo (14), and Egypt (40). Argentina was included in this group because the makeup of its population is strongly European. These groups were formed on the basis of PCA results. The proportion of between-group genetic variation calculated from these data was 10.07%, i.e., approximately 10% of variance was explained by the two groups ($F_{CT} = 0.10071$, $p < 0.0001$). The F_{ST} distance, which measures the variation of allele frequency between human populations, was 0.10466, with $p < 0.0001$, which indicates that the majority of variability (89.53%) occurred within, rather than between, populations. This result is possibly attributable to the HPA-1, 2, and 5 loci, as presence of alleles 1b, 2b, and 5b for these loci is exceedingly low in populations from Asia and Oceania.

Conclusion

Overall, we conclude that the allele frequencies observed in our sample for the HPA-1 through 5 and HPA-15 systems were similar to those described in European

populations. These findings corroborate the ethnic makeup of the population of Rio Grande do Sul. Our study population also demonstrated greater genetic proximity to the European population. The higher frequency of the HPA-5b allele observed in the non-Caucasian group of our sample suggests the risk of allosensitization to this immunogenic antigen in patients who receive platelet transfusions from donors of distinct genotypes. Therefore, the use of genetically compatible platelet concentrates should be considered in clinical practice, as HPA antigens are immunogenic. Our findings may contribute to improvements in transfusion therapy.

Table 1 : Primer sequences, fragment sizes, and final concentrations

<i>Primer</i>	<i>Sequence</i>	<i>Fragment size</i>	<i>Final concentration</i>
HPA-1a	5' TCACAGCGAGGTGAGGCCA3'	90 bp	1.4 µM
HPA-1b	5' TCACAGCGAGGTGAGGCCG 3'		
Common HPA-1	5' GGAGGTAGAGAGTCGCCATAG 3'		
HPA-2a	5' GCCCCCAGGGCTCCTGAC 3'	258 bp	1.4 µM
HPA-2b	5' GCCCCCAGGGCTCCTGAT 3'		
Common HPA-2	5' TCAGCATTGTCCTGCAGCCA 3'		
HPA-3a	5' TGGACTGGGGGCTGCCCAT 3'	267 bp	2.0 µM
HPA-3b	5' TGGACTGGGGGCTGCCCAG 3'		
Common HPA-3	5' TCCATGTTCACTTGAAGTGCT 3'		
HPA-4a	5' GCTGGCCACCCAGATGCG 3'	120 bp	1.4 µM
HPA-4b	5' GCTGGCCACCCAGATGCA 3'		
Common HPA-4	5' CAGGGGTTTTTCGAGGGCCT 3'		
HPA-5a	5' AGAGTCTACCTGTTTACTATCAAAG 3'	250 bp	2.0 µM
HPA-5b	5' AGAGTCTACCTGTTTACTATCAAAA 3'		
Common HPA-5	5' CTCTCATGGAAAATGGCAGTACA 3'		
HPA-15a Govb	5' TTCAAATTCTTGGTAAATCCTGG 3'	225 bp	2.0 µM
HPA-15b Gova	5' TTCAAATTCTTGGTAAATCCTGT 3'		
Common HPA-15a Govb	5' ATGACCTTATGATGACCTATTC 3'		
HGH control 1	5' GCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3'	429 bp	0.6 µM
HGH control 2	5' TCACGGATTCTGTGTGTTTC 3'		

Table 2: Allele frequencies, genotype frequencies, and Hardy–Weinberg equilibrium of the tested sample

	Frequency	HPA1	HPA2	HPA3	HPA4	HPA5	HPA15
Caucasians (n = 167)	AA	127 (0.765)	131 (0.789)	71 (0.428)	166 (1.0)	136 (0.824)	45 (0.269)
	AB	34 (0.205)	35 (0.211)	64 (0.386)	0 (0.0)	26 (0.158)	77 (0.461)
	BB	5 (0.030)	0 (0.0)	31 (0.187)	0 (0.0)	3 (0.018)	45 (0.269)
	Allele A	288 (0.867)	297 (0.895)	206 (0.621)	332 (1.0)	298 (0.903)	167 (0.500)
	Allele B	44 (0.133)	35 (0.105)	126 (0.379)	0 (0.0)	32 (0.097)	167 (0.500)
Non- Caucasians (n = 34)	AA	21 (0.618)	25 (0.735)	14 (0.412)	34 (1.0)	22 (0.647)	8 (0.235)
	AB	12 (0.353)	9 (0.265)	17 (0.500)	0 (0.0)	11 (0.324)	16 (0.471)
	BB	1 (0.029)	0 (0.0)	3 (0.088)	0 (0.0)	1 (0.029)	10 (0.294)
	Allele A	54 (0.794)	59 (0.868)	45 (0.662)	68 (1.0)	55 (0.809)	32 (0.471)
	Allele B	14 (0.206)	9 (0.132)	23 (0.338)	0 (0.0)	13 (0.191)	36 (0.539)
P-value*	Genotype	0.166	0.500	0.289	NC	0.044	0.942
	Allele	0.131	0.525	0.584	NC	0.034	0.691
	**HWE	0.306	0.080	0.076	NC	0.303	0.291

*Caucasians vs. non-Caucasians.

**HWE, Hardy–Weinberg equilibrium.

NC= Not calculated

Table 3: Comparison of allele frequencies across different populations (Fisher's exact test)

Country	Reference	Population	N	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	15a	15b
Brazilian Caucasians															
	Present study	Blood donors	167	0.867	0.133	0.895	0.105	0.621	0.379	1.0	0.0	0.903	0.097	0.500	0.500
South America															
Argentina	De La Vega <i>et al.</i> , 2008	Blood donors	192	0.878	0.122	0.875	0.125	0.612	0.388	1.0	0.0	0.927	0.073	0.510	0.490
Argentina	De La Vega <i>et al.</i> , 2008	Toba Amerindians	27	1.0	0.0	0.944	0.056	0.389	0.611	1.0	0.0	1.0	0.0	0.685	0.315
Brazil	Castro <i>et al.</i> , 1999	Brazilian blood donors -whites	100	0.925	0.075	0.850	0.150	0.600	0.400	1.0	0.0	0.920	0.080	NA	NA
Brazil	Castro <i>et al.</i> , 1999	Parakanã Indians	70	1.0	0.0	0.821	0.179	0.757	0.243	1.0	0.0	1.0	0.0	NA	NA
Brazil	Chiba <i>et al.</i> , 2000	Brazilian admixture- blood donors	79	0.918	0.082	0.861	0.139	0.639	0.361	1.0	0.0	0.823	0.177	NA	NA
Brazil	Chiba <i>et al.</i> , 2000	Brazil Indians- amazonian	95	1.0	0.0	0.963	0.037	0.710	0.290	1.0	0.0	0.963	0.037	NA	NA
Brazil	Conti <i>et al.</i> , 2014	Brazilian platelet donors	154	0.854	0.146	0.877	0.123	0.649	0.351	0.997	0.003	0.903	0.097	0.532	0.468
Africa															
Congo	Halle <i>et al.</i> , 2004	Blood donors	125	0.904	0.096	0.776	0.224	0.596	0.404	1.0	0.0	0.732	0.268	0.700	0.300
Egypt	Salem <i>et al.</i> , 2014	Egyptians	230	0.767	0.233	0.759	0.241	0.704	0.296	1.0	0.0	0.728	0.272	NA	NA
Europe															
Spain	Muniz <i>et al.</i> , 1993	Blood donors	500	0.810	0.190	0.900	0.100	0.650	0.350	1.0	0.0	0.880	0.120	0.479	0.521
Austria	Holensteiner <i>et al.</i> , 1995	Cord blood	900	0.852	0.148	0.918	0.082	0.612	0.388	NA	NA	0.892	0.108	NA	NA
Denmark	Steffensen <i>et al.</i> , 1996	Blood donors	**	0.831	0.169	0.917	0.083	0.626	0.374	1.0	0.0	0.922	0.078	NA	NA
France	Merieux <i>et al.</i> , 1997	Platelet donors	***	0.848	0.152	0.920	0.080	0.620	0.380	NA	NA	0.874	0.126	NA	NA
Poland	Drzewek <i>et al.</i> , 1998	Blood donors	#	0.874	0.126	0.898	0.102	0.592	0.408	1.0	0.0	0.937	0.063	NA	NA
Slovenia	Rozman <i>et al.</i> , 1999	Blood donors	152	0.809	0.191	0.891	0.109	0.592	0.408	0.997	0.003	0.934	0.066	NA	NA
Italy	EBI Institute, 2014	Whites	144	0.850	0.1493	0.888	0.111	0.611	0.389	1.0	0.0	0.899	0.100	NA	NA
United Kingdom	Jones <i>et al.</i> , 2003	Cadaver donors	134	0.840	0.160	0.925	0.075	0.627	0.373	1.0	0.0	0.914	0.086	NA	NA
Croatia	Pavic <i>et al.</i> , 2010	Healthy individuals	219	0.854	0.146	0.890	0.110	0.575	0.425	NA	NA	0.895	0.105	NA	NA
Germany	EBI Institute, 2014	Whites	573	0.839	0.160	0.910	0.090	0.586	0.413	NA	NA	0.917	0.083	NA	NA
Asia															
Korea	Seo <i>et al.</i> , 1998	Blood donors	200	0.989	0.011	0.923	0.077	0.555	0.445	0.995	0.005	0.978	0.022	NA	NA
China	Nie <i>et al.</i> , 2010	Platelet donors	200	0.995	0.005	0.963	0.037	0.543	0.457	0.995	0.005	0.990	0.010	0.403	0.597
Malaysia	Tan <i>et al.</i> , 2012	Blood donors	200	0.975	0.025	0.963	0.037	0.503	0.497	0.995	0.005	0.950	0.050	0.515	0.485
Indonesia	Asmarinah <i>et al.</i> , 2013	Blood donors	500	0.970	0.030	0.940	0.060	0.520	0.480	0.950	0.050	0.970	0.030	0.510	0.490
Oceania															
Maori natives	Edinur <i>et al.</i> , 2013	Maori people	75	0.960	0.040	0.933	0.067	0.580	0.420	1.0	0.0	0.987	0.013	0.340	0.660
Polynesia	Edinur <i>et al.</i> , 2013	Polynesians	25	0.980	0.020	0.920	0.080	0.720	0.280	1.0	0.0	0.940	0.060	0.300	0.700

Grey boxes indicate statistically significant differences in Fisher's exact test. P value $p < 0.05$

NA, not assessed. **HPA1 n = 557; HPA2 and HPA3 n = 163; HPA4 n = 131; HPA5 n = 427. *** HPA1 and 5 n = 800; HPA2 and 3 n = 350. # HPA1 n = 135; HPA2 n = 211; HPA3 n = 130; HPA4 n = 103; HPA5 n = 166.

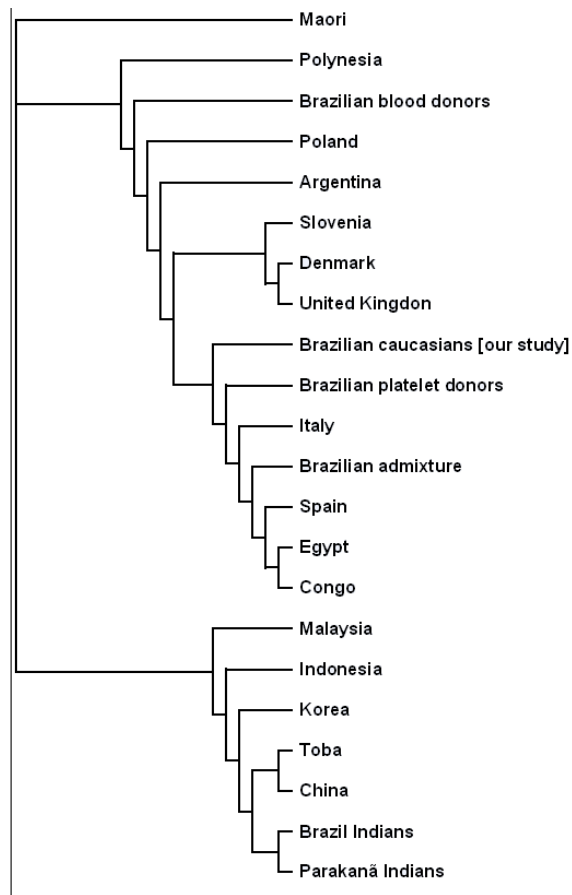


Figure 1: Tree diagram of genetic distances for the HPA-1 through 5 loci across different populations. Detail of Brazilian samples: Brazilian blood donors: Castro *et al* ; Brazilian caucasians = our study; Brazilian platelet donors: Conti *et al* ; Brazilian admixture: Chiba *et al*.

