

***SORAIA BUCHIGNANI CALONEGO***

**ESTUDO DO EFEITO DO ARMAZENAMENTO  
SOBRE A EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS  
ERITROCITÁRIOS Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S E s EM  
CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS USADOS PARA  
FINS TRANSFUSIONAIS**

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C137e Calonego, Soraia Buchignani  
Estudo do efeito do armazenamento sobre a expressão dos antígenos eritrócitários Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s em concentrados de hemácias usados para fins transfusionais /Soraia Buchignani Calonego. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador :Irene Lorand-Metze  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sistema do Grupo Sanguíneo Duffy. 2. Sistema do Grupo Sanguíneo MNS. 3. Citometria de fluxo. I. Lorand-Metze, Irene. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(Slp/fcm)

## DEDICATÓRIA

---

*Aos meus pais, Sérgio e Rosa, por toda dedicação, otimismo e perseverança para  
que eu pudesse superar meus limites...*

*Ao meu marido Alexandre pelo amor, carinho, estímulo e muita, muita paciência...*

---

## AGRADECIMENTOS

---

Especialmente, à **Dra. Irene**, orientadora e amiga, que com muita dedicação, compreensão, disposição e sabedoria sempre me incentivou e indicou o melhor caminho a ser seguido.

À **Dra. Malu**, co-orientadora e companheira, pela paciência, convivência e aprendizado durante o desenvolvimento do trabalho.

À **Fernanda**, minha verdadeira amiga, que me ajudou e incentivou, nos momentos de dificuldade me encorajou e nas alegrias compartilhadas.

**Ao Dr. Konradin**, pelo desenvolvimento estatístico e orientações na execução das análises.

Aos amigos do laboratório, **Alan, Suiellen, Eliane e Mariana**, pelos momentos de descontração e pelo carinho a mim dispensado.

À **Arlete e Leonardo**, pelo apoio didático, confeccionando posters, formatando aula, tese, figuras... por toda amizade, carinho e boa vontade.

À **secretária Nicete**, através de sua competência e conhecimento tudo foi possível.

À **secretária Cristiane da Pós-graduação**, pelas orientações até o término da tese.

À **Silmara e Joelma**, pelas cuidadosas convocações de doadores.

**Aos funcionários da Recepção e Coleta de Doadores**, pela atenção em colaborar com minha pesquisa.

**Aos doadores de sangue**, pela caridade e confiança em minha pesquisa.

**Aos funcionários do Fracionamento**, que me atenderam de forma muito gentil.

**À Magda**, pelos atenciosos treinamentos de aglutinação em gel e hemaglutinação em tubo.

**À ARLETE, Márcinha, Larissa e Zelma**, minhas amigas, pela amizade, carinho e incentivo, sempre.

**Aos meus amigos do Hemocentro**, Érika, Roberta, Paulinho, Fernanda, Silvana, Sonia, Maria Helena, pela convivência diária.

**À FAPESP e FAEPEX**, que patrocinaram o projeto, possibilitando meu crescimento profissional.

**Ao meu pai, Sérgio**, por sua demonstração de dignidade, ensinando e transmitindo valores, seu carinho, todo amor, confiança e sua bondade.

**À minha mãe, Rosa**, amiga, companheira, batalhadora, carinhosa, sempre presente e me passando determinação.

**Aos meus irmãos, Júnior, Marcelo, Simone e Renato**, pela convivência sadia que temos e nosso verdadeiro companheirismo....

**Ao amor da minha vida, Alexandre**, pelo amor, amizade, compreensão, incentivo, de todos os dias de nossas vidas e por tudo de melhor que ainda viveremos!

**A todos os meus familiares**, pelo carinho a mim dispensado.

# SUMÁRIO

---

LISTA DE ABREVIATURAS .....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
<b>RESUMO .....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 - ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS.....	16
1.2 - SISTEMA DUFFY .....	16
1.3 - SISTEMA MNSS.....	22
1.4 - COLETA, PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS (CH) PARA FINS TRANSFUSIONAIS. ....	24
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 – CASUÍSTICA.....	31
3.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.2.1 – FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA POR TÉCNICA DE HEMAGLUTINAÇÃO.....	33
TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO EM TUBO .....	33
CRITÉRIOS PARA A LEITURA DA AGLUTINAÇÃO EM TUBO .....	34
TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO EM GEL.....	34
CRITÉRIOS PARA A LEITURA DO AGLUTINAÇÃO EM GEL .....	36
3.2.2 - IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	37
PREPARAÇÃO DAS HEMÁCIAS PARA IMUNOFENOTIPAGEM .....	37
AQUISIÇÃO E ANÁLISE DAS HEMÁCIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	38
QIFIKIT™ .....	40
TÉCNICA DO QIFIKIT™ .....	40
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS FY <sup>A</sup> , FY <sup>B</sup> , S E S PELA TÉCNICA DE HEMAGLUTINAÇÃO EM TUBO.....	46
ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS FY <sup>A</sup> , FY <sup>B</sup> , S E S PELA TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO EM GEL.....	50
ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS FY <sup>A</sup> , FY <sup>B</sup> , S E S PELA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO .....	52
QUANTIFICAÇÃO DE SÍTIOS ANTIGÊNICOS ATRAVÉS DE KIT DE CALIBRAÇÃO.....	55
COMPARAÇÃO DA FENOTIPAGEM PELA AGLUTINAÇÃO EM GEL E OS RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO .....	56
DISCUSSÃO.....	62
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>

