



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MAYRA DORIGAN DE MACEDO

DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE IMORTALIZAÇÃO CELULAR PARA
PRODUÇÃO DE DNA DE REFERÊNCIA PARA REALIZAÇÃO DE TESTES
MOLECULARES PARA VARIANTES RH E GRUPOS SANGUÍNEOS.

CAMPINAS

2020

MAYRA DORIGAN DE MACEDO

DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE IMORTALIZAÇÃO CELULAR PARA
PRODUÇÃO DE DNA DE REFERÊNCIA PARA REALIZAÇÃO DE TESTES
MOLECULARES PARA VARIANTES RH E GRUPOS SANGUÍNEOS.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Ciências na área de Clínica Médica.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LILIAN MARIA DE CASTILHO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA MAYRA DORIGAN DE MACEDO, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. LILIAN MARIA DE CASTILHO.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M151d Macedo, Mayra Dorigan de, 1984-
Desenvolvimento de técnica de imortalização celular para produção de DNA de referência para realização de testes moleculares para variantes Rh e grupos sanguíneos / Mayra Dorigan de Macedo. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Lilian Maria de Castilho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anemia falciforme. 2. Vírus Epstein-Barr. I. Castilho, Lilian Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of a cell immortalization technique for the production of reference DNA to perform molecular tests for Rh variants and blood groups

Palavras-chave em inglês:

Sickle cell disease

Epstein-Barr virus

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Lilian Maria de Castilho [Orientador]

Marcelo Addas de Carvalho

Simone Cristina Olenscki Gilli

Simone Kashima Haddad

Carine Prisco Amoni

Data de defesa: 23-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0772-7849>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3147032685461013>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MAYRA DORIGAN DE MACEDO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LILIAN MARIA DE CASTILHO

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROFA. DRA. LILIAN MARIA DE CASTILHO**
 - 2. PROF. DR. MARCELO ADDAS-CARVALHO**
 - 3. PROFA. DRA. SIMONE CRISTINA OLENSCKI GILLI**
 - 4. PROFA. DRA. SIMONE KASHIMA HADDAD**
 - 5. PROFA. DRA. CARINE PRISCO ARNONI**
-

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 23/11/2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que foram fundamentais para que eu conseguisse desenvolvê-lo.

Primeiramente aos meus pais, **Neuza** e **José Carlos**, que sempre estiveram ao meu lado, que por inúmeras vezes se deslocaram por 400 km, deixando seus compromissos para me dar suporte, cuidar da minha filha e possibilitar que eu realizasse este trabalho. Muitas vezes abriram mão de seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu. Serei eternamente grata a vocês, meus amores.

Ao meu marido e parceiro de vida **Vitor**, que sempre me apoiou em meus objetivos, com compreensão e paciência, fazendo dos meus sonhos os dele.

À minha pequena **Bianca**, que surgiu inesperadamente no meio desta trajetória, como um desafio pessoal e fez-se objeto de meu fascínio pelo dom da vida. Uma benção de Deus que veio me ensinar o ato de amar incondicionalmente, desenvolver em mim a paciência, transformar as minhas prioridades, inspirar-me a cada dia, mostrar o quanto posso ser forte e que no final tudo dará certo.

À minha família: meus irmãos **Rodrigo** e **Leandro**, meus sobrinhos **Flávio**, **Júlia**, **Gabriela**, **Rafael**, **Miguel** e **Duda**, minhas cunhadas **Renata**, **Maria**, **Vanessa** e **Ellen**, e cunhados **Vinícius** e **Flávio**, à minha sogra **Elisa** e sogro **Vitor**. Essa turma sempre me apoiou, me ajudou, compreendeu minha ausência nas reuniões familiares, esteve comigo nos momentos de tristeza e de gargalhadas deliciosas.

À minha amiga **Kiara Zapponi**, pelo apoio no decorrer destes anos de trabalho no laboratório de sorologia, pelas conversas e palavras doces.

À minha orientadora do mestrado, Dra. **Simone Kashima**, quem me apresentou à Profa. Lilian, colocou-me no caminho do doutorado e mais uma vez influenciou positivamente em minha formação. À amiga Dra. **Evandra Strazza**, pelos conselhos, troca de ideias, discussões de estratégias experimentais, e pelo ombro amigo mesmo à distância.

À Prof. Dra. **Lilian Castilho**, que mais do que minha orientadora acadêmica, me orientou na vida, com acolhimento, apoio e compreensão. Jamais vou me esquecer de sua serenidade comigo quando descobri, no momento mais

importante deste trabalho, que estava grávida. Confiou em mim e apostou na minha capacidade de enfrentar os novos desafios. A você, o meu eterno obrigado.

Agradeço a Deus, pela minha vida e saúde, pelas pessoas que colocou e coloca em meu caminho, e que contribuem para meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos pacientes portadores de doença falciforme e aos doadores de sangue que foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho. Aos pacientes, minha admiração na luta diária pela vida, por aceitar participar de nosso estudo, como um fio de esperança de dias melhores. Aos doadores de sangue, que em um gesto de benevolência e amor ao próximo, doam vida e se doaram à nossa pesquisa, acreditando em nosso trabalho.

Agradeço imensamente à minha orientadora **Lilian Maria de Castilho**, pelas orientações, pela parceria e confiança em mim depositada. Por me ajudar inúmeras vezes e ser peça fundamental no desenvolvimento deste trabalho e nesta conquista.

Às parceiras de trabalho do laboratório de biologia molecular de grupos sanguíneos: **Emília, Anne, Tamires, Sheila, Ianca e Maria Rita**. Todas contribuíram na realização dos experimentos.

À Profa. Dra. **Maria de Fátima Sonati**, por disponibilizar a sala de cultura NB2 de seu laboratório de hemoglobinopatias hereditárias, e às suas alunas **Susan Jorge e Danaê Malimpensa** pelo apoio.

À Profa. Dra. **Laura Sterian**, funcionária **Natássia** e alunas **Jaqueline e Elisângela**, do laboratório de genética molecular do câncer no qual foram realizados os experimentos de PCR real time para o gene viral.

Ao laboratório de biologia molecular e cultura celular da Profa. Dra. **Sara Teresinha Olalla Saad**, em especial às funcionárias **Adriana da Silva Santos e Audrey Basso Zangirolami**, por toda ajuda, desde a preparação de reagentes, empréstimos de materiais até as discussões técnico-científicas.

Ao Prof. Dr. **Fernando Ferreira Costa** do laboratório de hemoglobinopatias e genoma que me autorizou a utilizar sua sala de estudo, viabilizando minhas leituras acadêmicas e análises dos resultados. E às funcionárias **Dulcinéia e Carolina**, pelo auxílio na realização dos sequenciamentos genômicos e parte burocrática de aquisição de materiais e reagentes.

Ao laboratório de hemostasia da Profa. Dra. **Joyce M. Annichino-Bizzacchi**, em especial à funcionária **Beatriz**, quem me auxiliou no uso do liofilizador.

À amiga **Devanira Paxão** do laboratório de imunologia plaquetária pela assistência e suporte em todo o decorrer deste trabalho.

Aos laboratórios do Hemocentro: investigação molecular e celular (**Lúcia Helena – Ucha**), controle de qualidade (**Andrea Fernanda Origa**), sorologia de doenças infectocontagiosas (**Ana Cláudia Azevedo e Vitor Costa**), imunohematologia especializada (**Ana Carolina Telles e Fernanda Moretto**). Aos laboratórios externos: Laboratório de referência em grupos sanguíneos do Einstein e o de imunohematologia da Colsan. Ao ambulatório de transfusão (Dra. **Simone Gilli**), ao setor de convocação de doadores (Dr. **Vagner de Castro e Thalita**) e coleta de sangue (equipe de enfermagem). A todos os funcionários do hemocentro que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP nos processos nº 2014/00984-3 e nº 2015/07559-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

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

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A transfusão de hemácias em pacientes com doença falciforme permanece como a principal intervenção no tratamento desta patologia. Contudo, a alta incidência da produção de anticorpos com importância clínica, principalmente como consequência da grande diversidade do locus RH, resulta em reações transfusionais hemolíticas, o que aumenta a complexidade dos testes de compatibilidade sanguínea. Métodos moleculares têm sido incorporados na rotina imunohematológica complexa e erros poderiam ser evitados com o emprego de painéis de DNA de referência validados. Várias são as formas de obtenção destes painéis. Dentre elas, a transformação de linfócitos B em linhagens celulares linfoblastóides (B-LCLs) pelo vírus Epstein-Barr (EBV), as quais fornecem material ideal para estudos genéticos e fenotípicos, tornando-se fonte ilimitada de biomoléculas. Assim, as B-LCLs têm sido utilizadas como material de referência em estudos genômicos. O objetivo deste trabalho foi identificar variantes do sistema Rh associadas com polimorfismos genéticos nos genes *RHD* e *RHCE* em pacientes portadores de doença falciforme e doadores de sangue e obter material genético de referência das mesmas a partir da imortalização de seus linfócitos B. Para isto, o EBV foi obtido a partir do cultivo da linhagem celular B95-8. Determinou-se a carga viral por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) a ser utilizado no processo de imortalização. Amostras de sangue total de quatro pacientes portadores de doença falciforme e um doador de sangue foram coletadas e analisadas por genotipagem eritrocitária estendida e pesquisa de variantes *RHD* e *RHCE*. Duas amostras (SCS_1981 e VACS_2730) foram enviadas ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) para imortalização. As demais foram processadas *in house*, com o isolamento das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) e avaliação de dois protocolos de imortalização dos linfócitos B pelo EBV: um utilizando meio de transformação com fitohemaglutinina (PHA-M) e outro com ciclosporina A (CsA). Das B-LCLs estabelecidas foram obtidos os DNAs, com posterior liofilização do mesmo e genotipagem eritrocitária pós-imortalização celular por laboratórios externos e *in house*. Como resultado, a carga viral obtida foi de 1×10^6 cópias virais/ μ L. Comparando os dados obtidos dos dois meios de transformação, ambos indicaram prevenir regressão celular. Contudo, ocorreu falha na transformação das células. As células enviadas ao BCRJ foram imortalizadas com sucesso, com confirmação dos genótipos eritrocitários anteriormente

identificados. De duas amostras foram obtidos seis alelos RH variantes que produzem anticorpos clinicamente significantes: *RHD*, *RHD*^{DAR}*, *RHD*^{DIIIa-CE(4-7)-D}*, *RHCE*^{ceAR}*, *RHCE*^{ce(733G)}*, *RHCE*^{ce(48C,733G,1006T)}*. Desta maneira, conclui-se que o estabelecimento das B-LCLs, mesmo demandando longos e difíceis períodos de trabalho pode ser eficiente e necessário no atual cenário das análises moleculares de grupos sanguíneos, uma vez que estas células são relativamente estáveis quanto a mutações genômicas e possuem código genético específico de cada indivíduo.

Palavras-chave: Anemia Falciforme; Variantes Rh; Genotipagem de grupos sanguíneos; Linhagens celulares linfoblásticas; Imortalização; Vírus Epstein-Barr.

ABSTRACT

Transfusion therapy in sickle cell disease (SCD) patients remains the main intervention in the treatment of this pathology. However, the high incidence of antibodies production with clinical significance mainly because of the RH locus diversity results in hemolytic transfusion reactions which increases the complexity of compatibility tests. Molecular methods have been incorporated into the complex immunohaematological routine and errors could be avoided with the use of validated reference DNA panels. There are several ways to obtain these panels. Among them the transformation of B lymphocytes into B-lymphoblast cell lines (B-LCLs) by the Epstein-Barr virus (EBV) which provides ideal material for genetic and phenotypic studies becoming an unlimited source of biomolecules. Thus, B-LCLs have been used as reference material in genomic studies. The goal of this study was to identify Rh variants associated with genetic polymorphisms in the *RHD* and *RHCE* genes in patients with SCD and blood donors, in order to obtain reference genetic material from them through the immortalization of their B lymphocytes. For this, the EBV was obtained from the cultivation of cell line B95-8. We analyzed the viral load by quantitative real-time PCR (qPCR) to be used in the immortalization process. Whole blood samples from four patients with SCD and one blood donor were collected and analyzed by extended red cell genotyping including *RHD* and *RHCE* variants. Two samples (SCS_1981 e VACS_2730) were sent to the Cell Bank (BCRJ) from Rio de Janeiro for immortalization. The others were processed in house with the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and evaluation of two protocols for immortalization of B lymphocytes by EBV: one using transformation medium with phytohemagglutinin (PHA-M) and the other with cyclosporine A (CsA). DNAs were obtained from the established B-LCLS, with subsequent lyophilization and red cell genotyping after cell immortalization was performed by external laboratories and in house. As result the viral load obtained was 1×10^6 viral copies/ μL . Comparing the data obtained from the two transformation media, both indicated to prevent cell regression. However, the cells transformation failed. The cells sent to the BCRJ were successfully immortalized with confirmation of the red cell genotypes previously identified. Six RH variant alleles that produce clinically significant antibodies were obtained from the two samples: *RHD*, *RHD**DAR, *RHD**DIIIa-CE(4-7)-D, *RHCE**ceAR, *RHCE**ce(733G), *RHCE**ce(48C,733G,1006T). Thus, we concluded

that the establishment of B-LCLs even demanding long and difficult periods of work it is efficient and necessary in the current scenario of molecular analysis of blood groups since these cells are relatively stable in terms of genomic mutations and have specific genetic code of each individual.

Key words: Sickle Cell Disease; Rh Variants; Blood group genotyping; Lymphoblastoid cell lines; Immortalization; Epstein-Barr Virus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Alterações molecular e estrutural da anemia falciforme.....	22
Figura 2 – Representação esquemática dos genes <i>RHD</i> , <i>RHCE</i> e das proteínas Rh codificadas por eles (D, C, c, E, e).....	28
Figura 3 – Mecanismo de conversão gênica no Locus do gene <i>RH</i>	28
Figura 4 – Fluxograma da estratégia experimental do estudo.....	46
Figura 5 – Representação esquemática da placa de cultivo no processo de imortalização.....	43
Figura 6 – Cultivo da célula B95-8 ao quinto dia (D=5) do protocolo de produção viral.....	48
Figura 7 – Cultivo da célula B95-8 ao décimo dia (D=10) do protocolo de produção viral.....	49
Figura 8 – Cultivo da célula B95-8 ao décimo quinto dia (D=15) do protocolo de produção viral.....	49
Figura 9 – Quantificação da carga viral de Epstein-Barr: curva de amplificação (gene alvo <i>EBNA-1</i>) com indicação do número de cópias virais (10^8 a 10^3 cópias/ μ L) para cada ponto da curva padrão.....	50
Figura 10 – Cultura celular do controle negativo do processo de imortalização (linfócitos B mais meio de cultivo tradicional).....	51
Figura 11 – Cultura celular do protocolo de imortalização dos linfócitos B com meio de transformação com PHA-M.....	52
Figura 12 – Cultura celular do protocolo de imortalização dos linfócitos B com meio de transformação com CsA.....	53
Figura 13 – Cultura celular para expansão das B-LCLs.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas de grupos sanguíneos.....	26
Tabela 2. Polimorfismos genéticos associados às variantes Rh mais comuns em pacientes portadores de doença falciforme.....	32
Tabela 3. Alelos variantes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> identificados em pacientes portadores de doença falciforme.....	47
Tabela 4. Alelos variantes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> identificados em doadores de sangue.....	47
Tabela 5. Variantes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> identificadas nas análises moleculares eritrocitária dos participantes do estudo antes da imortalização celular.....	48
Tabela 6. Quantificação do DNA obtido da cultura de células B95-8 após protocolo de produção viral e média dos <i>Cts</i> na PCR em tempo real.....	50
Tabela 7. Resultados dos critérios avaliados na imortalização dos linfócitos B com meio de transformação com PHA-M.....	52
Tabela 8. Resultados dos critérios avaliados na imortalização dos linfócitos B com meio de transformação com CsA.....	53
Tabela 9. Concentração dos DNAs das B-LCLs antes e após o processo de liofilização.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-D	Anticorpo contra o antígeno D
Anti-HBc	Anticorpo contra o <i>core</i> do vírus da Hepatite B
anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da Hepatite C
AVC	Acidente vascular cerebral
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
B-LCLs	Linhagens celulares linfoblastóides de células B
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMIA	Imunoensaio de quimioluminescência
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CsA	Ciclosporina A
<i>Ct</i>	<i>Cycle threshold</i>
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
C1	Concentrado celular 1
C2	Concentrado celular 2
DHFRN	Doença hemolítica do feto e do recém-nascido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTC	Doppler ultrassonográfico transcraniano
EBNA1	Antígeno nuclear 1 do vírus Epstein-Barr
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FCM	Faculdade de Ciências Médicas

FK506	Imunossupressor Tacrolimus
Hb	Hemoglobina
HbS	Hemoglobina S
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HHV4	Herpesvírus humano 4
HIV I/II	Vírus da imunodeficiência humana I/II
HTLV I/II	Vírus linfotrófico T humano I/II
ISBT	Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea
LCLs	Linhagens celulares linfoblastóides
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
pb	Pares de base
PBMCs	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Salina Tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PHA-M	Fitohemaglutinina
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
S1	Sobrenadante do concentrado celular 1

S2	Sobrenadante do concentrado celular 2
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecidas
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus celcius
cm	Centrímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
g	Gramas
<i>q.s.p.</i>	Quantidade suficiente para
≤	Menor igual
μL	Microlitros
μm	Micrometro
μM	Micromolar
mg	Miligramas
mL	Militros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
nm	Nanometro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Anemia Falciforme.....	22
1.1.1. Fisiopatologia.....	22
1.1.2. Manifestações Clínicas.....	23
1.1.3. Tratamento.....	23
1.1.4. Aloimunização Eritrocitária.....	24
1.2. Sistemas de Grupos Sanguíneos e a Aloimunização.....	25
1.2.1. Sistema Rh.....	27
1.2.2. Genotipagem RH.....	29
1.2.3. Painéis de Referência para Genotipagem de Variantes RH.....	31
1.3. Imortalização Celular de Linfócitos B pelo Vírus Epstein-Barr.....	33
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. Objetivo Geral.....	36
2.1.1. Objetivos Específicos.....	36
3. METODOLOGIA.....	37
3.1. Casuística.....	37
3.1.1. Indivíduos Participantes.....	37
3.1.2. Aspectos Éticos da Pesquisa.....	37
3.2. Materiais e Métodos.....	37
3.2.1. Coleta das Amostras de Sangue Total.....	37
3.2.2. Testes Sorológicos para Doenças Infecciosas.....	38
3.2.3. Obtenção das Frações do Sangue: Plasma, <i>Buffy Coat</i> e Hemácias...38	
3.2.3.1. Congelamento de Plasma e Hemácias.....	38

3.2.4. Extração de DNA.....	39
3.2.5. Isolamento das Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs).....	39
3.2.6. Imortalização de Linfócitos B pelo Vírus Epstein-Barr.....	40
3.2.6.1. Cultivo da B95-8 e Produção do EBV.....	41
3.2.6.2. Quantificação da Carga Viral por qPCR e Preparo de Estoques Virais.....	41
3.2.6.3. Produção das Linhagens Celulares Linfoblastóides (B-LCLs).....	42
3.2.7. Liofilização do DNA das B-LCLs.....	44
3.2.8. Genotipagem Eritrocitária.....	44
4. RESULTADOS.....	47
4.1. Genotipagem Eritrocitária.....	47
4.2. Indivíduos Selecionados.....	47
4.3. Cultivo da B95-8 para Produção do EBV.....	48
4.4. Quantificação da Carga Viral por qPCR.....	49
4.5. Produção das Linhagens Celulares Linfoblastóides (B-LCLs).....	51
4.6. Análises dos DNAs das B-LCLs Pós-Liofilização.....	54
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	64
8. ANEXOS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anemia Falciforme

1.1.1. Fisiopatologia

A anemia falciforme é uma desordem hematológica hereditária caracterizada por uma alteração molecular que consiste na substituição de uma base adenina (A) por uma timina (T) (GAG→GTG) no códon 6 do gene da globina β . Esta mutação de ponto resulta na substituição de um ácido glutâmico por uma valina ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$) na sexta posição da cadeia polipeptídica β da hemoglobina (Hb), e como consequência uma alteração em sua estrutura, originando uma hemoglobina anômala, a hemoglobina S (HbS)¹. A HbS, em seu estado desoxigenado (desoxi-HbS) e em concentração elevada, é capaz de estabelecer interações intermoleculares hidrofóbicas que promovem a sua polimerização no interior da célula, com drástica redução na sua solubilidade, causando deformação, enrijecimento, diminuição da flexibilidade (hemácias falcizadas), diminuição da sobrevivência das hemácias e à oclusão da microvasculatura² (Figura 1).

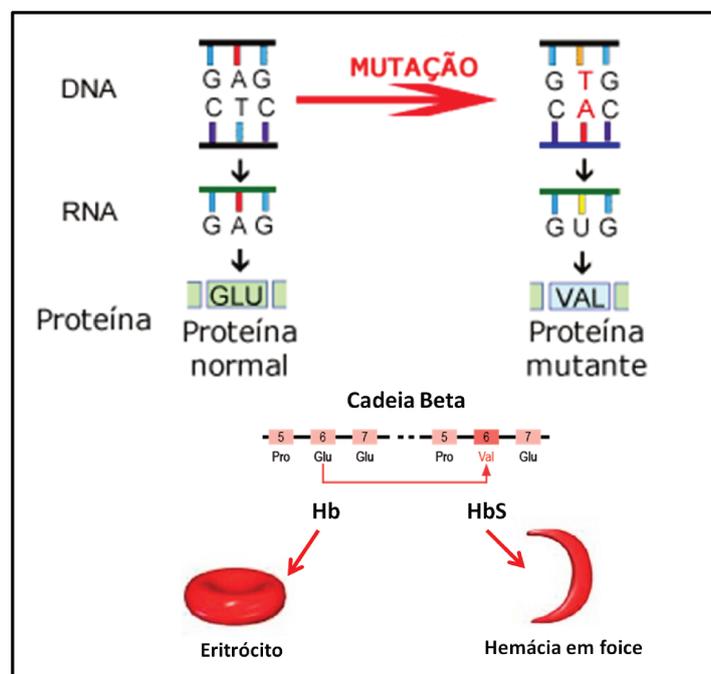


Figura 1- Alterações molecular e estrutural da anemia falciforme. Fonte: Adaptado de Ecologia – Instituto de Biociências [Internet]³.

A polimerização da hemoglobina S é o evento central na patogenia da anemia falciforme, resultando na alteração da forma do eritrócito (forma de foice). A repetição frequente desse fenômeno provoca lesão de membrana em algumas células, fazendo com que a rigidez e a configuração em forma de foice persistam mesmo após a reoxigenação¹.

1.1.2. Manifestações Clínicas

Nas doenças falciformes, as manifestações clínicas são variáveis e derivadas primariamente da oclusão vascular, a qual pode afetar praticamente todos os órgãos. Os pacientes com doença falciforme podem apresentar uma fase estável da doença, com períodos sem manifestações clínicas, bem como interrupções nesta com manifestações agudas, denominadas crises de falcização e caracterizadas por dor intensa. As crises de falcização podem ser classificadas em crises vaso-oclusivas ou episódios dolorosos, crises aplásticas, hemolíticas e de sequestro esplênico e hepático¹.

Em decorrência da acentuada rigidez das hemácias irreversivelmente falcizadas, a redução na vida-média dessas células contribui significativamente para a anemia hemolítica destes pacientes. No entanto, o quadro clínico da anemia falciforme não depende substancialmente dos sintomas causados pela anemia propriamente, mas, sim, da ocorrência de lesões orgânicas causadas pela inflamação e obstrução vascular e das crises de falcização. Outras manifestações clínicas podem ocorrer: complicações cardíacas, pulmonares, neurológicas, hepatobiliares, genitourinárias, oftalmológicas, osteoarticulares, bem como manifestações cutâneas¹.

1.1.3. Tratamento

A terapêutica dos pacientes com doença falciforme consiste no tratamento das complicações específicas e em cuidados gerais da saúde. São limitados os tratamentos disponíveis para profilaxia da morbidade da doença falciforme. As modalidades preventivas mais comumente utilizadas são hidroxiureia e transfusão sanguínea simples ou de substituição. A terapia por hidroxiureia, a qual promove o aumento da hemoglobina fetal, não é efetiva em todos os pacientes. Já o objetivo do regime transfusional é manter o nível de hemoglobina S abaixo de 30%, isto é, diluir a HbS com hemoglobina A e alcançar uma elevação prolongada dos níveis de

hemoglobina e hematócrito¹. Contudo, a transfusão de substituição pode ter o efeito adicional de remoção dos fatores solúveis inflamatórios e da coagulação. Outros efeitos adversos da transfusão crônica são o acúmulo de ferro, a transmissão de patógenos, reações transfusionais e principalmente a aloimunização eritrocitária que pode causar reações transfusionais hemolíticas tardias e agudas, produção de autoanticorpos e síndrome de hiperhemólise⁴. Ainda assim, em muitos casos, a terapia transfusional traz mais benefícios do que riscos e muitas vezes a necessidade desta conduta transpõe as complicações consequentes da mesma. Como exemplo, um estudo demonstrou claramente que um regime de transfusão sanguínea que mantenha o nível de HbS abaixo de 30% reduz significativamente o risco do primeiro episódio de acidente vascular cerebral (AVC) em crianças com Doppler Ultrassonográfico Transcraniano (DTC) alterado⁵.

1.1.4. Aloimunização Eritrocitária

As transfusões de concentrados de hemácias melhoram significativamente a morbidade e mortalidade em pacientes portadores de doença falciforme^{6,7}. Contudo, a exposição de um paciente a antígenos eritrocitários que estejam ausentes em suas hemácias (aloantígenos) pode induzir a ativação de uma resposta imune humoral, desencadeando a produção de anticorpos antieritrocitários, evento denominado aloimunização eritrocitária⁸. Além disso, a presença de aloanticorpos muitas vezes está associada com a presença de autoanticorpos, dificultando a identificação dos anticorpos formados e aumentando a complexidade dos testes de compatibilidade sanguínea, o que pode atrasar ou até mesmo impedir a transfusão de unidades de sangue antígeno-negativo para estes pacientes.

A transfusão de concentrado de hemácias não é considerada um estímulo altamente imunogênico, mesmo com a grande diversidade de epítomos de grupos sanguíneos presentes nas transfusões não autólogas⁸. A aloimunização a antígenos eritrocitários por transfusão sanguínea tem sido estimada entre 1-2,6% em pacientes hospitalizados em geral^{9,10}. Contudo, tem se observado que as taxas de aloimunização em pacientes que requerem terapia transfusional crônica são mais elevadas do que na população transfundida em geral. Em pacientes com Talassemia a taxa de aloimunização varia de 5,2% à 23,4%^{11,12}, enquanto que em pacientes com doenças onco-hematológicas e síndrome mielodisplásica a incidência é respectivamente de 9-16%^{13,14} e 15%¹⁵. Já na anemia falciforme a taxa de

aloimunização é maior, podendo variar de 18%¹⁶ a 52%^{17,18}. Em pacientes com anemia falciforme em regime de transfusões crônicas, a produção de anticorpos é uma complicação ainda mais grave, uma vez que 33 a 60% dos pacientes tornam-se imunizados e 45% desenvolvem múltiplos anticorpos¹⁹. Adicionalmente, pacientes que se tornam aloimunizados estão 20 vezes mais propensos a formar anticorpos adicionais após um ou mais eventos de transfusões¹⁴.