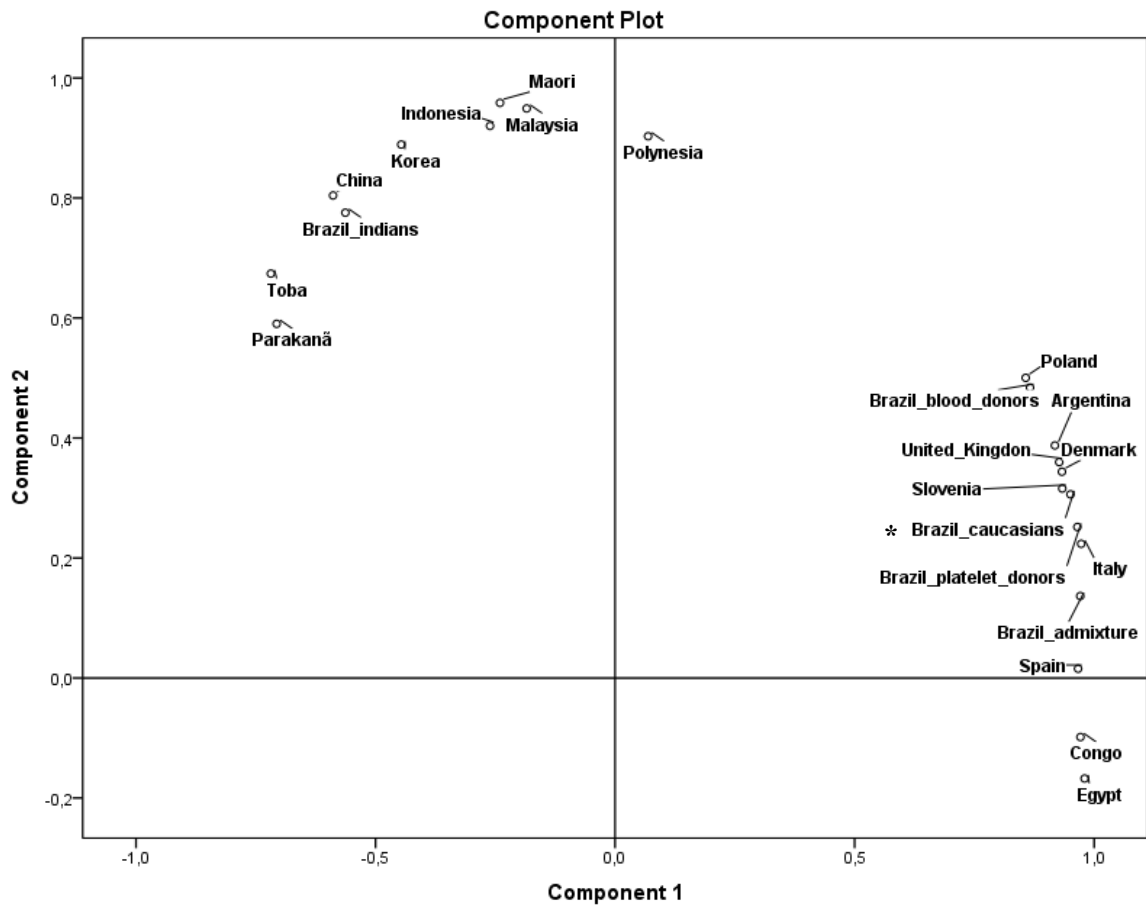


Figure 2: Principal components analysis based on the frequency of loci HPA-1 through 5, demonstrating the relationships between different populations. These two components explain 95.92% of variability between populations. The first and second components contributed 61.52% and 34.40% respectively. Detail of Brazilian samples: * Brazil_caucasians: our study; Brazil_blood_donors: Castro *et al* ; Brazil_platelet_donors: Conti *et al* ; Brazil_admixture: Chiba *et al*.

References

1. 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. Epub 2012/06/12.
2. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox sanguinis*. 2014;106(2):93-102. Epub 2013/10/10.
3. Li RS, Qiao ZL, Ling B, Lu P. Establishment of reference panel for human platelet antigen genotyping. *Vox sanguinis*. 2014. Epub 2014/04/05.
4. Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transplant immunology*. 2002;10(2-3):165-81. Epub 2002/09/10.
5. 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. Epub 2009/10/31.
6. 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. *Transfus Med*. 2008;18(2):83-90. Epub 2008/04/11.
7. Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE, Metcalfe P. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfus Med*. 1997;7(1):41-5. Epub 1997/03/01.
8. NIBSC. The National Institute for Biological Standards and Control. Europe2014 [cited 2014 01/11/2014]; Available from: <http://www.nibsc.org>.
9. Merzoni J. Padronização da genotipagem do sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) por PCR-SSP in house. In: HCPA, editor. Anais da 33 Semana Científica do HCPA. Porto Alegre-RS: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 2013. p. 212.
10. Nei M, Tajima F, Tatenos Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of molecular evolution*. 1983;19(2):153-70. Epub 1983/01/01.
11. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 1987;4(4):406-25. Epub 1987/07/01.
12. Takezaki N, Nei M, Tamura K. POPTREEW: web version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities. *Molecular biology and evolution*. 2014;31(6):1622-4. Epub 2014/03/08.
13. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*. 2010;10(3):564-7. Epub 2011/05/14.
14. 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. Epub 2005/02/26.
15. Reis JJ. Presença Negra: Conflitos e Encontros. In: Estatística IBdGe, editor. Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro: IBGE; 2007. p. 232.
16. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *British journal of haematology*. 2008;142(3):348-60. Epub 2008/05/31.
17. Kiefel V, König C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion*. 2001;41(6):766-70. Epub 2001/06/16.

18. Thiagarajan P, Afshar-Kharghan V. Platelet transfusion therapy. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2013;27(3):629-43. Epub 2013/05/30.
19. The-European-Bioinformatics-Institute. Immuno Polymorphism Database. Europe2014 [cited 2014 01/10/2014]; Available from: <http://www.ebi.ac.uk/>.
20. Pavic M, Zadro R, Herak DC, Antolic MR, Dodig S. Gene frequencies of platelet-specific antigens in Croatian population. *Transfus Med*. 2010;20(2):73-7. Epub 2009/09/26.
21. 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. Epub 2003/12/17.
22. Rozman P, Drabbelts 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. Epub 1999/08/24.
23. 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. Epub 1998/04/16.
24. Steffensen R, Kaczan E, Varming K, Jersild C. Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. *Tissue antigens*. 1996;48(2):93-6. Epub 1996/08/01.
25. 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. Epub 1995/05/01.
26. Drzewek K, Brojer E, Zupanska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transfus Med*. 1998;8(4):339-42. Epub 1999/01/09.
27. 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. Epub 1993/08/01. Frecuencia de los aloantigenos de las plaquetas en poblacion espanola.
28. Gregory V. Imigração Alemã: Formação de uma comunidade teuto-brasileira. In: IBGE, editor. *Brasil: 500 anos de povoamento*. Rio de Janeiro2007. p. 232.
29. Gomes AdC. Imigrantes Italianos: entre a italianità e a brasilidade. In: IBGE, editor. *Brasil: 500 anos de povoamento*. Rio de Janeiro2007. p. 232.
30. Guimarães LMP. Sonhos Galegos: os espanhóis no Brasil. In: IBGE, editor. *Brasil: 500 anos de povoamento*. Rio de Janeiro2007.
31. Venâncio RP. Presença Portuguesa: de colonizadores a imigrantes. In: IBGE, editor. *Brasil: 500 anos de povoamento*. Rio de Janeiro2007. p. 232.
32. 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. Epub 1999/12/20.
33. 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. Epub 2013/06/15.
34. 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. *Transfus Med*. 2000;10(3):207-12. Epub 2000/09/06.
35. Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata K, Ueno I, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med*. 1998;8(2):129-32. Epub 1998/07/24.

36. 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. *Transfus Med.* 2010;20(6):376-82. Epub 2010/07/30.
37. 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. Epub 2012/06/12.
38. Asmarinah, Dharma R, Ritchie NK, Rahayu S, Putricahya E, Santoso S. Human platelet-specific antigen frequencies in Indonesian population. *Transfus Med.* 2013;23(4):250-3. Epub 2013/04/27.
39. Edinur HA, Dunn PP, Lea RA, Chambers GK. Human platelet antigens frequencies in Maori and Polynesian populations. *Transfus Med.* 2013. Epub 2013/07/12.
40. 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. Epub 2013/06/06.

6. Artigo Original (Português)

Genotipagem dos antígenos plaquetários humanos em doadores de plaquetas do sul do Brasil

Resumo

Os antígenos plaquetários humanos são estruturas imunogênicas resultantes de alterações pontuais (SNP) que levam a substituição de um aminoácido a nível proteico. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência alélica e genotípica do sistema HPA-1 a -5 e -15 em doadores de plaquetas do estado do RS e comparar as frequências alélicas encontradas com as observadas em outras populações. A genotipagem HPA foi realizada através do método de PCR-SSP. Um total de 201 doadores de plaquetas foram incluídos no estudo sendo 167 caucasoides e 34 não caucasoides. O alelo "a" foi o alelo mais frequentemente encontrado para os sistemas HPA-1 a -5 em ambos grupos. O genótipo HPA-15AB foi predominante sobre os genótipos homocigotos para este sistema. O teste exato de Fisher revelou diferença estatisticamente significativa para o sistema HPA-5. Houve maior prevalência do alelo HPA-5B no grupo não caucasóide. Para o grupo caucasóide, o método de neighbor-joining e a PCA revelaram proximidade genética entre este grupo e as populações europeias. De um modo geral, concluímos que as frequências alélicas para os sistemas HPA-1 a -5 e -15 encontradas em nosso grupo caucasóide são similares as descritas em populações europeias. Estes dados corroboram a formação étnica da população do RS. A maior frequência do alelo HPA-5b encontrada no grupo não caucasóide de nosso estudo indica a possibilidade

de alosensibilização para pacientes que recebem transfusões de plaquetas não compatibilizadas geneticamente.

Introdução

Os antígenos plaquetários humanos (HPAs) são estruturas polimórficas localizadas na membrana plaquetária (1). As bases moleculares do sistema HPA indicam que os antígenos plaquetários são resultantes de mutações pontuais (SNPs – *Single nucleotide polymorphisms*) que ocasionam substituição de aminoácidos a nível proteico. Estas modificações geram uma alteração na estrutura terciária na membrana da glicoproteína resultando em diferentes epítomos que podem causar reconhecimento aloimune (2). Até o presente momento, foram identificados 33 diferentes HPAs expressos em diferentes glicoproteínas plaquetárias. No entanto, identificados por reatividade sorológica e com relevância clínica, foram descritos seis grupos bialélicos de HPAs (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 e HPA-15) (2). Estas variações polimórficas não ocasionam defeitos funcionais nas glicoproteínas; porém são estruturas imunogênicas(3).

A maioria destes polimorfismos foi descoberta por observações de aloanticorpos policlonais formados durante a gestação ou após múltiplas transfusões (4). Pacientes onco-hematológicos são os principais representantes do grupo de pacientes que recebem múltiplas transfusões de plaquetas e estão sujeitos a refratariedade plaquetária. A presença de anticorpos anti-HPA foi relacionada à dependência prolongada de transfusões de plaquetas e complicações hemorrágicas significantes(5). Anticorpos anti-HPA-1a são a principal causa do diagnóstico de trombocitopenia neonatal aloimune confirmados sorologicamente (2).

A frequência dos alelos do sistema HPA é diferente entre os diversos grupos étnicos. Estas características genéticas populacionais são determinantes para a ocorrência de aloimunização plaquetária e suas situações clínicas associadas(6). O objetivo deste estudo é determinar a frequência alélica e genotípica do sistema HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 e HPA-15 em doadores de plaquetas do estado do RS e comparar as frequências alélicas encontradas com as observadas em outras populações.

Materiais e Métodos

População de Estudo

A população de estudo foi composta de 201 doadores de plaquetas provenientes do Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, recrutados entre dezembro de 2013 e junho de 2014. As amostras de sangue periférico foram coletadas após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os sujeitos de pesquisa foram questionados sobre o seu grupo étnico conforme classificação utilizada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). A classificação foi feita por autodeclaração do sujeito de pesquisa. Para fins de análise estatística, os 201 sujeitos de pesquisa (156 homens e 45 mulheres), com idade média de 40,7 anos, foram estratificados em dois grupos: 167 (83,9%) caucasoides e 34 (16,1%) não caucasoides.

Este estudo transversal foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob nº 12-0447.

Métodos

Amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa em tubos contendo EDTA como anticoagulante. O DNA genômico foi extraído pelo método de *salting out*. As amostras de DNA foram genotipadas pelo método de PCR-SSP (*Polimerase Chain Reaction – Single Specific Primer*). Os *primers* e as condições da PCR foram adaptados de protocolos previamente estabelecidos (7) (8) . A combinação do mix de reagentes da PCR utilizada para o volume final de 10uL foi: 2uL de DNA genômico idealmente a 100ng/uL (20-250 ng/uL); 0,2uL de mistura de dNTPs a 2,5uM; 0,3 uL de MgCl₂ 1,5mM; 1,0 uL de buffer 10X; 0,07 uL de taq polimerase (Platinum, Invitrogen), 1,8uL de água ultra pura e 5,0 uL de primer mix específico para cada sistema HPA. As sequências e a concentração final dos *primers* estão descritas na tabela 1.

As reações de PCR foram amplificadas em termociclador (Veriti, Applied Biosystem). Os ciclos da PCR foram os seguintes: desnaturação inicial por um minuto a 96°C, seguido de cinco ciclos a 96°C por 25 segundos, 70°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos; 20 ciclos a 96°C por 25 segundos, 65°C por 45 segundos, 72°C por 30 segundos; 8 ciclos a 96°C por 25 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos e um ciclo final de extensão a 72°C por 3 mim. Os fragmentos resultantes da amplificação foram visualizados em transiluminador de luz UV em gel de agarose 2,5% contendo brometo de etídeo.