---

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

°C – Grau Celsius

μL- Microlitro

μm- Micrometro

AABB - American Association of Blood Banks

C – Terminação Carboxil

C3 – Fase do Sistema Complemento

CH – Concentrado de hemácias

CP - Concentrado de plaquetas

CP2D – Citrato, Bifosfato, Dextrose

CPD – Citrato, Fosfato e Dextrose

CPDA – 1 – Citrato, Fosfato, Dextrose e Adenina

CRIO – Crioprecipitado

DHRN – Doença Hemolítica do Recém-nascido

FDA - Food and Drug Administration

Fy – Símbolo SITS para o sistema Duffy

Fy<sup>a</sup> – Antígeno eritocitário Duffy a

FYA – Gene Fy<sup>a</sup>

Fy<sup>b</sup> - Antígeno eritocitário Duffy b

FYB – Gene Fy<sup>b</sup>

---

GPA – Glicoforina A

GPB – Glicoforina B

*GYPA* – Gene Glicoforina A

*GYPB* – Gene Glicoforina B

IgG – Imunoglobulina classe G

IgG1 - Imunoglobulina classe G – sub classe 1

IL –8 – Interleucina 8

ISBT – Internacional Society of Blood Transfusion

mL - Mililitro

N – Terminação Amino

PBS – Tampão Fosfato

PFC – Plasma Fresco Congelado

pH - Potencial de hidrogênio

rpm – Rotações por minuto

S – Antígeno S

s – Antígeno s

SAG – Salina, Adenina e Glicose

ST – Sangue Total

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Modelo da molécula carreadora do Sistema Duffy (Modificado de REID, 1997).. ..	17
<b>Figura 2:</b> Representação tri-dimensional da glicoproteína Duffy na membrana do eritrócito (Modificada de MALLINSON et al., 1995). .....	17
<b>Figura 3:</b> Modelo das moléculas carreadoras das glicoforinas GPA e GPB (Modificado de REID, 1997). .....	24
<b>Figura 4:</b> Esquema de obtenção dos CH leucodepletado e controle. ....	32
<b>Figura 5:</b> Leitura do gel teste (LAPIERRE et al., 1990). .....	36
<b>Figura 6:</b> Exemplo de um dot plot FSC-H x SSC-H com “gate” (R1) em hemácias. ....	38
<b>Figura 7:</b> Exemplo de histogramas dos antígenos Fy <sup>a</sup> , Fy <sup>b</sup> , S e s. ....	39
<b>Figura 8:</b> Histogramas das 5 populações de “beads” .....	41
<b>Figura 9:</b> Sobreposição dos histogramas do <i>QIFIKIT™</i> e dos antígenos Fy <sup>a</sup> , Fy <sup>b</sup> , S e s. ....	43
<b>Figura 10:</b> Curva de calibração para determinação do número de sítios antigênicos. ....	44
<b>Figura 11:</b> Histograma representando a freqüência do CMF do antígeno Fy <sup>a</sup> . ....	57
<b>Figura 12:</b> Histograma representando a freqüência do CMF do antígeno Fy <sup>b</sup> . ....	57
<b>Figura 13:</b> Dispersão dos doadores heterozigotos e homozigotos para os antígenos Fy <sup>a</sup> e Fy <sup>b</sup> . ....	58
<b>Figura 14:</b> Histograma representando a freqüência do CMF do antígeno S. ....	59
<b>Figura 15:</b> Histograma representando a freqüência do CMF do antígeno s. ....	60
<b>Figura 16:</b> Dispersão dos doadores heterozigotos e homozigotos para os antígenos S e s. ....	60

## **LISTA DE TABELAS**

---

<b>Tabela 1:</b> Fenótipos encontrados nas amostras dos grupos étnicos da cidade de Franca – SP, Brasil (modificado de UBIALI, 2003).....	<b>19</b>
<b>Tabela 2:</b> Distribuição fenotípica do sistema Duffy entre os habitantes do Estado do Amazonas e doadores de sangue da cidade de São Paulo (modificado de LANGHI, 2004).	<b>19</b>
<b>Tabela 3:</b> Frequências de fenótipos do sistema Duffy associados aos possíveis genótipos (modificado de MOURANT et al., 1976).....	<b>20</b>
<b>Tabela 4:</b> Leitura da aglutinação em tubo (MARSH, 1972). ....	<b>34</b>
<b>Tabela 5:</b> Número de Mab das populações de “beads” fornecido pelo fabricante (Dakocytomation) com o CMF correspondente obtido através da citometria de fluxo. ....	<b>42</b>
<b>Tabela 6</b> Medianas dos “scores” de doadores heterozigotos e homozigotos para antígenos Fy <sup>a</sup> e/ou Fy <sup>b</sup> obtidas pela técnica de hemaglutinação em tubo durante o período de armazenamento.....	<b>48</b>
<b>Tabela 7:</b> Medianas dos “scores” de doadores heterozigotos e homozigotos para antígenos s e/ou S obtidas pela técnica de hemaglutinação em tubo durante o período de armazenamento.....	<b>49</b>
<b>Tabela 8:</b> Medianas dos “scores” de doadores heterozigotos e homozigotos para antígeno Fy <sup>a</sup> e/ou Fy <sup>b</sup> obtidas pela técnica de aglutinação em gel durante o período de armazenamento.....	<b>51</b>
<b>Tabela 9:</b> Medianas dos “scores” de doadores heterozigotos e homozigotos para antígeno S e/ou s obtidas pela técnica de aglutinação em gel durante o período de armazenamento....	<b>52</b>
<b>Tabela 10:</b> Medianas das intensidades de fluorescência de doadores para antígenos Fy <sup>a</sup> e/ou Fy <sup>b</sup> obtidas pela técnica de citometria de fluxo nos dias 1 e 35 de armazenamento. ....	<b>53</b>
<b>Tabela 11:</b> Medianas das intensidades de fluorescência de doadores para antígenos S e/ou s obtidas pela técnica de citometria de fluxo nos dias 1 e 35 de armazenamento.....	<b>53</b>
<b>Tabela 12:</b> Estudo estatístico através do teste T-dependente do efeito da leucodepleção nos antígenos Fy <sup>a</sup> , Fy <sup>b</sup> , S e s nos dias 1 e 35 de armazenamento.....	<b>54</b>
<b>Tabela 13:</b> Medianas do número de sítios antigênicos de Fy <sup>a</sup> e Fy <sup>b</sup> , nos dias 1 de armazenamento, obtidas através da fórmula do kit de calibração (QIFIKIT <sup>TM</sup> ). ....	<b>55</b>
<b>Tabela 14:</b> Medianas do número de sítios antigênicos de S e s, nos dias 1 de armazenamento, obtidas através da fórmula do kit de calibração (QIFIKIT <sup>TM</sup> ). ....	<b>56</b>
<b>Tabela 15:</b> Medianas de cmf de doadores heterozigotos e homozigotos para antígeno Fy <sup>a</sup> e/ou Fy <sup>b</sup> obtidas pela técnica de citometria de fluxo no dia 1 de armazenamento.....	<b>58</b>
<b>Tabela 16:</b> Medianas de cmf de doadores heterozigotos e homozigotos para antígeno S e/ou s obtidas pela técnica de citometria de fluxo no dia 1 de armazenamento. ....	<b>59</b>