A complexidade do uso da terapia transfusional em pacientes portadores de doença falciforme está relacionada à alta incidência de aloimunização eritrocitária^{6,7}, em especial contra antígenos do sistema Rh devido à grande diversidade do locus RH nesses pacientes. Transfusões crônicas associadas com a presença de anticorpos eritrocitários podem resultar em reações transfusionais hemolíticas (aguda ou tardia) e na síndrome de hiperhemólise, com consequentemente diminuição da sobrevivência das hemácias transfundidas e um aumento dos riscos à vida do paciente⁸.

1.2. Sistemas de Grupos Sanguíneos e a Aloimunização

A maioria dos antígenos de grupos sanguíneos é herdada geneticamente e estabelecidos por sequências específicas de aminoácidos que constituem uma proteína, a qual pode ou não estar ligada a carboidratos ou lipídios²⁰. Estas proteínas de superfície podem aparecer ancoradas na membrana dos glóbulos vermelhos ou atravessarem a bicamada lipídica, comportando-se como determinantes antigênicos presentes na superfície das hemácias com capacidade de induzir uma resposta imune^{21,22}.

De acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (*International Society of Blood Transfusion – ISBT*) até o momento estão descritos 377 antígenos eritrocitários, sendo que 343 estão distribuídos em 43 sistemas de grupos sanguíneos (Tabela 1)²¹. A grande diversidade dos antígenos eritrocitários é originada a partir de alterações nos genes que variam desde polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), inserções, deleções, splicing alternativo, dentre outros mecanismos moleculares^{23,24}.

Tabela 1. Sistemas de grupos sanguíneos.

Nº	Nome do Sistema	Símbolo do Sistema	Nome(s) do gene(s)*	Número de antígenos	Localização Cromossomal
001	ABO	ABO	<i>ABO</i>	4	9q34.2
002	MNS	MNS	<i>GPYPA, GYPB, (GYPE)</i>	49	4q31.21
003	P1Pk	P1PK	<i>A4GALT</i>	3	22q13.2
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	55	1p36.11
005	Lutheran	LU	<i>BCAM</i>	25	19q13.2
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	36	7q33
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	6	19p13.3
008	Duffy	FY	<i>ACKR1</i>	5	1q21-q22
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	3	18q11-q12
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	22	17q21.31
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	5	7q22
012	Xg	XG	<i>XG, MIC2</i>	2	Xp22.32
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	7	1p34.2
014	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	10	12p13-p12
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	4	7p14
016	Landsteiner-Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	3	19p13.2
017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	9	6p21.3
018	H	H	<i>FUT1</i>	1	19q13.33
019	Kx	XK	<i>XK</i>	1	Xp21.1
020	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	11	2q14-q21
021	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	20	1q32
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	9	1q32.2
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	6	11p13
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	3	19p13.3
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	1	11p15.5
026	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	6	15q22.3-q23
027	I	I	<i>GCNT2</i>	1	6p24.2
028	Globosideo	GLOB	<i>B3GALNT1</i>	2	3q25
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	1	9p13
030	Rh-glicoproteína associada	RHAG	<i>RHAG</i>	3	6p12.3
031	FORS	FORS	<i>GBGT1</i>	1	9q34.13-q34.3
032	JR	JR	<i>ABCG2</i>	1	4q22.1
033	LAN	LAN	<i>ABCB6</i>	1	2q36
034	Vel	VEL	<i>SMIM1</i>	1	1p36.32
035	CD59	CD59	<i>CD59</i>	1	11p13
036	Augustine	AUG	<i>SLC29A1</i>	4	6p21.1
037	KANNO	KANNO	<i>PRNP</i>	1	20p13
038	Sid	SID	<i>B4GALNT2</i>	1	17q21.32
039	CTL2	CTL2	<i>SLC44A2</i>	2	19p13.2
040	PEL	PEL	<i>ABCC4</i>	1	13q32.1

041	MAM	MAM	<i>EMP3</i>	1	19
042	EMM	EMM	<i>PIGG</i>	1	4p16.3
043	ABCC1	ABCC1	<i>ABCC1</i>	1	16

*Como definido pelo HUGO Gene Nomenclature Committee <http://www.genenames.org/>.
Fonte: Adaptado de ISBT²¹.

Os sistemas de grupos sanguíneos Rh e Kell estão entre os que possuem antígenos mais imunogênicos, sendo que anticorpos dirigidos a estes antígenos são os mais frequentemente encontrados em pacientes com anemia falciforme²⁵. Visando prevenir a formação de aloanticorpos e as suas consequências, muitos serviços têm adotado o protocolo transfusional de compatibilidade para os antígenos ABO, Rh e Kell, o que tem contribuído para a redução da taxa de aloimunização^{26,27}. Contudo, tem sido demonstrado²⁸ que a implementação de protocolos de compatibilidade estendida mostrou uma eficácia maior, com níveis mais baixos de aloimunização e taxas de formação de anticorpos quando comparado à programas de compatibilidade intermediária (C, E e K)^{26,27}.

1.2.1. Sistema Rh

Desde a descoberta do sistema Rh em 1939 por Levine e colaboradores, há um grande interesse clínico no mesmo por seus anticorpos estarem envolvidos na aloimunização, com reações transfusionais hemolíticas e doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN). Este sistema é um dos mais importantes, complexos, polimórficos e imunogênicos sistemas de grupos sanguíneos com um grande número de antígenos²⁹. É composto por 56 antígenos definidos sorologicamente e reconhecidos pela ISBT²¹.

O Lócus RH está presente no braço curto do cromossomo 1 e consiste de dois genes altamente homólogos, com orientações opostas, 10 éxons cada um e uma sequência de aproximadamente 60.000 pares de bases (pb): o gene *RHD* que codifica a proteína D e o gene *RHCE* que codifica os antígenos CE em várias combinações (Ce, cE, ce, CE)^{29,30} (Figura 2). A maior diferença entre eles está no íntron 4, com uma deleção de 600pb no gene *RHD* em relação ao *RHCE*^{31,32}.

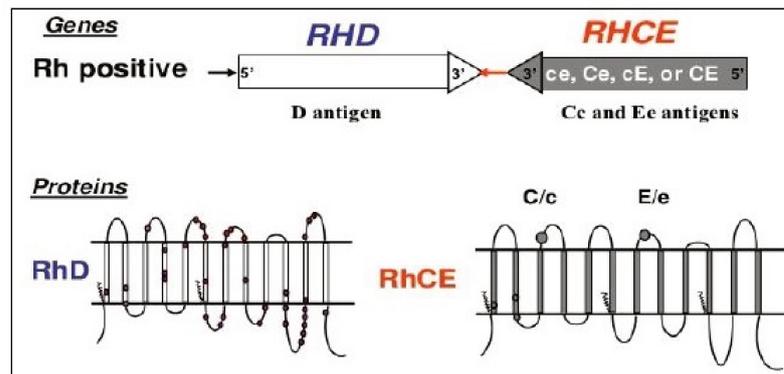


Figura 2- Representação esquemática dos genes *RHD*, *RHCE* e das proteínas Rh codificadas por eles (D, C, c, E, e)³³.

Como consequência da homologia e orientação oposta, podem ocorrer rearranjos entre estes genes que podem resultar na formação de genes híbridos. Estes rearranjos permitem a formação de "hairpin" e trocas gênicas pelo mecanismo de conversão gênica (Figura 3)³⁰. Um grande número de variantes RH e antígenos de baixa incidência surgem a partir deste mecanismo^{30,34}. Os genes *RHD* e *RHCE* são herdados como haplótipos e a expressão das proteínas ocorre exclusivamente nos eritrócitos.

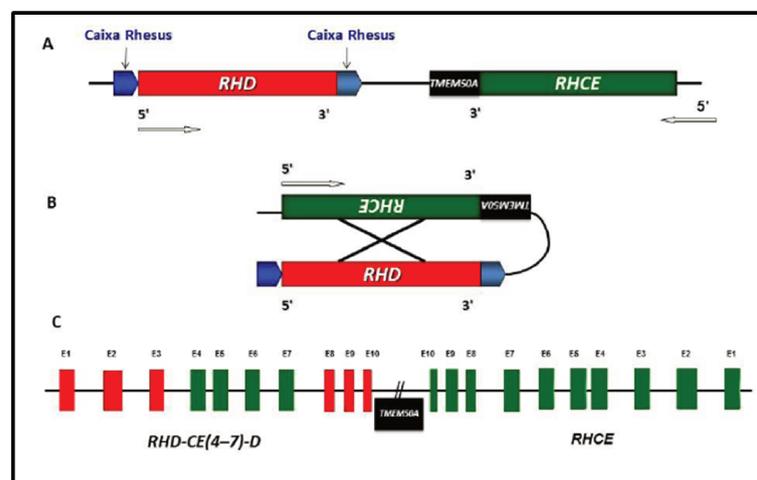


Figura 3- Mecanismo de conversão gênica no Locus do gene *RH*. **(A)** orientação oposta dos genes *RHD* e *RHCE*. **(B)** formação de *hairpin* com proximidade de segmentos homólogos em orientação idêntica. **(C)** estrutura de gene híbrido formada (RHD-CE(4-7)-D)³⁰.

As proteínas RhD e RhCE são hidrofóbicas e não glicosiladas, compostas por 417 aminoácidos, com 92% de homologia e diferem-se em 35/36 aminoácidos, sugerindo que os genes correspondentes são resultantes de uma duplicação de um gene ancestral comum^{31,32}. O antígeno D é o mais imunogênico do sistema RH, sendo 20 vezes mais potente que o antígeno c. Aproximadamente 80% dos indivíduos Rh negativo que recebem sangue Rh positivo irão produzir anti-D após o primeiro contato³⁵. A formação de genes híbridos é um dos principais mecanismos moleculares que explica o fenótipo RhD negativo (ausência do antígeno D) em indivíduos afrodescendentes, seguido pela presença do pseudogene, uma inserção de 37pb na junção íntron 3/éxon 4 no gene *RHD* que leva a formação de um códon de parada e conseqüentemente à não expressão do antígeno D³⁵.

A herança de variantes *RH* que codificam antígenos Rh parciais que resultam na ausência de um ou mais epítomos da proteína Rh compromete a expressão do antígeno D, fazendo com que ele se expresse de forma parcial³⁵. Além disso, fenótipos denominados como D fracos expressam um antígeno RhD intacto, com pouca probabilidade de formar aloanticorpo anti-D. No entanto, a presença de anti-D em alguns casos de D fraco tipo 4 e 15 já foi relatado^{36,37}.

As variantes *RHD* mais frequentemente encontradas em pacientes portadores de doença falciforme incluem os antígenos D parcial *DIIIa*, *DAR*, *DIVa*, *DAU* e *DOL*, enquanto que as variantes *RHCE* mais comuns são as derivadas de alelos *RHCE*ce* alterados que produzem antígenos “c” e “e” parciais que levam a não expressão dos antígenos de alta frequência hr^B e hr^S nas hemácias. Variantes da forma alélica *RHCE*ce* são geralmente herdadas com variantes do gene *RHD* em portadores de doença falciforme que acabam desenvolvendo anticorpos Rh complexos, na maioria das vezes clinicamente significantes, acarretando uma complicação séria a estes pacientes^{10,38}.

1.2.2. Genotipagem RH

Os laboratórios especializados em imunohematologia surgiram a partir da necessidade de análises mais detalhadas nos casos de pesquisas de anticorpos positivas, provas de compatibilidade incompatíveis e reatividade antigênica incomum³⁹. A resolução destes problemas tem sido realizada por testes de hemaglutinação (*gold standard*). Mas, devido às limitações destes testes sorológicos, especialmente em pacientes cronicamente transfundidos, atualmente

métodos moleculares têm sido incorporados na rotina imunohematológica complexa, pois além de possibilitarem uma determinação mais correta do perfil eritrocitário de um indivíduo, permitem identificar genes alterados que levam ao silenciamento ou fraca expressão de antígenos de grupos sanguíneos e possibilitam distinguir aloanticorpos de autoanticorpos³⁹. Uma das principais causas de aloimunização eritrocitária em pacientes com doenças falciformes é a diferença do perfil de antígenos eritrocitários entre doadores e pacientes com respectiva ascendência européia e africana e a predominância de variantes Rh em indivíduos de origem africana. Tem se observado que alguns pacientes, mesmo recebendo transfusões de sangue Rh compatível, desenvolvem anticorpos contra antígenos do sistema Rh e, a análise molecular, independentemente dos testes sorológicos realizados, tem revelado a presença de vários alelos *RH* alterados nestes indivíduos⁴⁰. Estas proteínas Rh alteradas não podem ser detectadas sorologicamente, mas podem ser reconhecidas pelo sistema imune como antígenos. Assim, estes pacientes podem produzir anticorpos tanto para proteínas alteradas RhD quanto RhCE⁴⁰, o que explica os casos de aloimunização Rh, apesar de transfusões compatíveis para os antígenos Rh.

Anticorpos contra variantes RhD e RhCE já demonstraram ser clinicamente significantes e uma das causas mais frequentes de reações transfusionais hemolíticas tardias^{41,42}. Portanto, a identificação de variantes RhD e RhCE pode ser de grande auxílio na prevenção da aloimunização e de reações transfusionais hemolíticas em pacientes portadores de doença falciforme politransfundidos. Atualmente a genotipagem para variantes RH está limitada a laboratórios de referência que realizam testes moleculares mais complexos, pois requer análise de várias regiões dos genes *RHD* e *RHCE*. No entanto, a prevalência de alelos *RH* alterados em portadores de doença falciforme tem levado vários laboratórios a expandir os testes moleculares para investigação de variantes Rh em doadores e pacientes com a finalidade de encontrar o sangue mais compatível para estes pacientes.

Em estudos anteriores^{42,43,44,45,46,47} demonstramos a importância da genotipagem de grupos sanguíneos na seleção mais adequada de sangue compatível para a transfusão de sangue de pacientes em regime de transfusão crônica. Verificou-se que a realização de genotipagem de variantes RH em pacientes e doadores de sangue aumenta a segurança transfusional, pois permite que a

maioria dos pacientes receba transfusões de sangue com um grau de compatibilidade maior e, conseqüentemente tenham um maior aproveitamento das transfusões recebidas.

Nos últimos anos, a genotipagem de grupos sanguíneos com ensaios multiplex tem sido amplamente utilizada na determinação de perfis antigênicos eritrocitários estendidos e de variantes RH^{48,49}. Com a utilização cada vez mais frequente da genotipagem, tem-se observado erros que poderiam ser evitados com o emprego de painéis de referência. Em 2009 e 2011 os resultados do Workshop Internacional de Genotipagem Molecular de Grupos Sanguíneos da Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) mostraram que somente 24 de 33 e 37 de 46 laboratórios participantes obtiveram respectivamente resultados completamente corretos, ou seja, em torno de 20 a 30% dos laboratórios cometeram erros principalmente na genotipagem RH^{50,51}.

1.2.3. Painéis de Referência para Genotipagem de Variantes RH

Painéis de referência validados são fundamentais para o desenvolvimento de kits de genotipagem eritrocitária, para a calibração dos testes e para o monitoramento e desempenho dos ensaios. No entanto, os materiais de referência atualmente disponíveis estão limitados e não contemplam as variantes Rh mais comuns e de importância clínica encontradas em pacientes portadores de doença falciforme^{52,53} (Tabela 2). A escassez de painéis de referência com cobertura dos alelos associados às variantes Rh pode levar fabricantes e laboratórios a utilizar materiais não caracterizados para o desenvolvimento, validação e controle de qualidade dos testes de genotipagem Rh, o que pode comprometer a segurança dos resultados. Estas plataformas de genotipagem tem auxiliado a constituir grupos de doadores extensivamente genotipados que permitem aumentar os estoques de sangue antígeno-negativo e possibilitam a compatibilidade eritrocitária mais exata para pacientes com doença falciforme.

Há várias formas de obter materiais genéticos de referência. Produtos de PCR e produtos de PCR clonados em plasmídeo são de fácil produção. No entanto, eles perdem a complexidade do DNA genômico e, portanto, não são representativos do material genético presente na amostra clínica. Quanto mais o material genético utilizado representar o DNA genômico, mais significado clínico ele terá. Dentre as diversas técnicas disponíveis para obtenção de materiais genéticos de referência

está a imortalização celular pelo vírus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus* – EBV). Células imortalizadas são capazes de proliferar em cultura e se manter indefinidamente. Desta maneira, estabelecer linhagens celulares imortalizadas de doadores de sangue e pacientes portadores de doença falciforme com polimorfismos genéticos de antígenos Rh variantes permite constituir uma fonte ilimitada de DNA genômico para estes painéis. Com validação adequada, os mesmos podem ser utilizados para o desenvolvimento, fabricação, regulamentação e aprovação de ensaios moleculares de variantes Rh. Além disto, podem ser utilizados como controles na genotipagem RH e assim, assegurar um resultado confiável e seguro para beneficiar os pacientes portadores de doença falciforme.

Tabela 2. Polimorfismos genéticos associados às variantes Rh mais comuns em pacientes portadores de doença falciforme.

Genes RH	Genótipo	Fenótipo
RHD	<i>RHD+ / RHD-</i>	RhD+
	<i>RHD- / RHD-</i>	RhD-
	<i>RHDψ / RHDψ</i>	RhD-
	<i>RHDψ / RHD+</i>	RhD+
	<i>RHDψ / RHD-</i>	RhD-
	<i>RHD*^{DAR}</i>	RhD+ parcial
	<i>RHD*^{DIIIa}</i>	RhD+ parcial
	<i>RHD*^{DIVa}</i>	RhD+ parcial
	<i>RHD*^{DVa}</i>	RhD+ parcial
	<i>RHD*^{DVIa}</i>	RhD+ parcial
	<i>RHD*^{DAU}</i>	RhD+ parcial
	<i>RHD*D fraco tipo 1</i>	RhD+ fraco
	<i>RHD*D fraco tipo 2</i>	RhD+ fraco
	<i>RHD*D fraco tipo 3</i>	RhD+ fraco
	<i>RHD*D fraco tipo 4.0</i>	RhD+ fraco
	<i>RHD*D fraco tipo 5</i>	RhD+ fraco
	<i>RHD*^{DIIIa-CE(4-7)-D}</i>	RhD-
	RHCE	<i>RHCE 122AG</i>
<i>RHCE 106AG</i>		Cx+/-
<i>RHCE 733CG, 1006GT</i>		VS+V-hrB+
<i>RHCE 733CC, 1006GG</i>		VS-V-hrB+
<i>RHCE 733CG, 1006GG</i>		VS+V+hrB+
<i>RHCE*^{ceMO}</i>		e-parcial, hrS-
<i>RHCE*^{ceAR}</i>		e-parcial, hrS-
<i>RHCE*^{ceTI}</i>		e-parcial
<i>RHCE*^{ceS}</i>	e-parcial, hrB-	

Fonte: Adaptado de Denomme GA, 2009⁵³.

1.3. Imortalização Celular de Linfócitos B pelo Vírus Epstein-Barr

O EBV é um gamaherpesvirus ubíquo que causa infecção assintomática na maioria da população. Também conhecido como o herpesvírus humano 4 (Human Herpesvirus 4 – HHV4) é altamente imunogênico, com mais de 95% da população mundial considerada soropositiva⁵⁴. É um vírus de DNA dupla-fita, com um genoma de 172 kilobases (Kb) e diâmetro de 120 a 180 nanômetros (nm), pertencente à família *Herpesviridae*. Os principais alvos do EBV são as células B, mas em determinadas circunstâncias podem infectar outras células, como as células T e as células epiteliais. A invasão do EBV nos linfócitos B ocorre, respectivamente, por meio da interação de suas glicoproteínas de membrana gp42 e gp350/220 com o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (*Major Histocompatibility Complex Class II* – MHC-II) e as moléculas CD21 (receptor de fragmentos do complemento C3) da superfície celular⁵⁶. Uma vez endocitados, o vírus apresenta o genoma em forma linear nas partículas virais e em forma circular no núcleo das células infectadas, persistindo como um episoma e estabelecendo uma infecção latente. Contudo, o vírus pode entrar em um ciclo lítico, produzindo novos vírus e ocasionando a morte das células infectadas com a liberação de novas partículas virais⁵⁵.

Na infecção latente de células B ocorre a expressão de até nove proteínas, sendo estas de antígenos nucleares e de membrana latente⁵⁵. Dentre os antígenos nucleares, a proteína EBNA1 (*Epstein-Barr vírus nuclear antigen 1*), codificada pelo gene *EBNA1*, se liga à origem de replicação do episoma do EBV, permitindo a replicação do DNA viral e sua distribuição entre as novas células produzidas⁵⁷. É importante salientar que a EBNA1 não é apresentada por moléculas de MHC de classe I, o que faz com que células B positivas para EBV que expressam apenas EBNA1 (fase de latência) não sejam reconhecidas pelas células T citotóxicas, evitando assim sua eliminação pelo sistema de defesa⁵⁸. O gene *EBNA1* é frequentemente utilizado como alvo em testes moleculares por apresentar um segmento altamente conservado e por sua proteína ser essencial na persistência do EBV e replicação de seu genoma em células com infecção latente, sendo esta a única proteína viral necessária para a manutenção da latência da infecção pelo EBV⁵⁹.

Sabe-se, desde 1968, que o EBV possui a capacidade de infectar linfócitos B humanos *in vitro*, transformando-os em linhagens celulares linfoblastóides (*Lymphoblastoid cell lines* – LCLs)^{60,61}, isto é, em uma célula com proliferação ativa devido à inibição de seus mecanismos de apoptose celular⁵⁵. Contudo, as linhagens de células B transformadas por EBV (B-LCLs) secretam poucas ou não infecciosas partículas virais⁶². Por esta razão, estudos que geram B-LCLs obtêm o vírus EBV de uma linhagem de macaco (Sagui) transformada com cepa (Hawley) humana de EBV, denominada B95-8. Esta célula secreta, no sobrenadante da cultura celular, o vírus em altos títulos e com atividade infecciosa^{63,64}.

Os procedimentos técnicos usados para estabelecer as linhagens de células B transformadas consistem em isolar as células mononucleares do sangue periférico, colocá-las em contato com o vírus Epstein-Barr para que este infecte os linfócitos B, transformando-os em B-LCLs. Entretanto, à medida que ocorre a integração do vírus à célula B, são gerados linfócitos T citotóxicos que eliminam as células B infectadas, levando à falha da transformação, evento conhecido como regressão. Visando evitar a regressão da cultura celular faz-se o uso de compostos químicos, como Ciclosporina A (CsA) e Fitohemaglutinina (PHA-M), ou anticorpos monoclonais para driblar a ação dos linfócitos T citotóxicos⁶⁵. Desta forma, uma cultura exposta ao EBV é composta por células não infectadas e infectadas. As células não infectadas morrem por apoptose ou necrose. Dentre as células infectadas, algumas produzem vírus infecciosos que podem infectar novas células. Outras sofrem o processo de transformação ou entram em estado de latência podendo ser ativado e reativado conforme condições favoráveis para a replicação viral⁶⁶.

Assim, as B-LCLs são consideradas como material ideal para estudos genéticos e fenotípicos, uma vez que representam uma fonte ilimitada de biomoléculas como DNA, RNA ou proteínas e são uma promessa de modelos *in vitro* para estudos de triagem genética, estudos de correlação genótipo-fenótipo, uma variedade de ensaios moleculares e funcionais juntamente com estudos de imunologia e biologia celular. Além disso, bancos de células possuem um grande potencial para fornecer material de referência para diagnóstico de raras desordens genéticas⁶⁷. Por este motivo, as B-LCLs têm sido utilizadas como material referência de escolha por muitos projetos de análise genômico, como o *International*

Histocompatibility Working Groups, International HapMap Project, Human Genome Diversity Project e em genotipagem de aloantígenos eritrocitários^{68,69}.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar variantes do sistema Rh associadas com polimorfismos genéticos nos genes *RHD* e *RHCE* em pacientes portadores de doença falciforme e doadores de sangue e obter material genético de referência a partir da imortalização de linfócitos B com as variantes Rh selecionadas.

2.1.1. Objetivos Específicos

- Realizar análise molecular para identificar e determinar as variantes Rh em pacientes portadores de anemia falciforme e doadores de sangue;
- Produzir o vírus Epstein-Barr a partir do cultivo da célula B95-8;
- Estabelecer linhagens celulares linfoblastóides a partir de sangue total de doadores de sangue e pacientes que apresentam polimorfismos genéticos de variantes Rh;
- Avaliar o DNA das células imortalizadas e confirmar a presença dos polimorfismos identificados pré-imortalização, validando o material de referência em diferentes laboratórios de biologia molecular de grupos sanguíneos.

3. METODOLOGIA

3.1. Casuística

3.1.1. Indivíduos Participantes

Foram selecionados com base em resultados de fenotipagem e genotipagem eritrocitárias, quatro pacientes portadores de doença falciforme (homozigotos para HbS) e um doador de sangue voluntário, todos do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Como critério de inclusão considerou-se indivíduos com deleção do gene *RHD* e com variantes *RHD* e *RHCE* confirmadas por genotipagem e de importância clínica.

3.1.2. Aspectos Éticos da Pesquisa

Este projeto possui aprovação pelos órgãos competentes: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (FCM/UNICAMP), registrado sob nº. CAAE 50644215.0.0000.5404, com parecer final em 12 de janeiro de 2016 (nº do parecer: 1.387.233); Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob nº. CAAE 50644215.0.0000.5404, com parecer final em 07 de junho de 2016 (nº do parecer: 1.577.509); e Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), sob nº. 6.370/2019, com parecer final em 23 de abril de 2019.

As amostras de sangue de pacientes e doadores de sangue foram obtidas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecidas (TCLE), conforme estabelecido pelos órgãos CEP e CONEP.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Coleta das Amostras de Sangue Total

Amostras de sangue periférico dos pacientes e do doador foram coletadas nos seguintes tubos: com gel separador para realização de sorologia (Sífilis, Hepatites B e C, HIV I/II, HTLV I/II e Chagas), com anticoagulantes etilenodiaminotetracético (EDTA) para extração de DNA de *buffy coat* e com heparina sódica para separação celular e posterior produção das B-LCLs. As amostras dos pacientes portadores de doença falciforme foram coletadas previamente à realização de transfusão sanguínea.

3.2.2. Testes Sorológicos para Doenças Infecciosas

As análises foram realizadas no laboratório de triagem de doenças infecciosas de transmissão transfusional do Hemocentro da UNICAMP, a fim de verificar o risco biológico de manipulação das amostras e descartar possíveis interferências no processo de imortalização ocasionadas por infecções prévias pelos patógenos aqui considerados. Os tubos com gel separador contendo as amostras foram centrifugados a 3500 RPM por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a triagem sorológica em sistema automatizado utilizando o ensaio de quimioluminescência (CMIA) ARCHITECT® (Abbott Diagnostics, Sligo, Irlanda) para os marcadores anti-Treponema (Sífilis), anti-HBc e HBsAg (Hepatite B), anti-HCV (Hepatite C), HIV Ag/Ab, anti-HTLV I/II, anti-Trypanosoma (Chagas).