O método de PCR SSP foi validado em nosso laboratório pela troca interlaboratorial de amostras de DNA (9). O Laboratório do Hospital Sírio Libanês- São Paulo, Brasil, gentilmente nos forneceu 7 amostras de DNA com genotipagem

HPA já conhecida, gerando 84 ensaios de genotipagem. Além disso, 3 amostras de DNA foram genotipadas em paralelo pelo método PCR SSP comercial Thrombotype (Lifecodes), gerando mais 36 ensaios de validação.

Análise estatística

As frequências alélicas e genotípicas foram estimadas por contagem direta. A análise do χ^2 foi aplicada para testar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para os genótipos HPA utilizando a calculadora Court Lab. As frequências alélicas observadas em nosso estudo foram comparadas às frequências observadas em diferentes populações. Esta comparação foi realizada através do teste exato de Fisher com o uso do software WinPepi versão 2.75. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

As distâncias genéticas entre as populações foram estimadas através do método modificado de Cavalli-Sforza (10). O método de *neighbor-joining tree* foi utilizado para construir o dendograma baseado nas matrizes de distâncias genéticas com o programa POPTREE (11) (12). O dendograma foi construído com 5 loci (HPA-1 a -5) através do uso das frequências das populações obtidas a partir dos artigos científicos e do site <http://www.ebi.ac.uk> (*The European Bioinformatics Institute*). A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada para sumarizar a distribuição da frequência dos alelos HPA-1 a -5 nas diferentes populações através do programa SPSS ver 18. A análise hierárquica da variância molecular (AMOVA) foi realizada utilizando o software ARLEQUIN 3.5 (13).

Resultados e Discussão

Frequências alélicas e genotípicas – Aspectos Imunológicos

As análises de validação da técnica de PCR-SSP resultaram em 100% de concordância de resultados, com coeficiente Kappa = 1. As frequências alélicas e genotípicas observadas em nosso estudo são apresentadas na tabela 2. Os resultados de genótipos para todos os sistemas HPA estudados foram consistentes com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

O alelo *a* foi o mais frequentemente encontrado nos sistemas HPA-1 a -5 na população de nosso estudo (caucasoides e não caucasoides). Para o sistema HPA-15, encontramos os alelos *a* e *b* igualmente distribuídos na população de caucasoides e uma ligeira predominância do alelo HPA-15b (0,539) em relação ao HPA-15a (0,471) no grupo de não caucasoides. O genótipo HPA-15AB (0,471) foi predominante sobre os genótipos homozigotos para este sistema (AA=0,235 e BB=0,294). O alelo HPA-4b não foi encontrado em nossa população de estudo (Tabela 2). Este alelo é extremamente raro em populações caucasoides.

A comparação entre as frequências alélicas e genotípicas entre os nossos grupos caucasóide e não caucasóide, através do teste exato de Fisher, não revelou diferenças estatisticamente significativas para os sistemas HPA-1 a -4 e HPA-15. Houve diferença estatisticamente significativa para o sistema HPA-5. Houve uma maior prevalência do alelo HPA-5b no grupo não caucasóide (0,191 *versus* 0,097 $p < 0,05$) (Tabela 2).

O alelo 5b é mais prevalente nas populações africanas, como em populações do Congo (14). O nosso grupo de não caucasoides foi composto majoritariamente por sujeitos autodeclarados negros e pardos (91,2%). É interessante observar que a população negra brasileira tem majoritariamente origem nos países do Congo, Angola e Moçambique (15). O aspecto mais relevante do ponto de vista clínico para este achado é a possibilidade de alo-sensibilização plaquetária que o alelo HPA-5b representa.

A refratariedade plaquetária está associada com a presença de anticorpos formados contra antígenos presentes na superfície plaquetária. Embora a aloimunização contra antígenos do sistema HLA (*human leucocyte antigen*) seja mais comum do que a aloimunização por anticorpos anti-HPA (16), os antígenos HPA já demonstraram imunogenicidade e relevância clínica. Kiefel *et al* (17) observaram que anticorpos anti-HPA-5b foram os mais frequentes anticorpos produzidos por pacientes onco-hematológicos politransfundidos sensibilizados para o sistema HPA. O tratamento da refratariedade plaquetária é difícil, oneroso e geralmente ineficiente (18). A maior prevalência do alelo HPA-5b no grupo não caucasóide pode representar possibilidade de alo-sensibilização plaquetária para receptores de plaquetas que não possuem em seu genótipo HPA o alelo 5b.

Frequências Alélicas - Aspectos Genéticos

A tabela 3 apresenta as frequências alélicas observadas no grupo caucasóide (n=167) do nosso estudo juntamente com as frequências reportadas em outras populações. O grupo caucasóide foi escolhido para fins de comparação de

frequências alélicas populacionais por ser o grupo mais representativo da população do RS e a maior parte da nossa amostra (83%).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para as frequências alélicas entre a nossa população de estudo e as populações da Argentina (6) (HPA-1 a -5 e -15), Itália (19) (HPA-1 a -5), Alemanha (19) (HPA-1 a -3 e -5), Croácia (20) (HPA-1 a -3 e -5), Reino Unido (21) (HPA-1 a -5), Eslovênia (22) (HPA-1 a -5), França (23) (HPA-1 a -5), Dinamarca (24) (HPA-1 a -5), Áustria (25) (HPA-1 a -3 e -5), Polônia (26) (HPA-1 a -5) e Espanha (27) (HPA-2 a -5 e -15) (Tabela 3). Para o HPA1, encontramos diferença estatisticamente significativa entre nossa população de estudo e a população espanhola (HPA1a= 0,867 e 1b= 0,133 *versus* HPA1a=0,810 e 1b=0,190, respectivamente, $p<0,05$). A população espanhola demonstrou ter o HPA-1b em maior frequência que as demais populações europeias. A população do RS é composta majoritariamente por descendentes de alemães (28), italianos (29), espanhóis (30) e portugueses (31) .

Em comparação com estudos realizados com a população brasileira, não observamos diferenças estatisticamente significativas entre o nosso estudo e o grupo caucasoide estudado por Castro *et al* (32) (HPA-1 a -5), grupo doadores de plaquetas estudados por Conti *et al* (33) (HPA-1 a -5 e -15) e grupo doadores de sangue estudados por Chiba *et al* (34) (HPA-1 a -4) (Tabela 3). Observamos diferença estatisticamente significativa para o HPA-5 entre nosso estudo e o grupo de doadores de sangue estudado por Chiba *et al* (34) (HPA5a=0,903 e 5b=0,097 *versus* HPA5a=0,823 e 5b=0,177, respectivamente, $p<0,05$). Este achado pode ser explicado pela grande diversidade étnica dos indivíduos estudados por Chiba *et al*. Na colonização do estado do RS, colônias de povoamento surgiram a partir do empenho dos colonos europeus em adquirir terras visando assegurar proximidade

geográfica com seus filhos e netos. A concentração de colonos de mesma origem étnica resultou na formação de grupos relativamente homogêneos no RS (28).

Quando comparamos as frequências de HPA encontradas em nosso estudo com as populações orientais (35) (36) (37) (38), populações da Oceania (39), populações de índios da Amazônia (32) e ameríndios Toba (6) as diferenças são mais significativas. Estas diferenças podem ser explicadas pela pequena/nula participação destas populações entre os habitantes do RS.

O método de *neighbor-joining* para os loci HPA-1 a -5 está representado no dendograma da figura 1. Nesta árvore é possível observar 3 grupos distintos de ancestralidade, onde o grupo de nativos Maori não possui relação de ancestralidade com as demais populações. Um segundo grupo é formado basicamente por populações europeias e africanas, que estão geneticamente mais próximas entre si. Um terceiro grupo é formado por populações asiáticas e populações nativas de ameríndios, que possuem proximidade genética uma da outra. A nossa população de estudo está geneticamente mais próxima das populações europeias (Itália e Espanha) e mais distante das populações nativas e asiáticas (primeiro e segundo grupos). Esta representação está de acordo com a formação étnica de nossa população, corroborando com o padrão de migração observado no RS. O mesmo padrão de distribuição foi observado na PCA (figura 2).

A PCA revelou a divisão das populações estudadas em dois grandes grupos: um grupo com populações asiáticas e Oceania e outro grupo de populações europeias e africanas. A nossa população de estudo está inserida neste segundo grupo, demonstrando relação genética estreita com populações europeias.

Para avaliar a habilidade dos alelos HPA para descrever a divergência populacional intercontinental, nós realizamos uma análise AMOVA, que permite

quantificar a separação entre as populações. Esta análise foi feita através da divisão das populações em um grupo que incluiu as populações asiáticas, oceania e indígenas (compostas por ameríndios Toba (6) , indíos Parakanã (32), indíos brasileiros, nativos Maori (39), Coréia (20), Malásia (37), Indonésia (38), China (36) e Polinésia (39) e outro grupo incluindo as populações europeias e africanas (compostas por Polônia (26), Dinamarca (24), Itália (19), Espanha (27), Reino Unido (21), Eslovênia (22), Argentina (6), Congo (14) e Egito (40). A Argentina foi incluída neste grupo por ter forte influência europeia na composição da sua população. Estes grupos foram formados baseados nos resultados da PCA. A proporção de variação genética entre os grupos calculada com estes dados foi de 10,07% ou seja, aproximadamente 10% da variância entre os dados é explicada pelos dois grupos ($F_{CT} = 0,10071$, $p < 0,0001$). A distância F_{ST} , que mede a variação da frequência alélica entre populações humanas foi de $F_{ST} = 0,10466$, com $p < 0,0001$, indicando que a maior variabilidade é intrapopulacional (89,53%). Este resultado possivelmente é atribuído aos loci HPA-1, -2 e -5, nos quais a presença dos alelos 1b, 2b e 5b para estes loci é extremamente baixa nas populações da Ásia e Oceania.

Conclusão

De um modo geral, nós concluímos que as frequências alélicas para os sistemas HPA-1 a -5 e -15 encontradas em nosso estudo são similares as descritas em populações europeias. Estes dados corroboram a formação étnica da população do RS. A nossa população de estudo também demonstrou maior proximidade genética com a população europeia. A maior frequência do alelo HPA-5b encontrada

no grupo não caucasóide de nosso estudo indica o risco de alo-sensibilização a este antígeno imunogênico em pacientes que recebem transfusões de plaquetas de doadores de genótipos distintos. O uso de concentrados de plaquetas geneticamente compatíveis deve ser considerado na prática clínica, uma vez que os antígenos HPA são imunogênicos. Nossos resultados podem contribuir para o estabelecimento de melhorias na terapia transfusional.

Tabela 1 : Sequências dos primers, tamanho dos fragmentos e concentração final

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>	<i>Tamanho do Fragmento</i>	<i>Concentração Final</i>
HPA-1a	5' TCACAGCGAGGTGAGGCCA3'	90 pb	1,4 μ M
HPA-1b	5' TCACAGCGAGGTGAGGCCG 3'		
Common HPA-1	5' GGAGGTAGAGAGTCGCCATAG 3'		
HPA-2a	5' GCCCCCAGGGCTCCTGAC 3'	258 pb	1,4 μ M
HPA-2b	5' GCCCCCAGGGCTCCTGAT 3'		
Common HPA-2	5' TCAGCATTGTCCTGCAGCCA 3'		
HPA-3a	5' TGGACTGGGGGCTGCCCAT 3'	267 pb	2,0 μ M
HPA-3b	5' TGGACTGGGGGCTGCCCAG 3'		
Common HPA-3	5' TCCATGTTCACCTGAAGTGCT 3'		
HPA-4a	5' GCTGGCCACCCAGATGCG 3'	120 pb	1,4 μ M
HPA-4b	5' GCTGGCCACCCAGATGCA 3'		
Common HPA-4	5' CAGGGGTTTTTCGAGGGCCT 3'		
HPA-5a	5' AGAGTCTACCTGTTTACTATCAAAG 3'	250pb	2,0 μ M
HPA-5b	5' AGAGTCTACCTGTTTACTATCAAAA 3'		
Common HPA-5	5' CTCTCATGGAAAATGGCAGTACA 3'		
HPA-15a Govb	5' TTCAAATTCTTGGTAAATCCTGG 3'	225pb	2,0 μ M
HPA-15b Gova	5' TTCAAATTCTTGGTAAATCCTGT 3'		
Common HPA-15a Govb	5' ATGACCTTATGATGACCTATTC 3'		
HGH control 1	5' GCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3'	429 pb	0,6 μ M
HGH control 2	5' TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC 3'		

Tabela 2: Frequências alélicas, genóticas e equilíbrio de *Hardy-Weinberg* da amostra investigada