## RESUMO

---

Os antígenos eritrocitários são estruturas polimórficas correspondendo glicoproteínas ou glicolípides localizados na membrana eritrocitária. Os antígenos  $Fy^a$  e  $Fy^b$  são os mais importantes do sistema Duffy e carregados por glicoproteínas de múltipla passagem transmembrana. Os antígenos S e s, pertencentes ao sistema MNS, são carregados pela glicoforina B (GPB). Há relatos na literatura de que todos eles seriam sensíveis à ação enzimática leucocitária e assim podem apresentar alteração de expressão durante o armazenamento.

O nosso objetivo foi estudar a influência da remoção de leucócitos e do tempo de armazenamento na expressão dos antígenos  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ , S e s em concentrados de hemácias (CH) coletados com CPDA-1 e armazenados para fins transfusionais e produção de reagentes eritrocitários. Estudamos 49 unidades de CH. Elas foram subdivididas em duas bolsas logo após a coleta sem abertura do sistema e uma foi leucodepletada com filtros *Sepacell*<sup>TM</sup> antes do armazenamento. A outra foi utilizada como controle. Foi realizada avaliação dos antígenos nos dias 1 e 35 de armazenamento através da hemaglutinação em tubo, aglutinação em gel e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Foi utilizado o *QIFIKIT*<sup>TM</sup> para determinar o número de sítios antigênicos através da citometria de fluxo.

O antígeno  $Fy^a$  apresentou um aumento na intensidade de fluorescência ( $p=0,02$ ) apenas no dia 35 de armazenamento quando a bolsa foi leucodepletada antes do armazenamento. Os outros antígenos ( $Fy^b$ , S e s) não apresentaram diferença de expressão com a leucodepleção. Em relação ao tempo de armazenamento, não

detectamos alteração significativa na densidade dos antígenos  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ , S e s durante os 35 dias estudados.

O resultado do número de sítios estimados através da citometria de fluxo para os respectivos antígenos foi:  $Fy^a$  1,1 e  $2,3 \times 10^4$  em doadores  $Fy(a+b+)$  e  $Fy(a+b-)$  respectivamente;  $Fy^b$  0,72 e  $0,78 \times 10^4$  em doadores  $Fy(a+b+)$  e  $Fy(a-b+)$ ; S 1,0 e  $2,1 \times 10^4$  em indivíduos Ss e SS e para o antígeno s 1,0 e  $2,4 \times 10^5$  em doadores Ss e ss.

A citometria de fluxo demonstrou ser uma técnica sensível e capaz de detectar alterações não perceptíveis com os outros métodos. Foi mais reprodutível, estável e adequada para os antígenos  $Fy^a$  e  $Fy^b$  que para os antígenos S e s. Isto talvez seja devido às características dos soros anti-S e anti-s disponíveis comercialmente. O estudo da expressão durante o armazenamento e a estimativa do número de sítios antigênicos são importantes no controle de qualidade e validade dos reagentes eritrocitários utilizados na prática transfusional. A leucodepleção influenciou somente o antígeno  $Fy^a$  no dia 35 de armazenamento.

## **ABSTRACT**

---

Red blood cells (RBCs) antigens are polymorphic structures, glycoproteins or glycolipids, located in the RBC membrane.  $Fy^a$  and  $Fy^b$  antigens are the most important ones in the Duffy system and they are carried by multipass transmembrane glycoproteins. S and s antigens, belonging to MNS system, are carried by glycophorin B (GPB). Reports in the literature have stated that such antigens are sensitive to enzymes produced by leukocytes, and therefore presenting changes in expression during the storage period.

The aim of our study was to evaluate the influence of leukocytes and storage in the expression of  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ , S and s antigens of RBCs units collected with CPDA-1. We studied 49 RBC units, which had been divided into two units immediately after blood collection. One unit was submitted a leukocyte reduction using Sepacell™ filters before the storage and the other was used as a control. Evaluation of antigens was carried out in days 1 and 35 of the storage period using hemagglutination techniques (tube and gel tests) and immunophenotyping by flow cytometry. The QIFIKIT™ was used to determine the number of antigenic sites by flow cytometry.

We found an increase in the  $Fy^a$  antigen fluorescence intensity ( $p=0,02$ ) only on day 35 of storage in the leukocyte-depleted bag. The other antigens ( $Fy^b$ , S and s) presented no difference of expression with the leukocyte-reduction. No significant alteration in the density of  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ , S and s antigens was detected in RBC during 35 days.

Concerning the number of antigenic sites studied by flow cytometry we found a median number of:  $Fy^a$  1,1 and  $2,3 \times 10^4$  in donors  $Fy(a+b+)$  and  $Fy(a+b-)$  respectively;  $Fy^b$  0,72 and  $0,78 \times 10^4$  in donors  $Fy(a+b+)$  and  $Fy(a-b+)$ ; **S** 1,0 and  $2,1 \times 10^4$  in individuals Ss and SS and for antigen **s** 1,0 and  $2,4 \times 10^5$  in donors Ss and ss.

