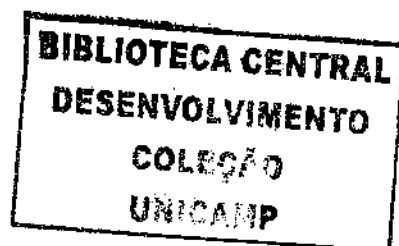


WILSON BALEOTTI JÚNIOR

***CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO SISTEMA
DE GRUPO SANGUÍNEO DOMBROCK
EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA.***

CAMPINAS

2006



WILSON BALEOTTI JÚNIOR

***CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO SISTEMA
DE GRUPO SANGUÍNEO DOMBROCK
EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA.***

*Tese de Doutorado apresentada à pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de concentração Ciências Básicas.*

ORIENTADORA: PROF. DRA. LILIAN MARIA DE CASTILHO

CAMPINAS

2006

NOME BC
 CHAMADA
 UNICAMP
 B195c
 EX
 MBO BC/ 69804
 OC. 16.123.06
 C ☐ D ☒
 EÇO 11.00
 TA 30.8.06

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
 Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

ID 385894

B195c

Baleotti Júnior, Wilson

Caracterização molecular do sistema de grupo sanguíneo Dombrock em uma população brasileira / Wilson Baleotti Júnior. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Lílían Maria de Castilho
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antígenos. 2. *Imunoglobulinas* Anticorpos. 3. Genes. I. Castilho, Lílían Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles : Molecular analysis of Dombrock blood group system in brazilian people

Keywords: • Antigen
 • Antibodies
 • Genes

Área de concentração : Clínica Médica

Titulação: Doutorado em Ciências Básicas

Banca examinadora: Profa. Dra. Lílían Maria de Castilho
 Profa. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad
 Prof Dr Fernando Ferreira Costa
 Prof Dr José Orlando Bordin
 Prof Dr Dimas Tadeu Covas

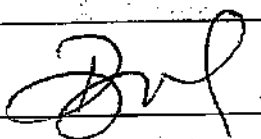
Data da defesa: 29-05-2006

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador(a): Profª. Drª. Lilian Maria de Castilho

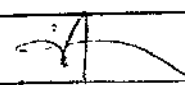
Membros:

1. Prof(a). Dr(a) José Orlando Bordin

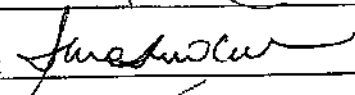


2. Prof(a). Dr(a). Dimas Tadeu Covas

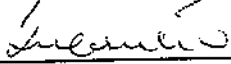
3. Prof(a). Dr(a). Fernando Ferreira Costa



4. Prof(a). Dr(a). Sara Terezinha Olalla Saad



5. Prof(a). Dr(a). Lilian Maria de Castilho



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/05/2006

200619589

Dedico este trabalho:

A DEUS

pelo seu AMOR infinito, carinho e luz constante em nossa vida...

À minha amada esposa

Luciana Ramos Baleotti

*esposa amorosa, que com todo carinho de MÃE,
cuida do tesouro mais precioso que temos em nossa vida: a*

LAURA.

*Tudo isso sem faltar com suas atividades profissionais que conquistou com o
brilhantismo, luta e a persistência de uma vencedora.*

À minha filha

Laura Ramos Baleotti

*Por ser tão perfeita no amor por nós e compreensiva nos momentos, em que doa muito
mais do seu coração do que espera receber.*

Aos meus pais,

Wilson Baleotti (in memorian) e Leda Polatti Baleotti,

sinônimos de carinho eterno, exemplos de vida, amor a Deus e ao próximo.

AGRADECIMENTOS

À **Profa Dra Lillian Maria de Castilho**, pela dedicação desprendida e forma serena de me orientar a transpor os obstáculos, transmitindo segurança e confiança em cada etapa deste trabalho. Pelos ensinamentos em Imunohematologia tão importantes no meu aperfeiçoamento profissional desde o início da minha carreira e pela confiança em mim depositada. *“É lento ensinar por teorias, mas breve e eficaz fazê-lo pelo exemplo”*. (**Sêneca**). Trabalhar sob sua orientação é para mim um grande privilegio.

Ao **Prof. Dr. Jordão Pellegrino Junior** pela sua amizade e contribuições valiosas durante o decorrer do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antonio Fabron Jr**, pela amizade, respeito, incentivo, confiança e apoio, que com toda certeza foram muito importante no meu desenvolvimento profissional.

Às **Profas Dra Marion Reid e Dra Maria Rios** pela valiosa contribuição que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

À **Profa. Dra. Sara Saad**, pelo apoio técnico, estímulo e sugestões que contribuíram para concretização deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Faculdade de Medicina da Universidade de Campinas, **Laércio, Ártemis, Karina, Clayton e Thaís**, pela amizade e apoio técnico.

Aos meus queridos amigos do **laboratório de Imunohematologia** do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília, **David, Marcelo, Márcia, Sueli, Lidiane e Danielle**, pelo apoio técnico.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília, **Prof. Dr. Spencer, Roger e Prof. Luciano**, pelo apoio técnico.

À minha querida amiga **Profa Dra Eliana Milanesi Rúbio** por ter sempre me apoiado, desde o início da minha carreira.

À amiga **Renata** pela gentileza, competência e atenção dispensada no decorrer do curso.

À amiga **Cecília**, pela sua eficiência e auxílio no decorrer do curso.

Ao **Marcel**, ao **Sérgio**, ao **Mário** e a todos os amigos do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília pelo constante incentivo.

*Trabalho realizado no Centro de
Hematologia e Hemoterapia da
UNICAMP e no Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Marília.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Descrição
Do^a	Antígeno Dombrock a
Do^b	Antígeno Dombrock b
Gy^a	Antígeno Gregory a
Hy	Antígeno Holley
Jo^a	Antígeno Josef a
DOA	Alelo <i>DOA</i>
DOB	Alelo <i>DOB</i>
DOA/DOB	Genótipo
GY	Alelo Gregory
HY	Alelo Holley
JO	Alelo Josef
DOA-SH	Alelo <i>DOA-SH</i>
DOB-SH	Alelo <i>DOB-SH</i>
DOA-HA	Alelo <i>DOA-HA</i>
DOB-WL	Alelo <i>DOB-WL</i>
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
NT	Nucleotídeo
898C/G	Polimorfismo no nucleotídeo 898 do gene <i>DO</i>
793A/G	Polimorfismo no nucleotídeo 793 do gene <i>DO</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS(cont.)

Sigla	Descrição
624T/C	Polimorfismo no nucleotídeo 624 do gene <i>DO</i>
793A/G	Polimorfismo no nucleotídeo 793 do gene <i>DO</i>
378C/T	Polimorfismo no nucleotídeo 378 do gene <i>DO</i>
350C/T	Polimorfismo no nucleotídeo 350 do gene <i>DO</i>
323G/T	Polimorfismo no nucleotídeo 323 do gene <i>DO</i>
gDNA	DNA genômico
mRNA	RNA mensageiro
Gly	Glicina
Thr	Treonina
Asn	Asparagina
Leu	Leucina
Val	Valina
Asp	Ácido aspártico
Ile	Isoleucina
DAF	Decay Accelerating Factor
MIRL	Membrane Inhibitor of Reactive Lysis
Proteína DO	Proteína Dombrock
DO	Gene Dombrock

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS(cont.)

Sigla	Descrição
Pb	Pares de bases
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfism
PCR-RFLP	Técnica de PCR seguida por análise dos fragmentos com enzimas de restrição
A	Adenina
T	Timina
C	Citosina
G	Guanina
EDTA	Acido etileno diamino tetracético
dNTP	2'-deoxinucleosídeo 5'-trifosfato
dATP	2'-deoxiadenina 5'-trifosfato
dTTP	2'-deoxitimina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitosina 5'-trifosfato
dGTP	2'-deoxiguanina 5'-trifosfato

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS(cont.)

Sigla	Descrição
µg	Micrograma
µl	Microlítro
rpm	Rotações por minutos
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA
MIMA-123	Soro monoclonal murino anti-Do ^b
MIMA-52	Soro monoclonal murino anti-proteína Dombrock
PNH	Paroxismal Nocturnal Hemoglobinuria
PBS	Solução salina tamponada (0,86% / pH 7.2)

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 Bases moleculares que definem os fenótipos Dombrock	06
TABELA 2 Bases moleculares associadas aos fenótipos Dombrock null	08
TABELA 3 Primers e enzimas de restrição utilizadas nas análises por PCR-RFLP	19
TABELA 4 Resultados da genotipagem Dombrock	34
TABELA 5 Frequências dos alelos Dombrock	35
TABELA 6 Resultados da Intensidade média de fluorescência, obtida por citometria de fluxo, para análise de expressão do antígeno Do ^b .	38
TABELA 7 Resultados da Intensidade média de fluorescência obtida por citometria de fluxo, para análise de expressão da proteína DO.	38
TABELA 8 Diferenças entre os nucleotídeos e aminoácidos que determinam os alelos Dombrock	45
TABELA 9 Frequências dos genótipos Dombrock em diferentes populações	47

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 Localizações das substituições dos aminoácidos associadas aos fenótipos Dombrock	7
FIGURA 2 Representação esquemática do gene Dombrock (<i>DO</i>).	7
FIGURA 3 PCR-RFLP para genotipagem <i>DOA/DOB</i>	21
FIGURA 4 PCR-RFLP para genotipagem <i>HY</i> (323G/T)	22
FIGURA 5 PCR-RFLP para genotipagem <i>JO</i> (350C/T)	23
FIGURA 6 PCR-RFLP para genotipagem 898 C/G	24
FIGURA 7 Protocolo simplificado da reação de Microarray	27
FIGURA 9 Representação esquemática da aquisição da imagem do BeadChip.	28
FIGURA 9 Fenotipagem sanguínea Dombrock	29
FIGURA 10 Representação gráfica dos resultados obtidos do sequenciamento do gene <i>DO</i>	36
FIGURA 11 Análise por histograma da expressão do antígeno Do ^b	37
FIGURA 12 Análise por histograma da expressão da proteína DO	39
FIGURA 13 Resultados da genotipagem Dombrock nas amostras de Marília e Campinas	42
FIGURA 14 Representação esquemática das bases moleculares dos novos alelos Dombrock.	44

SISTEMA DE GRUPOS SANGUÍNEOS

NOMENCLATURA ISBT*

Nº ISBT	NOME	ABREVIATURA
001	ABO	ABO
002	MNS	MNS
003	P	P
004	Rh	RH
005	Lutheran	LU
006	Kell	KEL
007	Lewis	LE
008	Duffy	FY
009	Kidd	JK
010	Diego	DI
011	Cartwright	YT
012	XG	XG
013	Scianna	SC
014	Dombrock	DO
015	Colton	CO
016	Landsteiner-Wiener	LW
017	Chido/Rodgers	CH/RG
018	Hh	H
019	Kx	XK
020	Gerbich	GE
021	Cromer	CROM
022	Knops	KN
023	Indian	IN
024	Ok	OK
025	Raph	MER2
026	JMH	JMH
027	I	I
028	Globoside	GLOB
029	GIL	GIL

*** ISBT - Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea**

SUMÁRIO

	<i>Pág.</i>
Resumo	xviii
Abstract	xix
Introdução	1
Objetivos	10
Material e Métodos	12
A. Material	13
B. Métodos	18
1. <i>Extração de DNA</i>	18
2. <i>Precipitação do DNA por Etanol</i>	18
3. <i>Genotipagem Dombrock por PCR-RFLP</i>	19
4. <i>Genotipagem Dombrock por Microarrays®</i>	24
5. <i>Sequenciamento direto de DNA genômico do gene DO</i>	27
6. <i>Análise da expressão do antígeno Do^b e da proteína DO</i>	28
Resultados	32
1. <i>Resultados da Genotipagem Dombrock</i>	33
2. <i>Sequenciamento do alelo DOB-WL</i>	36
3. <i>Expressão dos antígenos Dombrock</i>	36

SUMÁRIO(cont.)

	<i>Pág.</i>
<i>Discussão</i>	40
1. Genotipagem Dombrock	41
2. Novo alelo Dombrock DOB-WL	41
3. Novo alelo Dombrock DOA-SH	43
4. Frequência dos alelos Dombrock	45
5. Expressão dos antígenos Dombrock	46
<i>Conclusão</i>	50
<i>Referências bibliográficas</i>	54
<i>Apêndice</i>	60
1. Artigo: Dombrock gene analysis in Brazilian people reveals novel alleles	62
2. Resumo: Molecular studies of DO Alleles in Brazilians reveals the presence of 898G mutation without HY1	69

O sistema de grupo sanguíneo Dombrock é constituído por um par de antígenos antitéticos, Do^a e Do^b , e três antígenos de alta frequência populacional, Gregory (Gy^a), Holley (Hy) e Joseph (Jo^a). O gene *DO*, que codifica os antígenos do sistema Dombrock, foi recentemente clonado e suas bases moleculares foram elucidadas. Os antígenos Do^a e Do^b , são controlados pelos alelos *DOA* e *DOB* que estão associados à troca de três nucleotídeos no exon 2 do gene *DO*: 378C/T, 624T/C e 793A/G, respectivamente. O fenótipo $Jo(a-)$ está associado com a substituição 350C/T que caracteriza o alelo *JO*. O fenótipo Hy -negativo está associado à presença de um dos alelos: *HY1* ou *HY2*. O alelo *HY2* é caracterizado pela substituição 323G/T. Uma substituição adicional 898C/G, no exon 3, caracteriza o gene *HY1*. Recentemente dois novos alelos foram descritos: *DOB-SH* (378C, 624C, 793G) e *DOA-HA* (378T, 624T, 793A). Considerando que: as bases moleculares dos antígenos Dombrock foram elucidadas; que novos alelos têm sido descritos; a miscigenação da população brasileira e que até o momento nenhum estudo foi realizado sobre a frequência dos genes Dombrock na nossa população, estudamos 450 amostras de DNA, através das técnicas de **PCR-RFLP** e **Microarrays® - HEA Beadchip** para determinar a frequência dos alelos *DO* (*DOA*, *DOB*, *HY1*, *HY2*, *JO*). Dois novos alelos foram identificados baseados em novas combinações de SNPs: alelo *DOB-WL* (793G, 898G, 323C) e alelo *DOA-SH* (378C, 624C, 793A). Nossos dados demonstram uma grande complexidade e heterogeneidade dos alelos Dombrock na população brasileira e confirmam a necessidade do estudo molecular em diferentes populações.

Background: The molecular basis of the Do^a and Do^b polymorphism, are associated with three single-nucleotide polymorphisms (SNPs) on exon 2 of *DO* gene: 378C>T, 624T>C and 793A>G, *DOA* and *DOB* alleles, respectively. The SNPs 350C>T (*JO* allele) and 323G>T (*HY* allele) are associated with: Jo(a-) and Hy-negative phenotype. Recently, two new *DO* alleles were identified using the microarray technology, *DOB-SH* (378C, 624C, 793G) and *DOA-HA* (378T, 624T, 793A). Although the molecular background of Dombrock system is well defined, no studies were carried out in the Brazilian population.

Methods: We employed PCR-RFLP based assays and a microarray assay to determine the frequency of the *DO* alleles (*DOA*, *DOB*, *HY1*, *HY2* and *JO*) in Brazilians. We tested DNA of 288 Brazilians people by PCR-RFLP to determine the 793A>G (*DOA/DOB*), 323G>T (*HY*), 350C>T (*JO*) and 898C>G (*HY1/HY2*) SNPs. We also tested DNA from 162 blood donors by the HEA BeadchipTM (BioArray Solutions, USA) to determine the 378C>T, 624T>C, 793A>G (*DOA/DOB*), 350C>T (*JO* allele) and 323G>T (*HY*) SNPs.

Results: Two novel alleles combinations were found in our samples: the 793G SNP (*DOB* allele) associated with 898G and 323G (*DOB-WL*) and the SNPs 378C, 624C, 793A and 323G (*DOA-SH*). We also found the *DOB-SH* and *DOA-HA* alleles recently reported.

Conclusion: Our data demonstrate high heterogeneity of *DO* alleles in the Brazilian population and highlight the importance of testing a cohort of different populations to determine the *DO* allele combinations and establish reliable genotyping to predict the Do^a/Do^b antigen status.

INTRODUÇÃO

O sistema de grupo sanguíneo Dombrock foi descoberto em 1965, com a identificação de um anticorpo no soro de uma paciente de sobrenome Dombrock, que definiu o primeiro antígeno do sistema, denominado Do^a (**SWANSON et al., 1965**). O antígeno Do^b, par antitético de Do^a, foi descrito somente oito anos mais tarde por **MOLTHAN et al. (1973)**.

Inicialmente, os anticorpos anti-Do^a e anti-Do^b, definiram três fenótipos, Do(a+b-), Do(a-b+), Do(a+b+), com diferentes freqüências entre os grupos étnicos estudados. No entanto, devido à escassez de anti-soros os estudos de freqüência dos fenótipos Dombrock são derivados de investigações realizadas apenas com anti-Do^a (**SWANSON et al., 1965; POLESKY & SWANSON, 1966; CHANDANAYINGYONG et al., 1967; NAKAJIMA et al., 1979; NAKAJIMA & MOULDS, 1980**).

O sistema de grupo sanguíneo Dombrock (Sistema 014 – ISBT) foi reconhecido pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) somente em 1985 (**LEWIS et al., 1985**).

Em 1995, três antígenos de alta freqüência populacional foram adicionados ao sistema Dombrock: Gregory (Gy^a), Holley (Hy) e Joseph (Jo^a) (**DANIELS et al, 1995**). Os antígenos Gy^a e Hy foram descritos independentemente em 1967, como antígenos de alta freqüência populacional (>99%), por **SWANSON et al.** e **SCHMIDT et al.**, respectivamente. Somente, oito anos mais tarde estes antígenos foram fenotipicamente correlacionados, pela observação de que eritrócitos de indivíduos Caucasianos com fenótipo Gy(a-) são também Hy-negativo, e eritrócitos descendentes de Africanos com

fenótipo Hy-negativo apresentavam baixa expressão do antígeno Gy^a (**MOULDS et al., 1975**).

O antígeno Jo^a foi descrito isoladamente em 1972 como um antígeno de alta frequência populacional (**JENSEN et al.**). Posteriormente, este antígeno foi também correlacionado aos antígenos Gy^a e Hy, pela observação de que eritrócitos com fenótipo Gy(a-) ou Hy-negativo são também Jo(a-) (**WEAVER et al., 1984; BROWN, 1985**).