Frequências		HPA1	HPA2	HPA3	HPA4	HPA5	HPA15
Caucasoides (n = 167)	AA	127 (0,765)	131 (0,789)	71 (0,428)	166 (1,0)	136 (0,824)	45 (0,269)
	AB	34 (0,205)	35 (0,211)	64 (0,386)	0 (0,0)	26 (0,158)	77 (0,461)
	BB	5 (0,030)	0 (0,0)	31 (0,187)	0 (0,0)	3 (0,018)	45 (0,269)
	Alelo A	288 (0,867)	297 (0,895)	206 (0,621)	332 (1,0)	298 (0,903)	167 (0,500)
	Alelo B	44 (0,133)	35 (0,105)	126 (0,379)	0 (0,0)	32 (0,097)	167 (0,500)
Não caucasoides (n = 34)	AA	21 (0,618)	25 (0,735)	14 (0,412)	34 (1,0)	22 (0,647)	8 (0,235)
	AB	12 (0,353)	9 (0,265)	17 (0,500)	0 (0,0)	11 (0,324)	16 (0,471)
	BB	1 (0,029)	0 (0,0)	3 (0,088)	0 (0,0)	1 (0,029)	10 (0,294)
	Alelo A	54 (0,794)	59 (0,868)	45 (0,662)	68 (1,0)	55 (0,809)	32 (0,471)
	Alelo B	14 (0,206)	9 (0,132)	23 (0,338)	0 (0,0)	13 (0,191)	36 (0,539)
Valor-P*	Genotípico	0,166	0,500	0,289	NC	0,044	0,942
	Alélico	0,131	0,525	0,584	NC	0,034	0,691
	**EHW	0,306	0,080	0,076	NC	0,303	0,291

* caucasoides *versus* não caucasoides**EHW = Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

NC= não calculado

Tabela 3: Teste exato de Fischer para comparação de frequências alélicas entre diferentes populações

País	Referência	População	N	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	15a	15b
Brasil, caucasoídes	Nosso estudo	Doadores de sangue	167	0,867	0,133	0,895	0,105	0,621	0,379	1,0	0,0	0,903	0,097	0,500	0,500
América do Sul															
Argentina	De La Vega <i>et al.</i> , 2008	Doadores de sangue	192	0,878	0,122	0,875	0,125	0,612	0,388	1,0	0,0	0,927	0,073	0,510	0,490
Argentina	De La Vega <i>et al.</i> , 2008	Ameríndios Toba	27	1,0	0,0	0,944	0,056	0,389	0,611	1,0	0,0	1,0	0,0	0,685	0,315
Brasil	Castro <i>et al.</i> , 1999	Doadores de Sangue - Brancos	100	0,925	0,075	0,850	0,150	0,600	0,400	1,0	0,0	0,920	0,080	NA	NA
Brasil	Castro <i>et al.</i> , 1999	Índios Parakana	70	1,0	0,0	0,821	0,179	0,757	0,243	1,0	0,0	1,0	0,0	NA	NA
Brasil	Chiba <i>et al.</i> , 2000	Doadores de sangue - não estratificado	79	0,918	0,082	0,861	0,139	0,639	0,361	1,0	0,0	0,823	0,177	NA	NA
Brasil	Chiba <i>et al.</i> , 2000	Índios da Amazônia	95	1,0	0,0	0,963	0,037	0,710	0,290	1,0	0,0	0,963	0,037	NA	NA
Brasil	Conti <i>et al.</i> , 2014	Doadores de plaquetas	154	0,854	0,146	0,877	0,123	0,649	0,351	0,997	0,003	0,903	0,097	0,532	0,468
África															
Congo	Halle <i>et al.</i> , 2004	Doadores de sangue	125	0,904	0,096	0,776	0,224	0,596	0,404	1,0	0,0	0,732	0,268	0,700	0,300
Egito	Salem <i>et al.</i> , 2014	Egípcios	230	0,767	0,233	0,759	0,241	0,704	0,296	1,0	0,0	0,728	0,272	NA	NA
Europa															
Espanha	Muniz <i>et al.</i> , 1993	Doadores de sangue	500	0,810	0,190	0,900	0,100	0,650	0,350	1,0	0,0	0,880	0,120	0,479	0,521
Áustria	Holensteiner <i>et al.</i> , 1995	Cordão umbilical	900	0,852	0,148	0,918	0,082	0,612	0,388	NA	NA	0,892	0,108	NA	NA
Dinamarca	Steffensen <i>et al.</i> , 1996	Doadores de sangue	**	0,831	0,169	0,917	0,083	0,626	0,374	1,0	0,0	0,922	0,078	NA	NA
França	Merieux <i>et al.</i> , 1997	Doadores de plaquetas	***	0,848	0,152	0,920	0,080	0,620	0,380	NA	NA	0,874	0,126	NA	NA
Polônia	Drzewek <i>et al.</i> , 1998	Doadores de sangue	#	0,874	0,126	0,898	0,102	0,592	0,408	1,0	0,0	0,937	0,063	NA	NA
Eslovênia	Rozman <i>et al.</i> , 1999	Doadores de sangue	152	0,809	0,191	0,891	0,109	0,592	0,408	0,997	0,003	0,934	0,066	NA	NA
Itália	EBI Institute, 2014	Brancos	144	0,850	0,1493	0,888	0,111	0,611	0,389	1,0	0,0	0,899	0,100	NA	NA
Reino Unido	Jones <i>et al.</i> , 2003	Doadores cadavéricos	134	0,840	0,160	0,925	0,075	0,627	0,373	1,0	0,0	0,914	0,086	NA	NA
Croácia	Pavic <i>et al.</i> , 2010	Pessoas saudáveis	219	0,854	0,146	0,890	0,110	0,575	0,425	NA	NA	0,895	0,105	NA	NA
Alemanha	EBI Institute, 2014	Brancos	573	0,839	0,160	0,910	0,090	0,586	0,413	NA	NA	0,917	0,083	NA	NA
Ásia															
Coréia	Seo <i>et al.</i> , 1998	Doadores de sangue	200	0,989	0,011	0,923	0,077	0,555	0,445	0,995	0,005	0,978	0,022	NA	NA
China	Nie <i>et al.</i> , 2010	Doadores de plaquetas	200	0,995	0,005	0,963	0,037	0,543	0,457	0,995	0,005	0,990	0,010	0,403	0,597
Malásia	Tan <i>et al.</i> , 2012	Doadores de sangue	200	0,975	0,025	0,963	0,037	0,503	0,497	0,995	0,005	0,950	0,050	0,515	0,485
Indonésia	Asmarinah <i>et al.</i> , 2013	Doadores de sangue	500	0,970	0,030	0,940	0,060	0,520	0,480	0,950	0,050	0,970	0,030	0,510	0,490
Oceania															
Nativos Maori	Edinur <i>et al.</i> , 2013	Nativos Maori	75	0,960	0,040	0,933	0,067	0,580	0,420	1,0	0,0	0,987	0,013	0,340	0,660
Polinésia	Edinur <i>et al.</i> , 2013	Polinésios	25	0,980	0,020	0,920	0,080	0,720	0,280	1,0	0,0	0,940	0,060	0,300	0,700

Os valores em cinza indicam diferença estatisticamente significativas avaliados pelo teste exato de Fischer. $p < 0,05$.

NA = não avaliado.

HPA1 n = 557; HPA2 e 3 n = 163; HPA4 n = 131; e HPA5 n = 427. * HPA1 e 5 n = 800; e HPA2 e 3 n = 350. # HPA1 n = 135; HPA2 n = 211; HPA3 n = 130; HPA4 n = 103 e HPA5 n = 166.

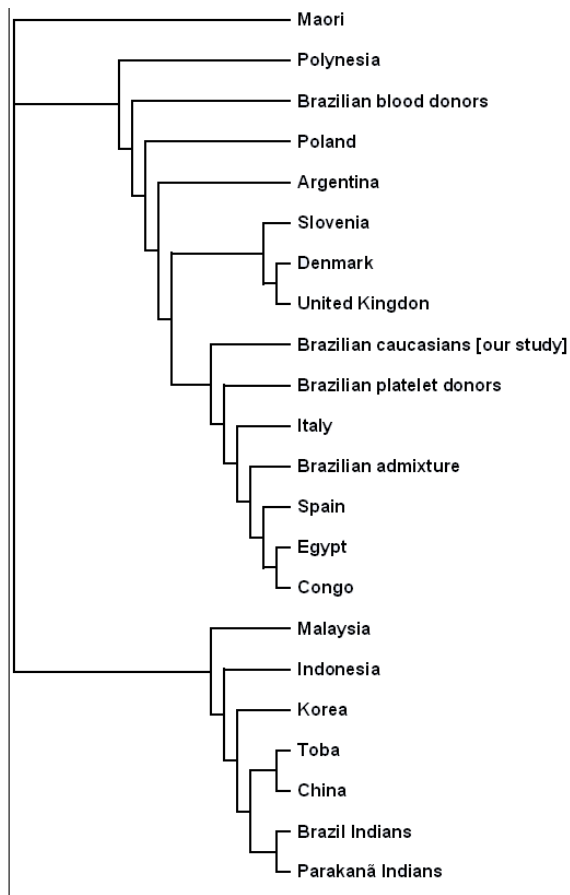


Figura 1: Dendrograma para distâncias genéticas para os loci HPA-1 a -5 entre diferentes populações. Detalhe das amostras do Brasil: Brazilian blood donors: Castro *et al*; Brazilian caucasians: nosso estudo; Brazilian platelet donors: Conti *et al*; Brazilian admixture: Chiba *et al*.

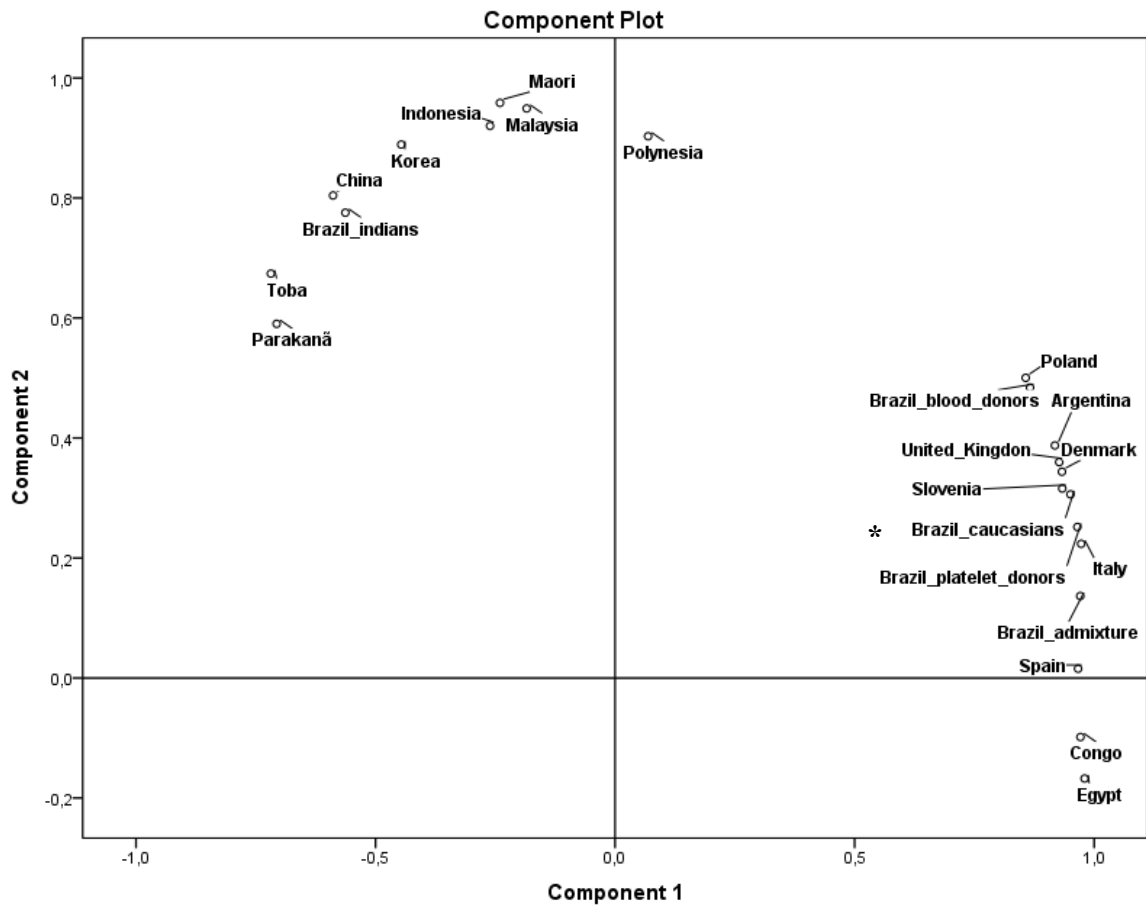


Figura 2: Análise dos componentes principais baseado na frequência dos loci HPA-1 a -5 demonstrando a relação entre as diferentes populações. Estes dois componentes explicam 95,92% da variabilidade encontrada entre as populações. A contribuição do primeiro e do segundo componente são respectivamente 61,52% e 34,40%. Detalhe das amostras do Brasil: * Brazil_caucasians = nosso estudo; Brazil_blood_donors: Castro *et al*; Brazil_platelet_donors: Conti *et al* ; Brazil_admixture: Chiba *et al*.