3.2.3. Obtenção das Frações do Sangue: Plasma, *Buffy Coat* e Hemácias

O tubo de amostra colhido com EDTA foi submetido a uma centrifugação de 2500 RPM por 10 minutos, obtendo-se as frações do sangue: plasma, *buffy coat* (camada leucoplaquetária) e hemácias. Estas frações foram coletadas separadamente, sendo que o plasma e as hemácias foram preparados para armazenamento/congelamento e do *buffy coat* foi extraído DNA. Plasma, hemácias e DNA foram congelados para posteriores análises complementares, caso necessário.

3.2.3.1. Congelamento de Plasma e Hemácias

O plasma foi transferido para tubos eppendorfs (2 mL) previamente identificados. Os mesmos foram armazenados à temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

As hemácias foram transferidas para tubos de ensaio (10 x 75 mm) identificados e lavadas por 3 vezes (3.500 RPM por um minuto) com solução salina 0,9%. Em um béquer, as células vermelhas foram misturadas, volume a volume, a uma solução de congelamento (54,0 g de glicose, 154 g de sacarose, 2,9 g de cloreto de sódio e água destilada *q.s.p.* 1000 mL), homogeneizadas cuidadosamente e mantidas em repouso por 30 minutos. A solução de hemácias foi aspirada com seringa de 10 ml sem agulha, sendo em seguida conectada uma agulha de insulina (13 x 4,5) na seringa. A solução de hemácias foi gotejada em nitrogênio líquido dentro de um recipiente de isopor. Durante o gotejamento das hemácias, foi mantida uma homogeneização do nitrogênio líquido a fim de evitar a adesão das gotas de

hemácias. Estas gotas, em contato com o nitrogênio líquido, formam pequenos aglomerados de células vermelhas em forma de esferas. As esferas foram removidas do nitrogênio líquido com uma peneira, transferidas para criotubos identificados e estes foram armazenados em container de nitrogênio líquido (-196°C).

3.2.4. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em dois momentos diferentes (Figura 4) para cada amostra. No primeiro momento, a partir do *buffy coat* da amostra colhida em tubo com EDTA (item 3.2.3). O DNA obtido foi somente avaliado quanto sua qualidade/quantidade e armazenados em freezer com temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Em um segundo momento, realizou-se a extração de DNA a partir das células imortalizadas (B-LCLs) diretamente da cultura celular (item 3.2.6.3). Neste caso, o DNA extraído foi avaliado quanto sua qualidade/quantidade e preparado para o processo de liofilização. O processo de extração de DNA foi realizado por meio do kit comercial Mini Spin Plus[®] da BIOPUR (Biometrix Diagnóstica, Paraná, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. A verificação do grau de pureza (DO 260/280nm) e concentração (em ng/ μL) do material genético foi realizada através de leitura óptica da absorbância em um equipamento de espectrofotometria (NanoDrop Lite, Thermo Scientific, Wilmington, USA).

3.2.5. Isolamento das Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs)

A amostra de sangue colhida em tubo com heparina sódica foi processada em laboratório de cultura celular, isto é, manipulada em fluxo laminar com área, reagentes e materiais estéreis. Desta amostra, realizou-se o isolamento das células mononucleares (*Peripheral blood mononuclear cells* – PBMCs) utilizando-se o reagente Ficoll-Paque[™] PLUS (*GE Healthcare*, Uppsala, Suécia), conforme instruções do fabricante. O sangue total previamente diluído com PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*) (HyClone[™], *GE Healthcare*, Utah, EUA) foi adicionado sobre o Ficoll, de maneira que ambos permanecessem como camadas separadas. Após centrifugação, ocorre uma migração diferencial, devido a um gradiente de densidade, que resulta na formação de camadas contendo os diferentes tipos celulares. A camada inferior contém os eritrócitos que se sedimentam através do Ficoll. A camada imediatamente acima contém principalmente os granulócitos que,

devido à pressão osmótica do reagente, migram através da camada de Ficoll. Devido à densidade mais baixa, os linfócitos permanecem na interface entre o plasma e o Ficoll, juntamente às plaquetas e monócitos. Estas células foram recolhidas da interface e submetidas a etapas curtas de lavagem com PBS 1X para remover plaquetas, plasma e o Ficoll. Ao pellet celular obtido foram adicionados 10 mL de meio RPMI-1640 completo (*Life Technologies*, NY, EUA) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*HyClone™*, *GE Healthcare*, Utah, EUA), homogeneizando cuidadosamente. Utilizou-se 12 µL da solução celular para realizar a contagem de células em contador automático *Cell-Dyn Emerald* (*Abbott*, Wiesbaden, Alemanha). A partir do número de células obtido, determinou-se por meio de cálculos, o volume necessário da solução celular para plaquear de 1×10^6 células/mL, as quais prosseguiram no protocolo de imortalização dos linfócitos B. As células remanescentes foram centrifugadas a 1500 RPM por 10 minutos e ressuspensas em volumes apropriados de solução de congelamento DMSO (*Sigma-Aldrich*, MO, EUA) com 10% de SFB para o congelamento de $6 - 7 \times 10^6$ células/mL. Foi aliquoteado 1 mL de células por criotubo previamente refrigerado. Os criotubos foram colocados em dispositivo comercial *Mr. Frosty* (*Nalgene Nunc Cooler*) também previamente refrigerado a 4°C, para realizar a curva de resfriamento de 4°C a -80°C, o qual permite a redução de -1°C por minuto. Este dispositivo foi armazenado em freezer -80°C durante as primeiras 24 horas. Após isso, os criotubos foram armazenados em um container de nitrogênio líquido (-196°C).

3.2.6. Imortalização de Linfócitos B pelo Vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr foi produzido utilizando-se a linhagem celular B95-8, a qual é capaz de secretar altos títulos virais no sobrenadante da cultura celular. Estas células foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Código BCRJ: 0042) e manipuladas em laboratório de cultura celular com nível de biossegurança 2.

3.2.6.1. Cultivo da B95-8 e Produção do EBV

A B95-8 foi cultivada em meio RPMI-1640 com 10% de SFB, a 37°C e 5% CO₂, inicialmente em garrafa de 25 cm². Estas células são semi-aderentes, ou seja, parte crescem em suspensão e parte aderem ao plástico da garrafa, necessitando ser tripsinizadas para sua remoção. Ao atingirem confluência de 70% foram transferidas para uma garrafa de 75 cm². As células foram então cultivadas de maneira a expandir o seu número, estabelecendo alíquotas estoques das mesmas com 1 x 10⁷ células/mL. O congelamento foi realizado conforme descrito no item 3.2.5.

Para produção do vírus Epstein-Barr, foram plaqueadas duas garrafas de 75 cm² (garrafa 1 e 2), cada uma contendo 1 x 10⁶ células em 20 mL de meio RPMI-1640 com 10% de SFB. Essas culturas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ e mantidas por 15 dias sem qualquer intervenção, somente sendo acompanhadas diariamente quanto à presença de contaminação, confluência celular e alteração na coloração do meio, indicativo do consumo do mesmo. Ao décimo quinto dia (alteração na cor do meio), o sobrenadante da cultura (amostras S1 e S2), contendo as células em suspensão, foi recolhido em tubos tipo Falcon; já as células aderentes (amostras C1 e C2) foram removidas após tripsinização e transferidas para outro tubo. Todas as amostras foram submetidas a 4 ciclos de congelamento (40 segundos em nitrogênio líquido) e descongelamento (1 minuto em banho Maria a 37°C) rápido para propiciar a lise das células e liberação dos vírus intracelulares. Foram recolhidos 300 µL de cada amostra para extração de DNA viral (item 3.2.4), sendo que para C1 e C2 foram realizadas duas eluições. A verificação do grau de pureza (DO 260/280nm) e concentração (em ng/µL) do material genético foi realizada através de leitura óptica da absorbância em um equipamento de espectrofotometria (NanoDrop Lite, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Todas as amostras foram centrifugadas à 1500 RPM por 10 minutos à temperatura de 4°C. Os pellets foram descartados, os sobrenadantes filtrados por filtros de 0,45 µm (Millipore, Cork, Irlanda) e congelados à - 80°C.

3.2.6.2. Quantificação da Carga Viral por qPCR e Preparo de Estoques Virais

Visando verificar a produção/quantificação do EBV por meio da detecção de seu material genético nas amostras de DNA extraídas (S1, C1, S2 e C2) foi realizada uma análise da carga viral por PCR quantitativo em tempo real

(*quantitative real-time PCR* – qPCR). Utilizou-se como alvo o gene *EBNA-1* (NC_007605.1), com *primers* e sonda (marcada com 6-carboxifluoresceína (FAM®)) customizados por *Applied Biosystems* - EUA (*ID Applied: AIBJXZK*)⁷⁰. Foi utilizado um controle positivo comercial com carga viral conhecida (*Advanced Biotechnologies, Maryland, EUA*)⁷⁰. A reação de amplificação foi em um volume final de 10 µL contendo 3,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2×), 0,175 µL do *mix* de primers e sondas (20×), 5 µL de DNA e 1,325 µL de água *nuclease-free*. As condições de ciclagem foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os ensaios foram realizados utilizando o sistema PCR em tempo real 7500 ABI Prism (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*). Após resultado detectável para EBV nas amostras de DNA extraídas, selecionou-se S2 para realizar a quantificação da carga viral. Para tal, uma curva padrão foi construída por meio de uma diluição seriada (1:10) do controle positivo (número de cópias virais conhecido). Em paralelo e baseando-se no resultado anterior de *cycle threshold* (*Ct*) da amostra de DNA S2, realizou-se na mesma uma diluição seriada (1:10), a fim de determinar a concentração viral de cada diluição e assim estabelecer as alíquotas estoques de uso do vírus. Das diluições de S2 foram recolhidos 300 µL para extração de DNA e posterior qPCR. As reações foram feitas em duplicatas e o resultado da carga viral de cada amostra foi obtido por comparação à curva padrão.

3.2.6.3. Produção das Linhagens Celulares Linfoblásticas (B-LCLs)

Das cinco amostras coletadas, duas (um paciente e um doador) foram enviadas ao BCRJ para produção das B-LCLs. As amostras dos outros três pacientes foram processadas nos laboratórios da Unicamp.

Para cada amostra, foram plaqueadas em placas de seis poços de 1×10^6 células/mL/poço (item 3.2.5) em cinco poços (Figura 5). Para tal, foram utilizados o meio de cultivo tradicional (RPMI-1640 completo com 10% de SFB) e dois meios de transformação: um contendo RPMI-1640 completo, 10% de SFB e 10 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA-M) (Sigma-Aldrich, MO, EUA); e o outro com RPMI-1640 completo, 10% de SFB e 2 µg/mL de Ciclosporina A (CsA) (Sigma-Aldrich, MO, EUA)^{65,67}. Dos cinco poços, foram adicionados o meio de cultivo tradicional em um poço, o meio de transformação com PHA-M em dois poços e nos outros dois o meio com CsA. Em seguida, alíquotas de EBV foram descongeladas rapidamente e

adicionou-se 10^6 cópias virais/mL à um poço de cada meio de transformação (poços testes). Aos outros três poços não foram adicionados vírus, sendo estes utilizados como controle negativo do processo de transformação celular. As placas foram homogeneizadas por *swirling* cuidadosamente e incubadas a 37°C e 5% CO₂. As culturas foram acompanhadas diariamente, observando alterações de coloração do meio, de morfologia, formação de grumos (*clumps*) e efeitos citopáticos, indicativos de transformação celular. Por volta do décimo quinto dia, iniciou-se a troca do meio de cultura, substituindo 50% dos meios de transformação por meio de cultivo RPMI-1640 completo com 10% SFB. Esse procedimento foi sendo realizado subsequente conforme viragem do meio, sempre com substituição de metade do meio de cultura.

As duas células imortalizadas no BCRJ foram cultivadas de modo a expandir o seu número, com transferência das mesmas para garrafas maiores, conforme necessário. Por último, parte das células foi recolhida para extração de DNA (item 3.2.4) e parte foi criopreservada (item 3.2.5), estabelecendo-se os estoques celulares.

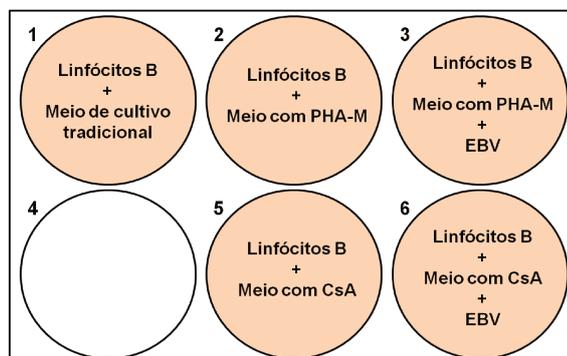


Figura 5 – Representação esquemática da placa de cultivo no processo de imortalização. **Poços 1, 2 e 5:** controles negativos do processo. **Poços 3 e 6:** processo de imortalização com EBV.

3.2.7. Liofilização do DNA das B-LCLs

Com a finalidade de conferir maior estabilidade aos DNAs de referência obtidos *in house*, visando o envio (transporte) para outras instituições dos mesmos, foi estabelecido o protocolo de liofilização do material genético.

Inicialmente foi produzida uma solução conservante contendo 0,80 mM de Tris, 80 μ M de EDTA e 6 mg/mL de Trehalose. Em tubos específicos com tampas em rosca, foram adicionados 1 mL da solução conservante e 20 μ L da amostra de DNA à aproximadamente 100 ng/ μ L. A mistura foi homogeneizada, os tubos mantidos parcialmente fechados à “meia rosca”, de maneira a permitir o fluxo de ar liberado. Os tubos foram então posicionados na prateleira do liofilizador ALPHA 2-4 LDplus (CHRIST®, Osterode am Harz, Alemanha) de acordo com instruções do equipamento. A prateleira juntamente com os tubos foi armazenada a -80°C por duas horas para congelamento das amostras. Temperatura e vácuo foram programados previamente no liofilizador, a prateleira com as amostras foi transferida rapidamente do -80°C para o mesmo e iniciou-se o processo de liofilização com duração total de 20 horas. Ao final, os tubos foram fechados e armazenados a -20°C .

Duas alíquotas de cada amostra tiveram seu DNA eluído em 80 μ L de água *nuclease-free*, realizando-se em seguida quantificação e os testes moleculares para confirmação do genótipo eritrocitário. Além disso, uma alíquota de cada amostra foi enviada à laboratórios externos, os quais foram orientados a eluir o material genético em 80 μ L de água *nuclease-free* para realização dos testes moleculares “às cegas”.

3.2.8. Genotipagem Eritrocitária

As genotipagens eritrocitárias foram realizadas inicialmente para a identificação das variantes *RHD* e *RHCE* nos pacientes portadores de doença falciforme e doadores de sangue. A partir das variantes encontradas foram selecionados os indivíduos participantes do estudo, dos quais foram feitas análises moleculares pré e pós imortalização, a fim de verificar se os processos de transformação celular e liofilização dos DNAs interferem no genótipo eritrocitário. Para tal, foram feitos os testes moleculares (PCR convencional) para detecção do gene *RHD* e presença de *RHD*pseudogene*, conforme descritos por Singleton et al⁴⁰. Também foram realizadas a genotipagem estendida dos antígenos eritrocitários

e a pesquisa das principais variantes *RHD* e *RHCE* utilizando-se as plataformas de *microarray* HEA BeadChip™, RHD BeadChip™ e RHCE BeadChip™ (BioArray Solutions, Immucor, Warren, EUA), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. A plataforma HEA BeadChip™ permite a identificação de 24 polimorfismos associados a 35 antígenos eritrocitários e três variantes fenotípicas. As plataformas RHD BeadChip™ e RHCE BeadChip™ contém, respectivamente, 35 marcadores associados com expressão alterada do gene *RHD* e 25 polimorfismos associados com alterações de alelos *RHCE*. Nos laboratórios externos, as genotipagens eritrocitárias foram realizadas por técnicas de PCR *in house* e sequenciamento genômico.

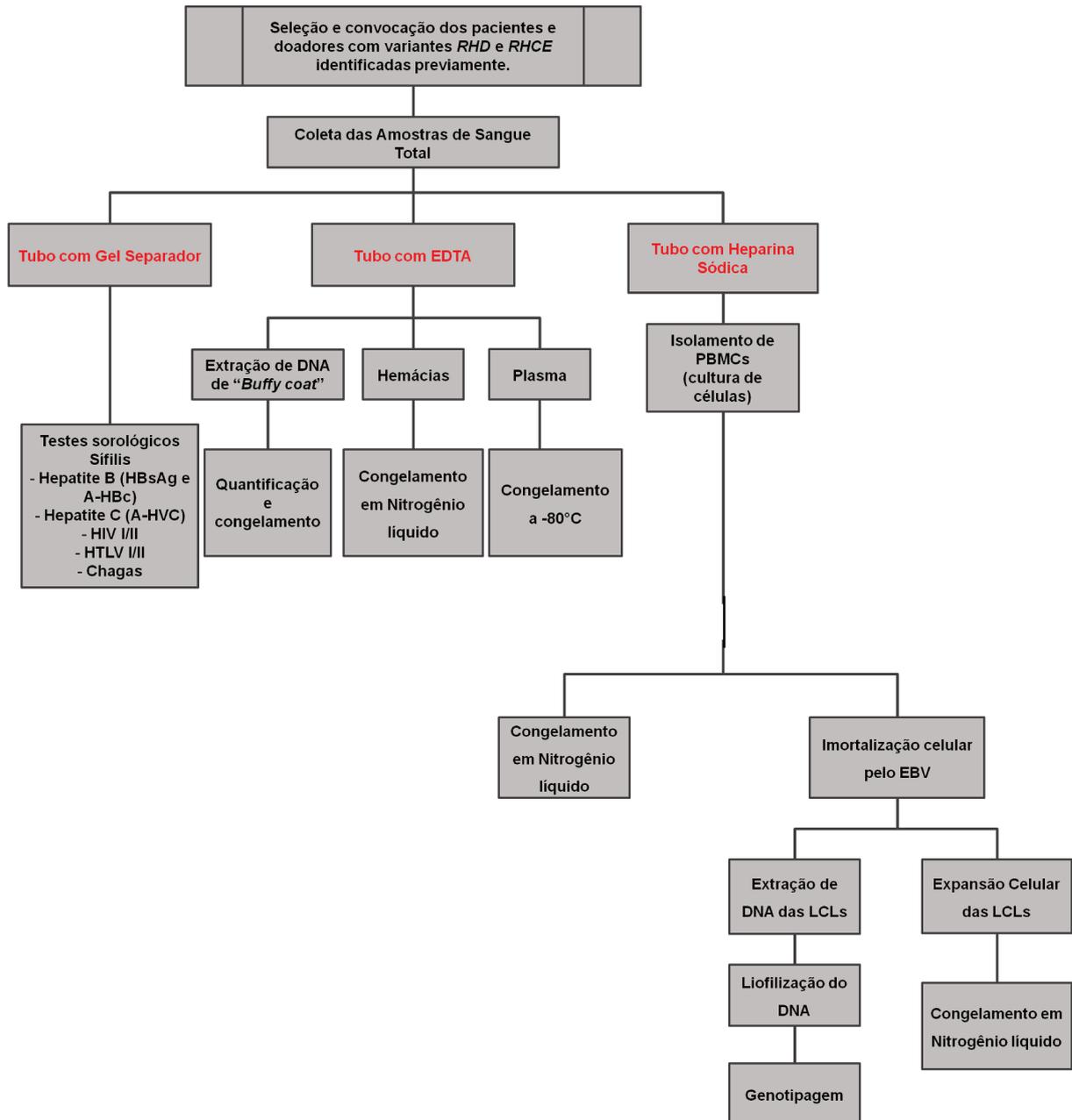


Figura 4- Fluxograma da estratégia experimental do estudo.

4. RESULTADOS

4.1. Genotipagem Eritrocitária

Da análise molecular inicialmente realizada nos pacientes portadores de doença falciforme e doadores de sangue foi possível identificar os alelos variantes *RHD* e *RHCE* descritos nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Alelos variantes *RHD* e *RHCE* identificados em pacientes portadores de doença falciforme.

Pacientes Portadores de Doença Falciforme	
Alelos <i>RHD</i> Variantes	Alelos <i>RHCE</i> Variantes
<i>RHD*</i> ψ	<i>RHCE*</i> ce48C
<i>RHD*</i> DAR	<i>RHCE*</i> ce733G
<i>RHD*</i> DIIIa	<i>RHCE*</i> ce48C,733G
<i>RHD*</i> DIVa	<i>RHCE*</i> ce48C,733G,1006T
<i>RHD*</i> DAU0	<i>RHCE*</i> ce733G,1006T
<i>RHD*</i> fraco tipo 1	<i>RHCE*</i> ceMO
<i>RHD*</i> fraco tipo 4.0	<i>RHCE*</i> ceAR
<i>RHD*</i> DIIIa-CE(4-7)-D	

Tabela 4. Alelos variantes *RHD* e *RHCE* identificados em doadores de sangue.

Doadores de Sangue	
Alelos <i>RHD</i> Variantes	Alelos <i>RHCE</i> Variantes
<i>RHD*</i> DAR	<i>RHCE*</i> ce733G
<i>RHD*</i> DVI tipo 1	<i>RHCE*</i> ce48C,733G
<i>RHD*</i> fraco tipo 1	<i>RHCE*</i> ce48C,733G,1006T
<i>RHD*</i> fraco tipo 38	<i>RHCE*</i> ceMO
<i>RHD*</i> fraco tipo 4.0	<i>RHCE*</i> ceAR
<i>RHD*</i> DIIIa-CE(4-7)-D	<i>RHCE*</i> ceJAL

4.2. Indivíduos selecionados

Visando obter variantes *RHD* e *RHCE* de importância clínica e o maior número de alelos variantes possíveis, a seleção dos indivíduos participantes do estudo, a partir de resultados prévios de genotipagens, incluiu presença de deleção, polimorfismos, pseudogene e gene híbrido (Tabela 5). Todos os participantes foram não reagentes para os marcadores sorológicos de doenças infecciosas.

Tabela 5. Variantes *RHD* e *RHCE* identificadas nas análises moleculares eritrocitária dos participantes do estudo antes da imortalização celular.

Indivíduo	Variante <i>RHD</i>	Variante <i>RHCE</i>
DFAC_534		<i>RHCE*ce(733G)/RHCE*ce(733G)</i>
RCCP_917	<i>RHD*Ψ/RHD*DAU3</i>	
NAC_1892	<i>RHD-/RHD-</i>	
SCS_1981	<i>RHD/RHD*DAR</i>	<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce(733G)</i>
VACS_2730	<i>RHD/RHD*DIIIa-CE(4-7)-D</i>	<i>RHCE*ce(733G)/RHCE*ce(48C,733G,1006T)</i>

4.3. Cultivo da B95-8 para Produção do EBV

Durante o cultivo das células B95-8 para expansão e produção viral (EBV), observou-se a presença de células firmemente aderidas à garrafa, células em suspensão e a formação de aglomerados celulares em forma de cachos (*clumps*) que se mantinham parcialmente aderidos, isto é, muitas vezes se soltavam da garrafa quando esta era submetida à movimentos (Figura 6).

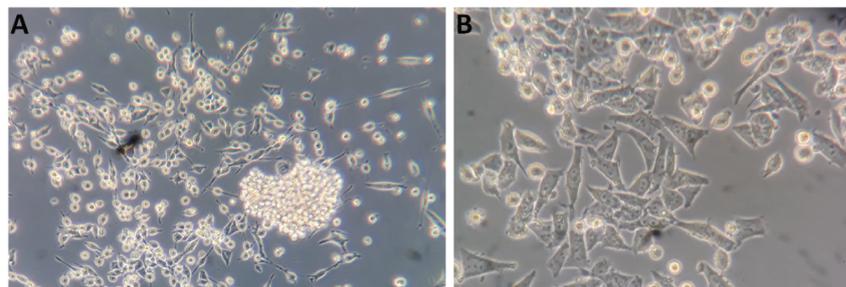


Figura 6 – Cultivo da célula B95-8 ao quinto dia (D=5) do protocolo de produção viral. **A:** Presença de aglomerados celulares (20X). **B:** Presença de células aderidas (fusiformes) e células em suspensão (40X).

Ao décimo dia de cultivo celular (D=10), foi possível perceber o início de alteração da cor do meio de cultivo, uma confluência celular de aproximadamente 70% e a presença das mesmas características morfológicas descritas acima (Figura 7).

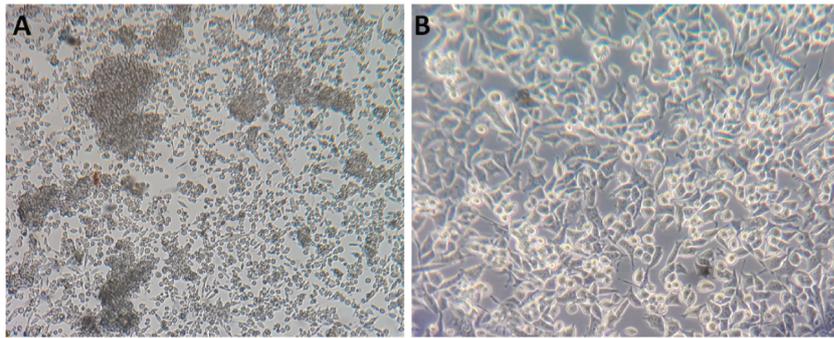


Figura 7 – Cultivo da célula B95-8 ao décimo dia (D=10) do protocolo de produção viral. **A:** Aumento na quantidade de aglomerados celulares (10X). **B:** Confluência de aproximadamente 70% (20X).

No último dia de cultivo celular (D=15) para produção do EBV, o meio de cultivo encontrava-se completamente consumido (meio ácido – coloração amarelada) e com 100% de confluência celular. Além disso, notou-se a presença de células esféricas de tamanhos maiores e internamente densas (Figura 8).

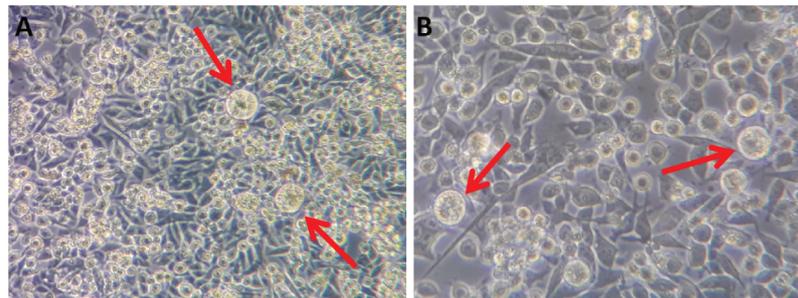


Figura 8 – Cultivo da célula B95-8 ao décimo quinto dia (D=15) do protocolo de produção viral. Setas vermelhas indicam células esféricas maiores e densas. **A:** Aumento de 20X. **B:** Aumento de 40X.

4.4. Quantificação da Carga Viral por qPCR

Ao término da produção do EBV pelas células B95-8, a extração de DNA das amostras dos sobrenadantes e células apresentou, conforme descrito na Tabela 6, os seguintes resultados de concentração de DNA e média das triplicatas dos *C_t*s (*cycle threshold*) na PCR em tempo real:

Tabela 6. Quantificação do DNA obtido da cultura de células B95-8 após protocolo de produção viral e média dos *Cts* na PCR em tempo real.