Estudos de fenotipagem e de correlação entre os antígenos Gy^a, Hy e Jo^a, identificaram três novos fenótipos raros que foram incluídos ao sistema Dombrock: **I)** O fenótipo Gy(a-) representando o fenótipo "null" do sistema Dombrock, associado à ausência da proteína Dombrock e conseqüentemente a perda da expressão dos antígenos Dombrock; **II)** O fenótipo Hy-negativo, sempre associado à presença do antígeno Do^b; e **III)** o fenótipo Jo(a-) sempre associado à presença do antígeno Do^a. O antígeno Do^a associado ao fenótipo Jo(a-) e o antígeno Do^b associado ao fenótipo Hy-negativo, podem apresentar um enfraquecimento da sua expressão antigênica (**BANKS et al., 1995; DANIELS et al., 1995**).

Os antígenos Dombrock são expressos sobre uma proteína "ancorada" na membrana do eritrócito humano através de uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (**TELEN et al., 1990**).

As primeiras evidências sobre a localização dos antígenos Dombrock, foram obtidas através de análises realizadas em eritrócitos de pacientes portadores de Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) e apontavam para a hipótese de que os antígenos Gy^a, Hy, Do^a e Do^b exerciam a função de proteínas reguladoras do

complemento: "Decay Accelerating Factor" (DAF, CD55) e "Membrane Inhibitor of Reactive Lysis" (MIRL, CD59) (TELEN et al., 1990). No entanto, através de análises moleculares, o gene Dombrock (DO) foi identificado como um membro da família de genes ADP-ribosiltransferase (ART4) e atualmente, tem sua função relacionada à atividade enzimática (GUBIN et al., 2000).

Após a descoberta do sistema Dombrock, os anticorpos anti-Do^a e anti-Do^b passaram a ser associados a relatos de reações hemolíticas transfusionais agudas ou tardias e, diversos estudos têm sido publicados a respeito da importância clínica destes anticorpos (MOHENG et al., 1985; KRUSKALL et al., 1986; JUDD et al., 1991; HALVERSON et al., 1994; SHIREY et al., 1998; BAUMGARTEN et al., 2006).

Os anticorpos anti-Dombrock pertencem à classe das imunoglobulinas G e, portanto, são detectados por técnicas de hemaglutinação que incluem o uso da antiglobulina humana. Anti-Do^a e anti-Do^b são difíceis de serem identificados na rotina transfusional, pelo fato destes anticorpos estarem usualmente presentes em amostras de soro de pacientes politransfundidos contendo múltiplos aloanticorpos. (STRUPP et al, 1997; MOULDS et al, 1975).

Apesar dos antígenos Do^a e Do^b, estarem bem desenvolvidos ao nascimento e, embora existam relatos de recém nascidos com teste direto da antiglobulina humana positivo, pela presença de anticorpos anti-Do^a na superfície das suas hemácias, nunca se constatou Doença Hemolítica Perinatal por anticorpos anti-Do^a ou anti-Do^b (SWANSON et al., 1965; MOLTHAN et al., 1973; POLESKY et al., 1968; ROXBY et al., 1994).

A fenotipagem do sistema Dombrock através de técnicas sorológicas é notoriamente difícil, devido à variabilidade da expressão dos antígenos, associados aos fenótipos HY-negativo e Jo(a-) e a dificuldade na obtenção de soro contendo anticorpos anti-Dombrock (REID, 2003, 2005; MOULDS et al., 1975; BANKS et al., 1995).

O polimorfismo Dombrock foi primariamente relacionado ao cromossomo um (LEWIS et al., 1978), porém estudos posteriores demonstraram que o gene Dombrock encontra-se no braço curto do cromossomo 12 (EIBERG et al., 1996; GUBIN et al., 2000). A localização dos antígenos Dombrock e do gene *DO* forneceram evidências que abriram caminho para os estudos que levaram a identificação e mapeamento do gene Dombrock (*DO*) e a caracterização molecular da proteína Dombrock e dos antígenos *Do^a* e *Do^b*.

A glicoproteína Dombrock é composta por 314 aminoácidos e possui o peso molecular de 50kD. É codificada pelo gene *DO* (Gen Bank - AF290204, XM_017877, AY899803.1) localizado no cromossomo 12p12.3, com 14 Kb, sendo que o cDNA isolado de células eritróides humanas consiste de 3 exons com 1102 pb (GUBIN et al, 2000).

Os resultados da clonagem e seqüenciamento do gene *DO* elucidaram as bases moleculares dos antígenos do sistema Dombrock. Os genes alelos *DOA* e *DOB* estão associados a troca de três nucleotídeos (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) no exon 2 do gene *DO*, respectivamente: 378C/T, 624T/C e 793A/G. Os SNPs 378C/T e 624T/C são silenciosos e portanto, não levam a substituição de aminoácidos (126 Tirosina e 208 Leucina, respectivamente) na glicoproteína Dombrock (Tabela 1). O SNP

793A/G promove a substituição do aminoácido Asparagina (Do^a) pelo Ácido Aspártico (Do^b) na posição 256 (Figuras 1 e 2) (GUBIN et al, 2000).

Tabela 1: Bases moleculares que definem os fenótipos Dombrock.

Alelos	nt 323	aa 108	nt 350	aa 117	nt 378	nt 624	nt 793	aa 265	nt 898	aa 300
DOA	G	Gly	C	Thr	C	T	A	Asn	C	Leu
DOB	G	Gly	C	Thr	T	C	G	Asp	C	Leu
HY1	T	Val	C	Thr	C	C	G	Asp	G	Val
HY2	T	Val	C	Thr	C	C	G	Asp	C	Leu
JO	G	Gly	T	Ile	T	T	A	Asn	C	Leu
DOA-HA	G	Gly	C	Thr	T	T	A	Asn	nd	nd
DOB-SH	G	Gly	C	Thr	C	C	G	Asp	nd	nd

nt – nucleotídeo. aa - aminoácido. nd -bases moleculares não determinadas.

- Sombreado em cinza escuro: SNPs que promovem substituições de aminoácidos.
- Sombreado em cinza claro: SNPs silenciosos.

RIOS et al., 2002 analisaram amostras de DNA de doadores com os fenótipos Hy-negativo e Jo(a-). Os resultados revelaram que o fenótipo Jo(a-) está associado com a troca de 2 nucleotídeos na sequência do gene *DOA* (exon 2), que caracterizam o gene *JO*: SNP 350C/T, que promove a substituição do aminoácido Threonina para Isoleucina na posição 117 (Thr117Ile) da cadeia polipeptídica da proteína Dombrock e o SNP silencioso 378C/T (Figuras 1 e 2 e Tabela 1) (**RIOS et al., 2002a**).

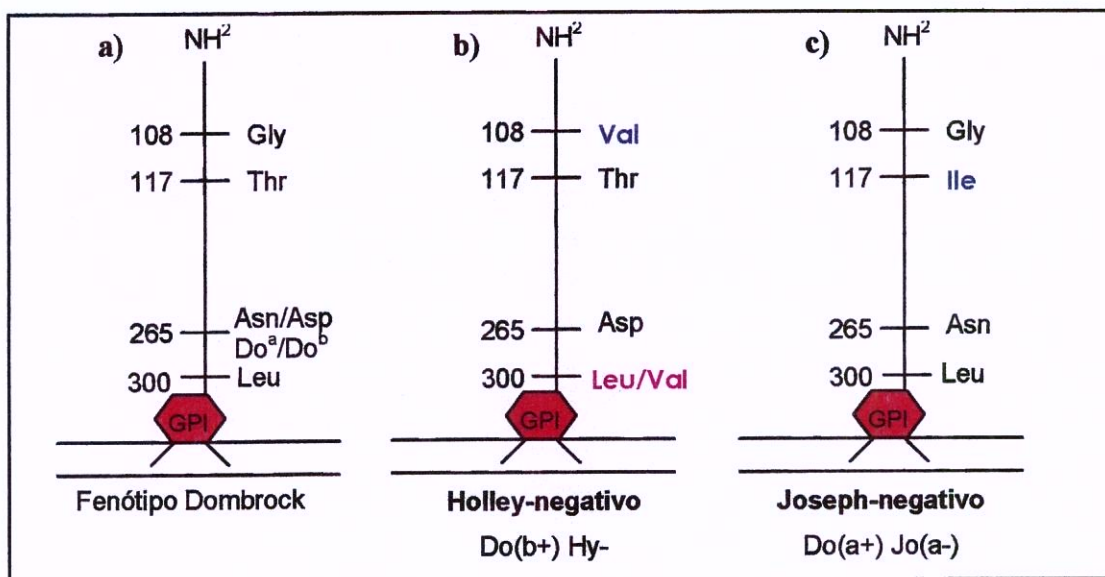


Figura 1: Localizações das substituições dos aminoácidos associados aos fenótipos Dombrock: a) Do^a/Do^b; b) Holley negativo (Hy-); c) Joseph negativo (Jo(a-)).

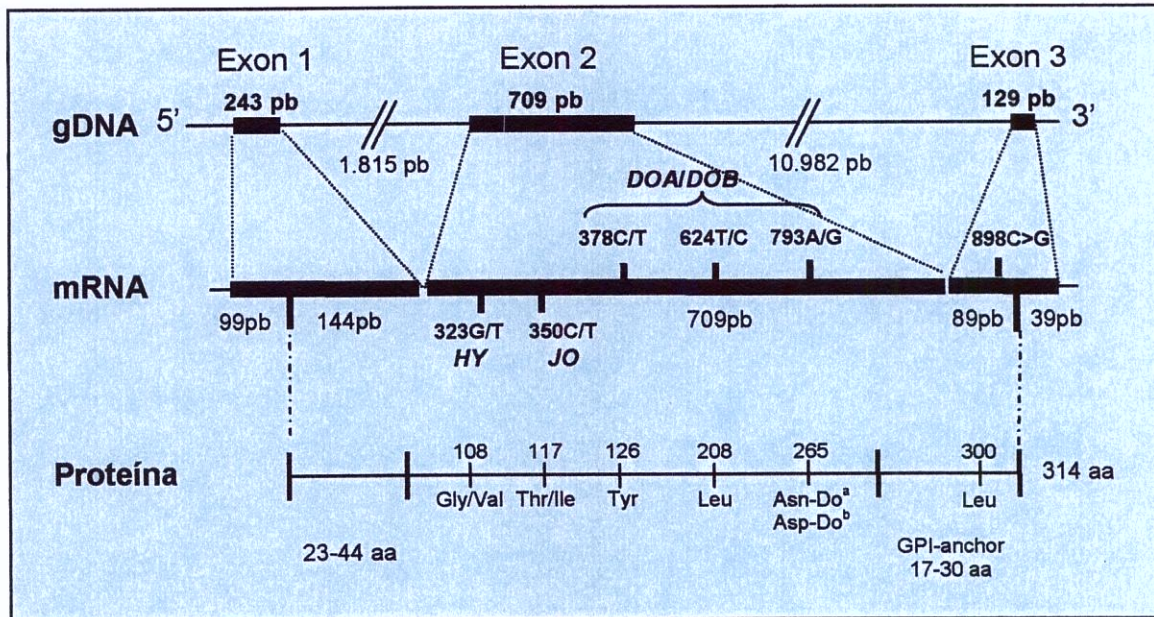


Figura 2: Representação esquemática do gene Dombrock (DO).

O fenótipo Hy-negativo está associado à presença de dois alelos: *HY1* e *HY2*. O alelo *HY2* é caracterizado por 2 SNPs, na sequência do gene *DOB* (exon 2): SNP 323G/T que promove a substituição do aminoácido Glicina por Valina na posição 108 (Gly108Val) da cadeia polipeptídica da proteína Dombrock e o SNP silencioso 378T/C. Um SNP adicional 898C/G, no exon 3, que promove a substituição do aminoácido Leucina por Valina na posição 300 (Leu300Val), caracteriza o gene *HY1*. A diminuição da expressão dos antígenos Gy^a e Do^b nas hemácias de pessoas com o fenótipo Hy-negativo foi relacionada à presença do nucleotídeo 898G (RIOS et al, 2002a).

O fenótipo Gy(a-) (Do null) foi associado a 4 mecanismos moleculares independentes (RIOS et al, 2001b; RIOS et al, 2002b; LUCIEN et al, 2002) (Tabela 2).

Tabela 2 - Bases moleculares associadas aos fenótipos Dombrock null.

Gy(a-)	Mecanismos moleculares	Substituição do aminoácido	Referências bibliográficas
GY1, 2, 3 DO null; Gy(a-)	Mutação a/g no sítio de splice do intron 1	Não transcrição do exon 2 do alelo <i>DOB</i>	RIOS et al, 2001b
GY4 DO null; Gy(a-)	Mutação t/c no sítio de splice do intron 1	Não transcrição do exon 2 do alelo <i>DOB</i>	RIOS et al, 2002b
GY5 DO null; Gy(a-)	SNP 442C/T (exon 2 - alelo <i>JO</i>)	Gln148STOP	RIOS et al, 2002b
DO null; Gy(a-)	Deleção 343-350 Exon 2 – alelo <i>DOA</i>	114 fs + X	LUCIEN et al, 2002

Os estudos relativos à frequência dos antígenos e dos genes Dombrock estavam até recentemente restritos apenas à frequência do antígeno Do^a, devido à escassez de anti-soros de boa qualidade. A elucidação das bases moleculares do sistema Dombrock e o desenvolvimento e padronização de técnicas de genotipagem molecular permitiram que novos estudos sobre a frequência dos alelos *DO* fossem realizados em diferentes populações e que novos polimorfismos fossem identificados (STORRY et al, 2003; ARAUJO et al, 2003; LIU et al, 2003; HASHMI et al, 2005). Recentemente, foram descritos dois novos alelos Dombrock, *DOB-SH* (378C, 624C, 793G) e *DOA-HA* (378T, 624T, 793A), que não alteram a estrutura ou expressão dos antígenos Dombrock, descritos anteriormente (HASHMI et al, 2005).

Considerando que as bases moleculares dos antígenos Dombrock foram elucidadas, que novos alelos têm sido descritos, a miscigenação da população brasileira e, que até o presente momento, nenhum estudo foi realizado sobre a frequência dos genes Dombrock nesta população, acreditamos que novos alelos possam ser identificados.

Além disto, a importância clínica e a dificuldade na fenotipagem dos antígenos deste sistema nos faz acreditar que a genotipagem Dombrock pode ser uma ferramenta útil na rotina transfusional.

Diante da complexidade do sistema Dombrock, estudos de frequências gênicas em diferentes populações são importantes para a definição dos haplótipos *DO* e padronização de técnicas moleculares que possam ser aplicadas na clínica.

OBJETIVOS

Considerando a importância clínica e a dificuldade na determinação dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo Dombrock e, o fato de não existirem estudos de frequência dos polimorfismos *DO* na população brasileira, nossos objetivos foram :

- Determinar a frequência dos alelos Dombrock na população brasileira;
- Identificar novos polimorfismos do sistema Dombrock;
- Validar técnicas moleculares de genotipagem dos alelos *DO*.
- Realizar análises da expressão dos antígenos Dombrock.

MATERIAL E MÉTODOS

A. MATERIAL

1. Amostras

Após consentimento informado foram coletadas 450 amostras de sangue periférico, anticoaguladas com EDTA: 288 amostras foram colhidas de doadores atendidos no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília e 162 amostras de doadores voluntários de sangue atendidos no Hemocentro da Unicamp entre o período de junho de 2003 a janeiro de 2005.

2. Antisoros

Foram utilizados dois antisoros monoclonais murinos em estudos de expressão dos antígenos Dombrock: anti-proteína Dombrock (MIMA-52) e anti-Do^b (MIMA-123), gentilmente cedidos pela Dra Marion Reid do New York Blood Center, NY, USA.

3. Cartões gel

Para a realização da fenotipagem Dombrock, com os antisoros monoclonais murinos MIMA-52 e MIMA-123, foram utilizados cartões de gel centrifugação ID-Card "PNH test" (DiaMed-AG) compostos por 6 microtubos contendo gel Sephadex G 100 e soro antiglobulina IgG anti-mouse.

4. Suspensão de hemácias

Foram preparadas suspensões de hemácias a 1% em solução salina tamponada (0.86%) pH 7.2 (PBS).

5. Solução de salina 0,86%

A solução de salina a 0,86% foi preparada utilizando-se 8,6 gramas de NaCl (PA) em 1000 ml de H₂O destilada.

6. Solução de fosfato dibásico de sódio anidro 0,1 m (Na₂HPO₄)

A solução de Na₂HPO₄ foi preparada diluindo-se 14,21 gramas de Na₂HPO₄ (anidro) em 1000 ml destilada.

7. Solução de fosfato de potássio monobásico anidro 0,1 m (KH₂PO₄)

A solução de KH₂PO₄ foi preparada diluindo-se 13,6 gramas de KH₂PO₄ (anidro) em 1000 ml destilada.

8. Solução salina (0,86%) tamponada pH 7,2

A solução salina tamponada foi preparada a partir de 900 ml de solução salina, adicionando-se 70 ml de Na₂HPO₄ e 30 ml de KH₂PO₄.

9. Kit de extração de DNA

O Kit, EZ-DNA Genomic DNA Isolation, utilizado para extração das amostras de DNA foi obtido da Biological Industries Ltd – Kibbutz Beit Haemek – 25115, Israel.

10. dNTPs

Os nucleotídeos dATP, dCTP, dGTP, dTTP foram obtidos da Invitrogen®, Carlsbad, CA. A concentração de dNTPs 2 mM utilizada nas reações de PCR foi obtida diluindo-se 20 µl de cada nucleotídeo em 920 µl de água deionizada e destilada (ddH₂O).

11. Taq DNA polimerase

A enzima Taq DNA polymerase, utilizada nas reações de PCR, foi obtida da Invitrogen®, Carlsbad, CA. O kit é composto de: 5 unidades/ μ l de enzima, 1 ml de tampão 10 X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4) e 500 mM de KCL) e 1 ml de $MgCl_2$ 50 mM.

12. Solução estoque de tampão Tris-Borato-EDTA (10x) (TBE)

Este tampão foi preparado, dissolvendo-se 108 g de Tris (Sigma Chemical CO ® St Louis), 55 g de ácido bórico (Sigma Chemical CO ® St Louis) e 40 ml de EDTA 0,5 M, pH 8.0 (Sigma Chemical CO ® St Louis), diluído em quantidade suficiente para (q.s.p.) 1000 ml de água deionizada e destilada (ddH_2O).

13. Solução de uso tampão Tris-Borato-EDTA (1x) (TBE)

A solução de uso foi preparada diluindo-se 100 ml da solução estoque Tris-Borato-EDTA em 900 ml de água destilada.