Referências Bibliográficas

1. 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. Epub 2012/06/12.
2. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox sanguinis*. 2014;106(2):93-102. Epub 2013/10/10.
3. Li RS, Qiao ZL, Ling B, Lu P. Establishment of reference panel for human platelet antigen genotyping. *Vox sanguinis*. 2014. Epub 2014/04/05.
4. Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transplant immunology*. 2002;10(2-3):165-81. Epub 2002/09/10.
5. 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. Epub 2009/10/31.
6. 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. *Transfus Med*. 2008;18(2):83-90. Epub 2008/04/11.
7. Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE, Metcalfe P. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfus Med*. 1997;7(1):41-5. Epub 1997/03/01.
8. NIBSC. The National Institute for Biological Standards and Control. Europe2014 [cited 2014 01/11/2014]; Available from: <http://www.nibsc.org>.
9. Merzoni J. Padronização da genotipagem do sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) por PCR-SSP in house. In: HCPA, editor. Anais da 33 Semana Científica do HCPA. Porto Alegre-RS: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 2013. p. 212.
10. Nei M, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of molecular evolution*. 1983;19(2):153-70. Epub 1983/01/01.
11. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 1987;4(4):406-25. Epub 1987/07/01.
12. Takezaki N, Nei M, Tamura K. POPTREEW: web version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities. *Molecular biology and evolution*. 2014;31(6):1622-4. Epub 2014/03/08.
13. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*. 2010;10(3):564-7. Epub 2011/05/14.
14. 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. Epub 2005/02/26.
15. Reis JJ. Presença Negra: Conflitos e Encontros. In: Estatística IBdGe, editor. Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro: IBGE; 2007. p. 232.
16. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *British journal of haematology*. 2008;142(3):348-60. Epub 2008/05/31.
17. Kiefel V, König C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion*. 2001;41(6):766-70. Epub 2001/06/16.
18. Thiagarajan P, Afshar-Kharghan V. Platelet transfusion therapy. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2013;27(3):629-43. Epub 2013/05/30.

19. The-European-Bioinformatics-Institute. Immuno Polymorphism Database. Europe2014 [cited 2014 01/10/2014]; Available from: <http://www.ebi.ac.uk/>.
20. Pavic M, Zadro R, Herak DC, Antolic MR, Dodig S. Gene frequencies of platelet-specific antigens in Croatian population. *Transfus Med.* 2010;20(2):73-7. Epub 2009/09/26.
21. 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. Epub 2003/12/17.
22. 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. Epub 1999/08/24.
23. 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. Epub 1998/04/16.
24. Steffensen R, Kaczan E, Varming K, Jersild C. Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. *Tissue antigens.* 1996;48(2):93-6. Epub 1996/08/01.
25. 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. Epub 1995/05/01.
26. Drzewek K, Brojer E, Zupanska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transfus Med.* 1998;8(4):339-42. Epub 1999/01/09.
27. 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. Epub 1993/08/01. Frecuencia de los aloantigenos de las plaquetas en poblacion espanola.
28. Gregory V. Imigração Alemã: Formação de uma comunidade teuto-brasileira. In: IBGE, editor. *Brasil: 500 anos de povoamento.* Rio de Janeiro2007. p. 232.
29. Gomes AdC. Imigrantes Italianos: entre a italianità e a brasilidade. In: IBGE, editor. *Brasil: 500 anos de povoamento.* Rio de Janeiro2007. p. 232.
30. Guimarães LMP. Sonhos Galegos: os espanhóis no Brasil. In: IBGE, editor. *Brasil: 500 anos de povoamento.* Rio de Janeiro2007.
31. Venâncio RP. Presença Portuguesa: de colonizadores a imigrantes. In: IBGE, editor. *Brasil: 500 anos de povoamento.* Rio de Janeiro2007. p. 232.
32. 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. Epub 1999/12/20.
33. 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. Epub 2013/06/15.
34. 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. *Transfus Med.* 2000;10(3):207-12. Epub 2000/09/06.
35. Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata K, Ueno I, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med.* 1998;8(2):129-32. Epub 1998/07/24.

36. 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. *Transfus Med.* 2010;20(6):376-82. Epub 2010/07/30.
37. 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. Epub 2012/06/12.
38. Asmarinah, Dharma R, Ritchie NK, Rahayu S, Putricahya E, Santoso S. Human platelet-specific antigen frequencies in Indonesian population. *Transfus Med.* 2013;23(4):250-3. Epub 2013/04/27.
39. Edinur HA, Dunn PP, Lea RA, Chambers GK. Human platelet antigens frequencies in Maori and Polynesian populations. *Transfus Med.* 2013. Epub 2013/07/12.
40. 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. Epub 2013/06/06.

7. APÊNDICE A

Relatório de Validação do Método Genotipagem HPA pela PCR-SSP *in house*

Local de execução

Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Resultados esperados

Validação da técnica *in house* de genotipagem HPA pela metodologia PCR-SSP

Executor

Joice Merzoni

Técnica

1. Descrição da Técnica

A metodologia de PCR-SSP baseia-se no princípio de que *primers* de oligonucleotídeos com correspondência completa são utilizados de forma mais eficaz para a amplificação de uma sequência alvo por taq polimerase do que um primer de oligonucleotídeos sem correspondência. Os primers são desenhados para apresentar correspondência com um único alelo. Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. A interpretação dos resultados de PCR-SSP baseia-se na ausência ou presença de um fragmento de DNA específico amplificado. Existe um par de primers de controle interno incluído em todas as reações de PCR. Uma reação positiva para um alelo HPA específico é visualizada no gel de agarose como um fragmento de DNA amplificado entre a banda do produto do controle interno e a banda do primer não incorporado. Esta é uma metodologia *in house* com o uso de diversos oligonucleotídeos combinados em uma placa, cujos volumes de reação, concentrações de reagentes e primers foram padronizados baseando-se no artigo científico Cavagnah (2001).

2. Interferentes da técnica:

Presença de hemoglobina e DNA extraído a partir de sangue coletado com heparina

3. Reagentes utilizados na técnica:

Nome do Reagente: Oligonucleotídeos liofinizados

Marca: Invitrogen

Preparação: Reconstituir com água ultra pura

Conservação: -20°C

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: Taq polimerase platinum

Marca: Invitrogen

Preparação: Pronto para uso

Conservação: -20°C

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: Cloreto de magnésio

Marca: Invitrogen

Preparação: Pronto para uso

Conservação: -20°C

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: Buffer 10x

Marca: Invitrogen

Preparação: Pronto para uso

Conservação: -20°C

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: DNTPs

Marca: 4G

Preparação: Reconstituir com água ultra pura

Conservação: -20°C

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: Água ultra pura

Marca: IDT

Preparação: Pronto para uso

Conservação: -20°C

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: Agarose

Marca: Promega

Preparação: Pronto para uso

Conservação: temperatura ambiente e protegido da umidade

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: Brometo de etídio

Marca: Sigma Aldrich

Preparação: Pronto para uso

Conservação: temperatura ambiente

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: Carvão ativado

Marca: Merck

Preparação: Pronto para uso

Conservação: temperatura ambiente e protegido da umidade

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: Tris

Marca: Bioamérica

Preparação: Pronto para uso

Conservação: temperatura ambiente e protegido da umidade

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: Ácido Acético

Marca: Synth

Preparação: Pronto para uso

Conservação: temperatura ambiente

Estabilidade: vide orientações do rótulo

Nome do Reagente: EDTA

Marca: Synth

Preparação: Pronto para uso

Conservação: temperatura ambiente

Estabilidade: vide orientações do rótulo

4. Biossegurança para manipulação

4.1 Utilização de EPI's : jaleco, máscara, óculos e luvas descartáveis

4.2 Utilização de EPC's: Capela de fluxo laminar

4.3 Descarte de amostras biológicas: De acordo com o POP-VPA-1036 – POP de Descarte de Resíduos Gerados em Laboratório.

4.4 Manuseio de brometo de etídio e carvão ativado: Utilizar luvas, jaleco, máscara e óculos de proteção. O descarte do material contendo este corante (gel e tampão) deve ser feito no lixo especial para substâncias químicas – lixo químico. Para o tampão TAE, utilizado na eletroforese, adicionar 300 mg de carvão ativado para cada 100mL de tampão e aguardar pelo menos 1 hora. Decorrido este tempo, filtrar o líquido em filtro de pregas. O papel filtro contendo os resíduos de brometo de etídio adsorvido pelo carvão ativado deve ser descartado no lixo de resíduos químicos. O

líquido filtrado pode ser descartado na pia (Bensaude, 1988). O gel deve ser descartado diretamente no lixo para resíduos químicos.

5. Otimização

5.1 Concentração de Primers: A otimização da concentração dos primers será realizada através do uso de três diferentes concentrações de primers. Utilizamos como referência as concentrações utilizadas por Cavagnah (2001).

5.2 Concentração de DNA: A otimização será realizada pelo teste de, pelo menos, cinco concentrações diferentes de DNA.

5.3 Gel de Agarose: A otimização será realizada pelo teste de três concentrações diferentes de agarose: 1,0 % 2,0% e 2,5% .

5.4 Taq polimerase: A otimização será realizada pelo teste de duas concentrações diferentes de enzima: 5 uni/ μ L e 10 uni/ μ L.

5.5 Cloreto de Magnésio: A otimização será realizada pelo teste de duas concentrações diferentes de cloreto de magnésio: 1,0 mM e 1,5 Mm

5.6 DNTPs: A otimização será realizada realizada pelo teste de duas concentrações diferentes de DNTPs: 2,5 mM e 5,0 mM

5.7 Tempo de Corrida: A otimização será realizada pelo uso de três tempos de corrida diferentes: 20, 30 e 40 minutos.

6. Parâmetros de Desempenho

6.1 Limite de Detecção: Serão utilizadas diluições em uma amostra até não ser possível a identificação de fragmentos amplificados (bandas de DNA).

6.2 Faixa de Trabalho: O limite mínimo e máximo de contração de amostra será testado através de diluições de uma amostra de DNA.

6.3 Sensibilidade: Será considerada a concentração mínima de amostra capaz de gerar um resultado confiável.

6.4 Exatidão: Será considerada a capacidade do sistema de detecção amplificar apenas o fragmento de interesse. Amostras de DNAs provenientes de um laboratório de referência serão utilizados para prever o índice de acerto da técnica.

6.5 Seletividade: A capacidade de seleção da amostra e visualização do resultado em uma condição adversa será testada através de um pool de amostras de tipagens conhecidas.

6.6 Robustez: Uso do controle interno de amplificação. Todas as amostras testadas devem apresentar a amplificação do controle interno de amplificação.

Atividades

1. Procedimentos Técnicos e Resultados

1. 1 Otimização

1.1.1 Concentração de *Primers*: A concentração de primers foi otimizada. Utilizamos como referência as concentrações utilizadas por Cavagnah (2001). Foram realizados cinco testes com diferentes concentrações de *primers*. O volume final dos primers utilizado, sua especificidade, alelos contemplados e tamanho do fragmento (em pares de base –pb) estão descritos no item 2.1.3.

1.1.2 Concentração de DNA: A otimização foi realizada pelo teste de oito concentrações diferentes de DNA.

1.1.3 Gel de Agarose: A otimização foi realizada pelo teste de três concentrações diferentes de agarose: 1,0 % 2,0% e 2,5% .

1.1.4 Taq polimerase: A otimização foi realizada pelo teste de duas concentrações diferentes de enzima: 5 uni/ μ L e 10 uni/ μ L.

1.1.5 Cloreto de Magnésio: A otimização foi realizada pelo teste de duas concentrações diferentes de cloreto de magnésio: 1,0 mM e 1,5 Mm

1.1.6 DNTPs: A otimização foi realizada pelo teste de duas concentrações diferentes de DNTPs: 2,5 mM e 5,0 mM

1.1.7 Tempo de Corrida: A otimização foi realizada pelo uso de 3 tempos de corrida diferentes: 20, 30 e 40 minutos.

1.2 Parâmetros de Desempenho

1.2.1 Limite de Detecção: Foi utilizado no teste uma amostra de DNA testado na concentração em que foi extraído (equivalendo à 1), concentrações intermediárias (1:2 ; 1:3 ; 1:5 ; 1:8 ; 1:15 ; 1:35) e concentração de limite inferior (1:80).

1.2.2 Faixa de Trabalho: Foi utilizado no teste uma amostra de DNA testado na concentração em que foi extraído (equivalendo à 1), concentrações intermediárias (1:2 ; 1:3 ; 1:5 ; 1:8 ; 1:15 ; 1:35) e concentração de limite inferior (1:80).

1.2.3 Sensibilidade: Foi utilizado no teste uma amostra de DNA testado na concentração em que foi extraído (equivalendo à 1), concentrações intermediárias (1:2 ; 1:3 ; 1:5 ; 1:8 ; 1:15 ; 1:35) e concentração de limite inferior (1:80).

1.2.4 Exatidão: Foram utilizadas 7 amostras de DNA cedidas gentilmente pelo Laboratório do Hospital Sírio Libanês. Todos os primers foram testados para verificar se os resultados obtidos conferem com o os obtidos pelo laboratório de referência.

1.2.5 Seletividade: *Pool* de amostras positivas e negativas foram testadas em uma mistura de amostras de DNA para testar a capacidade do sistema em preservar a amplificação correta de fragmentos de DNA.