Amostra	Identificação	Concentração DNA (ng/ μ L)	Média <i>Cts</i>
Células (garrafa 1) - 1ª eluição	C1 (1ª)	469,45	16,93
Células (garrafa 1) - 2ª eluição	C1 (2ª)	165,75	16,49
Sobrenadante (garrafa 1)	S1	13,75	15,98
Células (garrafa 2) - 1ª eluição	C2 (1ª)	32,05	15,79
Células (garrafa 2) - 2ª eluição	C2 (2ª)	7,65	15,93
Sobrenadante (garrafa 2)	S2	14,35	20,70

A partir da média dos *Cts*, a amostra S2 foi selecionada para realizar a quantificação da carga viral e estabelecer as alíquotas estoques prontas para uso. Desta forma, considerando a correspondência entre *Cts*, o número de cópias virais da curva padrão do controle positivo e os *Cts* das diluições seriadas de S2, foi possível identificar a diluição com carga viral ideal⁶² (1×10^6 cópias virais/ μ L) para a imortalização dos linfócitos B. Conforme Figura 9, uma amplificação entre os *Cts* 28 e 29 correspondem aproximadamente a 1×10^6 cópias virais/ μ L.

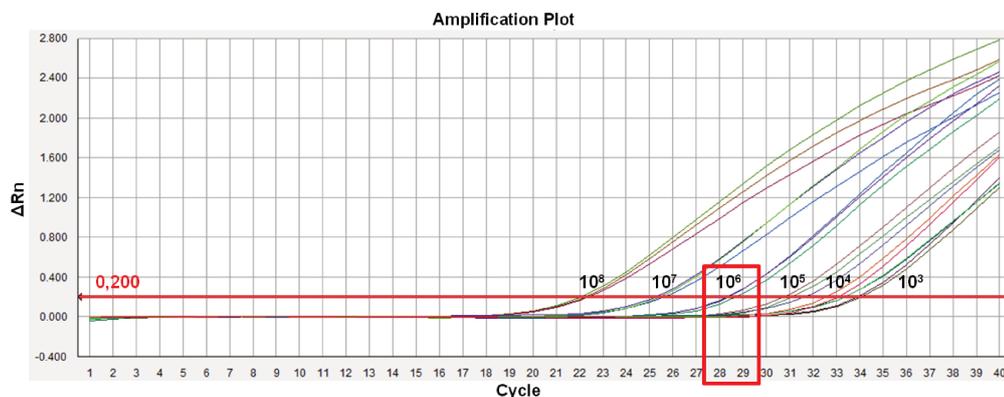


Figura 9 – Quantificação da carga viral de Epstein-Barr: curva de amplificação (gene alvo *EBNA-1*) com indicação do número de cópias virais (10^8 a 10^3 cópias/ μ L) para cada ponto da curva padrão. Em destaque na caixa vermelha, amplificação de 1×10^6 cópias virais/ μ L entre *Cts* 28 e 29. *Threshold* igual a 0,200.

4.5. Produção das Linhagens Celulares Linfoblastóides (B-LCLs)

As três amostras (DFAC_534, RCCP_917 e NAC_1892) submetidas ao processo de imortalização na Unicamp foram mantidas em cultura por aproximadamente 35 dias. Todas elas apresentaram, no decorrer deste período, basicamente mesma evolução, com alterações e características semelhantes.

Os controles negativos com linfócitos B e meio de cultivo tradicional não apresentaram alterações perceptíveis de coloração do meio, morfologia e confluência celular ao quinto dia de cultivo (D=5). Aproximadamente ao décimo dia de cultivo (D=10), observou-se uma alteração discreta na coloração do meio de cultura, redução no número de células, células aderidas e em suspensão e algumas com superfícies alteradas. Ao décimo quinto dia (D=15), houve uma diminuição significativa na quantidade de células, com alterações morfológicas e rompimento de membrana, indicando presença de morte celular (Figura 10). Não houve formação de grumos celulares (*clumps*) durante o cultivo. As culturas foram descartadas (D=15) por não haver células viáveis quando analisadas pela coloração de *Trypan Blue*.

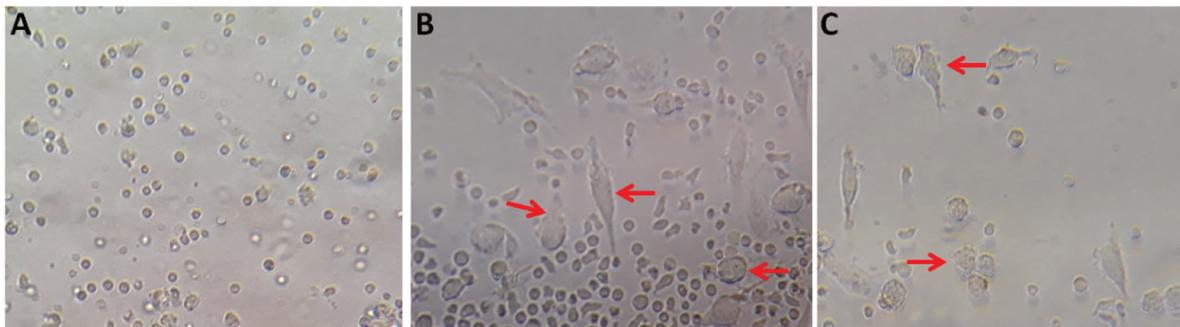


Figura 10 – Cultura celular do controle negativo do processo de imortalização (linfócitos B + meio de cultivo tradicional). **A:** Células em D=5. **B:** Células em D=10. **C:** Células em D=15. Setas vermelhas indicam alterações em morfologia e membrana (40X).

As demais culturas foram acompanhadas e avaliadas quanto à critérios indicativos de transformação celular ou não. Nas tabelas 7 e 8, e figuras 11 e 12 estão demonstrados os critérios observados para as culturas com PHA-M e CsA, respectivamente, nos tempos de cultivo D=5, D=10, D=20 e D=30.

Tabela 7. Resultado dos critérios avaliados na imortalização dos linfócitos B com meio de transformação com PHA-M. Controle negativo: linfócitos B com meio de transformação. Teste Imortalização: Linfócitos B com meio de transformação e EBV. ↑: aumento/intensidade. ↓: redução/intensidade.

Critérios Avaliados	Imortalização com PHA-M							
	Tempo de Cultivo							
	D=5		D=10		D=20		D=30	
	Controle Negativo	Teste Imortalização	Controle Negativo	Teste Imortalização	Controle Negativo	Teste Imortalização	Controle Negativo	Teste Imortalização
Consumo do meio	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Alteração no número de células	não	não	sim (↓)	sim (↓)	sim (↓)	sim (↑↑)	sim (↓)	sim (↓)
Presença de células maiores (efeito citopático)	não	não	não	sim (↑)	não	sim (↑↑)	não	sim (↓)
Presença de grumos (clumps)	não	não	sim (↑)	sim (↑↑)	sim (↑)	sim (↑↑↑)	sim (↓)	sim (↓)

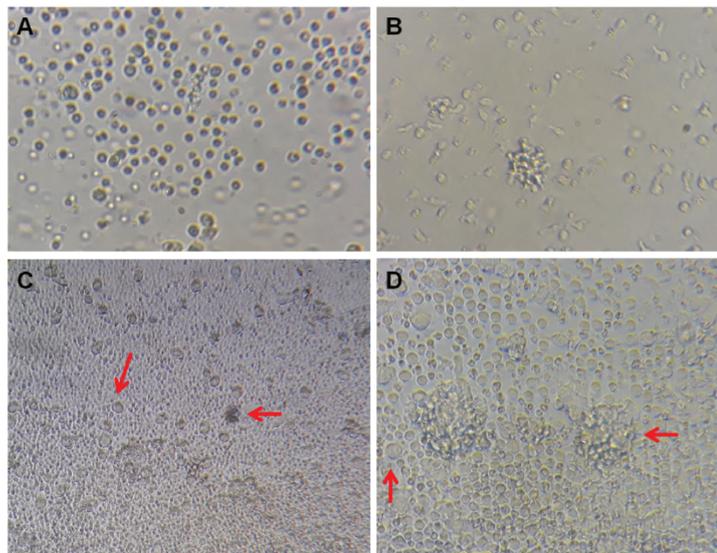


Figura 11 – Cultura celular do protocolo de imortalização dos linfócitos B com meio de transformação com PHA-M. **A:** Controle negativo em D=10 (40X). **B:** Controle negativo em D=20 (40X). **C:** Teste imortalização em D=10 (20X). **D:** Teste imortalização em D=20 (40X). Setas indicam células de tamanhos maiores e grumos celulares.

Tabela 8. Resultados dos critérios avaliados na Imortalização dos linfócitos B com meio de transformação com CsA. Controle negativo: linfócitos B com meio de transformação. Teste Imortalização: Linfócitos B com meio de transformação e EBV. ↑: aumento/intensidade. ↓: redução/intensidade.

Critérios Avaliados	Imortalização com CsA							
	Tempo de Cultivo							
	D=5		D=10		D=20		D=30	
	Controle Negativo	Teste Imortalização	Controle Negativo	Teste Imortalização	Controle Negativo	Teste Imortalização	Controle Negativo	Teste Imortalização
Consumo do meio	não	não	sim (↓)	sim (↓)	sim (↓)	sim (↓)	não	não
Alteração no número de células	não	não	sim (↓)	sim (↓)	sim (↓)	sim (↓)	sim (↓)	sim (↓)
Presença de células maiores (efeito citopático)	não	não	não	não	não	sim (↑)	não	sim (↓)
Presença de grumos (clumps)	não	não	não	não	não	sim (↑)	não	sim (↓)

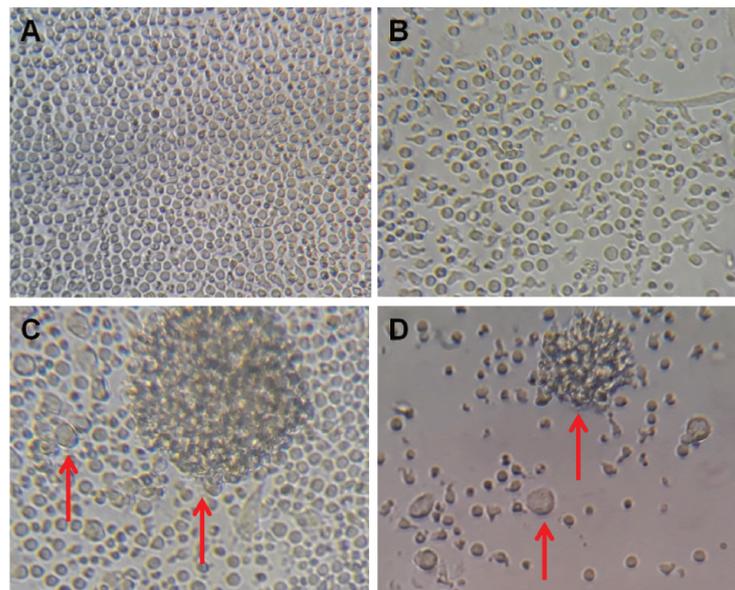


Figura 12 – Cultura celular do protocolo de imortalização dos linfócitos B com meio de transformação com CsA. **A:** Controle negativo em D=5 (40X). **B:** Controle negativo em D=10 (40X). **C:** Teste imortalização em D=20 (40X). **D:** Teste imortalização em D=30 (40x). Setas indicam células de tamanhos maiores e grumos celulares.

Após o trigésimo dia de cultivo (D=30), observou-se intensa morte celular em todas as culturas. Ao trigésimo quinto dia (D=35), as culturas foram descartadas após não identificar células viáveis pela coloração de *Trypan Blue*.

As amostras SCS_1981 e VACS_2730 foram imortalizadas com sucesso no BCRJ. Suas linhagens celulares linfoblastóides (B-LCLs) apresentaram características semelhantes as das células B95-8, com rápido crescimento, consumo intenso do meio, presença de células aderidas e em suspensão e formação de muitos grumos celulares (Figura 13).

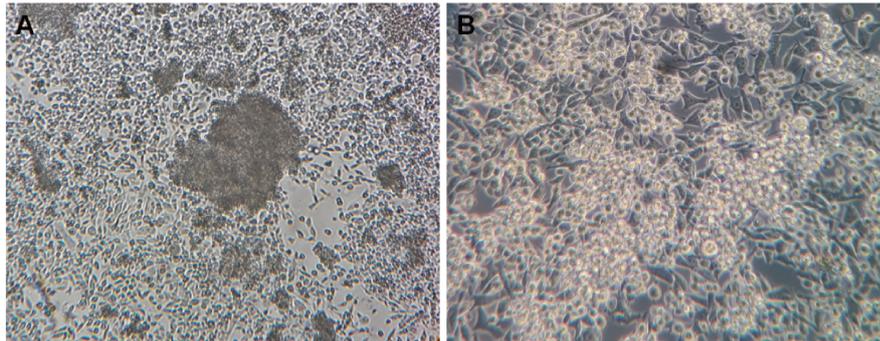


Figura 13 – Cultura celular para expansão das B-LCLs. Presença de muitos grumos e rápido crescimento. **A:** B-LCLs em D=10 (20X). **B:** B-LCLs em D=15 (40X).

4.6. Análises dos DNAs das B-LCLs Pós-Liofilização

Os DNAs de referência das linhagens celulares linfoblastóides SCS_1981 e VACS_2730 foram preparados de maneira a obter uma concentração de aproximadamente 25 ng/ μ L quando eluídos após liofilizados. Os resultados obtidos (Tabela 9) evidenciam que o preparo do material genético pré-liofilização, bem como o processo de liofilização foram satisfatórios quanto à recuperação dos DNAs pós-eluição.

Tabela 9. Concentração dos DNAs das B-LCLs antes e após o processo de liofilização.

Linhagens Celulares Linfoblastóides	Concentração do DNA (ng/ μ L)	
	Pré-liofilização (20 μ L)	Pós-liofilização (80 μ L)
SCS_1981 (alíquota 1)	103,40	27,10
SCS_1981 (alíquota 2)	102,50	25,90
VACS_2730 (alíquota 1)	103,00	27,40
VACS_2730 (alíquota 2)	103,05	28,30

A genotipagem estendida dos antígenos eritrocitários e a pesquisa de variantes *RHD* e *RHCE* realizadas *in house* e pelos dois laboratórios externos nos

DNAs das B-LCLs de SCS_1981 e VACS_2730 pós-eluição, confirmaram a presença dos mesmos polimorfismos, identificando as variantes *RHD* e *RHCE* pré-imortalização (Tabela 3), sem qualquer alteração e discordância ocasionadas pelo processo.

5. DISCUSSÃO

O uso de linhagens celulares linfoblastóides (LCLs) estabelecidas *in vitro* pelo processo de imortalização com vírus Epstein-Barr tem se tornando cada vez mais utilizado em diversos tipos de estudos biológicos, como modelos para investigações de latência do EBV e tumorigênese estimulada pelo mesmo⁷¹, apresentação de antígenos em ensaios imunológicos^{55,72}, produção de anticorpos monoclonais humanos^{73,74}, e como fonte ilimitada de material biológico quando a fonte primária é limitada^{75,76}, aplicação esta que pode ser utilizada para estabelecer painéis de DNA de referência para genotipagem de variantes RH. Para o estabelecimento das B-LCLs, há inúmeros métodos descritos na literatura^{55,61-65,67,69,72,75-77}, cada qual com suas particularidades nas etapas críticas do processo, como a produção do EBV pelas células B95-8, o tipo e quantidade de amostra utilizada para obtenção dos linfócitos B e o uso de drogas para aumentar eficiência do processo de imortalização.

A começar pela obtenção do vírus Epstein-Barr, umas das etapas mais importantes do processo de imortalização, é unânime entre os trabalhos o uso das células B95-8 como produtoras virais. Ao cultivar estas células, foi possível observar características concordantes com as descritas na literatura, como seu rápido crescimento exponencial e conseqüentemente fácil expansão, e a intensa formação de grumos celulares (*clumps*). Contrapondo à literatura que as caracterizam como células em suspensão, mas em conformidade com a descrição em sua ficha de dados de seu fornecedor, a B95-8 comportou-se como células semi-aderentes, isto é, parte em suspensão com morfologia linfoblastóide e parte aderida com morfologia fibroblastóide. Para a obtenção do EBV, alguns métodos estimulam as células com compostos químicos⁷⁷ ou redução de soro fetal bovino⁶⁷ a fim de induzir a produção viral, obtendo os vírus em menor tempo e em maior quantidade. Outros não o fazem, uma vez que essas células são produtoras naturais do EBV em altos títulos. Neste trabalho, a produção viral ocorreu sem estímulos externos, simplesmente mantendo as células por 15 dias em cultura sem qualquer intervenção, submetendo-as ao estresse de cultivo extremo. Apesar de um período maior de cultivo quando comparado aos métodos que utilizam estímulos (em média 5 dias) para produção viral, foi obtido uma alta carga viral do Epstein-Barr (maior que 10^8 cópias virais/ μ L),

o suficiente para estabelecer alíquotas estoques e realizar inúmeras imortalizações. Ao realizar a quantificação viral por qPCR, pode-se observar na tabela 4 que não há relação entre as concentrações de DNA obtido da B95-8 após a produção viral e o número de cópias virais obtido do processo, uma vez que as médias dos *Cts* das amostras foram próximas entre si, com concentrações de DNAs variando de muito baixa à muito alta. Aparentemente, a concentração de DNA corresponde ao material genético das células B95-8 e não do vírus, não devendo neste trabalho ser este um parâmetro considerado para avaliar o sucesso da produção viral. Provavelmente, esta discrepância entre as concentrações de DNA e as médias dos *Cts* ocorreu por ter sido utilizado um kit de extração de DNA total e não um de extração de DNA viral. Com isto, considerando a quantificação da carga viral, a amostra S2 foi selecionada por apresentar menos partículas virais e desta forma ser necessário realizar uma diluição seriada menor para obter alíquotas com carga viral desejada. A maioria dos estudos citados anteriormente, não mencionam a quantificação de carga viral utilizada para transformação de linfócitos B. Relatam somente a proporção de sobrenadante viral para número de células (PBMC). Contudo, trazem a necessidade de uma alta concentração celular (de 2 a 5 x 10⁶ células/ml) para compensar à intensa morte celular que ocorre no processo devido a elevada carga viral. Desta maneira, considerando o protocolo descrito por Biddison⁶² que utilizou uma cópia viral para cada célula, e a quantidade limitada de células obtidas dos pacientes participantes deste estudo, optou-se por avaliar inicialmente o processo de imortalização utilizando-se uma partícula viral para infectar uma célula (linfócito B). Vale ressaltar que deve ser considerado utilizar uma carga viral maior ou até mesmo realizar uma titulação viral nas culturas, quando possível, para avaliar o impacto na efetividade da imortalização celular.

Um segundo ponto importante do processo é o tipo e a quantidade de amostra utilizada para obtenção dos linfócitos B a serem imortalizados. Enquanto alguns métodos^{62,67,77} descrevem o uso de grandes volumes de sangue total (10 a 20 ml) para obtenção dos linfócitos por separação com gradiente de densidade (Ficoll-Paque), outro⁷⁸ menciona pequenos volumes (3 a 5 mL) para o mesmo processo e mais recente, Omi et al.⁶¹ cita a transformação pelo EBV a partir de quantidades limitadas de sangue total. Contudo, é consenso entre todos, a necessidade do número mínimo de 5x10⁶ células para cada imortalização. Este pode

ser um fator limitante quando realizado com amostras de pacientes, que por diversas razões, pode ser inviável a obtenção do número de células ideal.

A última etapa na produção das linhagens celulares linfoblastóides (B-LCLs) é a infecção dos linfócitos B pelo EBV, onde ocorre a desativação de mecanismos de apoptose e a transformação celular. Contudo, à medida que ocorre a integração do vírus à célula B, são gerados linfócitos T citotóxicos que eliminam as células B infectadas, levando à falha da transformação. Sabe-se que entre a primeira e segunda semana pós-infecção com EBV ocorre um aumento no número de células infectadas com formação de focos de agregados celulares linfoblastóides. No entanto, após isto, há uma intensa morte celular e completa degeneração dos agregados celulares. Este evento, conhecido como regressão, se dá como consequência do longo período de cultivo e à imunidade mediada pelas células T à células B infectadas⁶⁵. Hussain et al.⁷⁸ descreveram sucesso no processo de imortalização sem qualquer tipo de estímulo para aumentar sua eficiência. Por outro lado, outros estudos^{61-63,67,69,77} indicam o uso de agentes mitogênicos como a fitohemaglutinina (PHA-M) e lipopolissacarídeo, ou agentes imunossupressores de células T como a ciclosporina A (CsA) e tacrolimus (FK506), como alternativa para driblar a ação dos linfócitos T citotóxicos. O uso da fitohemaglutinina, um mitógeno conhecido por estimular predominantemente, mas não exclusivamente células T, induz estas a se transformarem rapidamente em células blásticas e morrerem antes que os linfócitos T citotóxicos possam ser gerados. Já a ciclosporina A, um metabólito fúngico, que exerce profundo efeito no sistema imune, tem o potencial de agente imunossupressor seletivo de linfócitos T inibindo especificamente a divisão celular dos mesmos.

Para prevenir a regressão, optou-se por avaliar e comparar a estimulação com PHA-M e o tratamento com CsA. Ao comparar o comportamento das culturas celulares dos controles negativos (todos sem exposição ao EBV, sendo um com meio de cultivo tradicional e os outros dois com meio de transformação contendo PHA-M e CsA respectivamente) pode-se observar que as drogas utilizadas nos meios de transformação promovem alterações nos critérios avaliados quando comparadas ao controle negativo com meio de cultivo tradicional. Enquanto este segue um processo de degradação progressiva da cultura celular desde o início de seu estabelecimento, em um período curto de 15 dias cultivo, com baixo consumo do meio indicando pouca atividade celular, morte celular gradativa, somente com

alterações morfológicas relacionadas à lise celular, os controles negativos com meio de transformação apresentam um comportamento mais estável, indicando que PHA-M e CsA por si só exercem efeitos nos critérios considerados para avaliar a ocorrência da transformação ou não.

No processo de transformação com PHA-M, quando comparado controle negativo com o teste de imortalização, é possível observar em ambos, no decorrer dos 30 dias, presença de atividade celular com constante consumo do meio, mesmo quando há redução no número de células. Acredita-se que haja relevante influência do efeito mitogênico da PHA-M na avaliação dos critérios selecionados. Enquanto o controle negativo manteve-se todo o tempo com redução no número de células, a cultura teste de imortalização apresentou um aumento significativo entre os dias 10 e 20 de cultivo. Somado a isto, houve precocemente (D=10) formação de grumos celulares tanto no controle negativo quanto na imortalização, porém a quantidade e o aspecto dos grumos mostraram-se diferentes, com grumos em maior número e mais densos e compactos no teste de imortalização. E por último, o critério mais importante e de maior impacto na avaliação de ocorrência da imortalização ou não, a presença de células maiores indicando um possível efeito citopático provocado pela infecção das células pelo EBV, não foi observado no controle negativo, sendo visualizado exclusivamente no teste de imortalização por volta do décimo dia de cultivo com intensificação até o vigésimo dia.

Ao analisar os dados da imortalização com CsA, tem-se que em todo o tempo de cultivo não houve, nem para controle negativo e nem para teste de imortalização, intenso consumo do meio como foi observado com PHA-M. Além disso, as culturas com CsA se mantinham aparentemente com confluência celular constante por certo período, seguido de pequenas reduções no número de células, sendo que em nenhum momento foi observado aumento deste número. Estas observações corroboram com a relação, discutida anteriormente, entre a presença de atividade celular pelo estímulo mitogênico da PHA-M. Diferentemente do processo de imortalização com PHA-M, com CsA não foi identificada a formação de grumos celulares no controle negativo e, a presença destes na cultura teste de imortalização ocorreu tardiamente (D=20) e em pequenas quantidades. Por outro lado e em conformidade com a imortalização com PHA-M, a presença de células maiores indicativas de efeito citopático foi observada somente na cultura teste de imortalização com CsA e não no controle negativo. Contudo, estas células surgiram

por volta do vigésimo dia de cultivo e em pequena quantidade, enquanto que com PHA-M apareceram com menos tempo de cultivo (D=10).

Comparando os dados obtidos para os meios de transformação com fitohemaglutinina e ciclosporina A, pode-se perceber que cada cultura evoluiu com perfil concordante com o princípio de ação da droga, e que aparentemente ambos auxiliam na proteção e prevenção da regressão celular. Neitzel⁶⁵ comparou a taxa de imortalização obtida com PHA-M e CsA, e descreveu um efeito preventivo à regressão com o tratamento da cultura com CsA como sendo significativamente superior ao efeito com PHA-M. A literatura, de modo geral, mostra que a imortalização com PHA-M comparada com CsA, ocorre em menos tempo. Porém, a taxa de transformação dos linfócitos é maior com CsA.

Após o vigésimo quinto dia para ambas as culturas, a manutenção e o acompanhamento das mesmas passaram a ser semanal e não mais diário. Observou-se por volta do trigésimo primeiro dia uma alteração morfológica das células, com rompimento das células maiores (efeito citopático), intensa presença de lise nas demais e perda dos grumos celulares. As culturas celulares evoluíram com degradação e perda das mesmas, não sendo possível avaliar o critério determinante do sucesso da imortalização, que é a alteração de uma cultura com crescimento lento para uma cultura de crescimento exponencial, alcançando confluência celular rapidamente e necessitando de vários repiques em curto espaço de tempo, características essas típicas de linhagens celulares. As células transformadas no BCRJ apresentaram todas essas características e mostraram que uma vez imortalizadas é de fácil expansão para obtenção do DNA.

Sabe-se atualmente que os pacientes portadores de doença falciforme, principalmente aqueles que fazem uso de terapia transfusional crônica, apresentam alta taxa de aloimunização eritrocitária devido à grande diversidade do locus *RH*, a qual resulta em uma diferença entre o perfil de antígenos eritrocitários de doadores e pacientes¹⁶. A presença de variantes Rh, originadas por meio de mutações ou formação de genes *RHD-RHCE* híbridos, levam a expressão de proteínas alteradas que muitas vezes não são identificadas sorologicamente, mas são reconhecidas pelo sistema imune como antígenos, fazendo com que ocorra produção de anticorpos clinicamente significantes^{40,41,42} e consequentemente um comprometimento do aproveitamento transfusional e da qualidade de vida do paciente. A identificação correta das variantes *RHD* e *RHCE* por testes moleculares é fundamental na

prevenção da aloimunização nestes pacientes, uma vez que permite que a maioria dos pacientes receba transfusões de sangue com um maior grau de compatibilidade.