The flow cytometry showed to be an efficient technique, able to detect antigen small expression alterations that were imperceptible with other methods. This technique was more reproducible, stable and appropriate for  $Fy^a$  and  $Fy^b$  antigens than for S

---

and s antigens, probably due to the characteristics of the commercially available anti-S and anti-s antibodies.

In conclusion, the study of the erythrocyte antigen expression during storage and the antigenic site quantification are important in the validity time as well as the quality control of RBC reagents used for transfusions. The leukocyte-reduction only influenced Fy<sup>a</sup> antigen on day 35 of storage.

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1.1 - ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS

Os antígenos eritrocitários são estruturas polimórficas que correspondem a proteínas, glicoproteínas ou glicolípides localizados na membrana eritrocitária (ORIOU, 1987; WATKINS, 1980). Alguns antígenos podem ser encontrados também na superfície epitelial e nas células endoteliais.

Estes antígenos são identificados por anticorpos obtidos através de anticorpos monoclonais, aloimunização por transfusões, gestações e também como consequência da imunização natural de antígenos provenientes do meio ambiente.

Os 245 antígenos eritrocitários conhecidos foram agrupados em 29 sistemas, seis coleções e duas séries de acordo com a Internacional Society of Blood Transfusion (ISBT)(DANIELS et al., 2004).

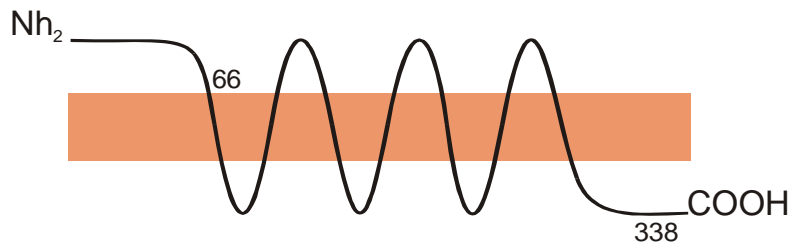
## 1.2 - SISTEMA DUFFY

O sistema Duffy é o número 008 na nomenclatura de grupos sanguíneos da ISBT (DANIELS et al., 2004).

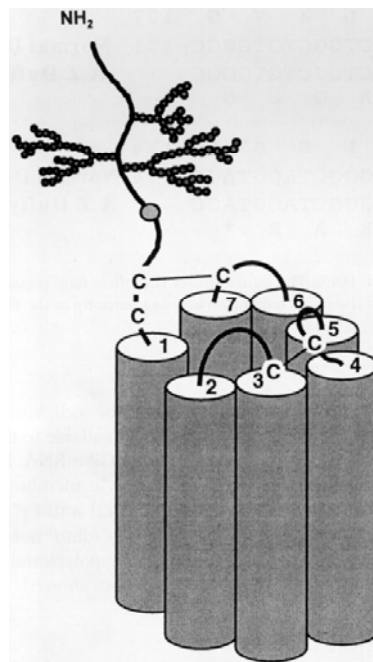
Os antígenos deste sistema são glicoproteínas com múltiplas passagens transmembrana codificadas pelo gene Duffy (**Figuras 1 e 2**). O sistema de grupo sanguíneo Duffy é constituído por seis antígenos, sendo que  $Fy^a$  e  $Fy^b$  são os mais importantes e determinam quatro fenótipos,  $Fy(a-b+)$ ,  $Fy(a+b-)$ ,  $Fy(a+b+)$  e  $Fy(a-b-)$ . Os antígenos  $Fy^a$  e  $Fy^b$  são codificados por um par de alelos codominantes (genes *FYA* e *FYB*, respectivamente) do locus Duffy no cromossomo 1 q22-q23



(DONAHUE et al., 1968). O gene Duffy codifica uma glicoproteína que é expressa em outros tecidos, incluindo cérebro, rim, baço, coração e pulmão (CHAUDHURI et al., 1993).



**Figura 1:** Modelo da molécula carreadora do Sistema Duffy (Modificado de REID, 1997).



**Figura 2:** Representação tri-dimensional da glicoproteína Duffy na membrana do eritrócito (Modificada de MALLINSON et al., 1995).

A glicoproteína do sistema Duffy é receptora do parasita da Malária (*Plasmodium vivax*) (SANGER et al., 1955) e os indivíduos com ausência destes antígenos são resistentes à doença (MILLER et al., 1976). Esta glicoproteína é um receptor da interleucina-8 (IL-8), uma citocina pró-inflamatória (SZABO et al., 1995).

UBIALI (2003) estudou a frequência dos fenótipos do sistema Duffy em três populações etnicamente diferentes, na cidade de Franca, São Paulo, Brasil. Os fenótipos Fy(a+b+) e Fy(a-b+) foram predominantes entre os indivíduos brancos. Entre os negros, o fenótipo Fy(a-b-) esteve presente na maioria dos indivíduos e entre os asiáticos, o fenótipo Fy(a+b-) apresentou maior frequência (**Tabela 1**).

Em 2004, LANGHI avaliou a distribuição fenotípica do sistema Duffy entre 199 doadores de sangue (mestiços de raças caucasóides e negróides) da cidade de São Paulo e 250 indivíduos do Estado do Amazonas, Brasil. O fenótipo Fy(a+b+) foi predominante entre os indivíduos do Amazonas e o Fy(a-b+) entre os doadores de sangue (**Tabela 2**).

Através de técnicas de hemaglutinação CASTILHO e colaboradores (2004) determinaram o fenótipo, do sistema Duffy, de 361 doadores de sangue (Campinas, SP, Brasil). O fenótipo predominante foi o Fy(a-b+) (n = 102), seguido do Fy(a+b-) (n = 93), Fy(a+b+) (n = 89) e Fy(a-b-) (n = 77).

**Tabela 1:** Fenótipos encontrados nas amostras dos grupos étnicos da cidade de Franca – SP, Brasil (Modificado de UBIALI, 2003).