1.2.6 Robustez: Este parâmetro foi testado através do uso do controle interno de amplificação nas 6 amostras testadas.

2. Análise e interpretação dos resultados obtidos

2.1 Otimização

2.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para a otimização da metodologia foram os seguintes:

Reagente	Marca/Lote	Validade
Primers	Invitrogen	Indeterminada
Taq Platinum	Invitrogen/BKEB1b	09/2016
dNTPs	4G/1102-1311	11/2015
Buffer 10x	Invitrogen/BH3B1d	09/2016
Cloreto de Magnésio	Invitrogen/BH4B1c	09/2016
Água ultra pura	IDT / 172083	Indeterminada
Agarose	Promega / 070561	07/2018
Brometo de etideo	Sigma Aldrich / 129K8708	03/01/216

Carvão ativado	Synth / 166789	18/04/2018
Tris	Bioamérica / 9M007813	08/2015
Ácido acético	Synth / 154957	18/05/2015
EDTA	Synth / 154715	09/05/2016

2.1.2 Equipamentos

Os seguintes equipamentos e instrumentos foram utilizados na validação da metodologia:

Equipamento/Instrumento	Marca	Patrimônio/Número de Série
Termociclador	Applied Biosystems	104
Pipeta P10	Gilson	P087
Pipeta P20	Gilson	P034
Pipeta P100	Gilson	P018
Pipeta P200	Gilson	P052
Pipeta P1000	Gilson	P073
R pipete	Thermo Scientific	P021
Cuba de eletroforese	FlowGen	77
Fonte de eletroforese	Auje	89
Sistema de fotodocumentação	Loccus	139

2.1.3 Concentração de Primers

2.1.3.1 Amostra testada: A55

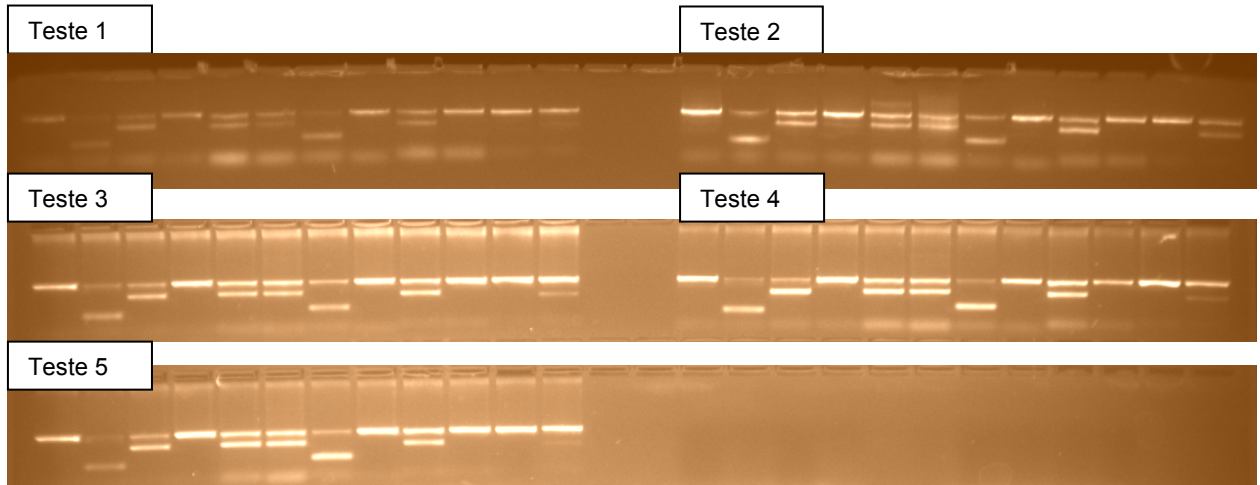
2.1.3.2 Tipagem HPA: HPA-1BB, 2AA, 3AB, 4AA, 5AA, 15AB

2.1.3.3 Realizado por: Joice Merzoni

2.1.3.4 Concentrações utilizadas:

Primers	Concentração teste 1	Concentração teste 2	Concentração teste 3	Concentração teste 4	Concentração teste 5
HPA-1a	0,35µM	0,5µM	1,0µM	1,4 µM	2,0µM
HPA-1b					
common HPA-1					
HPA-2a	0,35µM	0,5µM	1,0µM	1,4 µM	2,0µM
HPA-2b					
common HPA-2					
HPA-3a	0,5µM	0,7µM	1,2µM	2,0 µM	2,5µM
HPA-3b					
common HPA-3					
HPA-4a	0,35µM	0,5µM	1,0µM	1,4 µM	1,8µM
HPA-4b					
common HPA-4					
HPA-5a	0,50µM	0,7µM	1,2µM	2,0 µM	2,5µM
HPA-5b					
common HPA-5					
HPA-15a Govb	0,50µM	0,7µM	1,2µM	2,0 µM	2,5µM
HPA-15b Gova					
common HPA-15a Govb					
HGH control 1	0,2µM	0,3µM	0,4µM	0,6µM	0,8µM
HGH control 2					

2.1.3.5 Resultados:



2.1.3.6 Conclusão: A concentração ideal de primers para uso foram as utilizadas no teste 4, conforme tabela abaixo:

Primers	Sequencias	Tamanho do Fragmento	Concentração Ideal – Teste 4
HPA-1a	5' TCACAGCGAGGTGAGGCCA3'	90 pb	1,4 µM
HPA-1b	5' TCACAGCGAGGTGAGGCCG 3'		
common HPA-1	5' GGAGGTAGAGAGTCGCCATAG 3'		
HPA-2a	5' GCCCCAGGGCTCCTGAC 3'	258 pb	1,4 µM
HPA-2b	5' GCCCCAGGGCTCCTGAT 3'		
common HPA-2	5' TCAGCATTGTCCTGCAGCCA 3'		
HPA-3a	5' TGGACTGGGGGCTGCCAT 3'	267 pb	2,0 µM
HPA-3b	5' TGGACTGGGGGCTGCCAG 3'		
common HPA-3	5' TCCATGTTCACTTGAAGTGCT 3'		
HPA-4a	5' GCTGGCCACCCAGATGCG 3'	120 pb	1,4 µM
HPA-4b	5' GCTGGCCACCCAGATGCA 3'		
common HPA-4	5' CAGGGGTTTTCGAGGCCT 3'		
HPA-5a	5' AGAGTCTACCTGTTTACTATCAAAG 3'	250pb	2,0 µM
HPA-5b	5' AGAGTCTACCTGTTTACTATCAAAA 3'		
common HPA-5	5' CTCTCATGAAAAATGGCAGTACA 3'		
HPA-15a Govb	5' TTCAAATTCTTGGTAAATCCTGG 3'	225pb	2,0 µM
HPA-15b Gova	5' TTCAAATTCTTGGTAAATCCTGT 3'		
common HPA-15a Govb	5' ATGACCTTATGATGACCTATTC 3'		
HGH control 1	5' GCCTTCCAACCATTCCTTA 3'	429 pb	0,6µM
HGH control 2	5' TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC 3'		

2.1.4 Concentração de DNA

2.1.4.1 Amostra testada: A64

2.1.4.2 Tipagem HPA: HPA-1AA, 2AA, 3AB, 4AA, 5AA, 15AB

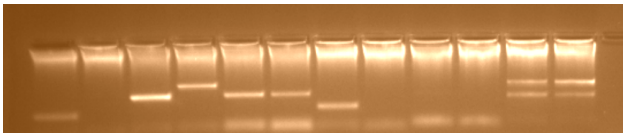
2.1.4.3 Realizado por: Joice Merzoni

2.1.4.4 Concentrações utilizadas: vide tabela abaixo

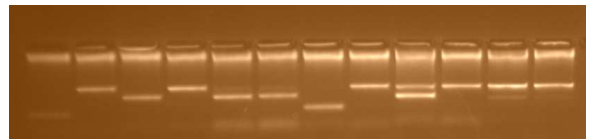
Teste nº	1	2	3	4	5	6	7	8
Diluições	Puro	1:2	1:3	1:5	1:8	1:15	1:35	1:80
Concentração da amostra (ng/μL)	556,66	278,33	185,55	111,33	69,58	37,11	15,90	6,95

2.1.4.5 Resultados:

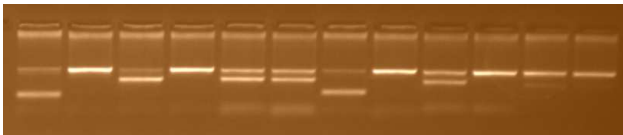
1) 556,66 ng/uL (Puro)



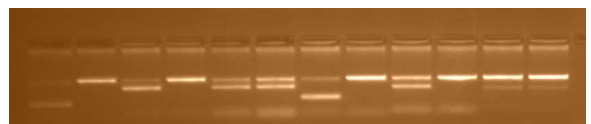
2) 278,33 ng/μL (1:2)



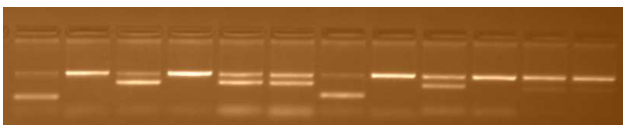
3) 185,55 na/ uL



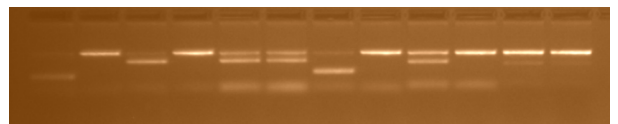
4) 111,33 ng/μL



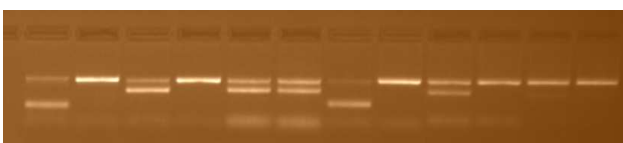
5) 69.58 na/uL (1:8)



6) 37,11 ng/μL (1:15)



7) 15,90 ng/μL (1:35)



8) 6,95 ng/uL (1:80)



2.1.4.1 Conclusão: observa-se que a quantidade mínima de DNA para garantir uma boa visualização das bandas foi de 15,90 ng/ μ L. Por aproximação, a quantidade mínima para uma boa visualização de bandas é de 20 ng/uL.

2.1.5 Concentração do Gel

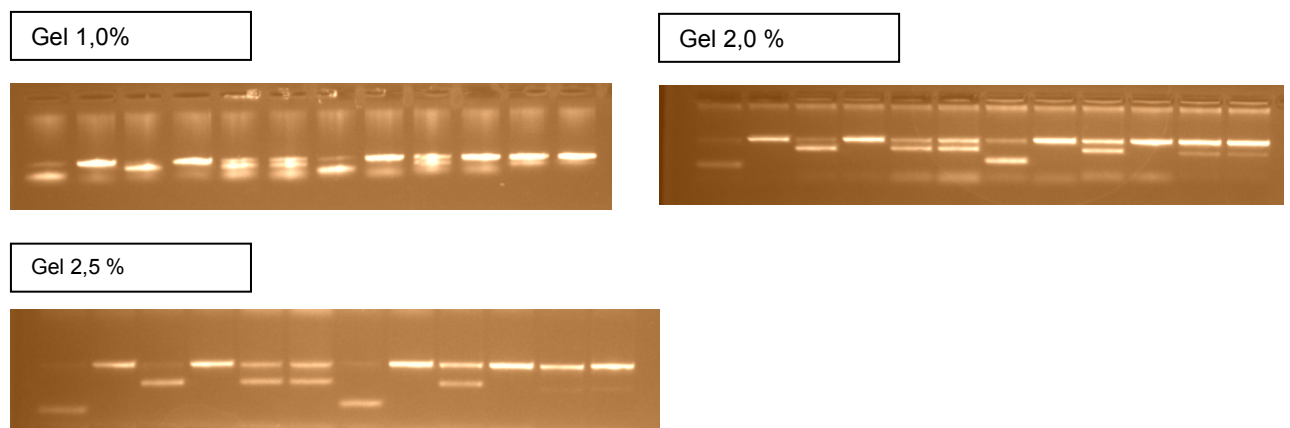
2.1.5.1 Amostra testada: A64

2.1.5.2 Tipagem HPA: HPA-1AA, 2AA, 3AB, 4AA, 5AA, 15AB

2.1.5.3 Realizado por: Joice Merzoni

2.1.5.4 Concentrações utilizadas: 1,0% ; 2,0% e 2,5%

2.1.5.5 Resultados:



2.1.5.1 Conclusão: observa-se que a concentração ideal do gel de agarose é de 2,0%. Concentrações menores fazem com que bandas se sobreponham.