Recentemente, tem sido amplamente utilizada a análise molecular de grupos sanguíneos para determinação de perfis antigênicos eritrocitários estendidos e de variantes RH^{48,49}. Em 2009 e 2011 os resultados do Workshop Internacional de Genotipagem Molecular de Grupos Sanguíneos da Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) mostraram que somente 24 de 33 e 37 de 46 laboratórios participantes obtiveram respectivamente resultados completamente corretos, ou seja, em torno de 20 a 30% dos laboratórios cometeram erros principalmente na genotipagem RH^{50,51}. Volkova et al. 2019⁷⁹ estabeleceu um painel de DNA de referência para genotipagem eritrocitária, validado por um estudo colaborativo internacional, envolvendo 28 laboratórios que determinou a acurácia na determinação de 41 polimorfismos associados à 17 sistemas de grupos sanguíneos. A análise dos resultados mostrou mais de 98% de concordância com os resultados esperados, demonstrando que o material genético obtido de B-LCLs é adequado para ser utilizado como referência. Contudo, este painel não contempla variantes Rh. A utilização de painéis de DNA de referência como controles dos testes poderia minimizar a ocorrência de erros, mas a dificuldade em se obter doadores de sangue e pacientes com variantes Rh relevantes previamente identificadas e caracterizadas é um limitante importante para tal. A partir das variantes identificadas nos indivíduos deste estudo, foram selecionadas as mais encontradas em pacientes portadores de doença falciforme, porém pouco frequentes na população geral. Variantes Rh relevantes clinicamente ou seja, capazes de induzir aloimunização, com maior diversidade de genótipos RH em menor número de amostras, ou seja, priorizou-se a seleção de amostras com variantes *RHD* e *RHCE* com mutações diferentes entre os alelos de cada gene (genótipos heterozigotos compostos). Considerando as células que foram imortalizadas com sucesso, observamos que com apenas duas amostras, foram obtidos como controles positivos seis alelos diferentes, sendo eles: *RHD*, *RHD*^{DAR}*, *RHD*^{DIIIa-CE(4-7)-D}*, *RHCE*^{ceAR}*, *RHCE*^{ce(733G)}*, *RHCE*^{ce(48C,733G,1006T)}*. Desta maneira, além de obtermos o alelo referência *RHD*, foi possível conseguir variantes *RHD* e *RHCE* que podem levar a aloimunização com produção de anticorpos clinicamente significantes.

Diante das considerações aqui realizadas, é notório que o estabelecimento das B-LCLs demanda longos e difíceis períodos de trabalho

principalmente quando há várias amostras manipuladas simultaneamente, mas pode ser eficiente. Contudo, com a necessidade de ter, para realização de estudos moleculares, controles positivos de genótipos raros *RHD* e *RHCE*, os quais são obtidos atualmente de fontes limitadas, entende-se que o desenvolvimento de linhagens celulares que possam se tornar fontes ilimitadas de um material genético com desvio mínimo do genótipo normal e que deter o conhecimento e a tecnologia para obtenção dessas linhagens, faz-se necessário no atual cenário dos estudos moleculares. Além disso, deter o manejo de execução da metodologia de imortalização celular permitirá outras diversas aplicações em estudos de diferentes linhas de pesquisa que são realizados no Hemocentro da Unicamp.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos deste trabalho e nas condições em que foi realizado, podemos concluir que:

- As análises moleculares realizadas em amostras de DNA de pacientes portadores de anemia falciforme e doadores de sangue permitiram identificar variantes do sistema Rh associadas a polimorfismos nos genes *RHD* e *RHCE*.
- Foi possível obter, sem o uso de estímulos externos, altos títulos virais do Epstein-Barr a partir do cultivo da linhagem celular B95-8.
- Linhagens celulares linfoblastóides com polimorfismos genéticos de variantes Rh foram obtidas, disponibilizando seis alelos diferentes, pouco frequentes e que podem levar a produção de anticorpos com importância clínica. Contudo, o protocolo de imortalização celular *in house* necessita de adequações.
- Os polimorfismos identificados pré-imortalização foram confirmados nas B-LCLs obtidas, sem evidências de mutações nas regiões gênicas analisadas, que possam ter sido ocasionadas pelo processo de imortalização, mas é necessário ampliar a validação destes DNAs para realizar análises de acurácia mais robusta.

7. REFERÊNCIAS

1. Costa FF, Conran N, Fertrin, KY. Anemia Falciforme. "In": Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2013. p. 205.
2. Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. *Expert Rev. Mol. Med.* 2006;8(9):1–23.
3. Ecologia – Instituto de Biociências [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006 [atualizada em 2010; acesso em Setembro de 2020]. Estudo de caso: Anemia Falciforme; [aproximadamente 2 telas]. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/evosite/evo101/IIC2aCasestudy.shtml>
4. Nance ST, Keller MA. Comments on: Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients [Scientific Comments]. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013; 35(1):3-17.
5. Adams RJ, Mckie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med.* 1998; 339:5-11.
6. Davies SC, McWilliam AC, Hewitt PE, Devenish A, Brozovic M. Red cell alloimmunization in sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* 1986; 63:241-5.
7. Josephson CD, Lu LL, Killyer KL, Hillyer CD. Transfusion in the patient with sickle cell disease: a critical review of the literature and transfusion guidelines. *Transfus Med Rev.* 2007; 21:118–33.
8. Hilyer CD. Blood banking and transfusion medicine : basic principles & practice - NLM Catalog - NCBI. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2007.
9. Heddle NM, Soutar RL, O'Hoski PL, et al. A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion. *Br. J. Haematol.* 1995;91(4):1000–5.
10. Chou ST, Liem RI, Thompson AA. Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. *Br. J. Haematol.* 2012;159(4):394–404.
11. Singer ST, Wu V, Mignacca R, et al. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. *Blood.* 2000;96(10):3369–73.

12. Gupta R, Singh DK, Singh B, Rusia U. Alloimmunization to red cells in thalassemics: emerging problem and future strategies. *Transfus. Apher. Sci.* 2011;45(2):167–70.
13. Blumberg N, Peck K, Ross K, Avila E. Immune response to chronic red blood cell transfusion. *Vox Sang.* 1983;44(4):212–7.
14. Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion.* 1999;39(7):763–71.
15. Sanz C, Nomdedeu M, Belkaid M, et al. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. *Transfusion.* 2013;53(4):710–5.
16. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood.* 1990;76(7):1431–7.
17. Aygun B, Padmanabhan S, Paley C, Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. *Transfusion.* 2002;42(1):37–43.
18. Dias Zanette AM, de Souza Gonçalves M, Vilasboas Schettini L, et al. Alloimmunization and clinical profile of sickle cell disease patients from Salvador-Brazil. *Ethn. Dis.* 2010;20(2):136–41.
19. Chou ST. Red blood cell antigen genotyping for haemoglobinopathies: considerations for thalassaemia and sickle cell disease. *ISBT Sci Ser.* 2018; 0:1-6.
20. Sutter B, Pereira PMP, Bordini CV, da Costa DC, Geraldo A. Estabilidade de antígenos eritrocitários humanos para controle interno da qualidade imunohematológico. *RBAC.* 2017; 49(3):275-82.
21. International Society of Blood Transfusion. ISBT. 2020.
22. Castilho L, Junior JP, Reid ME. Fundamentos de Imuno-hematologia. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2015. Capítulo 1, Anticorpos, antígenos e sistemas; p.1-2.
23. Denomme GA. Molecular basis of blood group expression. *Transfusion and Apheresis Science* 2011; 44(1):53-63.
24. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. The blood group antigen factsbook: Academic Press. 2012.
25. Alves VM, Martins PRJ, Soares S, Araújo G, Schmidt LC, Costa SSM, et al.

Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012. 34(3):206-11.

26. Vichinsky EP, Luban NL, Wright E, et al. Prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. *Transfusion.* 2001;41(9):1086–92.

27. Sakhalkar VS, Roberts K, Hawthorne LM, et al. Allosensitization in patients receiving multiple blood transfusions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005;1054:495–9.

28. Lasalle-Williams M, Nuss R, Le T, et al. Extended red blood cell antigen matching for transfusions in sickle cell disease: a review of a 14-year experience from a single center (CME). *Transfusion.* 2011;51(8):1732–9.

29. Avent ND. Large scale blood group genotyping. *Transfus. Clin. Biol.* 2007;14(1):10–5.

30. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus. Apher. Sci.* 2011;44(1):81–91.

31. Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology* 2004;20:23-36.

32. Flegel WA. The genetics of the rhesus blood group system. *Dtsch Arztebl* 2007;104:A 651-7.

33. Westhoff CM. The structure and function of the Rh antigen complex. *Semin Hematol.* 2007;44(1):42-50.

34. Wagner FF, Flegel WA. RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood.* 2002;99(6):2272–3.

35. Nardoza LMM, Szulman A, Barreto JA, Junior EA, Moron AF. Bases moleculares do sistema RH e suas aplicações em obstetrícia e medicina transfusional. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2010; 56(6):724-8.

36. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Muller TH, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood.* 2000. 95:2699-708.

37. Roxby D, Coloma M, Flegel WA, Poole J, Martin P, Abbott R. Observation of an anti-D after D-positive transfusion in an individual with weak D type-1 phenotype. *Vox Sang.* 2003. 87(Suppl 3):17-44.

38. Chou ST, Westhoff CM. The role of molecular immunohematology in sickle cell disease. *Transfus Apher Sci.* 2011; 44:73-9.
39. Reid ME, DENOMME GA. DNA-Based Methods in the Immunohematology Reference Laboratory. *Transfus Apher Sci.* 2011; 44:65–72.
40. Chou ST, Westhoff C. Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. *Hematology.* 2009; 178-184.
41. Chou ST, Jackson T, Vege S, Whitley KS, Friedman DF, Westhoff CM. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood.* 2013; 122:1062-71.
42. Sippert E, Machado D, Guelsin G, Gaspardi A, Gilli SCO, Saad STO, et al. Variant *RH* alleles and Rh immunization in patients with Sickle Cell Disease. *Blood Transfusion.* 2015; 13:72-7.
43. Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino JJ, Alberto FL, Saad ST, et al. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion.* 2002; 42:232-38.
44. Castilho L, Rios M, Pellegrino JJ, Saad ST, Costa FF. Blood group genotyping facilitates transfusion of b thalassemia patients. *J Clin Lab Anal.* 2002; 16:216-20.
45. Ribeiro KR, Guarnieri MH, Costa DC, Costa FF, Pellegrino JJ, Castilho L. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang.* 2009; 97:147-52.
46. Costa DC, Pellegrino JJ, Guelsin GAS, Ribeiro KR, Gilli SCO, Castilho L. Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013; 35:35-8.
47. Guelsin GAS, Rodrigues C, Visentainer JEL, Campos PM, Traina F, Pellegrino JJ, et al. Molecular matching for Rh and K reduces red blood cell alloimmunization in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood Transfus.* 2015; 13:53-8.
48. Hashmi G, Shariff T, Zhang Y, Cristobal J, Chau C, Seul M, et al. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion.* 2007; 47:736-47.
49. Le Goff GC, Bres JC, Rigal D, Blum LJ, Marquette CA. Robust, high-throughput solution for blood group genotyping. *Anal. Chem.* 2010; 82: 6185-92.

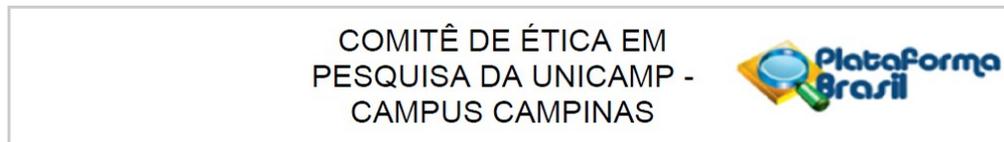
50. Daniels G, Van Der Schoot CE, Gassner C, Olsson ML. Report of the third international workshop on molecular blood group genotyping. *Vox Sang.* 2009; 96:337-43.
51. Daniels G, Van Der Schoot CE, Olsson ML. Report of the Fourth International Workshop on molecular blood group genotyping. *Vox Sang.* 2011; 101:327-32.
52. Boyle J, Thorpe SJ, Hawkins JR, Lockie C, Fox B, Matejtschuk P, et al. International reference reagents to standardise blood group genotyping: evaluation of candidate preparations in an international collaborative study. *Vox. Sang.* 2013; 104:144-52.
53. Denomme GA, Westhoff CM, Castilho L, Reid ME. Consortium for Blood Group Genes (CBGG): 2008 report. *Immunohematology.* 2009; 25:75-80.
54. Saha A, Robertson ES. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. *Clin Cancer Res.* 2011; 17:3056–3063.
55. Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:801-12.
56. Stanfield BA, Luftig MA. Recent advances in understanding Epstein-Barr virus. [version 1; referees: 4 approved] *F1000Research.* 2017, 6(F1000 Faculty Rev):386.
57. Yates JL, Warren N, Sugden B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature.* 1985; 313: 812–15.
58. Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G, et al. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature.* 1995; 375: 685–88.
59. Reisman D, Yates J, Sugden B. A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Mol Cell Biol.* 1985; 5: 1822–32.
60. Megyola C, Ye J, Bhaduri-McIntosh S. Identification of a sub-population of B cells that proliferates after infection with Epstein-Barr virus. *Virol J.* 2011; 8:84.
61. Omi N, Tokuda Y, Ikeda Y, Ueno M, Mori K, Sotozono C, et al. Efficient and reliable establishment of lymphoblastoid cell lines by Epstein-Barr virus transformation from a limited amount of peripheral blood. *Sci Rep.* 2017; 7:43833
62. Biddison WE. Generation of Continuously Growing B Cell Lines by Epstein-Barr Virus Transformation. *Curr Protoc Cell Biol.* 2001; 2: 241-243.

63. Miller G, Shope T, Lisco H, Stitt D, Lipman M. Epstein-Barr Virus: Transformation, Cytopathic changes, and Viral Antigens in Squirrel Monkey and Marmoset Leukocytes. *Proc Nat Acad Sci.* 1972; 69: 383-87.
64. Miller G, Lipman M. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Nat Acad Sci.* 1973; 70:190-4.
65. Neitzel H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet.* 1986; 73: 320-26.
66. Jha HC, Pei Y, Robertson ES. Epstein–Barr Virus: Diseases Linked to Infection and Transformation. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1602.
67. Tousizadeh B, Moghim S, Chaleshtori ARS, Ghanbarian M, Mirian M, Salehi M. Application of Epstein–Barr virus for optimization of immortalized B-lymphocyte production as a positive control in genetic studies. *Adv Biomed Res.* 2017; 6:80.
68. Kroll H, Carl B, Santoso S, Bux J, Bein G. Workshop report on the genotyping of blood cell alloantigens. *Transfus. Med.* 2001; 11: 211–19.
69. Danjoh I, Sone H, Shirota R, Hiroyama T, Nakamura Y. Development of a robust method for establishing B cell lines using Epstein-Barr Virus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2012; 48: 393-402.
70. Almeida JFM, Campos AH, Marcello MA, Bufalo NE, Rossi CL, et al. Investigation on the association between thyroid tumorigenesis and herpesviruses. *J Endocrinol Invest.* 2017; 40: 823-29.
71. Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 1328-37.
72. Kubuschok B, Schmits R, Hartmann F, Cochlovius C, Breit R, König J, et al. Use of spontaneous Epstein-Barr virus lymphoblastoid cell lines genetically modified to express tumor antigen as cancer vaccines: mutated p21 ras oncogene in pancreatic carcinoma as a model. *Hum. Gene Ther.* 2002; 13: 815-27.
73. Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, et al. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat. Med.* 2004; 10: 871-5.
74. Bernasconi N, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science.* 2002; 298: 2199-202.

75. Oh HM, Oh JM, Choi SC, Kim SW, Han WC, Kim TH, et al. An efficient method for the rapid establishment of Epstein-Barr virus immortalization of human B lymphocytes. *Cell Prolif.* 2003; 36: 191-7.
76. Ventura M, Gibaud A, Pendu JLe, Hillaire D, Gérard G, Vitrac D, et al. Use of a simple method for the Epstein-Barr virus transformation of lymphocytes from members of large families of Reunion Island. *Hum. Hered.* 1988; 38: 36-43.
77. Hui-Yuen J, McAllister S, Koganti S, Hill E, Bhaduri-McIntosh S. Establishment of Epstein-Barr Virus Growth-transformed Lymphoblastoid Cell Lines. *J. Vis. Exp.* 2011; 57: e3321.
78. Hussain T, Kotnis A, Sarin R, Mulherkar R. Establishment & characterization of lymphoblastoid cell lines from patients with multiple primary neoplasms in the upper aero-digestive tract & healthy individuals. *Indian J. Med. Res.* 2012; 135: 820-9.
79. Volkova E, Sippert E, Liu M, Mercado T, Denomme GA, Illoh O, et al.; Collaborative Study Group. Validated Reference Panel from Renewable Source of Genomic DNA Available for Standardization of Blood Group Genotyping. *J Mol Diagn.* 2019; 21(3):525-537.

8. ANEXOS

8.1 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (CEP).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE MOLECULAR DE VARIANTES DO SISTEMA Rh E DESENVOLVIMENTO DE PAINÉIS DE DNA DE REFERÊNCIA PARA REALIZAÇÃO DE COMPATIBILIDADE RH HAPLÓTIPO COMPATÍVEL EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

Pesquisador: Mayra Dorigan de Macedo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

Versão: 2

CAAE: 50644215.0.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.387.233

Apresentação do Projeto:

“A análise molecular de grupos sanguíneos e variantes Rh tem se mostrado útil na identificação de doadores de sangue mais compatíveis para pacientes com doença falciforme. No entanto, a inexistência de painéis de DNA de referência para genotipagem de variantes Rh tem se tornado atualmente um grande problema para o desenvolvimento, validação, utilização e controle de qualidade dos testes. Outro ponto de interesse são casos de genótipos e fenótipos Rh discrepantes não justificados por presença de polimorfismos nos genes RHD e RHCE, indicando uma possível regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional. Objetivos: i) identificar variantes do sistema Rh associadas com polimorfismos genéticos nos genes RHD e RHCE em pacientes falciformes e doadores de sangue, ii) desenvolver painéis de DNA de referência para genotipagem de variantes Rh e iii) investigar a participação de microRNAs na regulação da expressão gênica. Metodologia: Será realizada fenotipagem eritrocitária para os antígenos selecionados. Amostras

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			
Bairro: Barão Geraldo		CEP: 13.083-887	
UF: SP	Município: CAMPINAS		
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br	

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.387.233

com fenótipo alterado serão incluídas no estudo. Os genótipos RH serão verificados realizando-se técnicas de PCR convencionais (PCR alelo específico e PCR-RFLP), microarray (tecnologia BeadChip) e sequenciamento de DNA genômico (método de Sanger). Para constituir os painéis de referência de DNA serão estabelecidas linhagens de células linfoblásticas transformadas com o vírus Epstein-Barr (EBV). No processo de validação das sequências dos DNAs obtidos a partir destas linhagens, serão construídos controles positivos por meio de clonagem plasmidial das variantes de interesse RHD e RHCE e os DNAs genômicos dos painéis serão distribuídos em laboratórios para realização de genotipagem Rh e avaliação da performance do material. Já o estudo de miRNAs em variantes Rh será realizada por meio de PCR Array Human miRNome. Análise de dados: A fenotipagem será analisada pela ocorrência ou não de aglutinação das hemácias. A genotipagem será avaliada pela amplificação do fragmento em gel de eletroforese (PCR convencionais) e por programas específicos do microarray e sequenciamento. O desempenho dos painéis de referência de DNA será avaliado por meio de relatórios detalhados dos resultados preenchidos pelos laboratórios participantes. O perfil de expressão de miRNAs será determinado de forma relativa por meio do método 2Ct e as análises estatísticas através de programas específicos. Os dados serão agrupados hierarquicamente, buscando evidenciar miRNAs envolvidos na alteração da expressão gênica Rh. Resultados esperados: Espera-se obter painéis de DNA de referência bem caracterizados para 20 variantes genéticas do sistema Rh a fim de garantir segurança nos resultados da genotipagem RH em pacientes falciformes. Acredita-se ainda que o estudo de microRNAs forneça dados para elucidação mecanismos envolvidos na expressão de proteínas do sistema Rh, assegurando a compatibilização dos antígenos eritrocitários Rh para transfusão de sangue e melhorando a eficácia da terapêutica e a qualidade de vida dos pacientes”.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar variantes do sistema Rh associadas com polimorfismos genéticos nos genes RHD e RHCE em pacientes falciformes e doadores de sangue, desenvolver painéis de DNA de referência para genotipagem de variantes Rh e investigar a participação de microRNAs em casos de perfis fenotípicos Rh alterados não associadas a polimorfismos genéticos.

Objetivo Secundário: 1. Realizar análise molecular em DNA, RNA e microRNA para identificar e determinar as bases moleculares de variantes Rh em pacientes portadores de anemia falciforme e doadores de sangue; 2. Estabelecer linhagens celulares linfoblásticas imortalizadas a partir de sangue total de doadores de sangue que apresentam polimorfismos genéticos das principais variantes Rh; 3. Desenvolver painéis de DNA de referência abrangentes contendo polimorfismos genéticos associados a 20 antígenos Rh variantes de importância clínica; 4. Validar os painéis de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.387.233

referência em diferentes laboratórios de biologia molecular de grupos sanguíneos;5. Utilizar os painéis de DNA de referência na genotipagem eritrocitária para garantir maior segurança transfusional aos pacientes falciformes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e/ou desconfortos associados aos procedimentos da pesquisa são dor e/ou a possibilidade de equimoses decorrentes da colheita de sangue (punção venosa periférica).

Não há benefícios diretos aos participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa apresentada como trabalho de doutorado da pós-graduanda Mayra Dorigan de Macedo (pesquisadora responsável), com orientação da Profa. Dra. Lillian Maria de Castilho. Nesta pesquisa, pretende-se identificar variantes do sistema Rh associadas com polimorfismos genéticos nos genes RHD e RHCE em pacientes falciformes e doadores de sangue, desenvolver painéis de DNA de referência para genotipagem de variantes Rh e investigar a participação de microRNAs em casos de perfis fenotípicos Rh alterados não associadas a polimorfismos genéticos.

Para isso, pacientes com anemia falciforme (n=120) e doadores de sangue saudáveis (n=100) que apresentem resultado sorológico alterado ou discrepante nas tipagens eritrocitárias RhD e RhCE (sem faixa etária pré-determinada) serão convidados a participar do estudo. Será realizada uma consulta no banco de dados do laboratório de biologia molecular de grupos sanguíneos eritrocitários da instituição, a fim de identificar pacientes e doadores, que já tenham resultados de fenotipagem que se enquadrem no critério de inclusão e de genotipagem (variantes Rh ou não) que sejam de interesse para o desenvolvimento dos painéis de referência bem como das análises dos microRNAs. Esta consulta permitirá direcionar a abordagem dos sujeitos da pesquisa, evitando a coleta desnecessária de amostras de voluntários não alvos do estudo.

As questões levantadas no parecer consubstanciado 1.337.436 de 25 de novembro de 2015 foram respondidas em carta enviada ao CEP. Assim, os pesquisadores informaram que os sujeitos da pesquisa não virão ao Hemocentro da UNICAMP exclusivamente para participarem do estudo e que não haverá qualquer tipo de ressarcimento aos participantes. Os sujeitos serão convidados durante as rotinas de transfusão (pacientes) ou doação de sangue (doadores de repetição ou esporádicos)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.387.233

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela pesquisadora responsável, Mayra Dorigan de Macedo e por Joyce Maria Annichino-Bizzacchi coordenadora associada do Centro de Hematologia e Hemoterapia Hemocentro de Campinas, instituição indicada como proponente;
2. Termo de consentimento Livre Esclarecido (pacientes);
3. Termo de consentimento Livre Esclarecido (controles);
4. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto.
5. Projeto completo.
6. Carta de Esclarecimento ao CEP com respostas as questões indicadas no parecer consubstanciado

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações. As questões levantadas no parecer consubstanciado 1.337.436 de 25 de novembro de 2015 foram respondidas em carta enviada ao CEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126	CEP: 13.083-887
Bairro: Barão Geraldo	
UF: SP	Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187
	E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.387.233

normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_600595.pdf	15/12/2015 09:11:57		Aceito
Outros	CARTA_ESCLARECIMENTO_PENDENCIA.pdf	11/12/2015 16:00:10	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	14/10/2015 09:55:55	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Paciente.pdf	07/10/2015 16:12:13	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Doador.pdf	07/10/2015 16:11:51	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	07/10/2015 16:11:11	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.387.233

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

CAMPINAS, 12 de Janeiro de 2016

Assinado por:

**Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)**

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

8.2 – Parecer consubstanciado do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE MOLECULAR DE VARIANTES DO SISTEMA Rh E DESENVOLVIMENTO DE PAINÉIS DE DNA DE REFERÊNCIA PARA REALIZAÇÃO DE COMPATIBILIDADE RH HAPLÓTIPO COMPATÍVEL EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

Pesquisador: Mayra Dorigan de Macedo

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

Versão: 5

CAAE: 50644215.0.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.577.509

Apresentação do Projeto:

As informações foram retiradas do "PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_1543636.pdf", datado de 17/05/2016.