14. Gel de agarose a 3%

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 3 g de agarose (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD) em 100 ml de TBE 1X. Esta solução era aquecida em forno de microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, adicionava-se 50 μ g de brometo de etídio (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD).

**BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP**

15. Gel de agarose a 2%

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 2 g de agarose (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD) em 100 ml de TBE 1X. Esta solução era aquecida em forno de microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, adicionava-se 50 µg de brometo de etídio (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD).

16. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares de 25 pb, 50 pb e 100 pb, foram obtidos da Invitrogen®, Carlsbad, CA

17. Enzimas de restrição

As enzimas de restrição, *Eam*1105I, *Bsa* I, *Xcm* I, *A/w* 26I, utilizadas nas análises foram obtidas da New England Biolab®, MBI Fermentas®, Amherst, NY.

18. Big Dye

Este reagente utilizado no preparo das reações para o seqüenciamento automático de DNA foi obtido da BD Half-term, GenPak, Perkin Elmer Biosystems .

19. Concert rapid gel extraction system

Este kit obtido da Invitrogen®, Carlsbad, CA, foi utilizado na extração e purificação do DNA contido em gel de agarose para subsequente reação de seqüenciamento automático de DNA .

20. Concert rapid PCR purification system

O Kit utilizado na purificação da reação de PCR para subsequente reação de seqüenciamento automático de DNA foi obtido da Invitrogen®, Carlsbad, CA.

B. MÉTODOS

1. Extração do DNA

As extrações de DNA foram realizadas em um tubo cônico de plástico com volume de 1,5 ml, a partir de uma alíquota 500 µl de sangue total, adicionando-se 1000 µl de solução de lise de hemácias. A reação era homogeneizada lentamente por inversão do tubo, durante 10 minutos. Após a lise, a reação era centrifugada a 13.000 *rpm*, durante 3 minutos e, após centrifugação, descartava-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta automática. A operação era repetida com 500 µl da solução de lise. Após a segunda lise adicionava-se 500 µl de EZ-DNA, e a reação era homogeneizada e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente.

2. Precipitação do DNA com etanol.

Para precipitação do pellet de DNA adicionava-se 500 µl de etanol absoluto. A reação era homogeneizada e incubada por 3 minutos a temperatura ambiente. Após a precipitação do pellet de DNA a reação era centrifugada a 13.000 *rpm* durante 3 minutos e o sobrenadante retirado com o auxílio de uma pipeta automática. O pellet de DNA era lavado por duas vezes adicionando-se a cada lavagem 500µl com etanol a 95% e, após homogeneização, a reação era centrifugada a 13.000 *rpm* durante 1 minuto. O sobrenadante era então desprezado por inversão do tubo e, após secar a temperatura ambiente. O pellet de DNA era então suspenso em 100 µl de tampão TrisEDTA pH 8,0.

2. Genotipagem Dombrock por PCR-RFLP

Para a determinação da frequência dos alelos Dombrock e identificação de novos polimorfismos Dombrock, foram realizadas análises moleculares através das técnicas de **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**, seguida da análise dos produtos de PCR por digestão com a utilização de endonucleases de restrição (**RFLP**). As análises moleculares realizadas pela técnica de PCR-RFLP foram utilizadas para investigar a presença de 4 SNPs (323G/T, 350C/T, 793A/G e 898C/G). As seqüências genômicas do gene *DO* foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se como “templates” DNA genômico total. Foram utilizados três pares de primers com as seqüências descritas por **RIOS et al., 2002**. Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador Perkin Elmer 9700 (Foster City, CA) e variaram de acordo com o par de “primers” utilizados (**Tabela 3**).

Tabela 3: Primers e enzimas de restrição utilizadas nas análises por PCR-RFLP

Primers	CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO	Produto	Enzimas de restrição	Fragmentos de restrição	
DoABF DoABR	5'-CACTTTAATGCCTACACAGGGACCAGTCGA-3' 5'-TATGTGCTCAGGTTCCAGTTGACCTCAACGACAAC-3' 95°C por 15 minutos; 94°C por 20 segundos; 62°C por 20 segundos; 72°C por 20 segundos; durante 35 ciclos. Então 72°C por 10 minutos; e 4°C.	257pb	<i>Eam</i> 1105I (793A/G)	230, 27 (DOA)	196, 34, 27 (DOB)
DoX2F Do378R	5'-TCAGTACCAAGGCTGTAGCA-3' 5'-AGTAAAGTCAGAATGAACATTGCACAAT-3' 95°C por 15 minutos; 94°C por 20 segundos; 58°C por 20 segundos; 72°C por 20 segundos; durante 35 ciclos. Então 72°C por 10 minutos; e 4°C.	220 pb	<i>Bsa</i> I (323G/T) <i>Xcm</i> I (350C/T)	120, 92, 8 (323G) 167, 53 (350C)	212, 8 (323T-HY) 220 (350T-JO)
DoEx3F DoEx3R	5'-TCAATGGATAGATGAGGTAG-3' 5'-TGGTTTCAGCAGAAGTATGA-3' 95°C por 15 minutos; 94°C por 20 segundos; 55°C por 20 segundos; 72°C por 20 segundos; durante 35 ciclos. Então 72°C por 10 minutos; e 4°C.	291 pb	<i>A</i> lv 26I (898C/G)	291 (898C)	170, 121 (898G)

A reação em cadeia da Polimerase (PCR), utiliza 20 a 200 ng de DNA, 50 pmol de cada *primer*, 2 nmol de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase e tampão em um volume final de 50 µl.

Os produtos de PCR amplificados foram submetidos à ação de endonucleases de restrição: *Eam* 1105 I, *Bsa* II, *Xcm* I, *A/w* 26I, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A análise dos fragmentos obtidos com digestão enzimática foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 3%.

3.1 Genotipagem *DOA/DOB*

A genotipagem *DOA/DOB* (SNP 793A/G) foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se o par de *primers* DoABF e DoABR, que permite a amplificação de um produto com 257 pb, do exon 2 do gene *DO* (**Tabela 3**).

O produto obtido por PCR era submetido à ação da enzima de restrição *Eam*1 105I, que reconhece como sítio específico de clivagem a sequência genômica 5'...GACNNN↓NNGTC...3'. Dessa forma, quando o alelo *DOA* está presente, a enzima *Eam*1 105I reconhece apenas um sítio de clivagem no produto da PCR gerando dois fragmentos de restrição, um com 230 pb e outro com 27 pb (não observado na eletroforese). No produto de PCR onde o alelo *DOB* está presente a enzima *Eam*1 105I reconhece um segundo sítio de restrição, no fragmento de 230 pb, dando origem a mais dois fragmentos de restrição, um com 196 pb e outro com 34 pb. Os fragmentos de restrição apresentavam diferentes padrões de migração quando submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% (**Figura 3**).

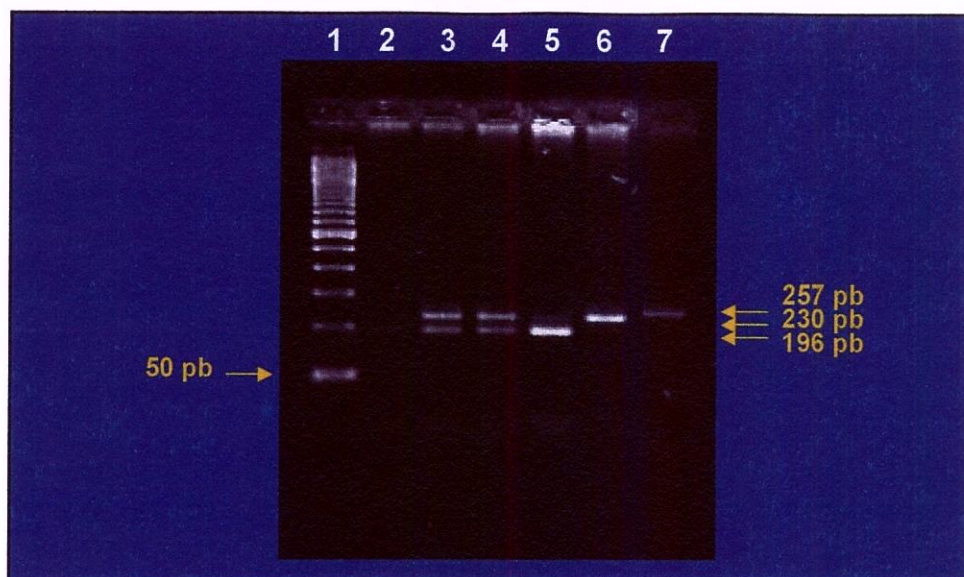


Figura 3: PCR-RFLP para genotipagem *DOA/DOB* (793A/G). Linha 1: Marcador de peso molecular. Linhas 2 e 5: amostras *DOB/DOB*. Linhas 3 e 4: amostras *DOA/DOB*. Linha 6 : amostra *DOA/DOA*. Linha 7: produto de PCR.

3.2. Genotipagem Holley (*HY*)

A genotipagem *HY* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se o par de *primers*, DoX2F/Do378R, que permite a amplificação de um produto com 220 pb, do exon 2 do gene *DO* (**Tabela 3**).

O produto obtido por PCR era submetido à ação da enzima de restrição *Bsa* *JI* que reconhece como sítio específico de clivagem a seqüência genômica 5'...C↓CNNGG...3'. Dessa forma, na ausência do nucleotídeo 323T (alelo *HY*), a enzima *Bsa* *JI* reconhece dois sítios de clivagem no produto da PCR, que davam origem a 3 fragmentos de restrição: um com 120 pb, outro com 92 pb e um terceiro fragmento com 8 pb, não visualizado na eletroforese. Na presença do alelo *HY* o segundo sítio de restrição é abolido e apenas dois fragmentos de restrição são gerados após a reação de RFLP, um com 212 pb e outro com 8 pb (**Figura 4**).

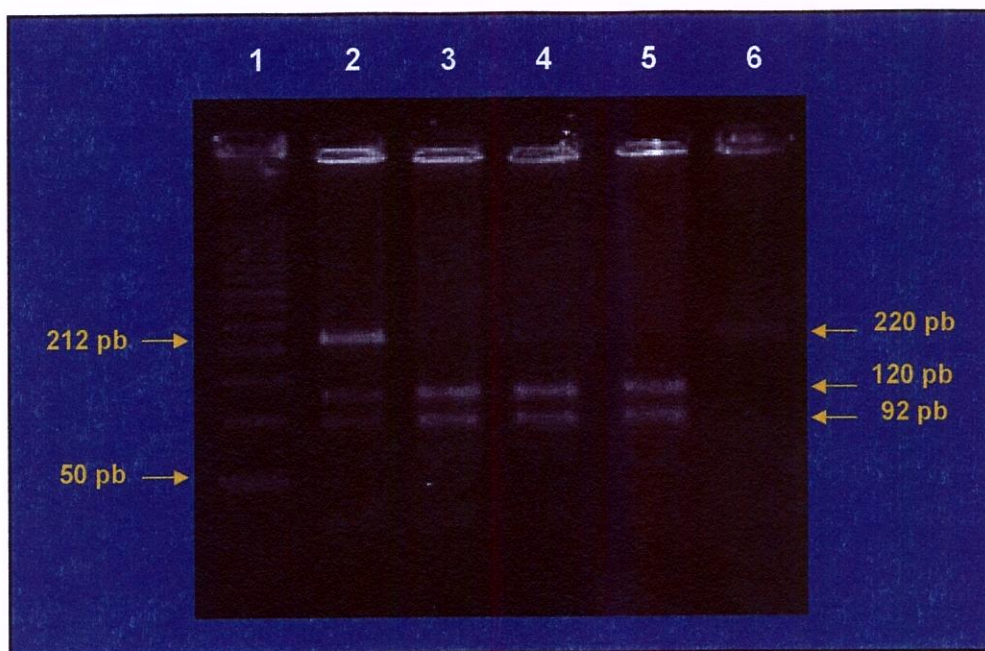


Figura 4: PCR-RFLP para genotipagem *HY* (323G/T): Linha 1: marcador de peso molecular. Linha 2 amostra *HY/DO*. Linhas 3, 4 e 5: amostras normais. Linha 6: produto de PCR.

3.3 Genotipagem Joseph (*JO*)

A genotipagem *JO* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se o par de *primers*, DoX2F/Do378R, que permite a amplificação de um produto com 220 pb, do exon 2 do gene *DO* (**Tabela 3**).

O produto obtido por PCR era submetido à ação da enzima de restrição *Xcm I* que reconhece como sítio específico de clivagem a sequência genômica 5'...CCANNNNN↓NNNNTGG...3'. Dessa forma, na ausência do nucleotídeo 350T (alelo *JO*), a enzima *Xcm I* reconhece um sítio de clivagem no produto da PCR que dá origem a 2 fragmentos de restrição: um com 167 pb e outro com 53 pb. Na presença do alelo *JO* o sítio de restrição é abolido e o produto da PCR permanece com 220 pb (**Figura 5**).

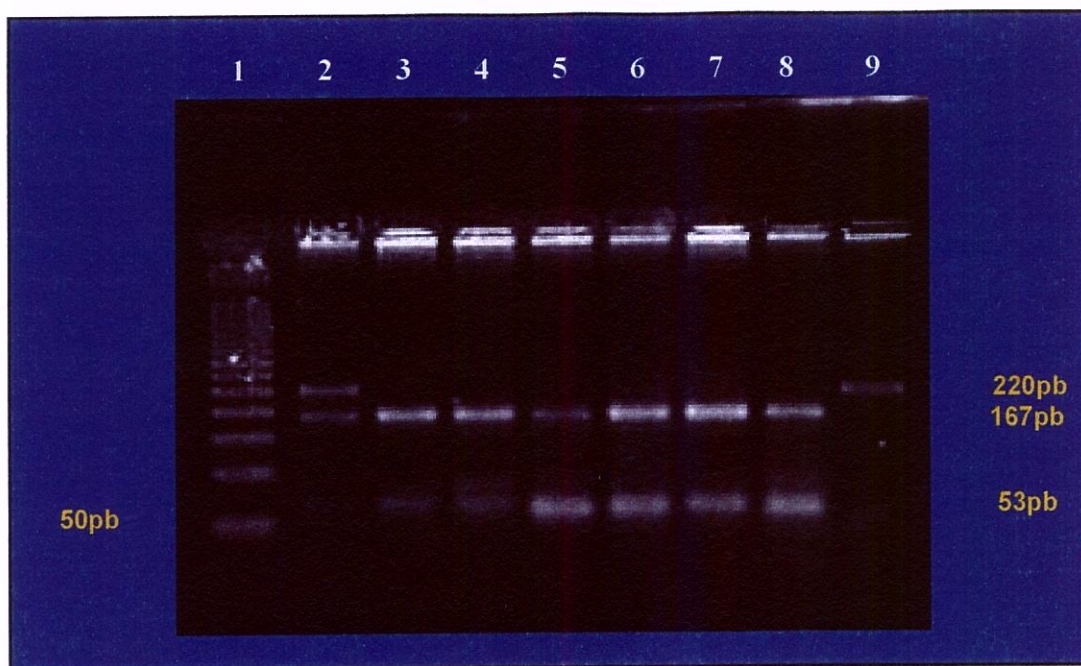


Figura 5: PCR-RFLP para genotipagem JO (350C/T). Linha 1: Marcador de peso molecular. Linha 2: amostra JO/DO. Linhas 3-8: amostras normais. Linha 9: amostra produto de PCR.

3.4. Genotipagem dos alelos HY1/HY2

A genotipagem dos alelos HY1/HY2 (SNP 898C/G) foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se o par de *primers*, DoEx3F/DoEx3R que permite a amplificação de um produto com 291 pb, do exon 3 do gene DO (**Tabela 3**).

O produto obtido por PCR com era submetido à ação da enzima de restrição *A/w 26/* que reconhece que reconhece como sítio específico de clivagem a sequência genômica 5'...GTCTC(1/5)↓...3'. Dessa forma, na presença do SNP 898G, a enzima *A/w 26/* reconhece um sítio de clivagem no produto de PCR que dá origem a dois fragmentos e restrição, um com 170 pb e outro com 121 pb. Na ausência do nucleotídeo 898G o sítio de restrição é abolido e o produto da PCR permanece com 291 pb (**Figura 6**).

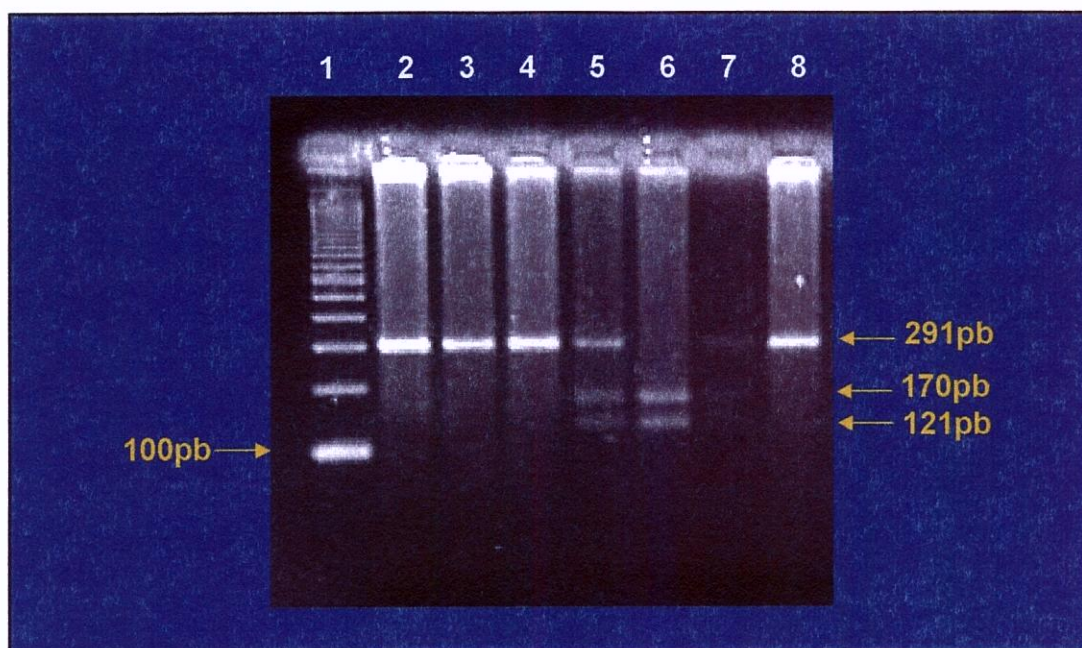


Figura 6: PCR-RFLP para genotipagem SNP 898C/G. Linha1: marcador de peso molecular. Linhas 2, 3 e 4: amostras 898C/C. Linhas 5 e 7: amostras 898C/G. Linha6: amostra 898G/G. Linha 8: produto de PCR.