2.1.6 Taq Polimerase

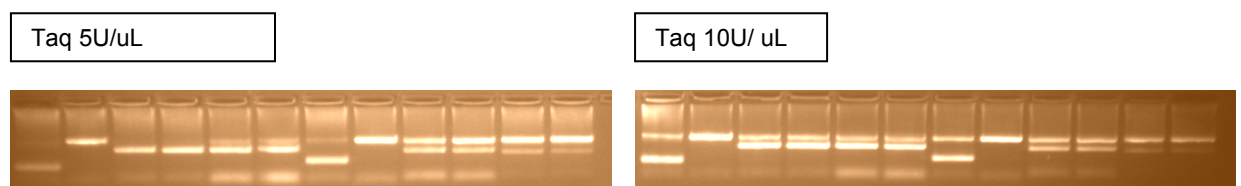
2.1.6.1 Amostra testada: A11

2.1.6.2 Tipagem HPA: HPA-1AA, 2AB, 3AB, 4AA, 5AB, 15AB

2.1.6.3 Realizado por: Joice Merzoni

2.1.6.4 Concentrações utilizadas: 5 e 10 U/uL

2.1.4.5 Resultados:



2.1.6.1 Conclusão: observa-se que a concentração ideal de taq polimerase é 5U/ μ L.

2.1.7 Cloreto de Magnésio

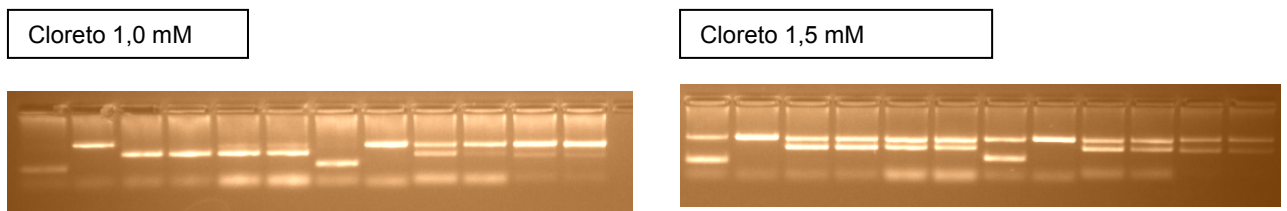
2.1.7.1 Amostra testada: A11

2.1.7.2 Tipagem HPA: HPA-1AA, 2AB, 3AB, 4AA, 5AB, 15AB

2.1.7.3 Realizado por: Joice Merzoni

2.1.7.4 Concentrações utilizadas: 1,0 e 1,5 mM

2.1.7.5 Resultados:



2.1.7.1 Conclusão: observa-se que a concentração ideal de cloreto de magnésio é 1,5 mM.

2.1.8 Dntps

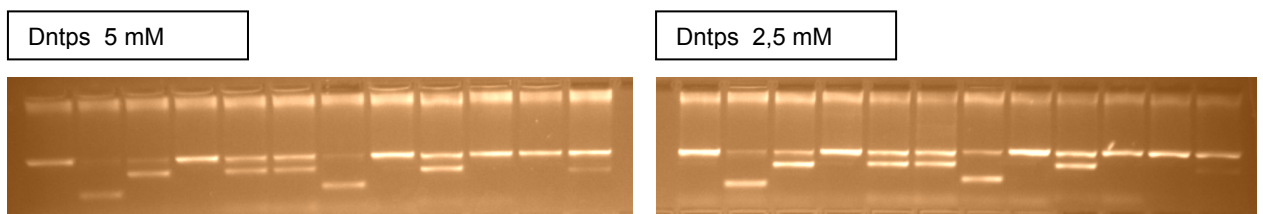
2.1.8.1 Amostra testada: A55

2.1.8.2 Tipagem HPA: HPA-1BB, 2AA, 3AB, 4AA, 5AA, 15AB

2.1.8.3 Realizado por: Joice Merzoni

2.1.8.4 Concentrações utilizadas: 5 e 2,5 mM

2.1.8.5 Resultados:



2.1.8.1 Conclusão: observa-se que a concentração ideal de DNTPs é 2,5 mM.

2.1.9 Tempo de Corrida Eletroforética

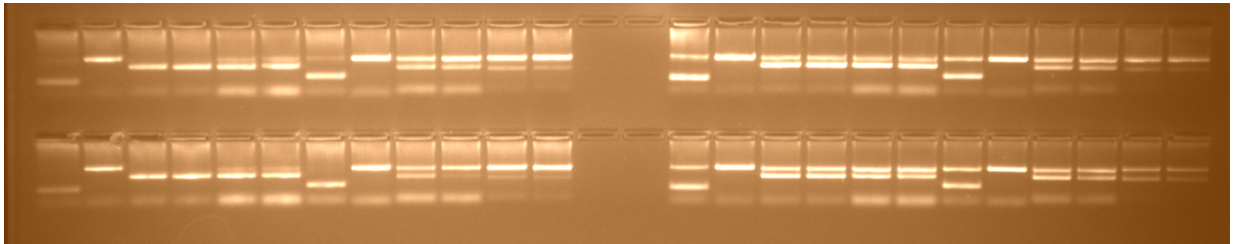
2.1.9.1 Amostra testada: A11

2.1.9.2 Tipagem HPA: HPA-1AA, 2AB, 3AB, 4AA, 5AB, 15AB

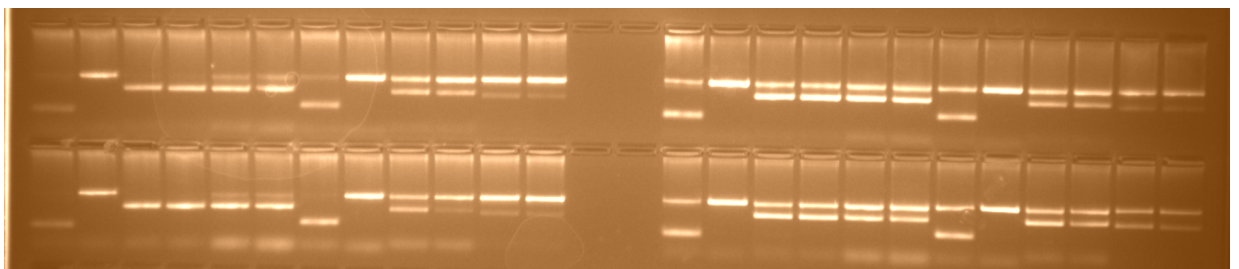
2.1.9.3 Realizado por: Joice Merzoni

2.1.9.4 Tempos de corrida utilizados: 20, 30 e 40 minutos

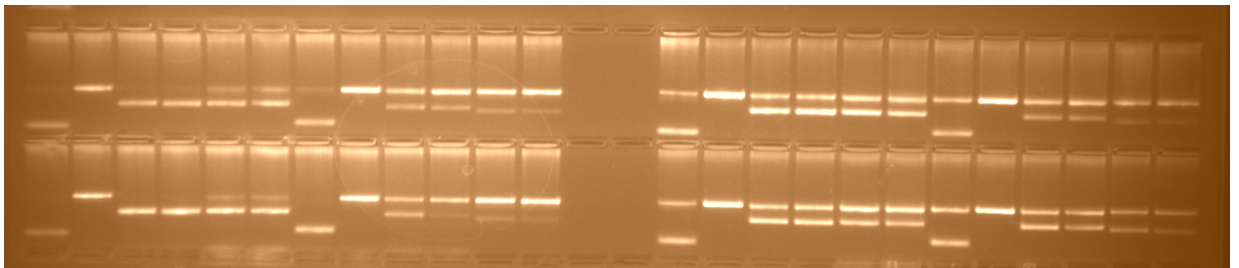
20 min de corrida eletroforética



30 min de corrida eletroforética



40 min de corrida eletroforética



2.1.9.5 Conclusão: O tempo de corrida ideal é de 30 minutos.

2.2 Parâmetros de Desempenho

2.2.1 Limite de Detecção, Faixa de Trabalho e Sensibilidade

2.2.1.1 Amostra testada: A64

2.2.1.2 Tipagem HPA: HPA-1AA, 2AA, 3AB, 4AA, 5AA, 15AB

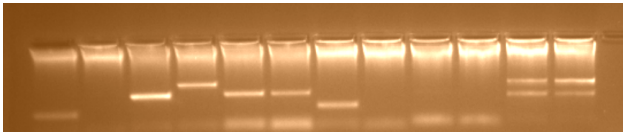
2.2.1.3 Realizado por: Joice Merzoni

2.2.1.4 Concentrações utilizadas: vide tabela abaixo

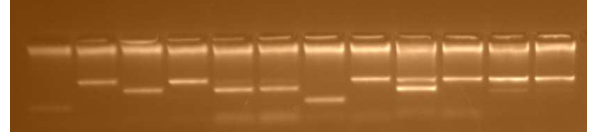
Concentração teórica	1	1:2	1:3	1:5	1:8	1:15	1:35	1:80
Concentração da amostra (ng/μL)	556,66	278,33	185,55	111,33	69,58	37,11	15,90	6,95

2.2.1.5 Resultados:

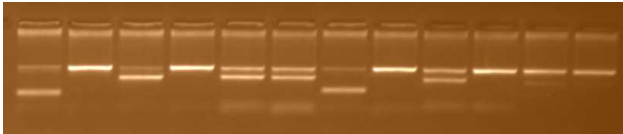
1) 556,66 ng/μL (Puro)



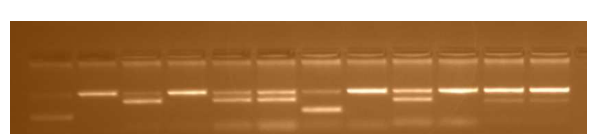
2) 278,33 ng/μL (1:2)



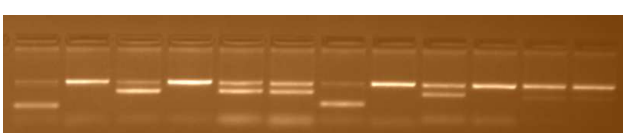
3) 185,55 ng/μL



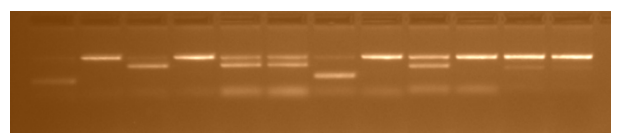
4) 111,33 ng/μL (1:5)



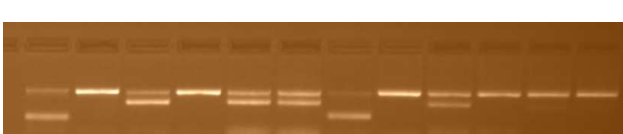
5) 69,58 ng/μL (1:8)



6) 37,11 ng/μL (1:15)



7) 15,90 ng/μL (1:35)



8) 6,95 ng/μL (1:80)



2.2.1.1 Conclusão:

2.2.1.2 Limite de detecção: A quantidade mínima de DNA para se detectar as bandas com a qualidade necessária para liberação de um resultado confiável é de 15,90 ng/μL. A quantidade máxima de DNA para se observar as bandas é de 278,33 ng/μL.

2.2.1.3 Faixa de trabalho: Desta forma a faixa de trabalho para esta metodologia, por aproximação dos resultados é de **20 ng/μL a 250 ng/μL de DNA**. A sensibilidade no caso da metodologia SSP se dá pela sensibilidade metodológica, já que, para se detectar verdadeiramente uma amostra positiva, é necessária uma boa resolução do gel.

2.2.1.4 Sensibilidade: Desta forma, a sensibilidade do método é caracterizada pelo limite inferior da faixa de trabalho, é de **20 ng/μL**.

2.2.2 Exatidão

Foram utilizadas 7 amostras de DNA cedidas gentilmente pelo Laboratório do Hospital Sírio Libanês. Todas as amostras concordaram em 100% com o resultado obtido pelo laboratório de referência. Também foram realizados testes com 4 amostras em paralelo, utilizando o nosso kit in house e o kit comercial Lifecodes ThromboType de Immucor®.

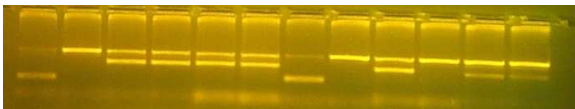
Testes amostras Hospital Sírio Libanês

2.2.2.1 Amostras testadas: S1, S2, S3, S4, S5, S6 e S7.

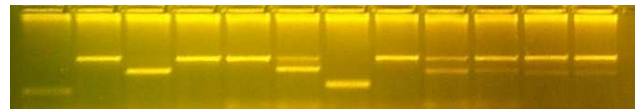
2.2.2.2 Realizado por: Joice Merzoni

2.2.2.3 Resultado dos testes:

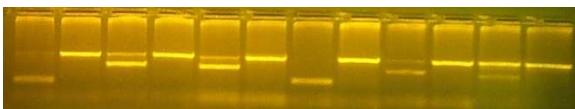
Amostra S1



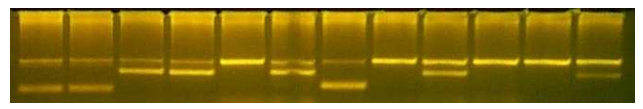
Amostra S2



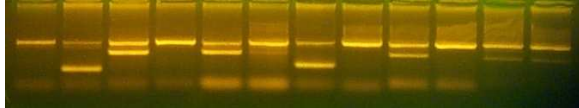
Amostra S3



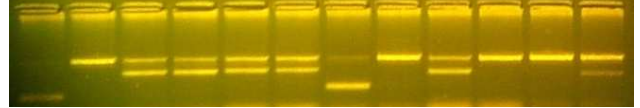
Amostra S4



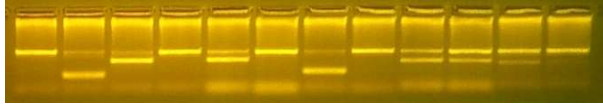
Amostra S5



Amostra S6



Amostra S7



Amostras	Tipagem HPA- Laboratório de Referência	Tipagem HPA - Serviço de Imunologia - HCPA	Índice de acerto de
S1	HPA-1AA, 2AB, 3AB, 4AA, 5AA, 15AB	HPA-1AA, 2AB, 3AB, 4AA, 5AA, 15AB	100%
S2	HPA-1AA, 2AA, 3BB, 4AA, 5AB, 15AB	HPA-1AA, 2AA, 3BB, 4AA, 5AB, 15AB	100%
S3	HPA-1AA, 2AA, 3AA, 4AA, 5AA, 15AA	HPA-1AA, 2AA, 3AA, 4AA, 5AA, 15AA	100%
S4	HPA-1AB, 2AB, 3BB, 4AA, 5AA, 15BB	HPA-1AB, 2AB, 3BB, 4AA, 5AA, 15BB	100%
S5	HPA-1BB, 2AA, 3AA, 4AA, 5AA, 15AB	HPA-1BB, 2AA, 3AA, 4AA, 5AA, 15AB	100%
S6	HPA-1AA, 2AB, 3AB, 4AA, 5AA, 15BB	HPA-1AA, 2AB, 3AB, 4AA, 5AA, 15BB	100%
S7	HPA-1BB, 2AA, 3AA, 4AA, 5AB, 15AA	HPA-1BB, 2AA, 3AA, 4AA, 5AB, 15AA	100%