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é caracterizada por uma alteração na estrutura da hemoglobina capaz de provocar, sob determinadas circunstâncias, uma singular interação molecular e drástica redução na sua solubilidade. A alteração molecular é representada pela substituição de uma adenina (A)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

por uma timina (T) (GAGGTC) no códon 6 do gene da globina . Esta mutação resulta na substituição do aminoácido glutamina na posição 6 por valina (6GluVal) e tem como consequência final a polimerização das moléculas dessa hemoglobina anormal (Hemoglobina S - HbS) quando desoxigenadas. A polimerização da hemoglobina S é o evento central na patogenia da anemia falciforme, resultando na alteração da forma do eritrócito (forma de foice) e na acentuada redução de sua deformabilidade. A repetição frequente desse fenômeno provoca lesão de membrana em algumas células, fazendo com que a rigidez e a configuração em forma de foice persistam mesmo após a reoxigenação. Em decorrência de sua acentuada rigidez, as células irreversivelmente falcizadas tem vida média reduzida e contribuem significativamente para a anemia hemolítica dos pacientes. No entanto, o quadro clínico da anemia falciforme não depende substancialmente dos sintomas causados pela anemia propriamente, mas, sim, da ocorrência de lesões orgânicas causadas pela inflamação e obstrução vascular e das chamadas "crises de falcização". As manifestações clínicas nas doenças falciformes são extremamente variáveis e derivadas primariamente da oclusão vascular que é marcada por crises de dor aguda. Praticamente todos os órgãos podem ser afetados pela oclusão vascular. Outras manifestações clínicas podem ocorrer: crises aplásticas, hemolíticas e de sequestro esplênico, complicações cardíacas, pulmonares, neurológicas, hepatobiliares, genitourinárias, oftalmológicas, osteoarticulares, bem como manifestações cutâneas. A terapêutica dos pacientes com doença falciforme consiste no tratamento das complicações específicas e em cuidados gerais da saúde. São limitados os tratamentos disponíveis para profilaxia da morbidade da doença falciforme. As modalidades preventivas mais comumente utilizadas são hidroxiureia e transfusão sanguínea simples ou de substituição. A terapia por hidroxiureia, a qual promove o aumento da hemoglobina fetal, não é efetiva em todos os pacientes. Já o objetivo do regime transfusional é manter o nível de hemoglobina S abaixo de 30%, isto é, diluir a HbS com hemoglobina A e alcançar uma elevação prolongada dos níveis de hemoglobina e hematócrito. Contudo, a transfusão de substituição pode ter o efeito adicional de remoção dos fatores solúveis inflamatórios e da coagulação. Outros efeitos adversos da transfusão crônica são o acúmulo de ferro, a transmissão de patógenos, reações transfusionais e principalmente a aloimunização que pode causar reações transfusionais hemolíticas tardias, produção de autoanticorpos e síndrome de hiperhemólise. Ainda assim, em muitos casos, a terapia transfusional traz mais benefícios do que riscos e muitas vezes a necessidade desta conduta transpõe as complicações consequentes da mesma. Como exemplo, um estudo demonstrou claramente que um regime de transfusão sanguínea que mantenha o nível de HbS abaixo de 30% reduz enormemente o risco do primeiro episódio de acidente vascular

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

cerebral (AVC) em crianças com Doppler Ultrassonográfico Transcraniana (DTC) alterado. Aloimunização Rh em pacientes falciformes. As transfusões de concentrados de hemácias melhoram significativamente a morbidade e mortalidade em pacientes falciformes. Contudo, sua utilização é complicada devido à alta incidência de aloimunização eritrocitária, o que aumenta a complexidade dos testes de compatibilidade sanguínea e pode atrasar ou até mesmo dificultar a transfusão de unidades de sangue antígeno negativo para estes pacientes. A produção de anticorpos é uma complicação grave em pacientes com anemia falciforme em regime de transfusões crônicas uma vez que 33 a 60% dos pacientes tornam-se imunizados e 45% desenvolvem múltiplos anticorpos. A grande diversidade do locus RH nesses pacientes contribui com a alta taxa de aloimunização eritrocitária, em especial contra antígenos do sistema Rh. Transfusões crônicas associadas com a presença de anticorpos eritrocitários podem resultar em reações transfusionais hemolíticas e conseqüentemente em um aumento dos riscos inerentes a transfusão como a lesão pulmonar aguda associada à transfusão (TRALI – Transfusional Related Acute Lung Injury). Adicionalmente, pacientes que se tornam aloimunizados estão 20 vezes mais propensos a formar anticorpos adicionais após um ou mais eventos de transfusões. Genotipagem RH em doadores de sangue e pacientes falciformes. Os laboratórios especializados em imunohematologia surgiram a partir da necessidade de análises mais detalhadas nos casos de pesquisas de anticorpos positivas, provas de compatibilidade incompatíveis e reatividade antigênica incomum. A resolução destes problemas tem sido realizada por testes de hemaglutinação (gold standard). Mas, devido às limitações destes testes sorológicos, especialmente em pacientes cronicamente transfundidos, atualmente métodos moleculares têm sido incorporados na rotina imunohematológica complexa, pois além de possibilitarem uma determinação mais correta do perfil eritrocitário de um indivíduo, permitem identificar genes alterados que levam ao silenciamento ou fraca expressão de antígenos de grupos sanguíneos e possibilitam distinguir aloanticorpos de autoanticorpos. Uma das principais causas de aloimunização eritrocitária em pacientes com doenças falciformes é a diferença do perfil de antígenos eritrocitários entre doadores e pacientes com respectiva ascendência européia e africana. Assim, como uma forma de prevenção da aloimunização tenta-se transfundir estes pacientes com sangue fenótipo compatível, especialmente para os sistemas ABO, Rh e Kell. No entanto, tem se observado que alguns pacientes, mesmo recebendo transfusões de sangue Rh compatível, desenvolvem anticorpos contra antígenos do sistema Rh e, a análise molecular, independentemente dos testes sorológicos realizados, tem revelado a presença de vários alelos RH alterados nestes indivíduos. O gene RHD codifica o antígeno D enquanto o gene RHCE codifica os

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

antígenos "C", "c", "E" e "e". Mutações nestes genes ou formação de genes RHDRHCE híbridos levam a produção de antígenos Rh alterados, denominados variantes Rh, as quais ocorrem predominantemente em indivíduos de origem africana. Estas proteínas Rh alteradas não podem ser detectadas sorologicamente, mas podem ser reconhecidas pelo sistema imune como antígenos. Assim, estes pacientes podem produzir anticorpos tanto para proteínas alteradas RhD quanto RhCE9, o que explica os casos de aloimunização Rh, apesar de transfusões compatíveis para os antígenos Rh normais. As variantes RhD mais frequentemente encontradas em pacientes falciformes incluem os antígenos D parcial DIIIa, DIVa, DAR, DOL e DAU, enquanto que as variantes RhCE mais comuns são as derivadas de alelos RHCE*ce alterados que produzem antígenos "c" e "e" parciais e levam a não expressão dos antígenos de alta frequência hrB e hrS nas hemácias. Variantes da forma alélica RHCE*ce são geralmente herdadas com variantes do gene RHD em pacientes falciformes que acabam desenvolvendo anticorpos Rh complexos, na maioria das vezes clinicamente significantes, acarretando uma complicação séria a estes pacientes. Anticorpos contra variantes RhD e RhCE já demonstraram ser clinicamente significantes e uma das causas mais frequentes de reações transfusionais hemolíticas tardias. Portanto, a identificação de variantes RhD e RhCE pode ser de grande auxílio na prevenção da aloimunização e de reações transfusionais hemolíticas em pacientes falciformes politransfundidos. Atualmente a genotipagem para variantes RH está limitada a laboratórios de referência que realizam testes moleculares mais complexos, pois requer análise de várias regiões dos genes RHD e RHCE. No entanto, a prevalência de alelos RH alterados em pacientes falciformes tem levado vários laboratórios a expandir os testes moleculares para investigação de variantes Rh em doadores e pacientes com a finalidade de encontrar o sangue mais compatível para estes pacientes. Estudos anteriores demonstram a importância da genotipagem de grupos sanguíneos na seleção mais adequada de sangue compatível para a transfusão de sangue de pacientes em regime de transfusão crônica. Verificou-se que a realização de genotipagem de variantes RH em pacientes e doadores de sangue aumenta a segurança transfusional, pois permite que a maioria dos pacientes receba transfusões de sangue com um grau de compatibilidade maior e, conseqüentemente tenham um maior aproveitamento das transfusões recebidas. Nos últimos anos, a genotipagem de grupos sanguíneos com ensaios multiplex tem sido amplamente utilizada na determinação de perfis antigênicos eritrocitários estendidos e de variantes RH. Com a utilização cada vez mais frequente da genotipagem, tem-se observado erros que poderiam ser evitados com o emprego de painéis de referência. Em 2009 e 2011 os resultados do Workshop Internacional de Genotipagem Molecular de Grupos Sanguíneos da Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) mostraram que somente 24 de 33 e 37

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

de 46 laboratórios participantes obtiveram respectivamente resultados completamente corretos, ou seja, em torno de 20 a 30% dos laboratórios cometeram erros principalmente na genotipagem RH. Painéis de referência abrangentes para genotipagem de variantes RHPainéis de referência validados são fundamentais para o desenvolvimento de kits de genotipagem eritrocitária, para a calibração dos testes e para o monitoramento e desempenho dos ensaios. No entanto, os materiais de referência atualmente disponíveis estão limitados e não contemplam as variantes Rh de importância clínica encontradas em pacientes falciformes. A escassez de painéis de referência com cobertura dos alelos associados às variantes Rh pode levar fabricantes e laboratórios a utilizar materiais não caracterizados para o desenvolvimento, validação e controle de qualidade dos testes de genotipagem Rh, o que pode comprometer a segurança dos resultados. Estas plataformas de genotipagem tem auxiliado a constituir grupos de doadores extensivamente genotipados que permitem aumentar os estoques de sangue antígeno negativo e possibilitam a compatibilidade eritrocitária mais exata para pacientes com doença falciforme. Em projetos anteriores, utilizando estas plataformas e testes sorológicos, conseguimos constituir em nossa instituição um banco de doadores fenotipados e genotipados para as principais variantes Rh. Há várias formas de obter materiais genéticos de referência. Produtos de PCR e produtos de PCR clonados em plasmídeo são fáceis de produzir. No entanto, eles perdem a complexidade do DNA genômico e, portanto, não são representativos do material genético avaliado na clínica. Quanto mais o material genético utilizado representar o DNA genômico, mais significado clínico ele terá. Por este motivo, propomos o desenvolvimento de painéis de referência constituídos por DNA genômico que incluam os alelos associados às variantes Rh de importância clínica. Células imortalizadas são capazes de proliferar em cultura e se manter indefinidamente. A imortalização ocorre quando os mecanismos de morte celular são desativados, permitindo a manutenção dessas células indefinidamente. Por técnicas específicas, é possível isolar uma ou mais células e deixá-las proliferar em cultura, dando origem a outras células com características semelhantes e contínuas. Assim, nosso objetivo é identificar variantes Rh em pacientes falciformes e doadores de sangue e desenvolver painéis de referência de DNA genômico abrangendo os polimorfismos genéticos de 20 antígenos Rh variantes. Linhagens celulares imortalizadas de DNA genômico de doadores de sangue que apresentam estes polimorfismos genéticos serão estabelecidas para servir como fonte ilimitada para estes painéis. Após validação adequada, estes painéis poderão ser utilizados para o desenvolvimento, fabricação, regulamentação e aprovação de ensaios moleculares de variantes Rh. Além disto, estes painéis de referência poderão ser também utilizados como controles da genotipagem RH e assim, assegurar um resultado confiável e seguro para beneficiar os pacientes

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

falciformes. O papel de miRNAs na expressão gênica de eritrócitos. O estudo dos genes RH vem ocorrendo desde o estabelecimento do uso da genética molecular na prática clínica e o número de alelos RHD descritos mais que duplicou a partir do ano de 2000. Vinte e cinco anos após a clonagem do primeiro gene RH, (RHCE), os polimorfismos têm sido caracterizados detalhadamente, levando à descobertas como a do ponto de quebra molecular de deleção na caixa Rhesus híbrida em RHD associado com o fenótipo D negativo e a identificação de variabilidade nas mesmas. Também, um grande esforço tem sido despendido para o entendimento da função das proteínas Rh e a definição de sua estrutura 3D, uma vez que não se sabe muito além de sua importância estrutural para integridade da membrana dos glóbulos vermelhos. Na prática da clínica transfusional, um amplo conhecimento dos grupos sanguíneos que expressam variantes, somado à história clínica do paciente, pode auxiliar na interpretação de resultados moleculares e sugerir investigações adicionais, como o sequenciamento de um determinado gene. Em algumas situações, a determinação do genótipo pode não se correlacionar com a expressão antigênica nas células vermelhas. Assim, deve-se considerar a relevância do preparo de cDNA a partir de mRNA, em adição a análise do DNA genômico, para solução de casos com discrepâncias genotípicas e fenotípicas. Entretanto, tem-se observado alguns casos de genótipo e fenótipo Rh discrepantes não justificados por presença de polimorfismos. A identificação de doadores e pacientes com expressão alterada de proteínas Rh, mas com resultados normais nas análises de DNA, cDNA e sequenciamento dos genes RHD e RHCE, tem gerado uma inquietude pelo esclarecimento dos fatos. Esta, por sua vez, despertou o interesse e a necessidade por investigações em eventos da expressão gênica além daqueles rotineiramente avaliados, como uma possível regulação pós transcricional. Neste sentido, voltamos nossos olhares aos microRNAs (miRNA), moléculas de RNA fita simples com tamanho aproximado de 19-25 nucleotídeos que regulam diversas vias celulares participando da maior parte dos processos biológicos. Atuam regulando de forma negativa a expressão de genes a nível pós-transcricional ao se ligar em regiões - UTR complementares no mRNA alvo. Sabe-se que o silenciamento gênico pode ocorrer tanto pela degradação do mRNA quanto pela inibição da tradução da proteína, dependendo do grau de complementaridade entre o miRNA e o mRNA³³. Apesar das funções dos miRNAs nos glóbulos vermelhos não estarem totalmente estabelecidas, vários estudos tem descrito conjuntos distintos destes como essenciais para homeostasia e diferenciação destas células. O papel do miR-451a foi descrito na regulação positiva da diferenciação final eritróide e na proteção das hemácias contra o estresse oxidativo. Já o miR- 320 foi relacionado com a regulação da expressão do receptor de transferrina CD7136, enquanto o miR- 144 demonstrou exercer um importante papel na tolerância de reticulócitos ao

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

estresse oxidativo em pacientes com doença falciforme. O miR-96 estava diretamente ligado e inibindo o mRNA de globina gama e conseqüentemente regulando a expressão da hemoglobina fetal na eritropoiese pós-natal. Por meio da tecnologia deep sequencing e análise proteômica, que as hemácias possuem uma maquinaria complexa de miRNA que confere regulação da tradução do mRNA mesmo após a perda do núcleo. Diante do acima exposto, acreditamos que uma análise molecular de miRNA endógenos de eritrócitos poderá fornecer respostas às discrepâncias Rh encontradas, além de direcionar para novos horizontes em estudos futuros. O entendimento dos mecanismos de degradação de RNA e regulação da tradução nos glóbulos vermelhos pode proporcionar uma melhor contextualização de doenças relacionadas a estas células.

HIPÓTESES

As hipóteses deste trabalho pautam-se tanto nos achados obtidos pelo nosso próprio grupo de pesquisa em estudos antecedentes como nos trabalhos publicados na literatura por outros grupos. Considerando os objetivos específicos desta proposta e que somente farão parte deste estudo amostras com fenotipagem Rh alteradas, as hipóteses são:

1. A análise do DNA e RNA identificará os polimorfismos genéticos de variantes Rh. Os casos que não apresentarem tais polimorfismos, isto é, sem explicação genética para o fenótipo Rh alterado, serão investigados a participação de microRNAs interferentes na regulação da expressão gênica.
2. Uma vez identificados os 20 principais polimorfismos genéticos das variantes Rh, os linfócitos B das respectivas amostras variantes Rh serão transformados pelo vírus Epstein-Barr (EBV), visando a imortalização de tais células e a produção de linhagens celulares para estabelecer um banco de células que forneçam material genético de interesse.
3. Com as linhagens celulares estabelecidas, será possível obter os DNAs destas em quantidades suficientes e deste modo desenvolver os painéis de DNA de referência para as variantes Rh de importância clínica.
4. Após a obtenção dos painéis de DNA de referência das variantes Rh, o desempenho destes será avaliado por laboratórios de biologia molecular de grupos sanguíneos a fim de executar o processo de validação do produto e verificar a efetividade de sua utilização como controle nos testes de genotipagem.
5. Ao finalizar o desenvolvimento dos painéis, os mesmos serão disponibilizados aos laboratórios de genotipagem eritrocitária e o seu uso será monitorado para mensura o quanto a sua implementação na rotina irá contribuir para o aumento da segurança transfusional aos pacientes falciformes.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

METODOLOGIA

- Confirmação dos fenótipos. Os fenótipos de todos os doadores serão confirmados realizando-se a fenotipagem eritrocitária para os antígenos selecionados.
- Extração de DNA, RNA e miRNA. DNA, RNA serão extraídos de leucócitos e o miRNA de reticulócitos utilizando-se o Kit comerciais específicos, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.
- Síntese de DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA será realizada a partir de aproximadamente 1 g de RNA por meio de enzima específica. Também serão realizadas reações de transcrição reversa a partir de miRNA.
- Confirmação dos genótipos RHOs. Genótipos RH de todos os doadores serão confirmados realizando-se técnicas de PCR convencionais, microarray e sequenciamento de DNA genômico. As técnicas de PCR convencionais incluirão técnicas de PCR alelo específico e PCR-RFLP já padronizadas em nosso laboratório para alguns polimorfismos selecionados. A técnica de microarray será realizada pela tecnologia BeadChip já implantada em nosso laboratório. A técnica de sequenciamento será realizada pelo método de Sanger para os polimorfismos que não estão contemplados na plataforma de microarray utilizada ou no PCR convencional padronizado.
- Imortalização de linfócitos B utilizando o vírus Epstein-Barr.
- Preparo das células a serem imortalizadas. Células mononucleares obtidas de sangue periférico (PBMCs) serão isoladas em gradiente de centrifugação com Ficoll-Hypaque. Para inativação dos linfócitos T, será adicionado 1-2 ug/mL de Cyclosporina A ao meio. Após contagem das células, as mesmas serão utilizadas para transformação ou serão congeladas para utilização futura.
- Transformação de linfócitos B utilizando o vírus Epstein-Barr (EBV). É nossa intenção enviar inicialmente três células ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) para imortalização para que possamos ter um material de referência. Em paralelo, realizaremos em nossa Instituição o procedimento de transformação de linfócitos B pelo EBV para o estabelecimento de linhagens de células linfoblastóides. No momento em que 4x10⁶ do total de células viáveis forem contadas, subculturas serão preparadas e expansões das células serão realizadas. Em torno de 6-8 semanas esperamos obter o número suficiente de células necessárias para criopreservação de 10 ou mais frascos de células.
- Criopreservação. As células EBV-transformadas serão congeladas em nitrogênio líquido para

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

garantir longo tempo de sobrevivência.

- Extração e liofilização do DNA genômico. Em torno de 1000 g de DNA genômico serão extraídos dos pellets das células. Testes de degradação acelerada serão realizados em uma ampla faixa de temperatura (560C a 1500C).
- Construção de controles positivos para variantes RHD e RHCE identificadas. Para obter DNA referência e caracterizado de cada amostra que irá compor o painel, serão construídos controles positivos através da inserção dos fragmentos correspondentes às variantes de interesse RHD e RHCE em pGEM®-T Easy Vector Systems.
- Validação dos painéis de referência Os DNAs genômicos serão distribuídos a laboratórios colaboradores para realização de genotipagem Rh e avaliação da performance do nosso painel.
- Pesquisa de miRNAs em variantes Rh não associadas a polimorfismos genéticos. O estudo de miRNAs será realizada por meio do kit miScript miRNA PCR Array Human miRNome, o qual permite avaliar o perfil de expressão dos miRNAs mais abundantemente expressos e com sequências mais bem caracterizadas do genoma humano (miRNome). O método baseia-se em PCR em tempo real e maximiza a probabilidade de identificar sequências de miRNAs cujo padrão de expressão se correlacione com fenótipos biológicos em estudo. Os dados obtidos serão analisados no software online específico para miScript miRNA PCR Array.

CRITÉRIO DE INCLUSÃO

O critério de inclusão no estudo será o mesmo para pacientes falciformes e doadores de sangue, o qual consiste em apresentar resultado sorológico alterado ou discrepante nas tipagens eritrocitárias RhD e RhCE, sem faixa etária pré-determinada.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS PRIMÁRIOS

Identificar variantes do sistema Rh associadas com polimorfismos genéticos nos genes RHD e RHCE em pacientes falciformes e doadores de sangue, desenvolver painéis de DNA de referência para genotipagem de variantes Rh e investigar a participação de microRNAs em casos de perfis fenotípicos Rh alterados não associadas a polimorfismos genéticos.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Realizar análise molecular em DNA, RNA e microRNA para identificar e determinar as bases moleculares de variantes Rh em pacientes portadores de anemia falciforme e doadores de sangue;
2. Estabelecer linhagens celulares linfoblastóides imortalizadas a partir de sangue total de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

- doadores de sangue que apresentam polimorfismos genéticos das principais variantes Rh;
3. Desenvolver painéis de DNA de referência abrangentes contendo polimorfismos genéticos associados a 20 antígenos Rh variantes de importância clínica;
 4. Validar os painéis de referência em diferentes laboratórios de biologia molecular de grupos sanguíneos;
 5. Utilizar os painéis de DNA de referência na genotipagem eritrocitária para garantir maior segurança transfusional aos pacientes falciformes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Considerando que a participação do voluntário na pesquisa consiste no procedimento para obtenção de amostra de sangue, a coleta de sangue será realizada em condições assépticas, seguindo os procedimentos operacionais estabelecidos pela Portaria 2.712, de 12 de Novembro de 2013. Todo material utilizado será descartável (agulha e seringa), não conferindo risco de contaminação ao participante. Deste modo, pode-se dizer que não há riscos previsíveis para os voluntários. Em relação aos profissionais de enfermagem e pesquisadores, responsáveis pela execução da coleta de sangue e manipulação de amostras biológicas respectivamente, estes estarão expostos aos riscos inerentes das atividades da profissão.

BENEFÍCIOS

O desenvolvimento destes painéis para variantes Rh permitirá a adoção de normas de qualidade no trabalho rotineiro dos laboratórios de tipagem sanguínea. Deste modo, este projeto trará benefícios diretos à comunidade científica e aos sujeitos da pesquisa, pois irá atribuir maior precisão e exatidão aos testes, gerando resultados mais fidedignos e confiáveis, reduzindo a exposição de pacientes (regime de transfusão crônica) a antígenos eritrocitários incompatíveis e consequentemente evitando o desenvolvimento de anticorpos e a destruição das células transfundidas. Tudo isto resultará em melhor aproveitamento das transfusões, com redução no número destas e no risco de contaminação destes pacientes por patógenos, atribuindo assim melhor qualidade de vida aos mesmos. Somado a isto, a criação de painéis de referência será uma inovação tecnológica brasileira para área da saúde. Os trabalhos neste sentido auxiliam na formação de recursos humanos com características multidisciplinares capazes de lidar com tecnologias mundialmente utilizadas e com a evolução do mercado de produção e cultivo de linhagens para fins biotecnológicos. Além disto, as análises que serão realizadas para o desenvolvimento dos painéis permitiram a identificação de doadores e pacientes com expressão

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

alterada de proteínas Rh, mas com resultados normais nas análises de DNA, cDNA e sequenciamento dos genes RHD e RHCE. Assim, investigações em eventos da expressão gênica, como uma regulação pós-transcricional por microRNAs (miRNA), poderá esclarecer mecanismos envolvidos na expressão de proteínas do sistema Rh e, de maneira a convergir com os benefícios do desenvolvimento dos painéis, traçar novas diretrizes para conciliar resultados de fenotipagem com genotipagem, assegurando mais uma vez a compatibilização dos antígenos eritrocitários Rh para transfusão de sangue e melhorando a eficácia da terapêutica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se da análise da resposta à pendência 1.2.3 ao Parecer Consubstanciado da Conep nº 1.543.636, datado de 17 de maio de 2016, oferecida pela pesquisadora Mayra Dorigan de Macedo, responsável pela pesquisa ANÁLISE MOLECULAR DE VARIANTES DO SISTEMA Rh E DESENVOLVIMENTO DE PAINÉIS DE DNA DE REFERÊNCIA PARA REALIZAÇÃO DE COMPATIBILIDADE RH HAPLÓTIPO COMPATÍVEL EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME, correspondente ao Protocolo CAAE 50644215.0.0000.5404, com patrocínio principal da FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise da resposta à pendência 1.2.3 ao PARECER CONEP 1.543.636, com data de 17 de maio de 2016:

1. Quanto ao documento Projeto Detalhado, intitulado "Projeto.pdfProjeto.pdf" seguem as seguintes pendências:

1.1. Solicita-se que o termo "sujeito" seja substituído por "participante da pesquisa", em todo o documento, conforme definição disposta no item II.10 da Resolução CNS nº 466 de 2012.

RESPOSTA: Conforme solicitado fez-se a substituição do termo "sujeito" por "participante da pesquisa" em todo o documento. Estas alterações encontram-se destacadas ao longo do texto da seguinte forma:
PARTICIPANTE (S) DA PESQUISA.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

1.2. Solicita-se que conste no Projeto Detalhado os critérios de inclusão e exclusão detalhados dos participantes da pesquisa, que deverão ser apresentados de acordo com as exigências da metodologia a ser utilizada no estudo proposto (Item 3.4.1.11, da Norma Operacional CNS nº 001 de 2013).

RESPOSTA: Conforme solicitado fez-se alterações em "5.1 PARTICIPANTES DA PESQUISA" e a inclusão de "5.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2.1. Não foi possível identificar a faixa etária da população à que a pesquisa se destina. Sendo assim, solicita-se esclarecer se haverá o recrutamento de participantes menores de idade. Solicita-se ainda, inserir nos critérios de inclusão a faixa etária da população estudada.

RESPOSTA: Conforme solicitado fez-se o esclarecimento sobre a faixa etária da população estudada em "5.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2.2. Na página 3 de 27 lê-se: "No momento antecedente à punção do voluntário, seja ela para acesso venoso para transfusão ou coleta para doação de sangue, o enfermeiro responsável apresentará o estudo em questão por meio de linguagem simples, clara e objetiva. Explicará que SERÁ COLETADO UM TUBO DE SANGUE (4 ML) adicional, o qual será realizado por meio do mesmo acesso venoso, sem a necessidade de outra punção. EM SEGUIDA, REALIZARÁ O CONVITE PARA PARTICIPAÇÃO E APRESENTARÁ O TCLE ao sujeito." (destaques nossos). Não é eticamente aceitável coletar material biológico com a finalidade da pesquisa sem conceder o tempo adequado para que o convidado a participar da pesquisa possa refletir, consultando, se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-los na tomada de decisão livre e esclarecida (Item IV.1, da Resolução CNS nº 466 de 2012). Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Conforme solicitado fez-se a alteração em "ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA - Modo de abordagem dos PARTICIPANTES DA PESQUISA para a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)". Alteração de: "No momento antecedente à punção do voluntário, seja ela para acesso venoso para transfusão ou coleta para doação de sangue, o enfermeiro responsável apresentará o estudo em questão por meio de linguagem simples, clara e objetiva. Explicará que será coletado um tubo de sangue (4 mL) adicional, o qual será realizado por meio do mesmo acesso venoso, sem a necessidade de outra punção. Em seguida, realizará o convite para

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

participação e apresentará o TCLE ao sujeito." Para: "O enfermeiro responsável apresentará o estudo em questão por meio de linguagem simples, clara e objetiva. Explicará que para tal será coletado um tubo de sangue (4 mL) adicional, o qual será realizado por meio do mesmo acesso venoso, sem a necessidade de outra punção. Em seguida, realizará o convite para participação e apresentará o TCLE ao PARTICIPANTE DA PESQUISA. Será informado ao convidado a participar da pesquisa que ele terá o tempo que julgar necessário para refletir e consultar, se for o caso, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-lo na tomada de decisão livre e esclarecida."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2.3. Na página 3 de 27 no item "Participação de Grupos Vulneráveis" lê-se: "Este estudo não é direcionado a grupos vulneráveis. No entanto, pode ocorrer de indivíduos vulneráveis, como pacientes MENORES DE IDADE (Destaque Nosso) ou pessoas analfabetas (tanto pacientes como doadores)". Diante do exposto e caso sejam incluídos menores de idade no estudo, solicita-se submeter para apreciação ética na Plataforma Brasil o Termo de Assentimento, o qual deve ser elaborado pelo pesquisador em linguagem acessível à compreensão dos participantes da pesquisa, EM SUAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (um para participantes até 12 anos e outro para participantes com idade entre 13 e 17 anos), não sendo adequado que seja elaborado somente um Termo de Assentimento para todos os participantes menores de 18 anos. Adicionalmente, caso sejam incluídos menores de idade no estudo, solicita-se a inclusão do TCLE para pais e responsáveis (Item II.2, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez-se a submissão para apreciação ética na Plataforma Brasil dos Termos de Assentimento (um para participantes até 12 anos e outro para participantes com idade entre 13 e 17 anos), bem como do TCLE para pais e responsáveis. Os documentos estão intitulados por:

"Termo_de_assentimento_ate_12_anos.pdf",

"Termo_de_assentimento_de_13_a_17_anos.pdf",

"TCLE_Responsaveis_por_pacientes_menores_de_idade.pdf".

ANÁLISE: A pesquisadora submeteu os Termos de Assentimento e o TCLE para os responsáveis, porém, considerando que o Termo de Assentimento deve ser elaborado em linguagem acessível à compreensão dos participantes da pesquisa, não é adequado que seja apresentado o mesmo Termo de Assentimento para todos os participantes menores de 18 anos. PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.