4. Genotipagem Dombrock por Microarrays®

A análise molecular por microarrays é realizada através de uma única reação de PCR-multiplex seguida de uma reação de “alongamento” (**extensão**) de cada produto gerado pelo PCR, após hibridização com seu alelo específico, em um sistema chamado “bead arrays” (BeadChip™ Technology, BioArrays Solutions Ltd., Warren, NJ, USA). As análises moleculares envolvendo esta técnica foram utilizadas para investigar a presença de 5 SNPs (323G/T, 350C/T, 793A/G, 378C/T e 624T/C).

4.1 Reação de PCR multiplex e seleção da fita DNA

A amplificação foi realizada em um único tubo utilizando-se alíquotas de DNA genômico, extraídas de sangue periférico. Todos os ensaios incluíam amostras controle

com genótipos conhecidos nas formas: homozigoto para o “alelo A”, homozigoto para o “alelo B” e heterozigoto (A/B), de cada SNP analisado.

A reação de PCR foi realizada utilizando-se entre 100 e 250 ng de DNA, solução tampão (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 50mmol/L de KCl, 0,1% Triton X-100), 3,5 mmol/L MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTP e 5 unidades de DNA polimerase. O excesso de primers dNTP era removido pela adição de ExoSAPIT (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ).

Na reação de PCR multiplex foi utilizado um painel composto por 14 pares de “primers” alelos específicos, desenvolvido para identificar 18 SNPs relacionados a antígenos de grupos sanguíneos (placa HEA-18) e, entre eles 5 SNPs (323G/T, 350C/T, 793A/G, 378C/T e 624T/C) associados às bases moleculares dos alelos Dombrock (DOA/DOB, HY, JO).

O produto gerado pela reação de PCR resulta em 14 segmentos de DNA, os quais após purificação são submetidos a uma reação de alongamento com sondas de oligonucleotídeos alelos específicos ligadas covalentemente a microesferas (beads) de uma lâmina de vidro, formando um sistema de chips.

A seleção da fita única (simples) de DNA foi realizada pela digestão enzimática do produto de PCR contendo primers fosforilados, incubando o produto de PCR com 0,5 unidades de λ-exonuclease (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ) a 37°C por 25 minutos, seguida da inativação da enzima a 75°C por 10 minutos.

4.2 Reação de extensão da fita simples de DNA

A extensão foi realizada pela técnica de “elongation-mediated multiplex analysis of polymorphisms” (eMAP) que consiste de pares de sondas de oligonucleotídeos alelo-específicos compostas por 20 a 21 nucleotídeos sintetizadas de forma a conter um nucleotídeo na região 3' variável de acordo com os polimorfismos analisados e um grupo 5'-amino-terminal covalentemente ligado com uma carboxila sobre as “beads”.

A reação foi realizada utilizando-se uma alíquota de 10µl de DNA de fita simples (amplicons) de cada amostra e um mesmo volume de um cocktail contendo 3 unidades da enzima Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ), tampão enzimático TAMRA-desoxicitosina (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ) e 1 µmol de cada dNTP não marcada.

Um volume de 15µl desta mistura foi colocado em um Beadchip™ montado em uma lâmina de vidro. A reação foi incubada a 53°C por 15 minutos e então lavada 3 vezes com água destilada. O protocolo utilizado na reação de microarray encontra-se simplificado na Figura 7.

4.3 Aquisição e análise das imagens da reação de Microarray

As imagens do BeadChip™ eram então adquiridas e os dados analisados. Após a identificação do código de barras a imagem era escaneada e adquirida de cada chip. O software combinava a imagem do ensaio com a informação pré-existente nas beads e gerava resultados como gráficos em barras ou genótipos (AA, AB, BB) (Figura 8).

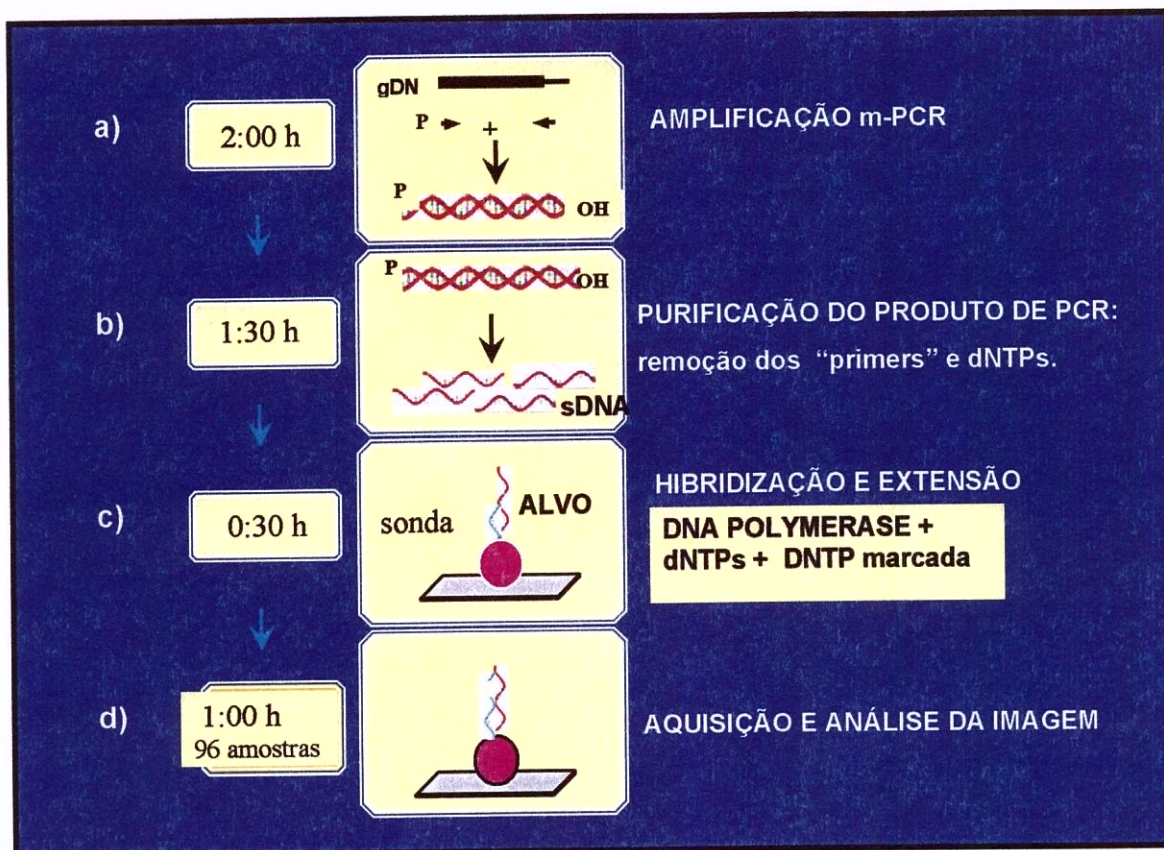


Figura 7: Protocolo simplificado da reação de microarray. a) reação de PCR multiplex. b) seleção da fita simples de DNA. c) Hibridização e extensão. d) aquisição e análise.

5. Seqüenciamento direto de DNA genômico - gene *DO*

As amostras que apresentaram novas combinações entre os SNPs estudados (novos alelos Dombrock), foram seqüenciadas através de seqüenciamento direto do produto de PCR. Os produtos de PCR foram eluídos do gel de agarose a 1% utilizando-se o Kit de extração Concert rapid gel extraction system ou purificados direto do tubo de PCR com o auxílio do Concert rapid PCR purification system e seqüenciados diretamente em ambas direções com o reagente Big Dye, em um seqüenciador automático ABI 373XL (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA, USA).

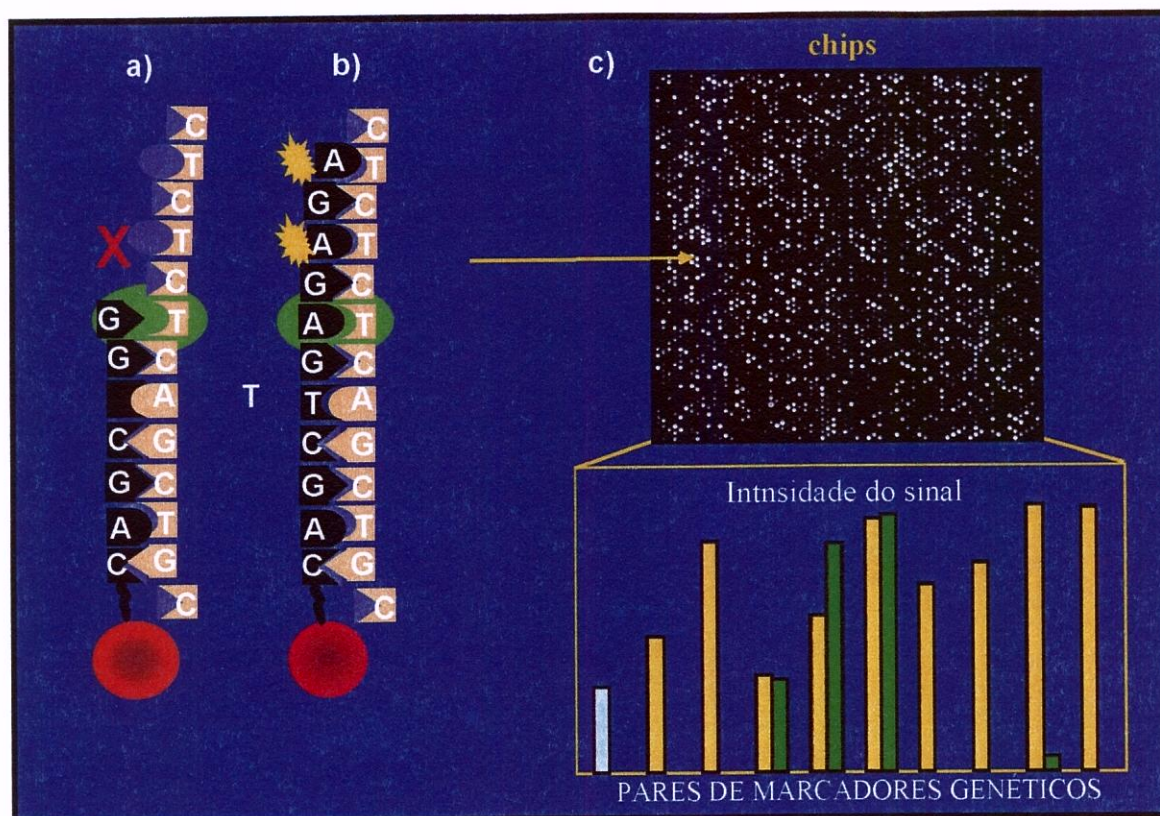


Figura 8: Representação esquemática da aquisição da imagem do BeadChip.
a) ausência de hibridização (reação negativa). b) Hibridização e extensão sobre a bead (reação positiva). c) aquisição da imagem.

6. Análise da expressão do antígeno Do^b e da proteína Dombrock (DO).

Foram realizadas análises da expressão dos antígenos Dombrock através das técnicas de fenotipagem eritrocitária e citometria de fluxo, com a utilização de anti-soros monoclonais anti-Do^b e anti-proteína Dombrock (anti-DO) obtidos do New York Blood Center.

6.1. Fenotipagem eritrocitária

A fenotipagem eritrocitária foi realizada através do método de hemaglutinação em coluna de gel. Foram utilizados dois microtubos para cada amostra, devidamente

identificados com o número da amostra e o anti-soro utilizado para fenotipagem. Em cada um dos microtubos foi adicionada uma alíquota de 50 µl de hemácias em teste, a 1% em solução fisiológica tamponada. A seguir, 25 µl dos anti-soros anti-Do^b (MIMA-123) e anti-DO (MIMA-52) nos microtubos correspondentes. Após a incubação de 15 minutos em incubadora a 37°C os cartões foram submetidos à centrifugação a 1200 *rpm* por 10 minutos.

A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação das hemácias, sendo consideradas positivas para o antígeno as amostras que apresentavam reação de aglutinação de 1+ a 4+ (**Figura 9**).

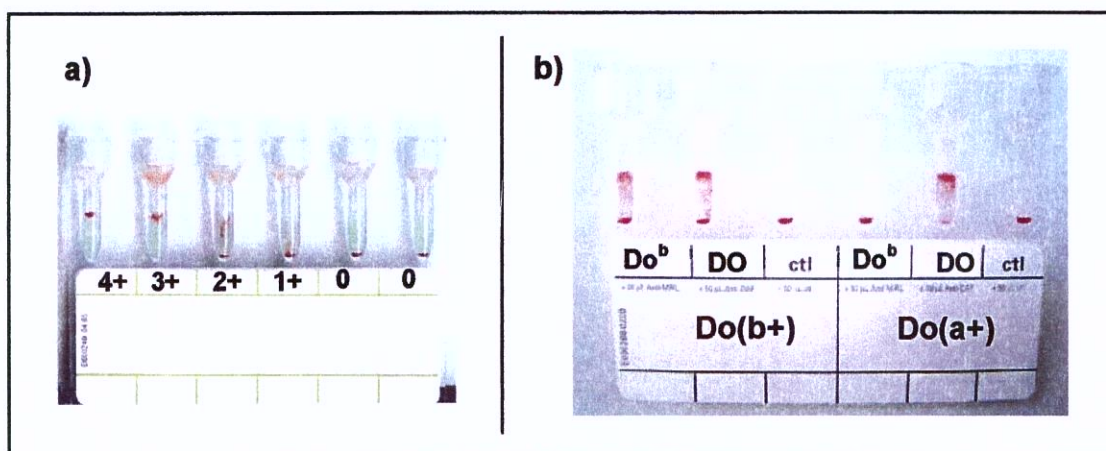


Figura 9: Fenotipagem sangüínea Dombrock. a) intensidade das reações de hemaglutinação; b) cartão de fenotipagem Dombrock, demonstrando a interpretação de dois dos possíveis resultados obtidos na fenotipagem.

A interpretação dos resultados foi realizada conforme os seguintes critérios: reação positiva (hemaglutinação) com o anti-DO e negativa com anti-Do^b considerou-se o fenótipo Do(a+b-) e a ocorrência de hemaglutinação com os dois anti-soros considerou-se

duas possibilidades fenotípicas, Do(a+b+) ou Do(a-b+), definidos posteriormente pelos resultados da genotipagem.

6.2. Citometria de fluxo

A expressão do antígeno Do^b e da proteína DO foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando os anticorpos monoclonais murinos, anti-Do^b (MIMA 123) e anti-Proteína Dombrock (MIMA-52) e incluíram 7 amostras com diferentes genótipos Dombrock: uma amostra *DOA/DOA* (controle negativo para Do^b e controle positivo para proteína Do); uma amostra *DOB/DOB* (controle positivo para Do^b e proteína Do); duas amostras *DOA/DOB* 898C homozigotas (controles positivos para Do^b e proteína Do) e três amostras *DOA/DOB* 898C/G heterozigotas (amostras testes).

Foram preparadas suspensões de hemácias lavadas e diluídas a 1% em PBS, de cada um dos genótipos selecionados e então, 100 µl de cada suspensão era incubado com 50 µl de cada antisoro, em tubos distintos por 30 minutos em banho maria a 37°C. Após a incubação, as hemácias eram lavadas por duas vezes com 2 ml de PBS, por centrifugação a 3.400 rpm durante 30 segundos a cada vez. Após a lavagem as hemácias eram incubadas com 20 µl anti-imunoglobulina+FITC (isotiocianato de fluoresceína), durante 20 minutos em temperatura ambiente e após a incubação, repetia-se a lavagem das hemácias e então era preparada uma suspensão de hemácias a 0,2%, adicionando-se 500 µl de PBS.

As amostras foram analisadas utilizando-se o equipamento de citometria de fluxo FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson and Company) equipado com um laser de argônio de 15-mW, operando a 488 nm e detector de fluorescência com um filtro de 525-

BP (bandpass). Os dados foram analisados pelo software modular system FACStation Data Management system featuring Macintosh® computer and Cell Quest™. Cada suspensão de hemácias foi inicialmente analisada por tamanho e granularidade para marcação do “gate”, ajustado com detector ajustado para amplificação logarítmica. Após aquisição dos dados a análise foi realizada por dot plot (FL1 e FL2) ou histograma de parâmetro único (FL1).

RESULTADOS

1. Resultados da Genotipagem Dombrock

A genotipagem foi realizada em 450 amostras de DNA utilizando-se as técnicas de **PCR-RFLP** (288 amostras) e **Microarrays® - HEA Beadchip** (162 amostras). Foi investigado a presença dos SNPs 793A/G (alelo *DOA/DOB*), 323G/T (alelo *HY*), 350C/T (alelo *JO*), o SNP 898C/G (*HY1*) e os SNP 378C/T e 624T/C.

Os genótipos foram definidos pela combinação entre os SNPs que caracterizam cada um dos alelos Dombrock, de acordo com critérios descritos na literatura por **Rios et al (2002)**. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 4**.

A análise dos resultados revelou uma nova combinação entre o alelo *DOB* (793G e 323G) associado a 898G, associação esta que define um novo alelo por nós designado *DOB-WL*. Outra combinação encontrada foi entre o alelo *DOA* (793A) associada a 624C que também define um novo alelo, por nós designado de *DOA-SH* (**Tabela 5**).

Das 288 amostras de DNA estudadas por PCR-RFLP, 29 (10%) foram genotipadas como *DOA/DOA* (793A/A), 114 (39,6%) como *DOA/DOB* (793A/G) e, 132 (45,8%) como *DOB/DOB* (793G/G). Das 114 amostras genotipadas como *DOA/DOB*, 36 eram 898C/G (*DOA/DOB-WL*), representando 12,5% do total de amostras. Das 132 amostras genotipadas como *DOB/DOB*, 39 (13,54%) eram 898C/G (*DOB/DOB-WL*) e 1 (0,35%) era 898G/G (*DOB-WL/DOB-WL*). Todas as amostras genotipadas como *DOA/DOA* ou *DOA/JO* foram 898C homozigotas. O alelo *JO* foi encontrado em heterozigose em 7 (2,43%) amostras genotipadas como *JO/DOB* e em 1 amostra genotipada como *JO/DOA*. O alelo *HY* esta presente em heterozigose em 5 amostras: 1 *HY1/DOA*, 1 *HY2/DOA*, 1 *HY2/DOB* e 2 *HY1/DOB*.