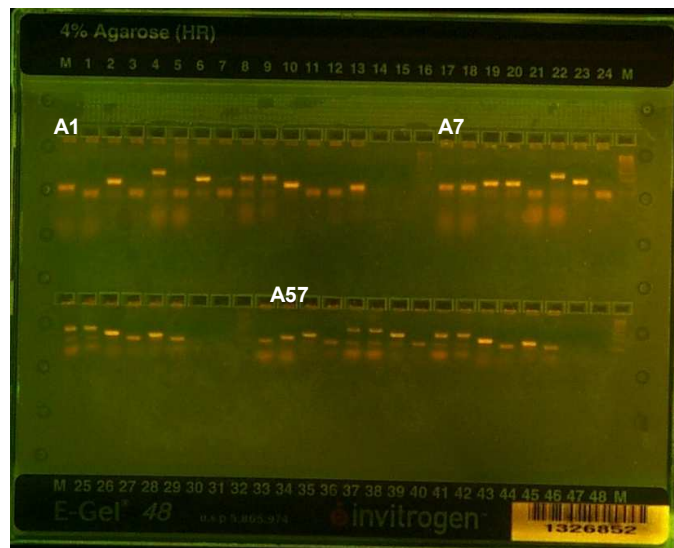
2.2.2.4 Conclusão: Houve 100% de concordância nos resultados.

Testes com kit comercial Thrombotype

2.2.2.1 Amostras testadas: A1, A7 e A57

2.2.2.2 Realizado por: Joice Merzoni

2.2.2.3 Resultado dos testes:



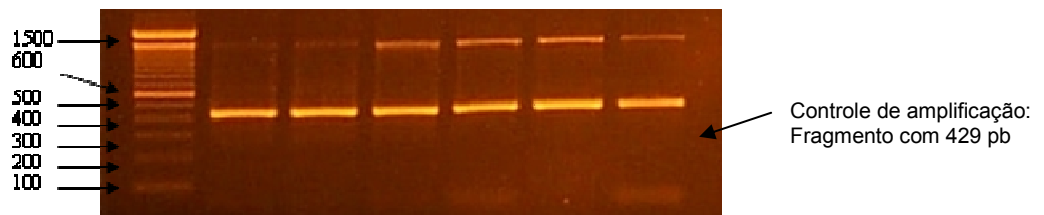
2.2.2.4 Conclusão: Mesmo em condições adversas (mistura de DNAs), a capacidade de seleção do método foi preservada.

2.2.4 Robustez

2.2.2.1 Amostras testadas: S1, S2, S3, S4, S5 e S6.

2.2.2.2 Realizado por: Joice Merzoni

2.2.2.3 Resultado dos testes:



2.2.2.3 Conclusão: Amplificação do controle interno de amplificação em todas as amostras testadas. 429 pb.

Conclusão da validação da técnica

A partir dos experimentos realizados, o método de genotipagem HPA - SSP *in house* utilizado pode ser considerado sensível, exato e robusto.

Referências da Validação da Técnica

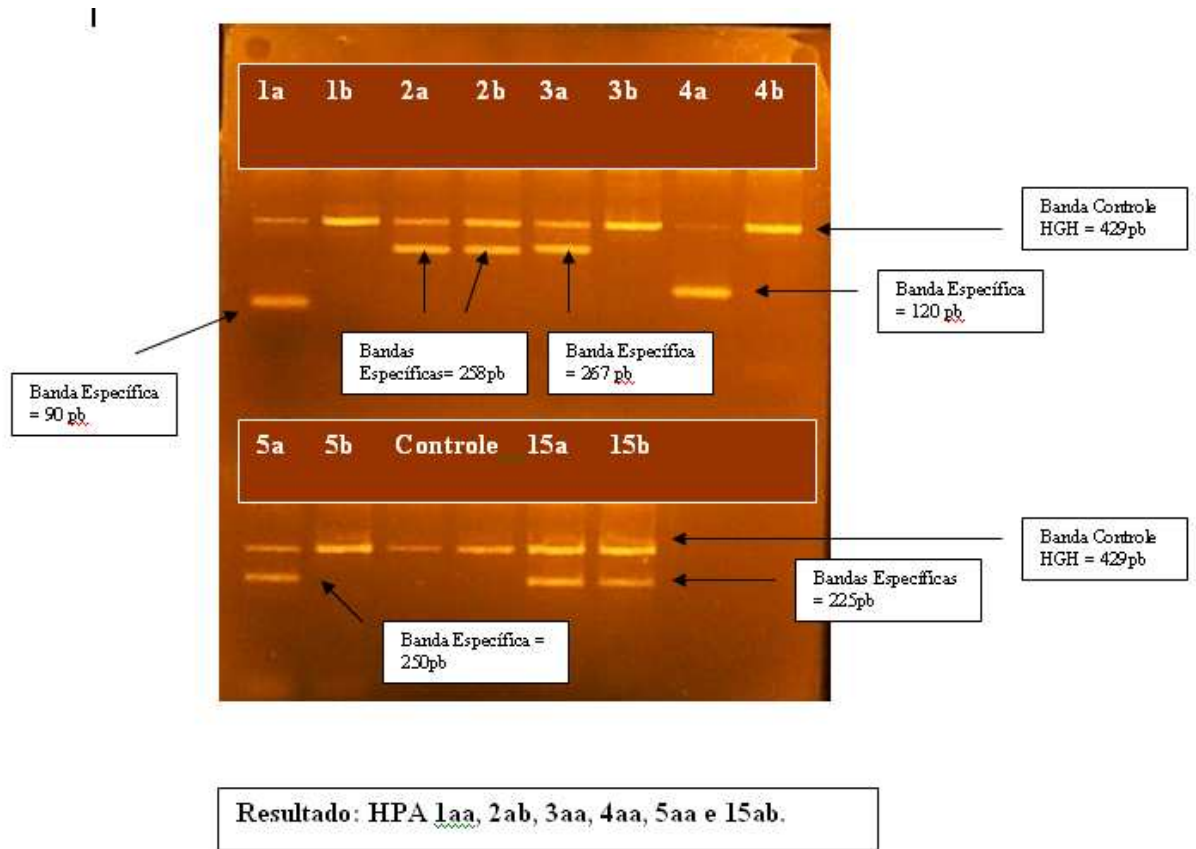
Silva, A.P; Alves, M.C.C. *Como Iniciar a Validação de Métodos Analíticos*. Rede Metrológica do Estado de São Paulo. Junho de 2006.

Oliveira, C.A; Mendes, M.E; Romano, P. *Validação de Sistema Analítico. Gestão da Fase Analítica Laboratorial*. ControlLab Controle de Qualidade para Laboratórios LTDA. Capítulo 2. Vol I. 1ªed. 2010.

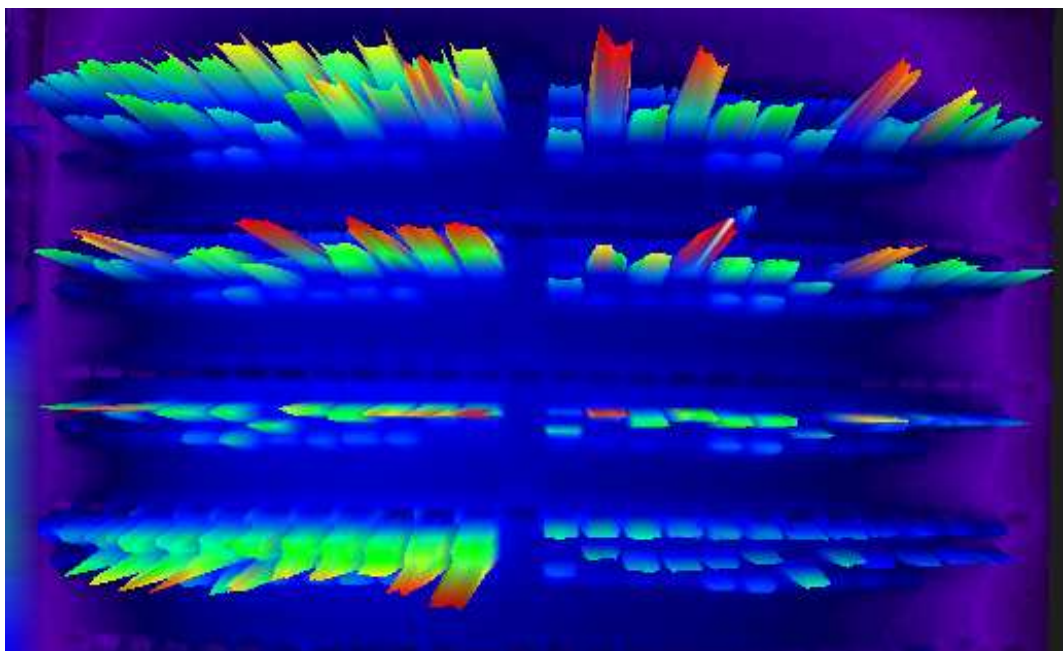
Brasil. Ministério da Saúde. Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003. *Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"*. Diário Oficial da União - Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil. Publicado em dois de junho de 2003.

8. APÊNDICE B

Gel típico genotipagem HPA



Gel 3D



9. APENDICE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor (a) _____

O (a) Senhor(a) esta sendo convidado a participar da pesquisa: " Genotipagem do sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) em uma população sul-brasileira". Esta pesquisa estudará as plaquetas, que são células presentes na corrente circulatória e que tem a função de parar o sangramento. Para cumprir esta função, estas células se aglomeram na lesão através do contato célula a célula. Este contato é feito através de marcadores presentes na superfície das plaquetas e estes podem ser diferentes entre as populações. O objetivo desta pesquisa é identificar estes marcadores através de um teste laboratorial. Esta pesquisa poderá ajudar os receptores de plaquetas.

Estamos solicitando a sua permissão para análise do seu sangue. E para isto será necessário fazermos uma coleta de sangue. Iremos fazer estudos do DNA (são substâncias que contém todas as informações sobre a formação do corpo humano) e vamos analisar os resultados obtidos.

O (a) Sr (a) poderá ser incluído em um banco de dados contendo o registro de doadores de plaquetas, que será utilizado para selecionar doadores para um receptor de plaquetas específico.

O paciente tem a total liberdade de não querer entrar no estudo, ou de sair do mesmo quando quiser, sem que isso traga prejuízos no seu cuidado. Não há formas de ressarcimento ou de indenização decorrentes da participação na pesquisa. Você tem o direito de solicitar informações e esclarecer dúvidas sobre a pesquisa que venha a participar. A sua identidade será mantida em sigilo. Os resultados do estudo serão sempre apresentados como o retrato de um grupo e não de uma pessoa. A sua participação neste estudo é muito importante e voluntária. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é realizado em duas (2) vias, sendo que, uma delas ficará com o(a) participante (no caso o(a) Senhor(a)) ou seu representante legal e a outra via será arquivada com o pesquisador responsável Professor Dr. Luiz Fernando Jobim. Caso haja a necessidade de maiores explicações, o(a) Senhor(a) poderá telefonar para 3359-8020 (Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) Contato: Pesquisadora executora: Joice Merzoni. Caso o (a) participante da pesquisa não puder decidir ou assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por algum motivo como o (a) mesmo sendo menor de idade ou possuir alguma condição que o incapacite de tal decisão, é necessária a decisão e assinatura de um representante legal.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador(a) que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

Esse documento se encontra em duas vias de igual conteúdo e valor.

Eu, _____, (responsável legal ou participante da pesquisa) abaixo assinado(a), ciente dos termos acima descritos, permito a coleta do sangue para a pesquisa: " Genotipagem do sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) em uma população sul-brasileira".

Assinatura do participante ou representante legal


Nome do pesquisador (a): _____

Assinatura do Pesquisador (a)

Porto Alegre, ____ de _____ de 201____.

10. ANEXO A

Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 120447
Data da Versão do Projeto:

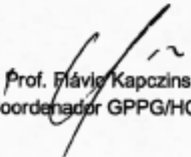
Pesquisadores:
LUIZ FERNANDO JOB JOBIM
TOR GUNNAR HUGO ONSTEN
MARIANA DE SAMPAIO LEITE JOBIM WILSON
IARA DOS SANTOS FAGUNDES

Título: Genotipagem do sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) em uma população sul-brasileira

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 03 de janeiro de 2013.


Prof. Flávio Kapczinski
Coordenador GPPG/HCPA