Grupos	Número Testado	Fy(a+b-)		Fy(a+b+)		Fy(a-b+)		Fy(a-b-)	
		n	F	n	F	n	F	n	F
<b>Branços</b>	47	06	<b>0,128</b>	17	<b>0,362</b>	24	<b>0,510</b>	0	<b>0</b>
<b>Negros</b>	50	09	<b>0,180</b>	0	<b>0</b>	08	<b>0,160</b>	33	<b>0,660</b>
<b>Asiáticos</b>	43	35	<b>0,814</b>	08	<b>0,186</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>
<b>Total</b>	140	50	<b>0,357</b>	25	<b>0,178</b>	0,32	<b>0,229</b>	33	<b>0,236</b>

n = número de indivíduos estudados; F = Freqüência dos fenótipos.

**Tabela 2:** Distribuição fenotípica do sistema Duffy entre os habitantes do Estado do Amazonas e doadores de sangue da cidade de São Paulo (Modificado de LANGHI, 2004)

Fenótipos	Número Testado	GRUPO			
		Amazonas		Doador	
		n	%	n	%
<b>Fy(a+b-)</b>	131	78	<b>31,2%</b>	53	<b>26,6%</b>
<b>Fy(a+b+)</b>	137	97	<b>38,8%</b>	40	<b>20,1%</b>
<b>Fy(a-b+)</b>	150	68	<b>27,2%</b>	82	<b>41,2%</b>
<b>Fy(a-b-)</b>	31	7	<b>2,8%</b>	24	<b>12,1%</b>
<b>Total</b>	449	250	<b>100%</b>	199	<b>100%</b>

n = número de indivíduos estudados.

A freqüência gênica encontrada dos antígenos do sistema Duffy em Indígenas brasileiros foi de 0,6 (SALZANO et al., 1977; BLACK et al., 1980) a 1,00 (WARD et al., 1975).

Na população dos Estados Unidos, os fenótipos Fy(a-b+), Fy(a+b-), Fy(a+b+) somam uma freqüência aproximada de 100% nos brancos (RACE et al., 1975). O fenótipo Fy(a-b-) é mais comum entre negros, tendo prevalência de 68% entre indivíduos afro-americanos (SANGER et al., 1955) e 88% entre indivíduos africanos (HITZEROTH et al., 1982). A freqüência destes fenótipos apresenta grande variação entre os grupos étnicos e suas distribuições geográficas. MOURANT et al. (1976) publicaram as freqüências dos fenótipos Duffy entre os europeus, africanos e japoneses (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Freqüências de fenótipos do sistema Duffy associados aos possíveis genótipos (Modificado de MOURANT et al., 1976).

Fenótipo	Genótipo	Freqüências (%)		
		Europeus	Africanos	Japoneses
Fy(a+b-)	Fy <sup>a</sup> / Fy <sup>a</sup> ou Fy <sup>a</sup> / Fy	20	10	81
Fy(a+b+)	Fy <sup>a</sup> / Fy <sup>b</sup>	48	3	15
Fy(a-b+)	Fy <sup>b</sup> / Fy <sup>b</sup> ou Fy <sup>b</sup> / Fy	32	20	4
Fy(a-b-)	Fy/ Fy	0	67	0

Os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> são sensíveis a ação de enzimas proteolíticas, sendo completamente destruídos pela quimiotripsina, papaína, ficina, bromelina e pronase (MORTON et al, 1962; JUDSON e ANSTEE, 1977; MILLER et al., 1975), que quebram a ligação do antígeno com a parte N-terminal da glicoproteína (SALMON et al., 1984). A enzima tripsina não afeta o antígeno Fy<sup>a</sup>, mas de alguma maneira modifica o antígeno Fy<sup>b</sup> (BEATTIE, 1988).

MASOUREDIS et al., 1980 definiram o número de sítios antigênicos do antígeno Fy<sup>a</sup> utilizando a técnica quantitativa com imunoferritina marcada e microscopia eletrônica. Os resultados deste estudo estimaram 17.000 sítios para hemácias homozigotas Fy(a+b-) e 6.900 sítios para as heterozigotas Fy(a+b+).

Em 1950 CUTBUSH e colaboradores descreveram a presença de um novo anticorpo em um paciente hemofílico politransfundido. O sobrenome do paciente era Duffy e os autores usaram este nome para o novo sistema de grupos sanguíneos. Um ano depois, o anticorpo anti-Fy<sup>b</sup> foi encontrado no soro de uma paciente que havia passado por três gestações e nenhuma transfusão (IKIN et al., 1951).

Em alguns indivíduos a sensibilização contra o Fy<sup>a</sup> pode ser estimulada durante a gravidez, mas na maioria o anticorpo anti-Fy<sup>a</sup> surge após transfusão sanguínea. A ocorrência natural do anticorpo anti-Fy<sup>a</sup> é muito rara (ALGORA et al., 1991). Os anticorpos anti-Fy<sup>a</sup> são do tipo IgG (MOLLISON et al., 1983), a maioria do subtipo IgG<sub>1</sub> (HARDMAN et al., 1981; SZYMANSKI et al., 1982). Estes anticorpos são facilmente identificados quando se utiliza antiglobulina humana nos testes de

pesquisa e identificação de anticorpos irregulares (CHOWN et al., 1965; RACE et al., 1953).

O anticorpo anti-Fy<sup>a</sup> pode ser responsável por reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias (PINEDA et al., 1978; ROSENFELD et al., 1950), entretanto raras reações fatais foram descritas (FREIESLEBEN, 1951; BADAKERE et al., 1970). Este anticorpo pode também causar doença hemolítica perinatal (DHPN) leve (BAKER, et al., 1956; GREENWALT, et al., 1959; WEINSTEIN, et al., 1975; GOODRICK, et al., 1997).