Tabela 4: Resultados da Genotipagem Dombrock

Genótipo	SNPs						PCR- RFLP		BeadChip	
	nt 323	nt 350	nt 793	nt 898	nt 378	nt 624	Total	%	Total	%
<i>DOA/DOA</i>	G/G	C/C	A/A	C/C	C/C	T/T	29	10,07	20	12,35
<i>DOA-HA/DOA</i>	G/G	C/C	A/A		T/C	T/T			1	
<i>DOA/DOB</i>	G/G	C/C	A/G	C/C	C/T	T/C	114	39,58	71	43,83
<i>DOA/DOB-WL</i>	G/G	C/C	A/G	C/G			36	12,50		
<i>DOA/DOB-SH</i>	G/G	C/C	A/G		C/C	T/C			1	0,62
<i>DOA-SH/DOB</i>	G/G	C/C	A/G		C/T	C/C			1	0,62
<i>DOA-HA/DOB</i>	G/G	C/C	A/G		T/T	T/C			3	1,85
<i>DOB/DOB</i>	G/G	C/C	G/G	C/C	T/T	C/C	132	45,83	64	39,51
<i>DOB/DOB-WL</i>	G/G	C/C	G/G	C/G			39	13,54		
<i>DOB-WL/DOB-WL</i>	G/G	C/C	G/G	G/G			1	0,35		
<i>JO/DOA</i>	G/G	T/C	A/A	C/C	T/C	T/T	1	0,35	2	1,23
<i>JO/DOB</i>	G/G	T/C	A/G	C/C	T/T	T/C	7	2,43	3	1,85
<i>HY/DOA</i>	T/G	C/C	G/A				2	0,69	1	0,62
<i>HY1/DOA</i>	T/G	C/C	G/A	G/C			1	0,35		
<i>HY2/DOA</i>	T/G	C/C	G/A	C/C			1	0,35		
<i>HY/DOB</i>	T/G	C/C	G/G				3	1,04	1	0,62
<i>HY1/DOB</i>	T/G	C/C	G/G	G/C			2	0,69		
<i>HY2/DOB</i>	T/G	C/C	G/G	C/C			1	0,35		
Total de Amostras							288		162	

Das 162 amostras estudadas através da genotipagem realizada por MicroArrays®BeadChip, 20 (12,35%) eram *DOA/DOA*, 71 (43,83%) eram *DOA/DOB* e, 64 (39,51%) *DOB/DOB*. Das 20 amostras genotipadas como *DOA/DOA*, 1 (0,62%) era *DOA-HA/DOA*; Das 71 amostras *DOA/DOB*, 1(0,62%) era *DOA/DOB-SH*, 1(0,62%) *DOA-SH/DOB* e, 3 (1,85) eram *DOA-HA/DOB*. O alelo *JO* estava presente em 5 amostras: 2 (1,23%) *JO/DOA* e 3 (1,85%) *JO/DOB* enquanto que o alelo *HY* foi encontrado em 2 amostras: 1 (0,62%) *HY/DOA* e 1 (0,62%) *HY/DOB*. O novo alelo *DOA-SH* foi encontrado em somente uma amostra (*DOA-SH/DOB*).

A frequência dos alelos Dombrock nas amostras de Marília e de Campinas, obtidas através da genotipagem, encontram-se na **Tabela 5**.

Tabela 5: Frequência dos alelos Dombrock

Alelos	SNPs						Marília		Campinas	
	nt 323	nt 350	nt 793	nt 898	nt 378	nt 624	Total	%	Total	%
<i>DOA</i>	G	C	A	C	C	T	175	30,38	109	33,64
<i>DOA-HA</i>	G	C	A		T	T			4	1,23
<i>DOA-SH</i>	G	C	A		C	C			1	0,31
<i>DOB</i>	G	C	G	C	T	C	311	53,99	202	62,35
<i>DOB-WL</i>	G	C	G	G			77	13,37		
<i>DOB-SH</i>	G	C	G		C	C			1	0,31
<i>JO</i>	G	T	A	C	T	T	8	1,39	5	1,54
<i>HY</i>	T	C	G		C	C			2	0,62
<i>HY1</i>	T	C	G	G			3	0,52		
<i>HY2</i>	T	C	G	C			2	0,35		
Total de Alelos							576		324	

Do total de 576 alelos analisados por PCR-RFLP, 77 (13,37%) eram *DOB-WL*. O alelo *DOB* foi o mais freqüente, presente em 127 amostras em heterozigose e em 92 amostras em homozigose, representando 311 alelos (53,99% dos alelos encontrados). O alelo *DOA* foi encontrado em 29 amostras em homozigose e, em 117 amostras em heterozigose, representando 175 alelos (30,38% do total de alelos). A frequência do alelo *JO* foi 1,4% enquanto que a do alelo *HY* foi 0,9%. Os resultados obtidos demonstraram uma grande variedade de alelos Dombrock na população estudada.

Na genotipagem realizada por MicroArrays®, a frequência dos alelos Dombrock obtidas foram semelhantes às encontrada pela técnica de PCR-RFLP. Como esta análise não incluiu a presença do SNP 898C/G não foi possível distinguir os alelos *HY1* e *HY2*.

2. Seqüenciamento do alelo *DOB-WL*.

A presença de 898G associado a 793G (alelo *DOB*) que caracteriza o alelo *DOB-WL*, foi confirmada pelo seqüenciamento direto do produto de PCR em 3 amostras de DNA (**Figura 10**).

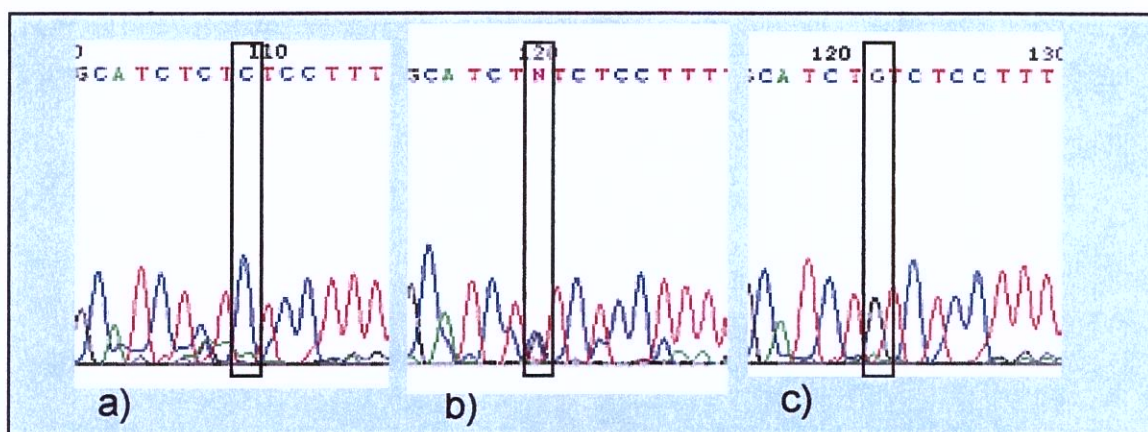


Figura 10: Representação gráfica dos resultados obtidos por seqüenciamento do gene *DO*.
a) amostra homozigota *DOB/ DOB* (898C/C); b) amostra heterozigota *DOB/ DOB-WL* (898C/G); c) amostra homozigota *DOB-WL/DOB-WL* (898G/G).

3. Expressão dos antígenos Dombrock

3.1 Resultados da Fenotipagem Dombrock.

A fenotipagem Dombrock foi realizada em 176 amostras de hemácias de doadores voluntários de sangue, empregando-se anti-soros monoclonais murinos não comerciais: anti-proteína Dombrock (anti-DO) e anti-Do^b. Houve concordância entre os resultados da fenotipagem e genotipagem em 174 amostras. Duas amostras que apresentaram na genotipagem o alelo *HY* (793G/323T) em heterozigose com o alelo *DOA* (*HY1/DOA* e *HY2/DOA*), não reagiram com o anti-soro anti-Do^b.

3.2 Resultados da Citometria de Fluxo

Com a finalidade de avaliar a expressão da proteína Dombrock (DO) e do antígeno Do^b nas amostras que apresentaram o alelo *DOB-WL*, foi realizada análise por citometria de fluxo em 7 amostras de hemácias com diferentes genótipos (*DOB/DOB*; *DOA/DOB*, *DOA/DOB-WL*, *DOA/DOA*).

3.2.1 Expressão do antígeno Do^b.

A representação gráfica da análise da expressão do antígeno Do^b por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo monoclonal murino anti-Do^b está apresentada na Figura 11. A intensidade média de fluorescência obtida em cada amostra analisada encontra-se na Tabela 6.

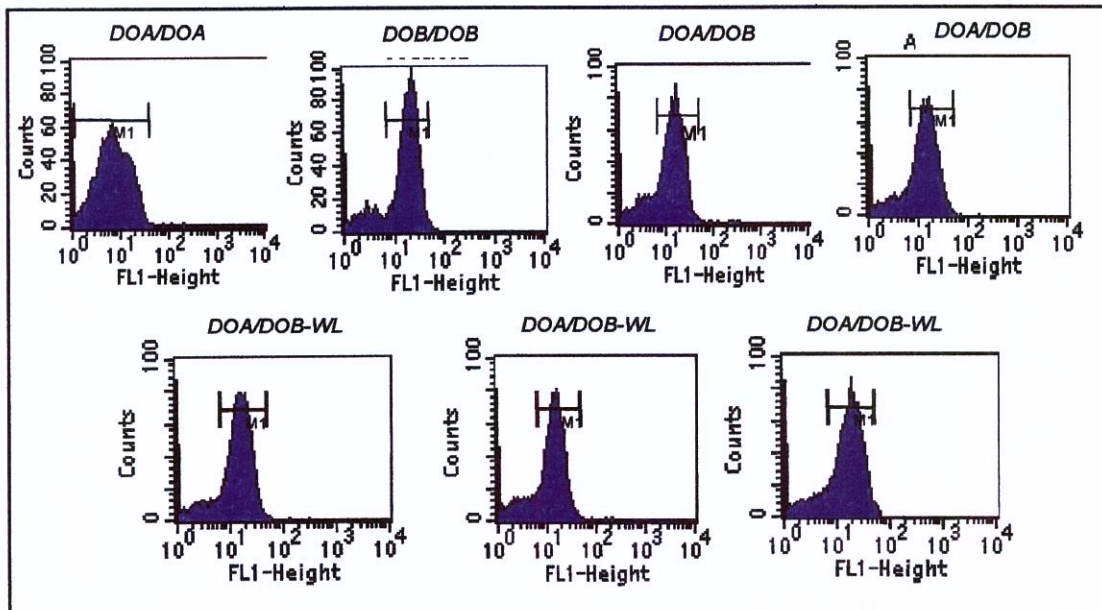


Figura 11: Análise por histograma da expressão do antígeno Do^b.

Tabela 6: Resultados da Intensidade média de fluorescência, obtida por citometria de fluxo, para análise de expressão do antígeno Do^b.

Intensidade	Amostras						
	DOA/DOA	DOB/DOB	DOA/DOB	DOA/DOB	DOA/DOB-WL	DOA/DOB-WL	DOA/DOB-WL
Total	8.62	18.49	13.70	13.08	14.60	13.34	16.97
M1	8.67	20.81	15.86	15.11	16.56	15.51	18.42

A amostra *DOB/DOB* apresentou a maior intensidade média de fluorescência. Não houve redução da expressão do antígeno Do^b nas hemácias com o genótipo *DOA/DOB-WL* quando comparadas com as hemácias com o genótipo *DOA/DOB*.

3.2.2 Expressão da proteína Dombrock

A representação gráfica da análise da expressão da proteína Dombrock (DO) por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo monoclonal murino anti-DO está apresentada na **Figura 12**. A intensidade média de fluorescência obtida em cada amostra analisada encontra-se na **Tabela 7**. Não foi observada diminuição da expressão da proteína DO nas amostras com o alelo *DOB-WL*.

Tabela 7: Resultados da Intensidade média de fluorescência, obtida por citometria de fluxo, para análise de expressão da proteína DO.

Intensidade	Amostras						
	DOA/DOA	DOB/DOB	DOA/DOB	DOA/DOB	DOA/DOB-WL	DOA/DOB-WL	DOA/DOB-WL
All	35.09	37.96	37.90	35.91	36.89	40.66	40.70
M1	35.01	36.60	36.56	35.80	35.52	37.56	39.12

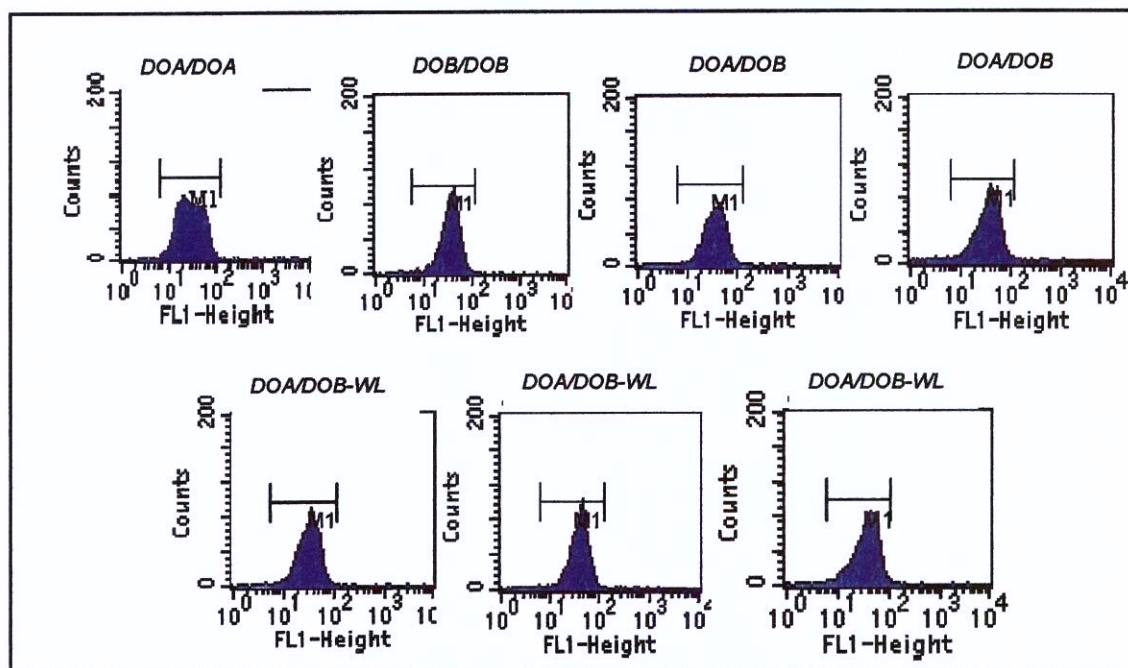


Figura 12: Análise por histograma da expressão da proteína DO.

DISCUSSÃO

1. Genotipagem Dombrock

As técnicas de genotipagem molecular têm sido cada vez mais utilizadas para diferenciar os alelos Dombrock devido às limitações dos reagentes utilizados nos testes de hemaglutinação (REID et al, 2005). Porém, até o momento, os trabalhos encontrados na literatura, com exceção de HASHMI (2005), contemplavam apenas a frequência dos alelos *DOA* e *DOB* pela determinação do polimorfismo 793A/G e não incluíam a determinação dos polimorfismos 323G/T e 350C/T, associados aos alelos *HY* e *JO*.

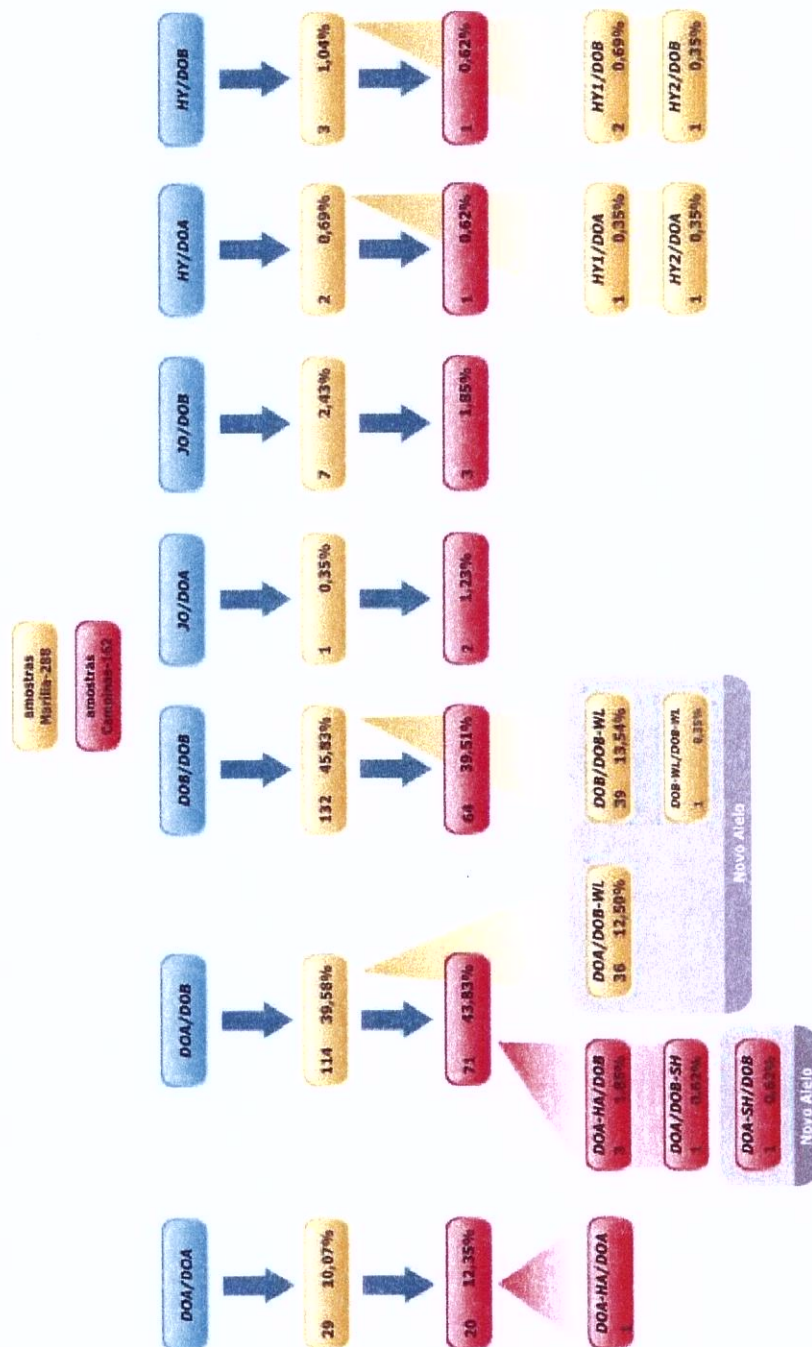
Em nosso estudo, os genótipos Dombrock foram determinados através da pesquisa dos SNPs: 793A/G (alelos *DOA* e *DOB*); 323G/T (alelo *HY*); 350C/T (alelo *JO*); 898C/G; 378C/T e 624 T/C. O resultado demonstrando a perda da expressão do antígeno *Do^b* em duas amostras genotipadas como 793G devido à presença do nucleotídeo 323T associado ao fenótipo Hy-negativo, leva-nos a crer que a inclusão da pesquisa do SNP 323C/T é imprescindível para a dedução correta dos fenótipos Dombrock. Podemos concluir que a genotipagem *DOA/DOB* baseada apenas na determinação 793A/G pode levar a erros de interpretação do fenótipo Dombrock a partir dos resultados do genótipo.