RESPOSTA: - não foram realizadas alterações no Termo de assentimento destinado a pacientes de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

13 a 17 anos, permanecendo o documento intitulado por "Termo_de_assentimento_de_13_a_17_anos.pdf";
- fez-se alterações no Termo de assentimento destinado a pacientes menores de 13 anos. Para tal, foi substituído o arquivo "Termo_de_assentimento_ate_12_anos.pdf" pelo arquivo intitulado por "Termo_de_assentimento_ate_12_anos_versao2.pdf". Além disso, foi anexado o arquivo "Termo_de_assentimento_ate_12_anos_versao2_Destaque.pdf", no qual todas as alterações realizadas encontram-se destacadas de vermelho.

ANÁLISE: Os modelos de Termos de Assentimento, nas respectivas faixas etárias, estão adequadas, e devidamente postadas na Plataforma Brasil. PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.3. Solicita-se que conste no Projeto detalhado, ou em declaração anexada, a garantia do Pesquisador Responsável de divulgar os resultados do estudo para os participantes da pesquisa e instituições onde os dados foram obtidos (Item 3.4.1.14, da Norma Operacional CNS nº 001 de 2013).

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez-se a inclusão do item "DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS PARA OS PARTICIPANTES DA PESQUISA E INSTITUIÇÃO ENVOLVIDA" em "ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA". Segue: "Os pesquisadores responsáveis por este estudo assumem o compromisso e a garantia de divulgar os resultados do estudo para os participantes da pesquisa e para a instituição onde os dados serão coletados (Hemocentro da UNICAMP). Aos participantes da pesquisa será emitido um laudo com o resultado dos testes de tipagem sanguínea. Além disto, ao final do estudo será enviada ao mesmo uma carta informativa sobre os resultados da pesquisa e a relevância de sua participação nesta. Ao Hemocentro, será disponibilizado em seu sistema de banco de dados os resultados sorológicos e moleculares dos pacientes e doadores, além de ser enviado o artigo resultante do estudo após sua publicação".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.4. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente e pode ser autorizado por até dez anos. Solicita-se explicitar no projeto de pesquisa e no cronograma o tempo que as amostras biológicas serão armazenadas (Item 12, da Resolução CNS nº 441 de 2011).

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez-se a inclusão do item "ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS" em "ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA". Segue: "O material biológico humano coletado será armazenado durante todo o desenvolvimento da pesquisa, a qual se dará do início do ano de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

2016 até o final de 2018. Como uma forma de garantia, o mesmo também será guardado durante o ano de 2019, caso haja necessidade de repetição de análises seja para confirmação de resultado ou para realização de testes adicionais que possam ser, por ventura, solicitados por revisores do artigo a ser publicado". Além disso, no item "5.5 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DA PESQUISA" do mesmo arquivo fez-se a inclusão de "Armazenamento das amostras" na tabela do cronograma.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.5. Não fica claro qual instituição/pesquisador será responsável pelo armazenamento dos dados genéticos obtidos no estudo proposto e quem terá acesso, entre outros. Considerando a necessidade de serem observados a proteção dos direitos humanos, das liberdades fundamentais e do respeito à dignidade humana na coleta, processamento, uso e armazenamento de dados genéticos humanos, solicitam-se esclarecimentos acerca do local e responsável pelo armazenamento dos dados genéticos obtidos no estudo (Preâmbulo, da Resolução CNS nº 340 de 2004).

RESPOSTA: Conforme solicitado, faz-se o seguinte esclarecimento: o projeto será desenvolvido pelo laboratório de biologia molecular de grupos sanguíneos eritrocitários situado dentro do Hemocentro da UNICAMP. Deste modo, os dados genéticos humanos obtidos no estudo ficarão armazenados nesta instituição e sob responsabilidade das pesquisadoras Mayra Dorigan de Macedo e Lilian Maria de Castilho.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.5.1. Solicita-se que conste no Projeto Detalhado o local de realização da pesquisa com detalhamento das instalações, dos serviços, centros e instituições nas quais se processarão as várias etapas da pesquisa, incluindo o local que analisará e processará as amostras biológicas coletadas no estudo em tela (Item 3.4.1.5, da Norma Operacional CNS nº 001 de 2013).

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez a inclusão do item "INFRAESTRUTURA DA INSTITUIÇÃO" no Projeto Detalhado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao documento Informações Básicas do Projeto, intitulado, "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_600595.pdf", seguem as seguintes PENDÊNCIAS:

2.1. Solicita-se que todos os pesquisadores e profissionais (assistentes) envolvidos no estudo em

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

tela sejam incluídos na Plataforma Brasil, nos campos "Assistente" ou "Equipe de Pesquisa", presente na Aba 1 - Informações Preliminares, da Plataforma Brasil.

RESPOSTA: Conforme solicitado, todos os profissionais envolvidos no estudo estão inclusos na Plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. No item "Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco? NÃO". (Destaque nosso). O tempo de armazenamento do material não define a constituição de um biorrepositório, podendo variar desde alguns minutos até muitos anos. O que, de fato, define a constituição de um banco de material biológico é a intenção de coleta para pesquisa científica. Assim, considera-se que todos os materiais biológicos coletados ao longo de uma pesquisa constituem um biorrepositório. Frequentemente, os protocolos de pesquisa clínica constituem biorrepositórios, já que são coletadas amostras biológicas especificamente para o estudo em questão. Até mesmo as amostras destinadas a exames considerados rotineiros em um ensaio clínico (como, por exemplo, hemograma e função renal) devem ser consideradas como constituintes de um biorrepositório, de curta duração, já que foram coletadas especificamente em um cenário envolvendo pesquisa. Ao analisar os documentos do estudo constatou-se que haverá armazenamento de amostras biológicas do estudo em tela (coleta de sangue e análise genética). Sendo assim, solicita-se que a informação acima destacada seja adequadamente corrigida, isto é, informar que HAVERÁ armazenamento de material biológico humano em biorrepositório. Ressalta-se que o significado do termo "banco", descrito no campo "Haverá retenção de amostras para armazenamento em BANCO?" na Aba 5 (Outras Informações) da Plataforma Brasil, representa as duas formas existente de armazenamento de amostras nos estudos clínicos (biobanco e/ou biorrepositório), cabendo distinguir no campo "Justificativa" (do campo acima destacado) qual o tipo de armazenamento que estará previsto para o estudo.

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez-se a alteração na Aba 5 (Outras informações) da Plataforma Brasil para: "Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco? SIM" Justificativa: "As amostras coletadas serão processadas e armazenadas no laboratório de biologia molecular de grupos sanguíneos eritrocitários do Hemocentro da UNICAMP (Brasil). O material biológico humano coletado será armazenado durante todo o desenvolvimento da pesquisa, a qual se dará do início do ano de 2016 até o final de 2018. Como uma forma de garantia, o mesmo também será guardado durante o ano de 2019, caso haja necessidade de repetição de análises seja para confirmação de resultado ou para realização de testes adicionais que possam ser, por ventura,

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

solicitados por revisores do artigo a ser publicado. Após o encerramento deste estudo as amostras serão descartadas. Deste modo, fica caracterizado como biorrepositório o tipo de armazenamento previsto neste estudo".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2.1. Adicionalmente solicita-se a apresentação dos documentos necessários para cumprimento das disposições contidas na Resolução CNS nº 441 de 2011. Em particular, o regulamento aprovado pela instituição depositária destinado à constituição e ao funcionamento do banco de material biológico humano.

RESPOSTA: O documento solicitado foi anexado à Plataforma Brasil intitulado como "Documento_Biorrepositorio.pdf".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.3. No item "Orçamento Financeiro" é apresentado um custo total do projeto no valor de "R\$ 55.600,00". Diante do exposto solicitam-se esclarecimentos de como se dará o financiamento do estudo, como por ex: (agência de fomento, Hemocentro, etc...) e caso o patrocinador de fato não for o pesquisador responsável, solicita-se que seja inserido na Plataforma Brasil nova Folha de Rosto com o campo patrocinador devidamente preenchido, datado e assinado (salienta-se que nos casos de agências de fomento não é necessário assinatura no campo patrocinador). Solicita-se adicionalmente que esse dado seja corrigido na Plataforma Brasil (Item "Financiamento", na Aba 3 "Desenho de Estudo/ Apoio Financeiro").

RESPOSTA: O financiamento do estudo se dará por meio da agência de fomento FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), o qual está aprovado sob o número 2015/07559-9. Conforme solicitado, fez-se a correção na Plataforma Brasil (Item "Financiamento", na Aba 3 "Desenho de Estudo/Apoio Financeiro") e a INSERÇÃO DE NOVA FOLHA DE ROSTO COM O CAMPO PATROCINADOR devidamente preenchido, datado e assinado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Quanto ao documento Folha de Rosto, intitulado, "Folha_de_Rosto.pdf":

3.1. Solicita-se complementar na nova Folha de Rosto o campo "3. Área Temática" acrescentando a área temática especial "Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País". (Observação: para que este dado seja aparente na folha de rosto, faz-se necessário

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

modificar o passo 2 "área de estudo" na Plataforma Brasil - marcar a opção: "Genética Humana".

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez-se a complementação na nova Folha de Rosto, campo "3. Área Temática" acrescentando a área temática especial "Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.2. No item 3 "Área Temática" lê-se: "Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana que não necessita de análise ética da CONEP". Solicita-se adequação pois, haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, devendo ser assinalada essa opção na Plataforma Brasil.

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez-se a adequação no item "3 Área Temática", para "Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Quanto ao documento Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, intitulados "TCLE_Paciente.pdf" e "TCLE_Doador.pdf":

4.1. Solicita-se esclarecer se o participante da pesquisa somente cederá a amostra de sangue ou se também haverá coleta de dados ou procedimento similar, descrever no TCLE os procedimentos que serão utilizados na pesquisa, com o detalhamento dos métodos a serem utilizados, isto é, descrever todos os procedimentos e exames que serão realizados no estudo, como por exemplo, quais questionários serão aplicados e quanto tempo será necessário para respondê-los, qual a quantidade de amostras que serão colhidas, quais exames serão realizados, em qual laboratório será realizada a coleta das amostras (Item IV.3.a, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Conforme solicitado faz-se o esclarecimento de que o participante da pesquisa somente cederá amostra de sangue. Não será aplicado questionário ao mesmo. Todos os dados adicionais necessários, como resultados de fenotipagem e/ou genotipagem eritrocitária, serão obtidos por meio de consulta ao banco de dados do laboratório no qual será desenvolvida a pesquisa. Ainda conforme solicitado neste subtópico, as demais alterações constam em "Procedimentos" nos arquivos atualizados citados acima.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

4.2. Solicita-se que seja inserido na Plataforma Brasil compromisso da instituição destinatária no exterior quanto à vedação do patenteamento e da utilização comercial do material biológico humano armazenado em Biorrepositório (Item 16 da Resolução CNS nº 441 de 2011; Item 3, tópico DOCUMENTOS NECESSÁRIOS PARA ARMAZENAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO EM BIORREPOSITÓRIO [ATRELADO A UM PROJETO DE PESQUISA ESPECÍFICO], Anexo II, da Norma Operacional CNS nº 001 de 2013).

RESPOSTA: Justificativa para a dispensa do documento solicitado neste subtópico: O projeto inicial propõe o envio de DNA, obtido a partir das linhagens celulares geradas in house (linfócitos B imortalizados por EBV), para instituições no exterior com a exclusiva finalidade de realizar o processo de validação do painel de DNA de referência. Deste modo, as amostras não serão parte de uma pesquisa perante as instituições, mas sim farão parte de um sistema estabelecido para realização de teste de proficiência. Cada laboratório realizará seus testes moleculares de rotina para os antígenos representados nestes DNAs e emitirá um laudo com o resultado. Não será estabelecido armazenamento de material biológico humano, uma vez que se tratará de material biológico de linhagens celulares e que este será descartado após sua análise.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.3. Na página 1 de 3 item Procedimentos, lê-se: "Participando do estudo você está sendo convidado a: DOAR um (1) tubo de sangue (4 mL) adicional no momento em que o enfermeiro for coletar seu sangue" (destaque nosso). Solicita-se substituir o termo em destaque, pois, o participante de pesquisa não "doa" o material biológico, mas concede o uso da amostra para a pesquisa (enquanto o participante mantiver o seu consentimento). A substituição deverá ser feita em todo o texto.

RESPOSTA: Conforme solicitado fez-se a substituição do termo "DOAR" por "CONCEDER" em todo o texto. As alterações estão em "Procedimentos" (CONCEDER) e em "Desconfortos e riscos" (CONCESSÃO).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.4. Na página 2 de 3 no item "Sigilo e Privacidade" lê-se: "Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores".

4.4.1. Considerando que o participante da pesquisa tem direito ao sigilo e à confidencialidade e a

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

equipe médica tem o dever de garanti-lo, solicita-se adequação do trecho acima citado, descrevendo de modo claro e afirmativo que será assegurada a GARANTIA DE SIGILO E CONFIDENCIALIDADE dos dados pessoais dos participantes de pesquisa, isto é, assegurar que os dados e documentos serão anonimizados antes de serem encaminhados pela equipe médica responsável pelos cuidados do participante do estudo para qualquer outra instância, SEJA PARA O PATROCINADOR OU OUTROS PESQUISADORES (Itens III.2.i e IV.3.e, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Fez-se a adequação do trecho: "Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores". Para: "Considerando que você (participante da pesquisa) tem o direito ao sigilo e à confidencialidade, nós da equipe responsável pelo estudo asseguramos a garantia de sigilo e confidencialidade de seus dados pessoais, isto é, seus dados e documentos serão anonimizados antes de serem encaminhados para qualquer outra instância. Sua amostra será identificada por um número e sua identidade mantida sob sigilo. Seu nome não será citado na divulgação dos resultados desse estudo".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.4.2. Solicita-se que conste no TCLE a informação quanto a medidas de proteção contra qualquer tipo de discriminação ou estigmatização, individual ou coletiva (Item V.1.g, da Resolução CNS nº 340 de 2004).

RESPOSTA: Fez-se a inclusão do trecho: "Garantimos ainda medidas de proteção ao participante da pesquisa contra qualquer tipo de discriminação ou estigmatização, seja individual ou coletiva".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.5. Na página 2 de 3 no item "Acompanhamento e assistência" lê-se: "Não existe risco para o participante deste estudo, pois a coleta de sangue é simples e será realizada por um enfermeiro responsável". Para o Sistema CEP/Conep não existe pesquisa livre de risco. O procedimento de coleta de sangue já implica em riscos potenciais para o participante de pesquisa (dor, desconforto, possibilidade de inflamação no local da coleta, infecção, etc). Sendo assim, solicita-se adequação no trecho em destaque indicando todos os riscos e desconfortos a que a pessoa sendo recrutada estará exposta ao concordar em participar da pesquisa (Itens II.22 e IV.3.b, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Conforme solicitado, no item "Acompanhamento e assistência", fez-se a seguinte

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

adequação: "Considerando o princípio de que não existe pesquisa livre de risco é necessário informar que o procedimento de coleta de sangue implica em riscos potenciais para o participante da pesquisa, como dor, desconforto, hematoma, raramente inflamação no local da coleta e infecção".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.5.1. Adicionalmente solicita-se que seja expresso de modo claro e afirmativo no TCLE o direito de assistência integral gratuita devido a danos diretos/ indiretos e imediatos/ tardios pelo tempo que for necessário ao participante da pesquisa. A assistência engloba o ato de atender, por parte do pesquisador, complicações e danos decorrentes, direta ou indiretamente do estudo, bem como aquela de cunho emergencial (integral e imediata) e deve ser sem ônus de qualquer espécie ao participante de pesquisa, em todas as situações que dela necessite (Itens II.3.1 e II.3.2, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Conforme solicitado, no item "Acompanhamento e assistência", fez-se a seguinte adequação: "Em casos de danos diretos/indiretos e imediatos/tardios, o participante da pesquisa terá o direito de assistência integral gratuita pelo tempo que for necessário. Esta assistência engloba o atendimento, por parte do pesquisador, de complicações e danos decorrentes, direta ou indiretamente do estudo, bem como em caráter emergencial (integral e imediata) sem custo de qualquer espécie ao participante da pesquisa".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.6. Solicita-se que conste no TCLE de forma clara e objetiva a garantia de plena liberdade ao participante da pesquisa, de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma (Item IV.3.d, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Conforme solicitado, consta no texto inicial do TCLE o seguinte trecho: "Você está sendo convidado a participar como VOLUNTÁRIO de uma pesquisa. VOCÊ TEM PLENA LIBERDADE DE RECUSAR-SE A PARTICIPAR OU RETIRAR SEU CONSENTIMENTO EM QUALQUER FASE DA PESQUISA, SEM QUALQUER TIPO DE PENALIZAÇÃO OU PREJUÍZO. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar."

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.7. Na página 2 de 3 do item "Ressarcimento" lê-se: "A sua participação será realizada durante a sua rotina na instituição, isto é, no momento da transfusão de sangue. Você não terá despesas na realização destes exames e a sua participação será voluntária".

4.7.1. Para melhor esclarecer o participante da pesquisa solicita-se que seja incluído no TCLE que caso aja alguma despesa na participação da pesquisa todas as despesas serão de responsabilidade do pesquisador responsável/ patrocinador, isto é, o participante da pesquisa não arcará com nenhum custo referente a procedimentos e/ou exames (Itens II.11 e II.16, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Fez-se a adequação:

"A sua participação será realizada durante a sua rotina na instituição, isto é, no momento da transfusão de sangue. Sua participação será voluntária, ou seja, não haverá pagamento de qualquer espécie para os participantes ou seus familiares. Caso haja alguma despesa na participação da pesquisa, todas as despesas serão de responsabilidade do pesquisador responsável/patrocinador. Assim, o participante da pesquisa não arcará com nenhum custo referente a procedimentos e/ou exames."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.8. Solicita-se incluir no TCLE o pedido de autorização para coleta, depósito, armazenamento e a utilização do material biológico humano. Para melhor esclarecer o participante da pesquisa, solicita-se ainda informar no TCLE o nome do laboratório e o país em que está localizado os laboratórios centrais em que as amostras biológicas coletadas no estudo serão processadas e armazenadas (item 2.II, da Resolução CNS nº 441 de 2011).

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez-se:

- inclusão no item "CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO" do pedido de autorização para coleta, depósito, armazenamento e a utilização do material biológico humano. Segue: "Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar desta pesquisa e autorizo a coleta de sangue, o depósito, armazenamento e a utilização de meu material biológico para os fins aqui citados". - inclusão no item "ARMAZENAMENTO DE MATERIAL" do nome do laboratório e o país de sua localização em que as amostras serão processadas e armazenadas.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

Segue: "As amostras coletadas serão processadas e armazenadas no laboratório de biologia molecular de grupos sanguíneos eritrocitários do Hemocentro da UNICAMP (Brasil). O armazenamento será somente enquanto esta pesquisa estiver em curso. Assim, as amostras não serão utilizadas em outras pesquisas. Após o encerramento deste estudo as amostras serão descartadas."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.9. Solicita-se que seja inserido no TCLE que a retirada do consentimento de guarda dos dados genéticos humanos armazenados em bancos deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA e que dar-se-á a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão, cabendo dessa forma a retirada dos dados genéticos do banco onde se encontrem armazenadas (Itens III.6 e III.7, da Resolução CNS nº 340 de 2004 e Item 10.I da Resolução CNS nº 441 de 2011).

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez-se a inclusão do item "RETIRADA DO CONSENTIMENTO": "Em qualquer momento, você poderá solicitar a retirada do consentimento de guarda dos dados genéticos armazenados em nossos bancos. Isto deverá ser feito por escrito e assinado, sem prejuízo ao participante da pesquisa. A validade da retirada do consentimento será a partir da data da comunicação da decisão."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.10. Solicita-se descrever no TCLE quais serão as análises genéticas que serão realizadas nas amostras biológicas coletadas para o estudo, citando quais as FAMÍLIAS de genes/segmentos de DNA e/ou RNA que serão pesquisados, bem como sua relação com a doença em estudo (Item V.1.a, da Resolução CNS nº 340 de 2004; Carta Circular nº 041/2015/CONEP/CNS/MS).

RESPOSTA: Consta no item "Justificativa e objetivo" do TCLE as informações aqui solicitadas como "análises dos genes RHD e RHCE (amplificação e sequenciamento de DNA)". Julgamos que o aprofundamento das informações técnicas e o uso de termos muito específicos da área pode confundir o participante da pesquisa. Ainda, o projeto não propõe o estudo de uma doença (como está colocado neste item 4.10 da lista de inadequações), mas sim uma investigação relacionada à variabilidade genética populacional que leva aos diferentes tipos de sangue (antígenos eritrocitários e suas variantes) e consequentemente deve ser avaliado para uma compatibilização sanguínea adequada entre paciente e doador.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

4.11. Solicita-se que conste no TCLE o tipo e grau de acesso aos resultados por parte do participante de pesquisa, com opção de tomar ou não conhecimento dessas informações (Item V.1.d, da Resolução CNS nº 340 de 2004).

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez a inclusão do item "Acesso aos resultados". Segue: "Caso você queira será fornecido um laudo com os resultados referentes à tipagem sanguínea do sistema Rh e suas variantes. Você tem a opção de tomar ou não conhecimento dessas informações. Quero ter acesso aos resultados: ()Sim ()Não"

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.12. Solicita-se que seja incluído no TCLE que, caso necessário, será realizado o aconselhamento genético e acompanhamento clínico, e que tal acompanhamento não gerará custos ao participante de pesquisa (Item V.1.c, da Resolução CNS nº 340 de 2004).

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez-se a inclusão no item "Acompanhamento e assistência" do seguinte trecho: "Caso seja necessário, será realizado aconselhamento genético e acompanhamento clínico, sem que haja qualquer custo ao participante da pesquisa".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.13. Na página 3 de 3 no item "Contato", solicita-se incluir o telefone do contato EMERGENCIAL disponível 24 horas no qual o participante de pesquisa consiga entrar em contato com o pesquisador responsável (Item IV.5.d, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Conforme solicitado, fez-se a inclusão no item "Contato" do seguinte trecho: "...pelo telefone (19) 3521-8750 OU EM CASO DE EMERGÊNCIA PELO (16) 98106-6939".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_600595.pdf	24/05/2016 18:05:30		Aceito
Outros	Lista_de_resposta_ao_parecer_1543636.pdf	24/05/2016 18:04:32	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_ate_12_anos_versao2_Destaque.pdf	24/05/2016 18:03:08	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_ate_12_anos_versao2.pdf	24/05/2016 18:02:31	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Documento_Biorrepositorio.doc	15/04/2016 20:56:10	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Paciente_versao3_FINAL.pdf	14/04/2016 17:30:17	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Paciente_versao3_DESTAQUE.pdf	14/04/2016 17:30:01	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Doador_versao3_FINAL.pdf	14/04/2016 17:29:44	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Doador_versao3_DESTAQUE.pdf	14/04/2016 17:29:26	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_versao3_FINAL.pdf	14/04/2016 17:28:53	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_versao3_DESTAQUE.pdf	14/04/2016 17:28:25	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
Outros	Resposta_as_pendencias.pdf	14/04/2016 17:27:48	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_Responsaveis_por_pacientes_menores_de_idade.pdf	06/04/2016 21:12:18	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.577.509

Ausência	TCLE_Responsaveis_por_pacientes_menores_de_idade.pdf	06/04/2016 21:12:18	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_de_13_a_17_anos.pdf	06/04/2016 21:11:54	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Documento_Biorrepositorio.pdf	06/04/2016 21:10:43	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_versao3.pdf	06/04/2016 21:00:43	Mayra Dorigan de Macedo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 07 de Junho de 2016

Assinado por:

Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

8.3 – Parecer da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

18/02/2020

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 6.370/2019 - EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 6.370/2019 - DOU - Imprensa Nacional

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

Publicado em: 23/04/2019 | Edição: 77 | Seção: 1 | Página: 99

Órgão: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações/Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 6.370/2019

A Presidência da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 221ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 11 de abril de 2019, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01250.072000/2018-60

Requerente: Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp

CQB: 072/98

Assunto: Solicitação de Parecer para Projeto

Extrato Prévio: 6318/19

Decisão: Deferido

A requerente, através de seu representante legal, solicitou parecer técnico da CTNBio referente à condução do projeto intitulado "Análise molecular de variantes do sistema Rh e desenvolvimento de painéis de DNA de referência para realização de compatibilidade Rh haplótipo compatível em pacientes com doença falciforme".

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a CTNBio concluiu que o presente pedido atende às normas e legislação pertinentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exige a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

Este é um extrato do Parecer Técnico da CTNBio. Sua íntegra, assim como todos os documentos referentes à solicitação, constam do processo armazenado na CTNBio. Informações complementares poderão ser solicitadas através do Serviço de Informação ao Cidadão - SIC, pelo sítio eletrônico <https://esic.cgu.gov.br/>.

MARIA SUELI SOARES FELIPE
Presidente da Comissão

Este conteúdo não substitui o publicado na versão certificada.

8.4 – Permissão da editora para utilização do artigo publicado na tese.

BLOOD TRANSFUSION

since 1956

Milan, 2nd November 2020

Dear Dr. Macedo,

considering your request, we are glad to give you free permission to use the article “Rh antibodies as a result of altered Rh epitopes on transfused red cells: a case series of seven Brazilian patients” (Blood Transfus 2020; DOI 10.2450/2020.0073-20) for your thesis.

Kind regards.

Editorial Office
SIMTIPRO Srl

OFFICIAL JOURNAL OF

SIMTI

Società Italiana di
Medicina Trasfusionale
e Immunoematologia

AICE

Associazione
Italiana dei Centri
Emofilia

HDTM

Hrvatsko Društvo
za Transfuzijsku
Medicinu

SETS

Sociedad Española de
Transfusión Sanguínea
y Terapia Celular

SISSET

Società Italiana per
lo Studio dell'Emostasi
e della Trombosi

8.5 – Artigo publicado na Blood Transfusion (DOI 10.2450/2020.0073-20).

[Home](#)[Aims and Scopes](#)[Affiliated societies](#)[Editorial board](#)

Rh antibodies as a result of altered Rh epitopes on transfused red cells: a case series of seven Brazilian patients

To cite this article: Blood Transfus 2020; DOI 10.2450/2020.0073-20

DOI: 10.2450/2020.0073-20

Published online: 09/10/2020

Authors

Mayra D. Macedo, Maria R. Miranda, Tamires D. Santos, Janca Leal, Lilian Castilho

Preview

ABSTRACT

Background - Rh antibodies produced by patients receiving Rh-matched RBC units may be associated with inheritance of altered *RH* alleles or a result of altered Rh epitopes on donor red blood cells (RBC). On this background, our aim was to evaluate unexpected Rh antibodies in Brazilian patients receiving regular transfusions and determine the clinical significance of the alloantibody produced.

Material and methods - We investigated seven patients (5 with sickle cell disease, 1 with myelodysplastic syndrome and 1 with β -thalassaemia) with unexplained Rh antibodies. All patients had complete serological and molecular analyses. A lookback at the donor units transfused to these patients was performed and donors suspected of having Rh variants were recruited for further analysis. Laboratory and clinical findings were used to evaluate the clinical significance of the alloantibodies produced.

Results - The unexpected Rh antibodies found in the patients were not linked to the expression of partial Rh phenotypes according to serological and molecular analyses. Anti-D was found in two patients, anti-C was found in one patient, anti-c was found in one patient and anti-e was found in three patients carrying conventional D, C, c and e antigens respectively. Serological and molecular analyses of donors' samples revealed that six donors whose RBC were transfused to these patients carried partial Rh antigens. Only one anti-e in a patient with β -thalassaemia was autoreactive and could not be explained by *RH* diversity in his donors. Three of the seven Rh antibodies were associated with laboratory and clinical evidence of a delayed haemolytic transfusion reaction or decreased survival of transfused RBC at first detection.