O Anti-Fy<sup>b</sup> é um anticorpo relativamente raro, encontrado com uma frequência 20 vezes menor que o anti-Fy<sup>a</sup> (MARSH, 1975). A maioria parece ocorrer em indivíduos que produzem múltiplos aloanticorpos após exposição a transfusões. Este anticorpo pode ser estimulado por gestações (IKIN et al. 1951; VETTER et al., 1967) e transfusões (GIBLETT et al., 1965). O anti-Fy<sup>b</sup> pertence à classe IgG, subtipo IgG<sub>1</sub>, (HARDMAN et al., 1981; SZYMANSKI et al., 1982) e frequentemente é identificado por testes que utilizam a imunoglobulina humana.

### **1.3 - SISTEMA MNSs**

O sistema MNS é o número 002 na nomenclatura de grupos sanguíneos da ISBT (DANIELS et al., 2004). Este sistema é composto de 40 antígenos carregados por proteínas intrínsecas de membrana eritrocitária, as glicoforinas (**Figura 3**). Os antígenos mais importantes são o M, N, S, e s, sendo o S envolvido em reações hemolíticas transfusionais. O antígeno M e N estão localizados na glicoforina A

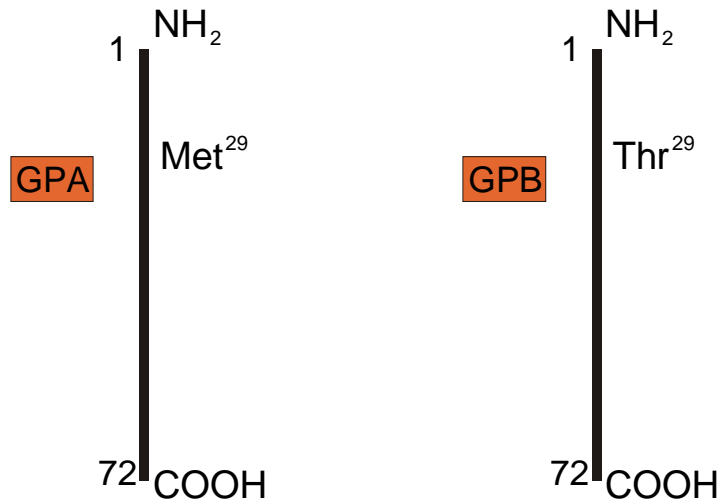
(GPA) e os antígenos S, s e U na glicoforina B (GPB). Estes antígenos são codificados pelos genes *GYP A* e *GYP B*, respectivamente, que estão situados no cromossomo 4 q28-q31 (RACE et al., 1975).

As glicoforinas são glicoproteínas transmembrana de passagem simples, com uma terminação carboxil (C) estendida para dentro do eritrócito, chegando ao citoplasma, um segmento hidrofóbico constituído de 23 aminoácidos embutidos na camada bilipídica da membrana eritrocitária e uma terminação amino (N) no ambiente extracelular (HUANG et al., 1995). Estas moléculas são sensíveis a enzimas proteolíticas (REID et al., 1997). ISLA e colaboradores (2003) quantificaram o número de sítios de GPA e GPB em doadores através da citometria de fluxo. A estimativa de sítios de GPA ficou entre  $(0,48 - 4,9 \times 10^5)$  e para GPB  $(0,21 - 1,14 \times 10^5)$ .

DAHR (1981) mensurou a quantidade de GPB em hemácias usando coloração PAS (periodic acid schif) e leitura colorimétrica. Através desta técnica o autor publicou que em indivíduos S homozigotos existe aproximadamente 1.5 vezes mais GPB que em indivíduos s homozigotos e, uma quantidade intermediária no fenótipo Ss.

A freqüência dos antígenos S e s é muito variável nos diferentes grupos étnicos. Em populações brancas, o fenótipo predominante é o ss com freqüência de 45%, seguido do Ss com 44% e SS com 11% (GREENWALT et al., 1954). O fenótipo S-s- é extremamente raro em populações européias (WIENER et al., 1954).

WALSH e MONTGOMERY (1947) encontraram o aloanticorpo, anti-S, durante estudo de um antígeno relacionado ao M e N. O anti-s foi descoberto por LEVINE e colaboradores (1951) investigando o produto de um alelo do antígeno S.



**Figura 3:** Modelo das moléculas carreadoras das glicoforinas GPA e GPB (Modificado de REID, 1997).

#### 1.4 - COLETA, PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS (CH) PARA FINS TRANSFUSIONAIS.

O sangue total é coletado em uma bolsa plástica contendo uma solução anticoagulante e conservadora designada a manter a função e viabilidade celular durante o armazenamento. Essa solução contém, basicamente, dextrose, cuja função é a geração de ATP, um substrato que é a adenina, fosfato de sódio que controla o pH e anticoagulante, o citrato. O Food and Drug Administration (FDA) autoriza para 21 dias de armazenamento o sangue coletado com o anticoagulante CPD (citrato, fosfato, dextrose) e CP2D (citrato, bifosfato, dextrose, dextrose) e para



o período de 35 dias coletado com CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrose e adenina) (Technical Manual AABB, 2005).

O doador é submetido antes da doação à triagem clínica e assepsia do local de punção venosa. Em seguida, o sangue total coletado é fracionado, ou seja, separado por centrifugação em diferentes componentes, entre eles, concentrado de hemácias (CH), concentrado de plaquetas (CP), plasma fresco congelado (PFC) e crioprecipitado (CRIO). O concentrado de hemácias é conservado em temperatura constante de 4 °C com monitoramento de vinte e quatro horas (Technical Manual AABB, 2005, GORLIN et al., 2002).

Durante o armazenamento, pode ocorrer degranulação, fragmentação ou morte (apoptose) dos leucócitos com liberação de substâncias que podem promover reações febris transfusionais. Estudos sugerem que a remoção de leucócitos seja realizada nas primeiras 24 horas de armazenamento, evitando assim reações transfusionais (BUCHHOLZ et al., 1994; HEDDLE & KELTON, 2001).