Os resultados da genotipagem Dombrock em nossas amostras permitiram identificar dois novos alelos, designados *DOB-WL* e *DOA-SH*, a ocorrência de dois alelos recentemente descritos, *DOB-SH* e *DOA-HA* e ainda determinar a frequência dos alelos em nossa população estudada (Figura 13).

2. Novo alelo Dombrock *DOB-WL*

As análises moleculares realizadas através da técnica de PCR-RFLP, com inclusão da pesquisa do SNP 898C/G, permitiram identificar um novo alelo definido pela associação do nucleotídeo 793G, base molecular do alelo *DOB*, com o nucleotídeo 898G,

Figura 13: Resultados da genotipagem Dombrock nas amostras de Marília e Campinas



anteriormente descrito como sendo invariavelmente associado ao alelo *HY1* (RIOS et al, 2002). Todas as amostras genotipadas como *DOA/DOA* ou *DOA/JO* eram 898C homozigotas, demonstrando que o nucleotídeo 898G está associado aos alelos *DOB* e *HY*.

Esta nova associação entre os nucleotídeos 793G/898G, sem a presença de 323T, caracteriza o alelo *DOB-WL* (Figura 14), confirmada por meio do seqüenciamento de três amostras primariamente genotipadas como *DOB/DOB*: 898C/C, 898C/G e 898G/G. Pela primeira vez foi demonstrado que a presença do polimorfismo 898C/G não está restrito a raça, uma vez que foi encontrado em 13.4% da população heterogênea de doadores estudada e nem parece estar estritamente ligado ao SNP 323T que codifica o fenótipo Hy-negativo.

A importância da identificação do alelo *DOB-WL* está especialmente relacionada ao fato do SNP 898C/G levar a substituição do aminoácido leucina por valina, na posição 300 da proteína Dombrock. Segundo a literatura (RIOS et al, 2002), o fato de estar muito próximo ao ponto de âncora-GPI pode influenciar na ligação e na expressão da proteína sobre a membrana do eritrócito.

3. Novo alelo Dombrock *DOA-SH*

A técnica de MicroArrays® foi utilizada para análise de 162 amostras e incluiu "beads" capazes de identificar os SNPs: 323G/T, 350C/T, 378C/T, 624T/C, 793A/G.

Entre as amostras analisadas foi identificado uma nova combinação entre os SNPs cuja base molecular ainda não havia sido descrito na literatura. Esta nova combinação identificada *DOA-SH* ocorre sobre a base molecular do alelo *DOA* (378C e 793A) com a troca silenciosa do nucleotídeo 624T/C (alelo *DOB*) (Figura 14). Esta combinação é semelhante ao alelo *DOB-SH*, exceto pelo SNP 793A/G.

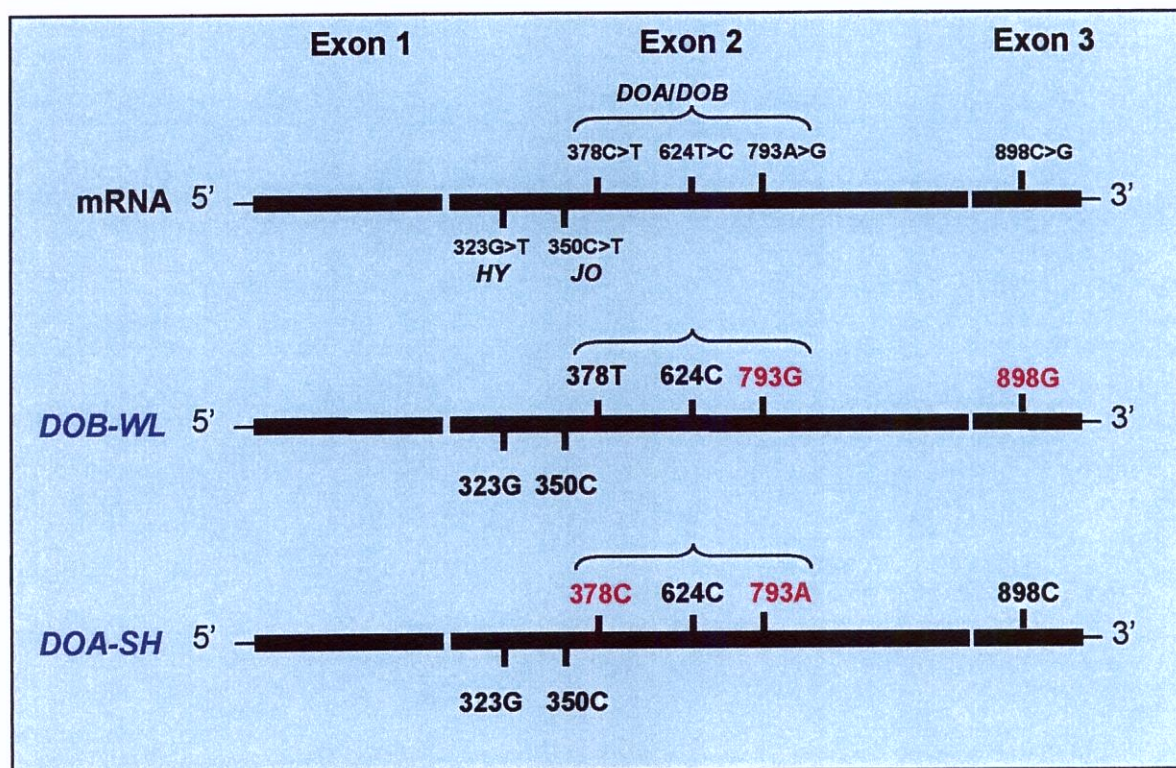


FIGURA 14: Representação esquemática das bases moleculares dos novos alelos Dombrock.

Outros dois alelos recentemente descritos, *DOB-SH* (378C, 624C, 793G) e *DO-HA* (378T, 624T, 793A) foram também encontrados em nossas amostras. A ocorrência do alelo *DOB-SH* em posição trans com o alelo *DOA*, sugere que *DOB-SH* está relacionado com a expressão do antígeno Do^b, enquanto que a ocorrência do alelo *DOA-SH* em trans com o alelo *DOB*, sugerem a relação de *DOA-SH* com a expressão do antígeno Do^a (HASHMI et al, 2005).

A determinação das bases moleculares que codificam os antígenos do Sistema de grupo sanguíneo Dombrock (**Tabela 8**) demonstra vários rearranjos entre os alelos associados a *DOA* e *DOB*. Estas várias combinações de SNPs podem ser explicadas como

variações normais dentro do gene e portanto, esperadas em uma população heterogênea como a população brasileira.

Estes polimorfismos mostram a importância de analisar diferentes populações para determinar os haplótipos *DO*, e podem potencialmente mudar a prática da medicina transfusional, pois permitem estabelecer protocolos de genotipagem para dedução segura do fenótipo Dombrock e assim identificar doadores antígeno negativos para as transfusões de pacientes aloimunizados.

Tabela 8: Diferenças entre os nucleotídeos e aminoácidos que determinam os alelos Dombrock.

Alelo	nt (aa) 323 (106)	nt (aa) 350 (117)	nt 378	nt 624	nt (aa) 793 (265)	nt (aa) 898 (300)
<i>DOA</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	T	A (Asn)	C (Leu)
<i>DOB</i>	G (Gly)	C (Thr)	T	C	G (Asp)	C (Leu)
<i>DOB-WL</i>	G (Gly)	C (Thr)	T	C	G (Asp)	G (Val)
<i>HY1</i>	T (Val)	C (Thr)	C	C	G (Asp)	G (Val)
<i>HY2</i>	T (Val)	C (Thr)	C	C	G (Asp)	C (Leu)
<i>JO</i>	G (Gly)	T (Ile)	T	T	A (Asn)	C (Leu)
<i>DOA-HA</i>	G (Gly)	C (Thr)	T	T	A (Asn)	*
<i>DOB-SH</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	C	G (Asp)	*
<i>DOA-SH</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	C	A (Asn)	*

nt – nucleotídeos

aa – amino-ácidos

4. Frequência dos alelos Dombrock

As análises moleculares realizadas pelas técnicas de PCR-RFLP e Microarrays® permitiram determinar a frequência dos genótipos *DOA/DOA*, *DOA/DOB*, *DOB/DOB* e dos alelos *HY* e *JO* na população de doadores estudada (**Figura 13**). Uma grande variedade de

alelos foi evidenciada em nossas amostras o que é consistente com a heterogeneidade da população brasileira .

É importante ressaltar que quando realizamos os cálculos de frequência dos alelos *DO*, levando em consideração a presença do alelo *DOB-WL*, verificamos uma menor frequência do alelo *DOB* (54%), se comparado com a literatura.

Ao analisarmos os dados da literatura, verificamos que a predominância do alelo *DOB* em nossas amostras é consistente com os dados publicados em outras populações (**Tabela 9**). No entanto, a frequência do alelo *JO* por nós encontrada foi mais alta do que a do alelo *HY*, o que difere da literatura (**tabela 5**).

5. Expressão dos antígenos DOMBROCK

A fenotipagem dos antígenos Dombrock é notoriamente difícil devido à inexistência de anti-soros comerciais e ao fato dos antígenos apresentarem variações de expressão nas hemácias (**REID, 2005; RIOS et al, 2002**). Dados sobre a frequência dos fenótipos Dombrock são raramente encontrados na literatura e estão restritos apenas a algumas populações da Ásia, EUA e Europa. A caracterização sorológica da expressão destes antígenos também é rara e limitada aos fenótipos Holley e Joseph.

Até o presente momento, este trabalho foi o único que estudou os antígenos Dombrock na população brasileira (174 amostras de hemácias de doadores voluntários de sangue) através da determinação da expressão do antígeno Do^b e da proteína Dombrock, pela técnica de hemaglutinação. Foram utilizados anti-soros monoclonais murinos, produzidos no New York Blood Center.

Em 172 das 174 amostras analisadas, houve concordância entre os resultados da fenotipagem e da genotipagem para o antígeno Do^b e proteína Dombrock (*DO*). No

Tabela 9: Frequências dos genótipos Dombrock em diferentes populações.

	Judeus Asquenazi		Chineses Israelenses		Tailandeses		Novaiorquinos		Brasileiros		Portugueses		Chineses	
	69	%	58	%	188	%	100	%	288	%	162	%	100	%
Amostras	Alelos													
DOA/DOA	13.1		0		11.2		2		10.07		11.73		20	
DOA/DOA-HA	1.4		1.7		5.3		0		NT		0.62		NT	
DOA/DOB	30.4		12.1		42.6		14		27.08		40.74		46	
DOA/DOB-WL	NT		NT		NT		NT		12.50		NT		NT	
DOA-SH/DOB	NT		NT		NT		NT		NT		0.62		NT	
DOA/DOB-SH	NT		NT		NT		NT		NT		0.62		NT	
DOA-HA/DOB	2.9		6.9		5.3		11		NT		1.85		NT	
JO/JO	0		0		0		0		0		0		NT	
JO/DOA	0		0		0		0		0.35		1.23		NT	
JO/DOB	0		0		0		0		2.43		1.85		NT	
HY/JO	0		0		0		0		0		0		NT	
HY/HY	0		0		0		0		0		0		NT	
HY/DOA	0		0		0.5		0		0.69		0.62		NT	
HY/DOB	0		0		0		0		1.04		0.62		NT	
HY/DOB-SH	0		0		0		0		NT		NT		NT	
DOB/DOB	52.2		79.3		35.1		73		31.94		39.51		34	
DOB/DOB-SH	0		0		0		0		NT		NT		NT	
DOB/DOB-WL	NT		NT		NT		NT		13.54		NT		NT	
DOB-WL/DOB-WL	NT		NT		NT		NT		0.35		NT		NT	
Referências					Hashmi et al, 2005				Balleotti et al, 2006				Araujo et al, 2006	
													Wu et al, 2001	

entanto, duas amostras genotipadas como *DOA/HY* (*HY1* e *HY2*) não reagiram com anti-*Do^b*, demonstrando que apesar da presença do nucleotídeo 793G (alelo *DOB*), sua associação com 323T (alelo *HY*) diminui a expressão do antígeno *Do^b*. Este fato confirma dados da literatura que sugerem que a expressão do antígeno *Do^b* poderia estar diminuída na presença do fenótipo Hy-negativo (**MOULDS et al 1975; WEAVER et al, 1984**).

Baseados na hipótese proposta por **RIOS et al, 2002** de que a presença do nucleotídeo 898G poderia levar a diminuição da expressão dos antígenos *Gy^a* e *Do^b*, realizamos análises por citometria de fluxo da expressão do antígeno *Do^b* e da proteína Dombrock em amostras que apresentaram o alelo *DOB-WL*.

Em nossa análise não houve diferença significativa entre os resultados da intensidade média de fluorescência obtida nas amostras com genótipo *DOA/DOB*, independentemente da presença ou ausência do nucleotídeo 898G, demonstrando desta forma, que o SNP 898C>G não interfere na expressão do antígeno *Do^b*.

Outro dado que deve ser considerado é a diminuição da intensidade média de fluorescência observada entre as amostras *DOA/DOB* (15.86; 15.11; 16.56; 15.51; 18.42) quando comparada com a intensidade média de fluorescência da amostra controle positivo *DOB/DOB* (20,81). Este resultado demonstra uma variação quantitativa de antígenos *Do^b* na membrana das hemácias, caracterizando um “efeito de dose” do antígeno *Do^b*.

Quando as amostras foram analisadas por citometria de fluxo utilizando-se o anti-soro anti-proteína Dombrock não observamos variação na intensidade média de fluorescência, independentemente da presença do nucleotídeo 898G ou do genótipo

homozigoto ou heterozigoto para os alelos *DOA/DOB*, demonstrando assim que a presença de 898G não alteraria a expressão do antígeno Gy^a.

CONCLUSÕES

Considerando os objetivos do presente trabalho e as condições em que foi realizada a caracterização molecular dos antígenos Dombrock em amostras de DNA de doadores de sangue brasileiros, podemos concluir que:

1. A realização da genotipagem Dombrock em amostras de DNA de doadores permitiu identificar e determinar a frequência dos alelos Dombrock em uma população brasileira.
2. A análise por PCR-RFLP permitiu identificar um novo alelo *DO*, por nós designado DOB-WL, a partir da combinação entre os nucleotídeos 793G/898G, sem a presença de 323G.
3. O alelo DOB-WL foi descrito até o momento apenas na população brasileira e leva a substituição do aminoácido Leucina por Valina na posição 300. O polimorfismo 898C>G não interfere na expressão do antígeno Do^b ou da proteína Dombrock
4. Pela primeira vez foi demonstrado que o polimorfismo 898C/G não está restrito ao grupo étnico uma vez que foi encontrado em 13.4% da população heterogênea de doadores estudada e nem aparece estritamente ligado a 323T que codifica o fenótipo Hy-negativo.

5. Todas as amostras genotipadas como *DOA/DOA* ou *DOA/JO* eram 898C homozigotas, demonstrando que o nucleotídeo 898G está associado aos alelos *DOB* e *HY*.
6. A técnica de Microarrays® nos permitiu identificar uma nova combinação silenciosa entre SNPs: 624C associado ao alelo *DOA*, por nós designada *DOA-SH*.
7. A ocorrência do alelo *DOB-SH* em posição trans com o alelo *DOA*, demonstra que *DOB-SH* está relacionado com a expressão do antígeno Do^b, enquanto que a ocorrência do alelo *DOA-SH* em trans com o alelo *DOB*, demonstra a relação de *DOA-SH* com a expressão do antígeno Do^a.
8. A expressão do antígeno Do^b pode estar diminuída ou ausente na presença do fenótipo Hy-negativo.
9. A determinação das bases moleculares que codificam os antígenos do Sistema de grupo sanguíneo Dombrock demonstra vários rearranjos entre os alelos associados a *DOA* e *DOB*.
10. Nossos resultados mostram a importância de analisar diferentes populações para determinar os haplótipos *DO*, e podem potencialmente mudar a prática da medicina transfusional, pois permitem estabelecer protocolos de genotipagem

para dedução segura do fenótipo Dombrock e assim identificar doadores antígeno negativos para as transfusões de pacientes aloimunizados.

11. A frequência do alelo *JO* é mais alta do que a do alelo *HY* na nossa população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo F, Pereira C, Monteiro F, Henriques I, Meireles E, Lacerda P, Cunha-Ribeiro LM. Genotyping Dombrock alleles in Portuguese blood donors by real-time PCR. *Transfusion* 2003; 43(10):1495-6
- Banks JA, Hemming N, Poole J. Evidence that the Gy^a, Hy and Jo^a antigens belong to the Dombrock blood group system. *Vox Sang* 1995; 68:177-82.
- Baumgarten R, Van Gelder W, Van Wintershoven J, Maaskant-Van Wijk PA, Beckers EA. Recurrent acute hemolytic transfusion reactions by antibodies against Doa antigens, not detected by cross-matching. *Transfusion* 2006; 46(2):244-249.
- Brown D. Reactivity of anti-Joa with Hy- red cells (abstract). *Transfusion* 1985; 25:462.
- Chandanayingyong D, Sasaki TT, Greenwalt TJ. Blood groups of the Thais. *Transfusion* 1967; 7:269-76.
- Daniels GL, Anstee DJ, Cartron JP, Dahr W, Issitt PD, Jorgensen J, Kornstad L, Levene C, Lomas-Francis C, Lubenko A, et al. Blood group terminology 1995. ISBT Working Party on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang* 1995; 69(3):265-79.
- Eiberg H, Mohr J. Dombrock blood group (DO): assignment to chromosome 12p. *Hum Genet* 1996; 98(5):518-21.
- Gubin AN, Njoroge JM, Wojda U, Pack SD, Rios M, Reid ME, Miller JL. Identification of the dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP-ribosyltransferase gene family. *Blood* 2000; 96(7):2621-7.