Discussion - Our study provides evidence that patients exposed to RBC units from donors with Rh variants may develop antibodies and some of these may be of clinical significance.

Keywords: *Rh antibodies, Rh epitopes, transfused patients, Rh variants, RBC alloimmunisation.*

Rh antibodies as a result of altered Rh epitopes on transfused red cells: a case series of seven Brazilian patients

Mayra D. Macedo¹, Maria R. Miranda¹, Tamires D. Santos¹, Ianca Leal¹, Lilian Castilho¹



¹Unicamp Blood Centre,
Campinas, San Paolo,
Brazil

Background - Rh antibodies produced by patients receiving Rh-matched RBC units may be associated with inheritance of altered *RH* alleles or a result of altered Rh epitopes on donor red blood cells (RBC). On this background, our aim was to evaluate unexpected Rh antibodies in Brazilian patients receiving regular transfusions and determine the clinical significance of the alloantibody produced.

Material and methods - We investigated seven patients (5 with sickle cell disease, 1 with myelodysplastic syndrome and 1 with β -thalassaemia) with unexplained Rh antibodies. All patients had complete serological and molecular analyses. A lookback at the donor units transfused to these patients was performed and donors suspected of having Rh variants were recruited for further analysis. Laboratory and clinical findings were used to evaluate the clinical significance of the alloantibodies produced.

Results - The unexpected Rh antibodies found in the patients were not linked to the expression of partial Rh phenotypes according to serological and molecular analyses. Anti-D was found in two patients, anti-C was found in one patient, anti-c was found in one patient and anti-e was found in three patients carrying conventional D, C, c and e antigens respectively. Serological and molecular analyses of donors' samples revealed that six donors whose RBC were transfused to these patients carried partial Rh antigens. Only one anti-e in a patient with β -thalassaemia was autoreactive and could not be explained by *RH* diversity in his donors. Three of the seven Rh antibodies were associated with laboratory and clinical evidence of a delayed haemolytic transfusion reaction or decreased survival of transfused RBC at first detection.

Discussion - Our study provides evidence that patients exposed to RBC units from donors with Rh variants may develop antibodies and some of these may be of clinical significance.

Keywords: *Rh antibodies, Rh epitopes, transfused patients, Rh variants, RBC alloimmunisation.*

INTRODUCTION

One of the main complications of red blood cell (RBC) transfusion is alloimmunisation, which has become a major concern in transfusion medicine, especially in transfusion-dependent patients such as those with sickle cell disease (SCD), thalassaemia or myelodysplastic

Arrived: 25 March 2020
Revision accepted: 22 June 2020
Correspondence: Lilian Castilho
e-mail: castilho@unicamp.br

syndrome (MDS)¹⁻⁶. The antibodies that develop after transfusions remain in the patients' plasma and may be implicated in delayed haemolytic transfusion reactions (DHTR) and in the reduction of the number of compatible blood units for future transfusions, resulting in the inability to give safe transfusions and delays in finding compatible RBC units⁷.

In order to prevent the formation of alloantibodies against RBC antigens and the negative consequences subsequent to DHTR, many services have adopted a prospective transfusion protocol of phenotype matching for ABO, Rh (D, C, c, E, e) and Kell (K) antigens, while others have implemented a more extended matching protocol including Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b and Ss antigens⁸⁻¹¹. Transfusion protocols based on the genotypic profile of patients have proven to be even more efficient in preventing alloimmunisation and haemolytic transfusion reactions in patients undergoing chronic transfusion¹²⁻¹⁵. Although these protocols have contributed significantly to the reduction of red cell alloimmunisation and to the improvement of RBC transfusion therapy, it has been observed that some patients still produce antibodies directed to Rh antigens despite receiving transfusions of Rh-matched RBC units. In many cases, these antibodies are considered autoantibodies, because the patient has the corresponding antigen^{16,17}. However, molecular analysis has revealed the presence of several altered *RH* alleles predicting expression of partial Rh antigens in these individuals, demonstrating that these antibodies can be classified as alloantibodies and can be clinically significant¹⁸⁻²⁰. Conversely, a patient exposed to donor red cells with variant Rh antigens may also recognise these as foreign and form alloantibodies, as suggested in previous studies performed in SCD patients with conventional *RH* alleles and unexplained Rh antibodies^{20,21}.

The high frequency of altered *RH* alleles in patients and donors, due to the great genetic diversity of the *RH* locus, and the limitations of serological methods to distinguish variant antigens, contribute to the high rate of Rh alloimmunisation in chronically transfused patients¹⁶. Even though some observations suggest that not all Rh antibodies developed by these patients are associated with inheritance of altered *RH* alleles and may also be a result of altered Rh epitopes on donor RBC^{20,21}, evidence to prove this is still lacking. Furthermore, the distinction between

auto- and allo-antibodies in these patients is difficult and often inconclusive.

Based on this and the fact that donor RBC units with partial antigens are being transfused to Brazilian patients with conventional antigens, our aim was to evaluate Rh alloimmunisation in transfused patients carrying conventional *RH* alleles exposed to partial antigens to provide evidence that Rh antibodies may result from altered Rh epitopes on donor RBC. We also determined the clinical significance of the alloantibodies produced.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Seven patients (5 with SCD, 1 with MDS and 1 with β -thalassaemia) on chronic RBC transfusion therapy at the Haematology and Haemotherapy Centre of the State University of Campinas (UNICAMP; Campinas, Brazil) who developed unexplained Rh antibodies in the last 3 years in our institution were evaluated in this study under an institutional review board-approval protocol. These patients had been given Rh and K or extended (Rh, K, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S) phenotype/genotype-matched RBC units. The transfusion requests and alloimmunisation history from January 2017 to December 2019 were reviewed. The RBC antigen phenotypes of each patient and their history of RBC antibodies were obtained from medical records, the Transfusion Service's computerised database and interviews with the patients. All patients were genotyped for *RH*, *KEL*, *FY*, *JK*, *MNS*, *DI*, *DO*, *LW*, *SC* and *RH* variants.

Donors

Donors with weak expression or discrepant results on Rh typing whose RBC were transfused to these seven patients with Rh antibodies were identified in a look-back period of 3 years and recruited for further serological and molecular analyses. From 854 donors evaluated, 11 (1.3%) had weak expression or discrepant results in Rh typing and were recruited: all were repeat donors, had given at least one donation per year in our centre with regular collection and agreed to participate in this study by signing informed consent. Sixteen of these donors were also genotyped for *RH* and *KEL* and for *RH* variants. The study was conducted in accordance with our institutional review board-approval protocol.

Serological analyses

RBC samples collected into EDTA from the seven patients

with Rh antibodies and from the 11 donors recruited for this study were re-typed for D, C, c, E, e by manual haemagglutination in gel cards (Bio-Rad, Lagoa Santa, MG, Brazil) using two different sources of licensed monoclonal antibodies (Immucor, Norcross, GA, USA and Bio-Rad). Antibody screening and a direct antiglobulin test were performed by gel testing on all patients' samples. Eluate was obtained using an acid elution method (Diacidel, Biorad, Cressier, Switzerland). As most of the patients had been recently transfused, antibodies were tested with autologous cells after performing high-speed microhaematocrit centrifugation to separate autologous RBC from donor RBC²² and with allogeneic partial Rh antigens when available in our frozen RBC inventory. Adsorption onto autologous RBC was also performed to aid the differentiation of autoantibodies from alloantibodies.

Molecular analyses

Genomic DNA was extracted from whole blood from patients and donors using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RBC genotyping was performed by HEA BeadChip and RH variants were genotyped with RHD and RHCE BeadChip arrays (Bioarray, Warren, NJ, USA) contained 35 markers associated with RHD and 25 polymorphisms associated with RHCE alleles. The assays were performed with 8 µL of each DNA sample, containing approximately 10 to 80 ng/mL of genomic DNA (gDNA), in accordance with the manufacturer's recommendations, and analysed with the web-based software BASIS that automatically generates genotype and predicted phenotype reports. DNA sequence analysis was performed on polymerase chain reaction (PCR) products amplified from gDNA for all samples from patients and donors that were not characterized by the RHD and RHCE BeadChips in order to determine the specific allele present, using RHD- and RHCE-specific primers as previously reported^{23,24}. PCR products were purified by elution from 1% agarose gels using a Qiaex II gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), and sequenced directly, without subcloning, on an ABI 373XL Perkin Elmer Biosystems (PEB) sequencer, with the PEB Big Dye reagent BD Half-term (GenPak, Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA, USA).

For specific detection of the RHD gene deletion, we used PCR-restriction fragment length polymorphism

amplification of the downstream and hybrid Rhesus box as well as digestion of the PCR products with the restriction enzyme PST I, as previously reported²⁵. We also used a quantitative PCR approach²⁶, complemented by the specific detection of RHD ψ ²⁷.

Analysis of Rh alloimmunisation and clinical significance of the Rh antibodies

Records of transfusions, serological and molecular results were evaluated for all seven patients with unexpected antibodies. The clinical significance of the antibody was determined by comparison of the haemoglobin levels recorded before and after transfusion at the time of antibody detection. A DHTR was defined by a decrease of more than 1 g/dL in haemoglobin levels after transfusion and the transfusion need of the patient.

RESULTS

Subjects

All patients and donors enrolled in this study were from Southeast Brazil and shared African, European and Amerindian ancestries. The patients with SCD had a higher proportion of African ancestry while the patients with thalassemia and MDS had a higher proportion of European ancestry. During this 3-year study the patients received two RBC units every 2-4 weeks for simple transfusion with Rh and K or extended phenotype/genotype-matched units in our Institution.

Unexplained Rh antibodies identified in the patients

Antibodies were classified as auto- or allo-antibodies based on the results of serological testing. Despite transfusions with RH-matched RBC, anti-D was found in one patient with SCD and in one patient with MDS whose RBC were D⁺. Anti-C was found in one patient with SCD who was typed C⁺ and anti-c was found in one patient with SCD typed c⁺. Anti-e was found in two patients with SCD and in one patient with thalassaemia who typed e⁺. Serological features of the identified antibodies were compatible with the presence of alloantibodies in six patients as these patients' plasma was non-reactive with their own RBC or different kinds of allogeneic partial Rh antigens tested. Only the anti-e detected in a patient with thalassaemia was autoreactive and positive in the eluate.

Rh typing

Patients' RBC showed normal expression of D, C, c, E and e antigens, compatible with conventional antigens. Donors'

RBC showed weak expression or discordant results with the monoclonal reagents used in Rh typing. Seven donors showed weak or discrepant results on D typing, one donor showed weak expression of C antigen, one donor showed weak and discordant c typing and two donors showed weak or discrepant results on e typing (Table I).

Molecular analyses

No altered *RHD* and *RHCE* alleles were found in the DNA samples of the seven patients according to *RHD/RHCE* BeadChip and sequencing results although these molecular methods may miss clinically relevant *RH* alleles. Among the 11 donors with suspected Rh variant phenotypes who were studied, two had altered *RHD* alleles (*RHD***DAR* and *RHD***DVI*) encoding partial D phenotypes, one had the hybrid allele *RHD***DIIIa-CE(4-7)-D* encoding partial C, one had a partial c encoded by *RHCE***ceJAL* and two had partial e encoded by *RHCE***ceMO* and *RHCE***ce733G*. Discordant results

in five donors were due to weak D encoded by *RHD***weak D type 1*, *RHD***weak D type 4.0* and *RHD***weak D type 38* (Table I).

Analysis of Rh alloimmunisation

The seven patients with unexplained Rh antibodies received RBC units antigen-positive to the antibody identified. Serological and molecular analyses on donors' samples revealed that six donors whose RBC were transfused into six of the seven patients with unexplained Rh antibodies in the last 3 years carried partial Rh antigens. One SCD patient and one patient with MDS presenting anti-D received RBC units from donors with partial D. SCD patients with anti-C, anti-c and anti-e had been transfused with RBC units carrying partial C, partial c and partial e, respectively. The patient with thalassaemia who developed the autoreactive anti-e was not, apparently, transfused with RBC units from donors with partial e. Table II shows the transfusion protocol with the Rh

Table I - Donors with discrepant results in Rh typing, types of discrepancies and RH genotypes

Number of donors	Antigen	Type of discrepancy in Rh typing	RH genotypes
1	D	Weak expression and discordant results with different clones	<i>RHD</i> * <i>DVI</i> type 1/ <i>RHD</i> * deleted
1	D	Weak expression and discordant results with different clones	<i>RHD</i> * <i>DAR</i> / <i>RHD</i> * <i>DAR-RHCE</i> * <i>ceAR</i> / <i>RHCE</i> * <i>ceAR</i>
1	C	Weak expression	<i>RHD</i> * <i>DIIIa-CE(4-7)-D</i>
1	E	Weak expression and discordant results with different clones	<i>RHCE</i> * <i>ce733G</i> / <i>RHCE</i> * <i>ce733G</i>
1	E	Weak expression and discordant results with different clones	<i>RHCE</i> * <i>ce</i> * <i>ceMO</i> / <i>RHCE</i> * <i>ce</i>
1	C	Weak expression and discordant results with different clones	<i>RHCE</i> * <i>ceJAL</i> / <i>RHCE</i> * <i>ceJAL</i>
2	D	Weak expression	<i>RHD</i> * <i>weak D type 1</i> / <i>RHD</i> * <i>weak D type 1</i>
1	D	Weak expression	<i>RHD</i> * <i>weak D type 38</i> / <i>RHD</i> * deleted
2	D	Weak expression	<i>RHD</i> * <i>weak D type 4.0</i> / <i>RHD</i> * <i>weak D type 4.0</i>

Table II - Patients with unexplained Rh antibodies, transfusion protocol with the Rh phenotypes recommended, red blood cell units with Rh variants received and the patients' transfusion needs

Pt	Diagnosis	Transfusion protocol (Rh phenotypes)	Rh antibodies	Annual average of RBC transfusions	Genotypes of RBC units with Rh variants transfused to the patients
1	SCD	R ₀ r	Anti-D	30	<i>RHD</i> * <i>DAR</i> / <i>RHD</i> * <i>DAR-RHCE</i> * <i>ceAR</i> / <i>RHCE</i> * <i>ceAR</i> <i>RHD</i> * <i>weak D type 4.0</i> / <i>RHD</i> * <i>weak D type 4.0</i>
2	SCD	R ₁ r	Anti-C	36	<i>RHD</i> * <i>DIIIa-CE(4-7)-D ceS</i> / <i>RHCE</i> * <i>ce</i> <i>RHD</i> * <i>weak D type 38</i> / <i>RHD</i> * deleted
3	SCD	R ₀ r	Anti-e	40	<i>RHCE</i> * <i>ce733G</i> / <i>RHCE</i> * <i>ce733G</i> <i>RHD</i> * <i>weak D type 4.0</i> / <i>RHD</i> * <i>weak D type 4.0</i>
4	SCD	R ₀ r	Anti-c	48	<i>RHCE</i> * <i>ceJAL</i> / <i>RHCE</i> * <i>ceJAL</i>
5	SCD	R ₂ r	Anti-e	26	<i>RHCE</i> * <i>ce</i> * <i>ceMO</i> / <i>RHCE</i> * <i>ce</i>
6	MDS	R ₁ r	Anti-D	42	<i>RHD</i> * <i>DVI</i> / <i>RHD</i> * deleted <i>RHD</i> * <i>weak D type 1</i> / <i>RHD</i> * <i>weak D type 1</i>
7	Thalassaemia	R ₁ r	Anti-e	36	<i>RHCE</i> * <i>ce</i> / <i>RHCE</i> * <i>ce</i> <i>RHD</i> * <i>weak D type 1</i> / <i>RHD</i> * <i>weak D type 1</i>

Pt: patient; RBC: red blood cells; SCD: sickle cell disease; MDS: myelodysplastic syndrome.

phenotypes recommended for each patient, the antibodies developed, the annual average RBC transfusions and the units with Rh variants transfused to the patients.

Clinical and laboratory evidence of delayed haemolytic transfusion reactions

Three of seven patients with unexplained Rh antibodies (1 SCD patient with anti-D, 1 MDS patient with anti-D and 1 SCD patient with anti-C) developed worsening anaemia and/or a decrease in haemoglobin levels greater than 1 g/dL after transfusion with D⁺ and C⁺ RBC units compared to the pre-transfusion values, compatible with a DHTR at the time of antibody detection, which was also indicated by the increased frequency of transfusions that these patients required.

DISCUSSION

Unexpected Rh antibodies, defined as those produced by patients who have the corresponding antigens, have been the target of many investigations in patients receiving chronic transfusions, especially SCD patients²¹. Individuals with altered *RH* alleles encoding partial antigens lack common Rh epitopes and are at risk of developing clinically significant antibodies¹⁶⁻²⁰. Likewise, exposure to altered epitopes on donor RBC can stimulate the formation of antibodies in the patient but the clinical significance of transfusion of a donor unit with partial antigens to patients with conventional antigens remains unknown²⁸.

We report a 3-year retrospective study in which we investigated the origin of unexplained antibodies in patients undergoing chronic transfusion. We evaluated seven patients with unexpected Rh antibodies and no altered *RHD* and *RHCE* alleles, according to the methods of molecular analysis used. The patients were receiving Rh and K matched RBC units in our institution. All patients had undergone extended genotyping for *RH*, *KEL*, *FY*, *JK*, *MNS*, *DI*, *DO*, *LW*, *SC* and *RH* variants and six of them had Rh antibodies with serological features of alloantibodies according to the autoadsorption tests performed and absence of reactivity with their own RBC or with various allogeneic partial Rh antigens tested. A look-back in the records of 854 donors whose RBC units were transfused to these patients identified 11 (1.3%) with weak expression or discrepant results in Rh typing. These donors were repeat donors, had undergone extended antigen typing (Rh, K,

Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, Ss) and were re-typed at three donations. Although very mixed, around 40% of donors had a higher proportion of African ancestry. They were recruited for this study and their samples were evaluated by serology and molecular analyses to confirm the presence of Rh variants that could potentially stimulate the production of alloantibodies in the recipients. Six of these 11 donors had altered *RH* alleles encoding partial antigens and five had *RH* variant alleles encoding weak D antigens.

- Patient 1 has SCD and anti-D: phenotyped and genotyped as D⁺, this patient received extended phenotype-matched units with partial and weak D antigens encoded by the variant *RHD* alleles *RHD*^{*DAR} and *RHD*^{*weak D type 4.0}. As the patient had a conventional *RHD* gene we suppose that the unexplained antibody had been stimulated by exposure to donor RBC with altered epitopes. An interesting fact is that a blood unit transfused to this patient also had the variant *RHCE*^{*ceAR} and the patient did not develop anti-c or anti-e. Perhaps, this may be explained by the D antigen immunogenicity compared to that of the c and e antigens.
- Patient 2, with SCD, was typed as C⁺ and was being given extended phenotype-matched units but developed anti-C after transfusion with a RBC unit containing a partial C encoded by the hybrid *RHD*^{*DIIIa-CE(4-7)-D} allele. This patient was also transfused with one unit of RBC typed as weak D type 38 but did not develop anti-D, suggesting that weak D types with normal epitopes and low antigenic density may not induce alloimmunisation.
- Patient 3 with SCD, typed as e⁺ with anti-e and receiving extended phenotype-matched RBC units, was transfused with one RBC unit containing a partial e encoded by the *RHCE*^{*ce733G} allele. This patient also received one RBC unit homozygous for *RHD*^{*weak D type 4.0} alleles but did not develop anti-D. There is still controversy as to whether *RHD*^{*weak D type 4.0} should be considered partial or weak although recently Flegel *et al.* included this type in the list of weak D antigens that do not cause alloimmunisation in transfusion recipients²⁹. According to these authors, weak D types 1, 2, 3, 4.0 and 4.1 may be managed safely as D⁺ in the context of blood transfusions.
- Patients 4 and 5 both have SCD. Patient 4, receiving extended phenotype-matched units, was typed as c⁺ with anti-c. This patient was transfused with a donor unit

with a partial c encoded by a homozygous *RHCE*ceJAL* allele that probably stimulated the production of the antibody. Patient 5, also receiving extended phenotype-matched units, was typed as e⁺ with anti-e and had been transfused with one RBC unit with a partial e encoded by *RHCE*ceMO*, suggesting that this altered e was the cause of production of the patient's unexplained antibody.

- Patient 6, who has MDS and was typed as D⁺, was receiving Rh and K-matched RBC units and made anti-D after receiving one RBC unit with a partial D encoded by a hemizygous *RHD*DVI* allele. This patient also received one RBC unit with weak D encoded by a homozygous *RHD*weak D type 1* but we believe that this transfusion was not related to his alloimmunisation as his anti-D was first detected after the transfusion with the partial D category VI unit.
- Patient 7, a patient with β -thalassemia receiving Rh and K-matched RBC units, typed as e⁺ with an autoreactive anti-e. All RBC donor units analysed for this patient had a conventional e antigen and we, therefore, consider this antibody as an autoantibody. The only point of note from the look back was that the patient had been transfused with a weak D type 1 RBC unit, reinforcing the theory that weak D types may not induce alloimmunisation.

As only patients 1, 2 and 6 had evidence of DHTR after receiving antigen-positive RBC units we suppose that the clinical significance of the antibodies detected may be related to the immunogenicity of and exposure to the antigen, as suggested by Coleman *et al*¹⁹. A follow up of the antibodies identified in the patients' serum would be interesting in order to better analyse the clinical significance and evanescence of the antibodies.

The limitations of our study include the molecular methods used that may miss clinically relevant *RH* alleles, the small number of patients, the occurrence of transfusions outside our institution that were not under control and the evaluation period of 3 years. Since these patients are chronically transfused, there is a likelihood that patients 1, 2 and 6 have been exposed to a greater number of red blood cells from donors with Rh variants in other years. The Brazilian population is of mixed ethnicity and therefore our patients, even the SCD patients, receive blood transfusion from donors with an admixture of Caucasian, African and Amerindian ancestry, as reflected by the types

of variants found in this study. Thus, patients who receive chronic transfusions are often transfused with RBC units from donors with different types of Rh variants.

Further studies involving all patients who received blood units with altered Rh epitopes are important to confirm our findings.

CONCLUSIONS

In this study, we showed that many Rh epitopes were involved in a small number of patients who developed unexplained Rh antibodies, providing evidence that unexplained Rh antibodies in transfused patients carrying conventional Rh antigens can be alloantibodies as a result of RBC transfusions from donors with altered Rh epitopes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the patients and donors who participated in this research. This study was supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [São Paulo State Research Support Foundation] grants n. 2014/00984-3 and 2015/07559-9.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

MDdM recruited the participants, carried out the serological and molecular genetic studies, analysed data and wrote the manuscript, MRM, TDdS and IL carried out molecular analyses. LC designed and coordinated the study, analysed data and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

The Authors declare no conflict of interests.

REFERENCES

1. Anstee DJ. Goodbye to agglutination and all that? *Transfusion* 2005; **45**: 652-3.
2. Noizat-Pirenne F, Tournamille C, Bierling P, et al. Relative immunogenicity of Fy^a and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion* 2006; **46**: 1328-33.
3. Denomme GA, Flegel WA. Applying molecular immunohematology discoveries to standards of practice in blood banks: now is the time. *Transfusion* 2008; **48**: 2461-75.
4. Fasano RM, Monaco A, Meier ER, et al. RH genotyping in sickle cell disease patient contributing to hematopoietic stem cell transplantation donor selection and management. *Blood* 2010; **116**: 2836-8.
5. Chou ST. Transfusion therapy for sickle cell disease: a balancing act. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; **2013**: 439-46.
6. Chou ST, Liem RI, Thompson AA. Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. *Br J Haematol* 2012; **159**: 394-404.
7. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev* 2007; **21**: 58-71.

Unexplained Rh antibodies in chronically transfused patients

8. Vichinsky EP, Luban NL, Wright E, et al. Prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. *Transfusion* 2001; **41**: 1086-92.
9. Sakhalkar VS, Roberts K, Hawthorne LM, et al. Allosensitization in patients receiving multiple blood transfusions. *Ann N Y Acad Sci* 2005; **1054**: 495-9.
10. Lasalle-Williams M, Nuss R, Le T, et al. Extended red blood cell antigen matching for transfusions in sickle cell disease: a review of a 14-year experience from a single center (CME). *Transfusion* 2011; **51**: 1732-9.
11. Chou ST, Alsawas M, Fasano RM, et al. American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: transfusion support. *Blood Adv* 2020; **4**: 327-55.
12. Castilho L, Rios M, Bianco C, et al. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion* 2002; **42**: 232-8.
13. Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, et al. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang* 2009; **97**: 147-52.
14. Da Costa DC, Pellegrino J, Guelsin GAS, et al. Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013; **35**: 35-8.
15. Guelsin GAS, Fujita CR, Rodrigues C, et al. Molecular matching for Rh and K reduces red blood cell alloimmunization in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood Transfus* 2015; **13**: 53-8.
16. Chou ST, Jackson T, Vege S, et al. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood* 2013; **122**: 1062-71.
17. Sippert E, Fujita CR, Machado D, et al. Variant RH alleles and Rh immunisation in patients with sickle cell disease. *Blood Transfus* 2015; **13**: 72-7.
18. Gaspardi AC, Sippert EA, De Macedo MD, et al. Clinically relevant RHD-CE genotypes in patients with sickle cell disease and in African Brazilian donors. *Blood Transfus* 2016; **14**: 449-54.
19. Coleman S, Westhoff CM, Friedman DF, Chou ST. Alloimmunization in patients with sickle cell disease and underrecognition of accompanying delayed hemolytic transfusion reactions. *Transfusion* 2019; **59**: 2282-91.
20. Chou ST, Evans P, Vege S, et al. RH genotype matching for transfusion support in sickle cell disease. *Blood* 2018; **12**: 1198-1207.
21. Dinardo CL, Kelly S, Dezan MR, et al. Diversity of RH and transfusion support in Brazilian sickle cell disease patients with unexplained Rh antibodies. *Transfusion* 2019; **59**: 3228-35.
22. Reid ME, Toy PT. Simplified method for recovery of autologous red cells from transfused patients. *Am J Clin Pathol* 1983; **79**: 364-6.
23. Arnoni CP, Latini FR, Muniz JG, et al. How do we identify RHD variants using a practical molecular approach? *Transfusion* 2014; **54**: 962-9.
24. Noizat-Pirenne F, Lee K, Le Penec PY, et al. Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety. *Blood* 2002; **100**: 4223-31.
25. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in Rhesus box. *Blood* 2000; **95**: 3662-8.
26. Chiu RW, Murphy MF, Fidler C, et al. Determination of Rhd zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin Chem* 2001; **47**: 667-72.
27. Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rhd-negative blood group phenotype. *Blood* 2000; **95**: 12-8.
28. DePalma H, Godbey EA, Opalka A, et al. Reliability of labeling red cell units with minor antigen historical results and process considerations. *Transfusion* 2020; **60**: 822-30.
29. Flegel WA, Denomme GA, Queenan JT, et al. It's time to phase out "serologic weak D phenotype" and resolve D types with RHD genotyping including weak D type 4. *Transfusion* 2020; **60**: 855-9.