O procedimento de leucodepleção pode ser realizado por diferentes técnicas como, sedimentação, centrifugação, lavagem, congelamento e descongelamento, mas a filtração ainda é a mais eficiente, uma vez que os filtros de tecnologia avançada são mais eficazes, proporcionando uma redução de 99,9% ( $> 3 \log_{10}$ ) dos leucócitos (BRUIL et al., 1995; Technical Manual AABB, 2005). A remoção de leucócitos através de filtros proporciona a prevenção de reações transfusionais febris não hemolíticas, transmissão de agentes infecciosos (citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, Creutzfeldt-Jakob) e auxilia na remoção de bactérias e prevenção do

crescimento tumoral em modelos experimentais (BORDIN et al., 1994; GOLDMAN e DELAGE, 1995; MORAES-SOUZA et al., 1995)

MYHRE et al. (1984) descreveram que hemácias coletadas com CPDA –1, CPDA –2 ou com Salina-Adenina-Glicose (SAG) e posteriormente armazenadas a 4° C, apresentam uma redução da expressão de antígenos eritrocitários, principalmente do antígeno Lewis e P.

Alguns antígenos, como por exemplo, M, P1, Knops, HLA, deterioram durante o armazenamento mais rapidamente que outros. Alterações do pH durante o período de armazenamento também podem influenciar a intensidade da deterioração do antígeno eritrocitário. Por exemplo, os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> sofrem redução da expressão quando as células são armazenadas em meio com pH baixo e soluções de baixa força iônica (Technical Manual AABB, 2005).

A alteração de expressão de antígenos eritrocitários durante o período de armazenamento ainda é pouco relatada. Os antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s são glicoproteínas sensíveis à ação enzimática leucocitária e podem apresentar alteração de expressão durante o armazenamento. Essa possível diferença na densidade antigênica é importante na produção de reagentes utilizados na investigação da prática transfusional.

Há ausência de estudos, na literatura, que demonstrem o número de sítios dos antígenos eritrocitários Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s determinado por citometria de fluxo. Os estudos encontrados são da década de 80 e relatam a determinação da densidade antigênica por técnicas antigas e menos sensíveis que a citometria de fluxo.

Portanto, frente a estes dados resolvemos estudar a expressão dos antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s pela citometria de fluxo comparando com métodos de hemaglutinação.

# ***OBJETIVOS***

- Estudo da expressão dos antígenos  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ , S e s durante o armazenamento de concentrado de hemácias (CH) coletados com CPDA-1 para fins transfusionais e produção de reagentes eritrocitários.
- Estudo da influência da remoção dos leucócitos na expressão dos antígenos  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ , S e s de concentrado de hemácias durante o período de armazenamento.

# ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

### 3.1 – CASUÍSTICA

O projeto deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Campinas (UNICAMP) e desenvolvido no Hemocentro da UNICAMP.

Foram avaliados 49 doadores considerados aptos à doação de sangue, pelos critérios das Normas Técnicas do Ministério da Saúde do Brasil (Portaria 1376 / 1993 – Ministério da Saúde do Brasil).

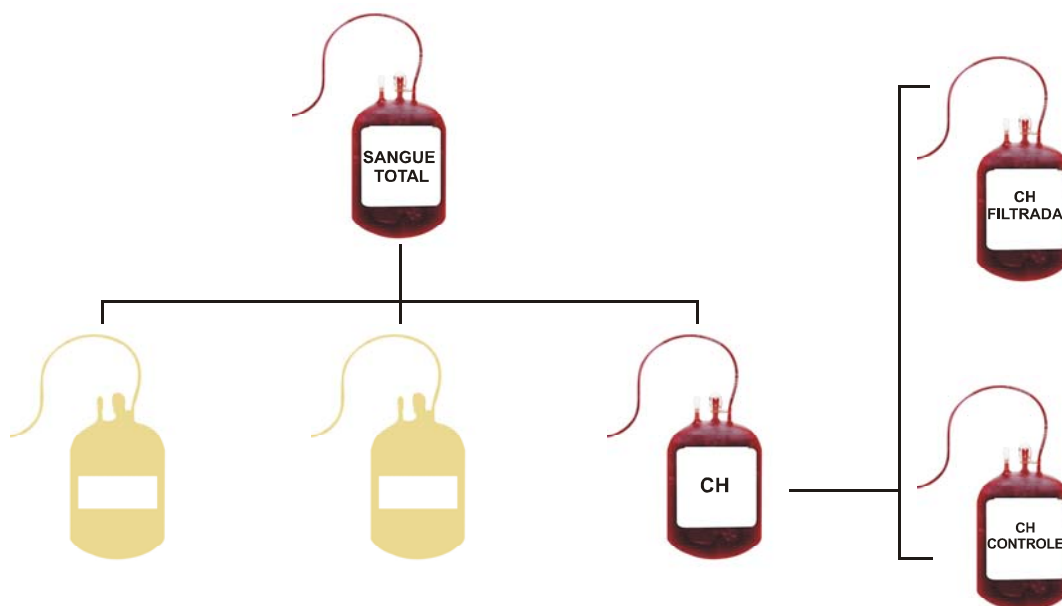
Os procedimentos de coleta, produção e armazenamento de CH foram realizados de acordo com as normas American Association of Blood Bank (Technical Manual AABB, 2005) e da Resolução-RDC n.º.: 153/04 (Ministério da Saúde do Brasil).

Doadores de sangue previamente fenotipados para os Sistemas Duffy (Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>) e Ss foram convocados e esclarecidos em relação ao projeto de pesquisa. Os doadores que aderiram voluntariamente e assinaram o termo de consentimento pós-informado (**Anexo 1**) foram submetidos a coleta de uma unidade de sangue total (ST) em bolsas com solução CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrose e adenina) para posterior fracionamento em concentrado de hemácias (CH) (Technical Manual AABB, 2005).