- Halverson G, Shanahan E, Santiago I, Mabile R, Thurrell T, Strupp AM, Wolf CF, Spruell P, Moulds MK. The first reported case of anti-Dob causing an acute hemolytic transfusion reaction. *Vox Sang* 1994; 66(3):206-9.
- Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajjhala P, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, Lomas-Francis C, Chaudhuri A, Reid ME. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* 2005; 45(5):680-8. Erratum in: *Transfusion* 2005; 45(6):1045.
- Jensen L, Scott EP, Marsh WL, et al. Anti-Jo^a: an antibody defining a high-frequency erythrocyte antigen. *Transfusion* 1972; 12:322-4.
- Judd WJ, Steiner EA. Multiple hemolytic transfusion reactions caused by anti-Do^a. *Transfusion* 1991; 31(5):477-8.
- Kruskall MS, Greene MJ, Strycharz DM, Getman EM, Cawley A. Acute hemolytic transfusion reaction due to antiDombrocka (Doa) [abstract]. *Transfusion* 1986; 26: 545.
- Lewis M, Kaita H, Giblett ER, Anderson JE. Genetic linkage analysis of the Dombrock (Do) blood group locus. *Cytogenet Cell Genet* 1978; 22 (1-6):313-8.
- Lewis M, Allen FH JR, Anstee DJ, Bird GW, Brodheim E, Contreras M, Crookston M, Dahr W, Engelfriet CP, Giles CM, et al. ISBT Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens: Munich report. *Vox Sang* 1985; 49(2):171-5.
- Lucien N, Celton JL, LE Pennec PY, Cartron JP, Bailly P. Short deletion within the blood group Dombrock locus causing a Do(null) phenotype. *Blood* 2002; 100(3):1063-4.

- Moheng MC, Mccarthy P, Pierce SR. Anti-Dob implicated as the cause of a delayed hemolytic transfusion reaction. *Transfusion* 1985; 25(1):44-6.
- Molthan L, Crawford MN, Tippet P. Enlargement of the Dombrock blood group system: the finding of anti-Do b. *Vox Sang* 1973; 24(4):382-4.
- Moulds JJ, Polesky HF, Reid M, Ellisor SS. Observations on the Gy^a and Hy antigens and the antibodies that define them. *Transfusion* 1975; 15(3):270-4.
- Nakajima H, Skradski K, Moulds JJ. Do^a (Dombrock) blood group antigen in the Japanese. *Vox Sang* 1979; 36:103-104.
- Nakajima H, Moulds JJ. Do^a (Dombrock) blood group antigen in the Japanese: tests on further population and family samples. *Vox Sang* 1980; 38:294-6.
- Polesky HF, Swanson JL. Studies on the distribution of the blood group antigen Do^a (Dombrock) and the characteristics of anti-Do^a. *Transfusion* 1966; 6:294-6.
- Polesky HF, Swanson J, Smith R. Anti-Do^a stimulated by pregnancy. *Vox Sang* 1968; 146(6):465-6.
- Reid ME. The dombrock blood group system: a review. *Review. Transfusion* 2003; 43(1):107-14.
- Reid ME. Complexities of the Dombrock blood group system revealed. *Review (2 SUPPL). Transfusion* 2005; 45:92S-99S.
- Roxby DJ, Paris JM, Stern DA, Young SG. Pure anti-Do^a stimulated by pregnancy. *Vox Sang* 1994; 66(1):49-50.

- Rios M, Hue-Roye K, Lee AH, Chiofolo JT, Miller JL, Reid ME. DNA analysis for the Dombrock polymorphism. *Transfusion* 2001a; 41(9):1143-6.
- Rios M, Hue-Roye K, Storry JR, Lee T, Miller JL, Reid ME. Molecular basis of the Dombrock null phenotype. *Transfusion* 2001b; 41(11):1405-7.
- Rios M, Hue-Roye K, Oyen R, Miller J, Reid ME. Insights into the Holley- and Joseph-phenotypes. *Transfusion* 2002a; 42(1):52-8.
- Rios M, Storry JR, Hue-Roye K, Chung A, Reid ME. Two new molecular bases for the Dombrock null phenotype. *British Journal of Haematology* 2002b; 117(3):765-7.
- Schmidt RP, Frank S, Baugh M. New antibodies to high incidence antigenic determinants (anti-So, anti-E1, anti-Hy and anti-Dp) (abstract). *Transfusion* 1967; 7:386.
- Shirey RS, Boyd JS, King KE, Caturegli PP, Montgomery WM JR, Ness PM. Assessment of the clinical significance of anti-Dob. *Transfusion* 1998; 38(11-12):1026-9.
- Strupp A, Cash K, Uehlinger J. Difficulties in identifying antibodies in the Dombrock blood group system in multiply alloimmunized patients. *Transfusion* 1998; 38:1022-5.
- Swanson J, Polesky HF, Tippet P, Sanger R. A "new" blood group antigen, Do^a (abstract). *Nature* 1965; 206:313.

Swanson J, Zweber M, Polesky HF. A new public antigenic determinant Gy^a (Gregory). *Transfusion* 1967; 7:304-6.

Telen MJ, Rosse WF, Parker CJ, Moulds MK, Moulds JJ. Evidence that several high-frequency human blood group antigens reside on phosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane proteins. *Blood* 1990; 75(7):1404-7.

Weaver T, Kavitsky D, Carty L, et al. An association between the Joa and Hy phenotypes (abstract). *Transfusion* 1984; 24:426.

Wu GG, Jin SZ, Deng ZH, Zhao TM. Polymerase chain reaction with sequence-specific primers-based genotyping of the human Dombrock blood group DO1 and DO2 alleles and the DO gene frequencies in Chinese blood donors. *Vox Sang* 2001; 81(1):49-51.

APÊNDICE

Dombrock gene analysis in Brazilian people reveals novel alleles

W. Baleotti Jr,¹ M. Rios,² M. E. Reid,³ G. Hashmi,⁴ A. Fabron Jr,¹ J. Pellegrino Jr⁵ & L. Castilho⁵

¹Hemocentro, Faculdade de Medicina, Marília, SP, Brazil

²DETD, OBRR, CBER, FDA, Rockville, MD, USA

³New York Blood Center, New York, NY, USA

⁴BioArray Solutions, Warren, NJ, USA

⁵Hemocentro Unicamp, Campinas, SP, Brazil

Background and Objectives The Do^a and Do^b polymorphisms are associated with three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 2 of the *DO* gene: 378C/T, 624T/C and 793A/G for the *DOA* and *DOB* alleles, respectively. The SNPs 350C/T (*JO* allele) and 323G/T (*HY* allele) are associated with the Jo(a-) and Hy-negative phenotypes. Recently, two new *DO* alleles [*DOB-SH* (378C, 624C, 793G) and *DOA-HA* (378T, 624T, 793A)] were identified using microarray technology. Although the molecular background of Dombrock alleles is well defined, no studies have been conducted in the Brazilian population.

Materials and Methods We employed polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)-based assays and a microarray assay to determine the frequency of the *DO* alleles (*DOA*, *DOB*, *HY1*, *HY2* and *JO*) in Brazilians. We tested DNA of 288 Brazilians from three different ethnic groups by PCR-RFLP to determine the 793A/G (*DOA/DOB*), 323G/T (*HY*), 350C/T (*JO*) and 898C/G (*HY1/HY2*) SNPs. We also tested DNA from 162 blood donors by using the HEA Beadchip™ assay to determine the 378C/T, 624T/C, 793A/G (*DOA/DOB*), 350C/T (*JO* allele) and 323G/T (*HY*) SNPs.

Results Two novel allele combinations were found in our samples: the *DOB* allele (793G and 323G) associated with 898G (*DOB-WL*); and an allele carrying the nucleotides 378C, 624C, 793A and 323G (*DOA-SH*). We also found the *DOB-SH* and *DOA-HA* alleles recently reported.

Conclusions Our data demonstrate high heterogeneity of *DO* alleles in the Brazilian population. Our study also highlights the importance of testing a cohort of different populations to determine *DO* haplotypes and of establishing reliable genotyping tests for predicting Do^a/Do^b status.

Key words: Brazilians, Dombrock alleles, genotyping assays, microarray.

Received: 15 February 2006,

revised 3 April 2006,

accepted 3 April 2006,

published online 8 May 2006

Introduction

The Dombrock blood group system is composed of the major antigens Do^a and Do^b and the high-incidence antigens Hy

and Jo^a that are closely related at the phenotypic level and are carried on a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked glycoprotein. The Gy(a-) phenotype, associated with Hy-negative and Jo(a-), represents the null phenotype. The Hy-negative phenotype is associated with weak expression of Do^b and Jo^a antigens, while Jo(a-) is associated with weak expression of the Do^a and Hy antigens [1–6]. The Dombrock antibodies are weakly reactive and are generally found in serum samples with multiple antibodies; moreover, the antigens can be weakly expressed on the red blood cell membrane [7–9]. Therefore,

Correspondence: Lilian Castilho, PhD, Hemocentro, Unicamp, Rua Carlos Chagas, 480, Caixa Postal 6198, CEP 13081-970 Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil

E-mail: castilho@unicamp.br

Dombrock typing has severe limitations because the antibodies (especially anti-Do^b) are rarely available as a single specificity with strength and volume to make accurate typing possible [6]. As the molecular basis of the Dombrock antigens has been determined, the ability to distinguish DOA and DOB makes it possible to type donors and patients [10,11].

The gene encoding the protein-carrying antigens in the DO blood group system, DO, consists of three exons spread over ≈ 14 kb of genomic DNA. The cDNA transcript is predicted to encode a protein of 314 amino acids that includes a signal peptide and a GPI anchor motif [4].

Dombrock system antigens are distinguished by major point mutations underlying predicted amino acid sequence differences as follows: Asn265 for DOA, Asp265 for DOB, Val108 for HY (i.e. Hy-) and Ile117 for JO [i.e. Jo(a-)] [10]. The molecular background of the null phenotype is varied, with four molecular causes responsible for this variation [12–14]. There are two forms of the allele encoding the Hy-negative phenotype, one with 898G (named HY1) encoding 300Val and the other with 898C (designed HY2) encoding 300Leu [2]. It has been suggested that the 898C/G single nucleotide polymorphism (SNP) was a possible reason for the observed weakened expression of Gya and Dob on red blood cells from HY1 homozygous individuals [2], but specific studies addressing this issue have not been conducted.

Silent polymorphisms have also been previously associated with either DOA or DOB alleles, which are now recognized as simply variation within the DO gene [4,10,15]. Recently, two new DO alleles – DOB-SH and DOA-HA – were identified using a bead array format for typing alleles associated with blood group antigens [15]. The SNPs associated with DO alleles are given in Table 1.

Although the molecular background of Dombrock alleles is well defined, no studies have been conducted in the Brazilian

population. The frequency of DO alleles in other populations (North American, Asians and Europeans) included the frequencies of the DOA, DOB, HY and JO alleles, but not the 898C/G polymorphism. Based on this knowledge, we employed polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)-based assays to determine four DO SNPs (793A/G, 350C/T, 323G/T and 898C/G) in DNA samples from Brazilians. We found one new DO allele (designated DOB-WL) with 898G (like HY1) encoding 300Val on the molecular background of the DOB allele.

In testing DNA samples with a BeadChip array that included probes for five SNPs (350C/T, 323G/T, 793A/G, 378C/T and 624T/C) a new DO allele was found, the DOA-SH (378C, 624C, 793A and 323G), predicted to express the Do^a antigen.

Materials and methods

Blood samples

Peripheral blood samples from 450 Brazilian blood donors, representing a high inter-racial mixture including Europeans, Japanese, South Americans and African-Americans, were collected in EDTA after obtaining signed informed consent, as approved by the Institutional Review Board.

PCR-RFLP

PCR assays were performed on 288 DNA samples from Brazilian blood donors using 100–200 ng of DNA, 50 pmole of each primer, 2 nmole of each dNTP, 1 U of *Taq* DNA polymerase, and buffer, in a total volume of 50 µl. For each assay, PCR amplification was performed with the same reaction and cycling conditions as described previously, except for the annealing temperature [2,10]. Amplified DNA fragments were digested with four different restriction enzymes (*Eam*1105I for the polymorphism at nucleotide 793, *Bsa*JI for the polymorphism at nucleotide 323, *Xcm*I for the polymorphism at nucleotide 350, and *Alu*26I for the polymorphism at nucleotide 898), according to the conditions recommended by the manufacturers, and were analysed on 3% agarose gels after being stained with ethidium bromide (Figs 1–4). The sequence of primers, PCR annealing temperature, the restriction enzyme used to digest each PCR-amplified product and the expected restriction fragment sizes are given in Table 2.

BeadChip assay

A BeadChip array (HEA-18 BeadChip; BioArray Solutions, Warren, NJ, USA), which included probes for five DO SNPs (nucleotides 378, 624, 793, 323 and 350), was used to analyse DNA samples from 162 Brazilian blood donors not

Table 1 Differences between DO alleles

Allele	Nucleotide (amino acid)					
	323 (108)	350 (117)	793 (265)	898 (300)	378	624
DOA	G (Gly)	C (Thr)	A (Asn)	C (Leu)	C	T
DOB	G (Gly)	C (Thr)	G (Asp)	C (Leu)	T	C
HY1	T (Val)	C (Thr)	G (Asp)	G (Val)	C	C
HY2	T (Val)	C (Thr)	G (Asp)	C (Leu)	C	C
JO	G (Gly)	T (Ile)	A (Asn)	C (Leu)	T	T
DOA-HA	G (Gly)	C (Thr)	A (Asn)	NT	T	T
DOB-SH	G (Gly)	C (Thr)	G (Asp)	NT	C	C
DOA-SH ^a	G (Gly)	C (Thr)	A (Asn)	NT	C	C
DOB-WL ^a	G (Gly)	C (Thr)	G (Asp)	G (Val)	T	C

^aNew alleles.

NT, not tested.

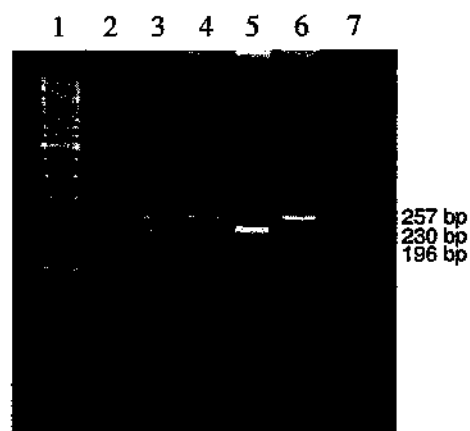


Fig. 1 Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) assay using *Eam1105I* to identify *DOA/DOB* alleles. Lane 1, 50-bp ladder; lane 2, *DOB/DOB* sample; lanes 3 and 4, *DOA/DOB* (heterozygous); lane 5, *DOA/DOA* sample; lane 6, uncut PCR product.

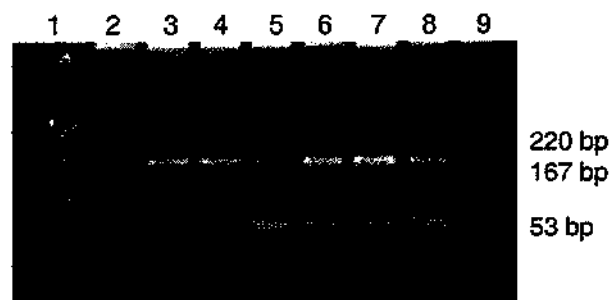


Fig. 2 Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) assay using *XcmI* to identify the 350C/T polymorphism (*JO* allele). Lane 1, 50-bp ladder; lane 2, *JO/DO* sample; lanes 3–8, wild-type samples; lane 9, uncut PCR product.

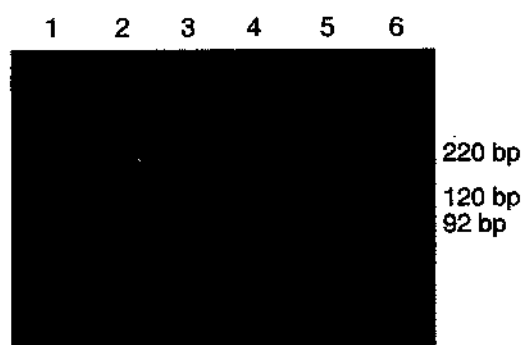


Fig. 3 Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) assay using *BsaI* to identify the 323G/T polymorphism (*HY* allele). Lane 1, 50-bp ladder; lane 2, *HY/DO* sample; lanes 3–5, wild-type samples; lane 6, uncut PCR product.

tested by PCR–RFLP [15]. The assay used primers for a single multiplexed PCR reaction and used allele-specific oligonucleotides with a variable 3'-terminal nucleotide for elongation-mediated multiplex analysis of these *DO* polymorphisms.

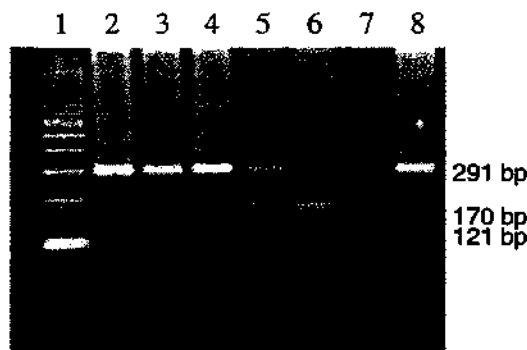


Fig. 4 Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) assay using *Aflw26I* to identify the 898C/G polymorphism. Lane 1, 50-bp ladder; lanes 2–4, wild-type samples; lanes 5 and 7, 898C/G samples; lane 6, 898G/G sample; lane 8, uncut PCR product.

Color-encoded beads displaying the elongation probes were assembled into planar arrays on semiconductor chips, permitting the instant imaging of fluorescent elongation products from the entire array.

After barcode scanning, the assay image was taken automatically from each chip. The software combined the assay image with the pre-existing bead information and generated results as bar graphs for allele assignment.

Sequence analysis

In order to confirm the new allele results obtained by PCR–RFLP and by the BeadChip array, five samples carrying the *DOB-WL* allele and the sample with the *DOA-SH* allele were sequenced. *DOB-WL* samples were amplified with the primer pair Do3F/Do3R located in the intronic region flanking the exon 3 [2]. The *DOA-SH* sample was amplified with the primer pair Do2F/Do2R located in the intronic region flanking exon 2 [2]. PCR products were purified by elution from 1% agarose gels by using a gel extraction kit (Qiaex II; Qiagen, Valencia, CA) and were sequenced directly on a sequencer (ABI 373XL, with Big Dye reagent BD Half-term; GenPak, Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA, USA).

Flow cytometry

Expression of the *Do^b* antigen on three red blood cell samples of the *DOA/DOB-WL* genotype was measured on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA), using a monoclonal anti-*Do^b* (mouse MIMA-123) [16]. The secondary antibody was goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG), Fab-fragment, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugate (supplied by Interlab; Jackson ImmunoResearch, Hamburg, Germany).

Table 2 Primers used for polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis

Primer	Sequence	Uncut size	Restriction enzyme	Restriction fragment size (bp)	
DoABF	5'-CACITTAATGCCTACACAGGGACCAAGTCGA-3'	257 bp	Eam1105I (793A>G)	230, 27	196, 34, 27 (DOB)
DoABR	5'-TATGTGCTCAGGTTCCAGTTGACCTCAACGACAAC-3' (annealing temperature 62 °C) [2,10]			(DOA)	
DoX2F	5'-TCAGTACCAAGGCTGTAGCA-3'	220 bp	BsaI (323G>T) XcmI (350C>T)	120, 92, 8 (wild type)	212, 8 (variant)
Do378R	5'-AGTAAAGTCAGAATGAACATTGCACAAT-3' (annealing temperature 58 °C) [2,10]			167, 53 (wild type)	220 (variant)
DoEx3F	5'-TCAATGGATAGATGAGGTAG-3'	291 bp	Alw26I (898C>G)	291	170, 121 (variant)
DoEx3R	5'-TGGTTTCAGCAGAAGTATGA-3' (annealing temperature 55 °C) [2,10]			(wild type)	

Table 3 Results of Dombrock genotyping polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis

Genotype	Nucleotide				Total (%)
	323	350	793	898	
DOA/DOA	G/G	C/C	A/A	C/C	29 (10.06)
DOA/DOB	G/G	C/C	A/G	C/C	78 (27.08)
DOA/DOB-WL	G/G	C/C	A/G	C/G	36 (12.5)
DOB/DOB	G/G	C/C	G/G	C/C	92 (31.9)
DOB/DOB-WL	G/G	C/C	G/G	C/G	39 (13.54)
DOB-WL/DOB-WL	G/G	C/C	G/G	G/G	1 (0.34)
JO/DOA	G/G	T/C	A/A	C/C	1 (0.34)
JO/DOB	G/G	T/C	A/G	C/C	7 (2.43)
HY1/DOA	T/G	C/C	G/A	G/C	1 (0.34)
HY2/DOA	T/G	C/C	G/A	C/C	1 (0.34)
HY1/DOB	T/G	C/C	G/G	G/C	2 (0.69)
HY2/DOB	T/G	C/C	G/G	C/C	1 (0.34)
Total					288

Results

PCR-RFLP results

Testing for DO, HY and JO alleles in Brazilian blood donors showed a great variety of different alleles (Table 3).

When samples of these donors were analysed, a novel allele combination, the DOB allele (793G and 323G) associated with 898G (previously described only on a molecular background of the HY1 allele) was identified and designated as the DOB-WL allele. This new allele encoding 300Val is the same as HY1 at nucleotide 898 on the molecular background of DOB.

From 114 samples genotyped as DOA/DOB, 36 were 898C/G (DOA/DOB-WL). From 132 samples genotyped as DOB/DOB, 39 were 898C/G (DOB/DOB-WL) and one sample

Table 4 Results of Dombrock genotyping using the HEA BeadChip assay

Genotype	Nucleotide					Blood donors n (%)
	323	350	793	378	624	
DOA/DOA	G/G	C/C	A/A	C/C	T/T	19 (11.7)
DOA/DOB	G/G	C/C	A/G	C/T	T/C	66 (40.7)
DOB/DOB	G/G	C/C	G/G	T/T	C/C	64 (39.5)
JO/DOA	G/G	T/C	A/A	C/T	T/T	2 (1.2)
JO/DOB	G/G	T/C	A/G	T/T	T/C	3 (1.8)
HY/DOA	T/G	C/C	G/A	C/C	C/T	1 (0.6)
HY/DOB	T/G	C/C	G/G	C/T	C/C	1 (0.6)
DOA-HA/DOA	G/G	C/C	A/A	T/C	T/T	1 (0.6)
DOA-HA/DOB	G/G	C/C	A/G	T/T	T/C	3 (1.8)
DOA/DOB-SH	G/G	C/C	A/G	C/C	T/C	1 (0.6)
DOA-SH/DOB	G/G	C/C	A/G	C/T	C/C	1 (0.6)
Total						162

was 898G homozygous (DOB-WL/DOB-WL). Among the 576 alleles analysed by PCR-RFLP, 77 were DOB-WL (898G). This represents an overall frequency of 13.4% for DOB-WL across the population studied. All the samples genotyped as DOA/DOA or JO/DOA were 898C homozygous.

Results for DO obtained through the HEA BeadChip assay

The various combinations of DO alleles obtained through the HEA BeadChip assay in 162 Brazilian blood donors are given in Table 4. In testing DNA samples from these donors with the BeadChip array, which included probes for five DO SNPs, one new DO allele was found: DOA-SH is the same as HY at nucleotides 378, 624 and 793 but has wild-type nucleotide 323 and is predicted to express the Doa antigen. We also found the two recently reported alleles (DOB-SH 378C, 624C,

Table 5 Flow cytometry analysis (relative mean fluorescence intensity) on *DOB-WL* red blood cells using anti-Do^b monoclonal antibody

Marker	Samples					
	<i>DOA/DOA</i>	<i>DOB/DOB</i>	<i>DOA/DOB</i>	<i>DOA/DOB-WL</i>	<i>DOA/DOB-WL</i>	<i>DOA/DOB-WL</i>
All	8.62	18.49	13.08	14.60	13.34	16.97
M1	8.67	20.81	15.11	16.56	15.51	18.42

All, all cells; M1, positive cells.

793G; and *DOA-HA* 378T, 624T, 793A) [15] in our samples (Table 4).

Sequencing results

Sequencing studies on five DNA samples that displayed the *DOB-WL* allele revealed the presence of 898G associated with 793G (*DOB* allele) (data not shown), confirming previous results obtained by PCR-RFLP. The combination of 378C, 624C, 793A and 323G associated with the *DOA-SH* allele was also confirmed by sequencing in one DNA sample.

Flow cytometry results

Red blood cells from three samples with the *DOA/DOB-WL* genotype were available for analysis by flow cytometry. There was no reduction of Do^b antigen expression on red blood cells from all three samples. They had an equivalent relative mean fluorescence intensity comparable to that of the red blood cells with the *DOA/DOB* genotype, which were used as a control (Table 5).

Discussion

We report the frequencies of *DO* alleles in Brazilian blood donors. During this population study, we found two novel *DO* alleles, namely *DOB-WL* and *DOA-SH*. We also observed the occurrence of two recently described alleles (*DOB-SH* and *DOA-HA*) and the presence of *DOB-SH* in *trans* to *DOA*, previously unidentified (Fig. 5) [15]. The occurrence of *DOB-SH* in *trans* to *DOA* predicts that this allele encodes the Do^b antigen, while the novel allele *DOA-SH* in *trans* to *DOB* is predicted to encode the Do^a antigen.

The 898G nucleotide was associated with the presence of the *HY1* allele, while 898C was found to be associated with *HY2* [2]. During this study, we unexpectedly found a high frequency (13.4%) of 898G not invariably associated with the presence of the *HY1* allele. This new allele, designated *DOB-WL*, has 898G (like *HY1*) on the molecular background of the *DOB* allele.

It was postulated that 898G (which encodes 300Val within the sequence motif for GPI linkage) may cause reduced efficiency of protein anchoring to the red blood cell membrane, thereby weakening the expression of Gy^a and Do^b antigens [2]. However, no reduction of Do^b antigen expression on the

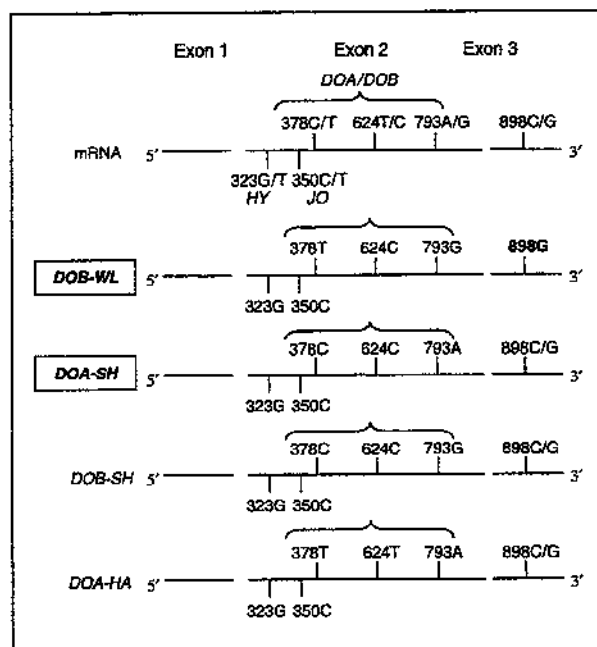


Fig. 5 Depiction of *DO* alleles showing the various allele combinations.

DOB-WL red blood cells was observed, as determined by flow cytometry.

Genotype frequencies for *DOA/DOA*, *DOA/DOB* and *DOB/DOB*, and for *HY* and *JO* alleles in Brazilians demonstrated a great variety of different alleles, which is consistent with the fact that the Brazilian population is very diverse, characterized by an intense racial admixture of immigrants from Europe, Africa and Asia, as well as Indian groups. The predominance of *DOB* in this population is consistent with published data in other populations [15, 17–19], but in contrast to the other populations [15], the frequency of the *JO* allele was demonstrated to be somewhat higher (1.4%) than the *HY* allele (0.9%) (Table 6).

Determination of the molecular basis underlying the antigens in the Dombrock blood group system has shown various rearrangements between the alleles associated with *DOA* and *DOB*. The various SNPs combinations could be explained as a normal variation within the *DO* gene and therefore they were expected in a genetically diverse group of individuals.

In summary, we found two novel *DO* alleles, namely *DOB-WL* and *DOA-SH*, and observed the occurrence of the *DOB-SH*

Table 6 DO alleles in ethnic populations

Allele	Ashenazi (%)	Chinese (%)	Israeli (%)	Thai (%)	New York donors (%)	Portuguese (%)	Chinese (%)
DOADOA	13.1	0	11.2	2	11	20	1
DOA/DOA-HA	1.4	1.7	5.3	0	1.8	NT	NT
DOA/JO	0	0	0	0	2.3	NT	NT
JO/JO	0	0	0	0	1.8	NT	NT
DOA/HY	0	0	0.5	0	0.5	NT	NT
DOA/DOB	30.4	12.1	42.6	14	21.5	46	18.5
HY/JO	0	0	0	0	0.9	NT	NT
DOB/DOA-HA	2.9	6.9	5.3	11	2.8	NT	NT
DOB/JO	0	0	0	0	1.4	NT	NT
HY/DOB-SH	0	0	0	0	1.4	NT	NT
HY/HY	0	0	0	0	1.4	NT	NT
DOB/HY	0	0	0	0	14.2	NT	NT
DOB/DOB-SH	0	0	0	0	0.5	NT	NT
DOB/DOB	52.2	79.3	35.1	73	38	34	80.5
References	[15]	[15]	[15]	[15]	[15]	[17]	[18]

NT, not tested.

and the DO-HA alleles recently described. For the first time, we show that the 898C/G polymorphism is neither ethnically restricted nor appears to be tightly linked to 323T that encodes the Hy-negative phenotype.

These findings demonstrate high heterogeneity of DO alleles in the Brazilian population and highlight the importance of testing DNA samples from distinct ethnic groups to achieve a better understanding of the genetic basis associated with blood group antigens. The possibility of using microarray or a bead array to identify blood group SNPs will provide a rapid procedure that can detect new alleles in donor cohorts.

Acknowledgements

We thank Josiane Thomazini Fukasawa for technical assistance.

References

- Banks JA, Hemming N, Poole J: Evidence that the Gy^a, Hy and Jo^a antigens belong to the Dombrock blood group system. *Var Sang* 1995; 68:177-182
- Rios M, Hue-Roye K, Oyen R, Miller J, Reid ME: Insights into the Holley- and Joseph-phenotypes. *Transfusion* 2002; 42:52-58
- Spring FA, Reid ME, Nicholson G: Evidence for expression of the Jo^a blood group antigen on the Gya/Hy-active glycoprotein. *Var Sang* 1994; 66:72-77
- Gubin AN, Njoroge JM, Wojda U, Pack SD, Rios M, Reid ME, Miller JL: Identification of the Dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP-ribosyltransferase gene family. *Blood* 2000; 96:2621-2627
- Scofield IL, Miller JP, Storry JR, Rios M, Reid ME: Evidence that Hy- RBCs express weak Jo^a antigen. *Transfusion* 2004; 44:170-172
- Reid ME: The Dombrock blood group system: a review. *Transfusion* 2003; 43:107-114
- Strupp A, Cash K, Uehlinger J: Difficulties in identifying antibodies in the Dombrock blood group system in multiply alloimmunized patients. *Transfusion* 1998; 38:1022-1025
- Shirey RS, Boyd JS, King KE, Catargli PP, Montgomery WM Jr, Ness PM: Assessment of the clinical significance of anti-Dob. *Transfusion* 1998; 38:1026-1029
- Moulds JJ, Polesky HF, Reid M, Ellis SS: Observations on the Gy-a and Hy antigens and the antibodies that define them. *Transfusion* 1975; 15:270-274
- Rios M, Hue-Roye K, Lee AH, Chiofolo JT, Miller JL, Reid ME: DNA analysis for the Dombrock polymorphism. *Transfusion* 2001; 41:1143-1146
- Storry JR, Westhoff CM, Charles-Pierre D, Rios M, Hue-Roye K, Vege S, Nance S, Reid ME: DNA analysis for donor screening of Dombrock blood group antigens. *Immunohematology* 2003; 19:73-76
- Rios M, Hue-Roye K, Storry JR, Lee T, Miller JL, Reid ME: Molecular basis of the Dombrock null phenotype. *Transfusion* 2001; 41:1405-1407
- Rios M, Storry JR, Hue-Roye K, Chung A, Reid ME: Two new molecular bases for the Dombrock null phenotype. *Br J Haematol* 2002; 117:765-767
- Lucien N, Celton JL, Le Pennec PY, Cartron JP, Bailly P: Short deletion within the blood group Dombrock locus causing a Do (null) phenotype. *Blood* 2002; 100:1063-1064
- Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajhala P, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, Lomas-Francis C, Chaudhuri A, Reid ME: A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* 2005; 45:680-688
- Reid ME, Hue-Roye K, Charles Pierre D, Halverson GR, Poole J, Castillo L, Baleotti W Jr, Lee A: Production, characterization and testing of monoclonal anti-Do^a. *Transfusion* 2004; 44:SP300

- 17 Araujo F, Pereira C, Monteiro F, Henriques I, Meireles E, Lacerda P, Cunha-Ribeiro LM: Genotyping Dombrock alleles in Portuguese blood donors by real-time PCR. *Transfusion* 2003; 43:1495–1496
- 18 Wu G-G, Jin S-Z, Deng Z-H, Zhao T-M: Polymerase chain reaction with sequence-specific primers-based genotyping of the human Dombrock blood group *DO1* and *DO2* alleles and the *DO* gene frequencies in Chinese blood donors. *Var Sang* 2001; 81:49–51
- 19 Reid ME: Complexities of the Dombrock blood group system revealed. *Transfusion* 2005; 45:92S–99S

TRANSFUSION



A Supplement to Transfusion

Mt. Rainier provides a dramatic 14,441-foot backdrop to Seattle, host city to the AABB Annual Meeting and TXPO, October 15-18, 2005



SP337

Molecular Studies Of DO Alleles In Brazilians Reveal The Presence Of 898G Mutation Without HY1

W Baleotti, Hemocentro, Marília, Marília, Brazil; M Rios, DETTD, CBER, FDA, Bethesda, MD; M E Reid, New York Blood Center, New York, NY; A Fabron Jr., Hemocentro, Marília, Marília, Brazil; J Pellegrino Jr., L Castilho (*castilho@unicamp.br*), Hemocentro, Unicamp, Campinas, Brazil

Background: The Dombrock blood group system consists of two antithetical antigens (Do^a and Do^b) and three high incidence antigens (Gy^a, Hy and Jo^a). The molecular background associated with Hy-negative and Jo(a-) was reported and the mutation 898G was associated with the presence of HY1 allele while 898C was found associated with HY2. The 898 C>G mutation, within the sequence motif for glycosylphosphatidylinositol linkage, may cause reduced efficiency of anchoring the protein to the RBC membrane, thereby weakening the expression of Gy^a and Do^b antigens. Based on this knowledge, we employed PCR-based assays to determine the DO alleles (DO A/DO B, HY and JO), the frequency of the 898 C>G mutation and its association with HY1 and HY2 in Brazilian blood donors. **Methods:** We tested DNA from 67 Brazilian blood donors by PCR-RFLP analysis to determine the changes on nucleotides; 793 A>G (DO A/DO B), 323 G>T (Hy+/Hy-), 898 C>G (HY1/HY2) and 350 C>T (JO). **Results:** Seven (10.4%) samples typed as DO A/DO A, 31 (46.2%) as DO A/DO B and 29 (43.3%) as DO B/DO B. Two (2.6%) samples were heterozygous for the HY2 allele (1 DO B/DO B and 1 DO A/DO B) and were 898C. Nineteen (27%) of the 67 DNA samples studied had the 898 C>G change (18 heterozygous and 1 homozygous) without the HY1 allele, Table 1. **Conclusion:** Our results show that the 898G is frequent in our population and is not invariably associated with the presence of HY1 allele. These findings emphasize the importance to test populations with different ethnic background to define their DO allele.

Table 1: Results on DO alleles in Brazilians

Number of samples	323	350	793	898
9	G	C	A/G	C/G
7	G	C	A/A	C/C
21	G	C	A/G	C/C
9	G	C	G/G	C/G
18	G	C	G/G	C/C
1	T/G	C	A/G	C/C
1	T/G	C	G/G	C/C
1	G	C	G/G	G/G