Cada unidade de ST coletada foi subdividida em duas bolsas, sendo que uma foi leucodepletada com filtros *Sepacell™* (Baxter, Haina, Republica Dominicana) previamente ao processo de fracionamento e armazenamento, e a outra unidade foi fracionada e armazenada sob as mesmas condições (controle) (**Figura 4**). Os CHs foram armazenados a 4 °C em câmaras frias com controle de temperatura e

alarmes, seguindo as normas definidas para produção de componentes hemoterápicos destinados à transfusão (Technical Manual AABB, 2005).

Amostras foram coletadas, sem abertura do sistema, através do equipamento *Fenwal™* (Câmara para amostragem sanguínea) (*Baxter, Deerfield, USA*) nos dias 01, 14, 28 e 35 de armazenamento. Realizada avaliação da expressão dos antígenos eritrocitários  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ , S e s através de testes imunohematológicos utilizando técnicas de hemaglutinação e imunofenotipagem por citometria de fluxo.



**Figura 4:** Esquema de obtenção dos CH leucodepletado e controle.



## 3.2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 – FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA POR TÉCNICA DE HEMAGLUTINAÇÃO

Foi realizada técnica de hemaglutinação em tubo (VENGELEN-TYLER, 1996) e aglutinação em gel (LAPIERRE et al., 1990). Os antisoros anti-Fy<sup>a</sup>, anti-Fy<sup>b</sup>, anti-S e anti-s (*Gamma Biologicals Inc., Houston, TX, EUA*) foram utilizados de acordo com os critérios do fabricante. As amostras foram submetidas a redeterminação dos antígenos dos sistemas Duffy e MNS pelo menos três vezes (tubo e gel).

#### ***Técnica de aglutinação em tubo***

A técnica de hemaglutinação em tubo foi realizada de acordo com a padronização da American Association of Blood Banks (AABB, 2005) e a avaliação da intensidade de aglutinação seguiu os padrões descritos por (MARSH, 1972).

Em 1 tubo de vidro adicionou-se 50 µL de hemácias lavadas a 1 mL de solução salina 0,9%, para preparo de solução de hemácias a 4%. Adicionou-se 50 µL desta solução com 50 µL de soro reagente (*Gamma Biologicals Inc., Houston, TX, EUA*) em tubo de vidro. Os tubos foram incubados em banho-maria (*Quimis<sup>®</sup>*) a 37°C por 15 minutos e lavados por 3 vezes com solução salina 0,9%. Adicionou-se 50 µL de globulina anti-humana e centrifugou-se a 1.500 rpm por 1 minuto.

A aplicação de “scores”, na mensuração da aglutinação, é vantajosa pelo fato de substituir o uso de símbolos (cruzes) por números, tornando mais precisa a análise da intensidade de expressão antigênica. O gradiente de “scores” varia de 0 a 12, onde 0 é a reação negativa e o 12 a reação com aglutinação completa (**Tabela 4**)

### ***Crêterios para a leitura da aglutina o em tubo***

A aglutina o em tubo de Kahn necessita de uma discreta centrifuga o e de uma suave ressuspensão do “botão” de hemácias.

**Tabela 4:** Leitura da aglutina o em tubo (MARSH, 1972).

<b>Aparência macroscópica</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Score</b>
Um �nico aglutinado, nenhuma hemácia livre	4+	12
Grandes aglutinados	3+	10
Várias aglutina�es grandes, ausência de hemácias livres	2+	8
Pequenas aglutina�es, presença de hemácias livres	1+	5
Poucos aglutinados, presença de hemácias livres no fundo	+	3
Macroscopicamente negativo, aglutina�es microscópicas	(+)	2
Ausência de aglutina�o microscópica	0	0

### ***Técnica de aglutina o em gel***

Cartões constituídos por microtubos ou microcolunas contendo gel de Sephadex, meio de baixa força iônica e antiglobulina humana (*Cartão Gel LISS/Coombs, DiaMed-Latino América S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil*) foram utilizados como meio para realiza o da rea o de hemaglutina o. A técnica foi padronizada de acordo com instru es do fabricante e seguindo os padrões de mensura o definidos por LAPIERRE et al., 1990.

Soros anti-Fy<sup>a</sup>, anti-Fy<sup>b</sup>, anti-S e anti-s foram procedentes da *Gamma Biologicals Inc. (Houston, TX, EUA)* e após titulação diluídos nas concentrações 1:8, 1:2, 1:2, 1:16, respectivamente. Controles positivos com amostras homozigotos e heterozigotas para os antígenos e controles negativos foram realizados paralelamente. As amostras controles com presença dos antígenos citados apresentaram resultados da reação de hemaglutinação no gel e tubo com intensidade mínima de 3+ e “score” 10, segundo LAPIERRE et al. (1990) e MARSH, (1972), respectivamente.

Amostras de CH foram centrifugadas (3 vezes) a 1.500 rpm (*Centrífuga Excelsa Baby II, Modelo 206-R, Fanem*) com solução salina 0,9% por 3 minutos para lavagem das hemácias.

Em 1 tubo de vidro adicionou-se 10 µL das hemácias lavadas a 1 mL de solução diluente de baixa força iônica (*ID-Diluente 2 – DiaMed-Latino América S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil*), para preparo de suspensão de hemácias a 0,8%. Adicionou-se 50 µL desta suspensão juntamente com 25 µL de soro reagente (*Gamma Biologicals Inc., Houston, TX, EUA*) aos microtubos do cartão de hemaglutinação. Os cartões foram incubados (*DiaMed-ID<sup>TM</sup> Micro Typing System, Bedienungsanleitung – ID-Inkubator 37 SI, DiaMed AG, Schweiz*) a 37°C por 15 minutos e após a incubação foram centrifugados (*DiaMed-ID<sup>TM</sup> Micro Typing System, Bedienungsanleitung – ID-Zentrifugenkopf 12 S, DiaMed AG, Schweiz*) a 3.400 rpm por 10 minutos.

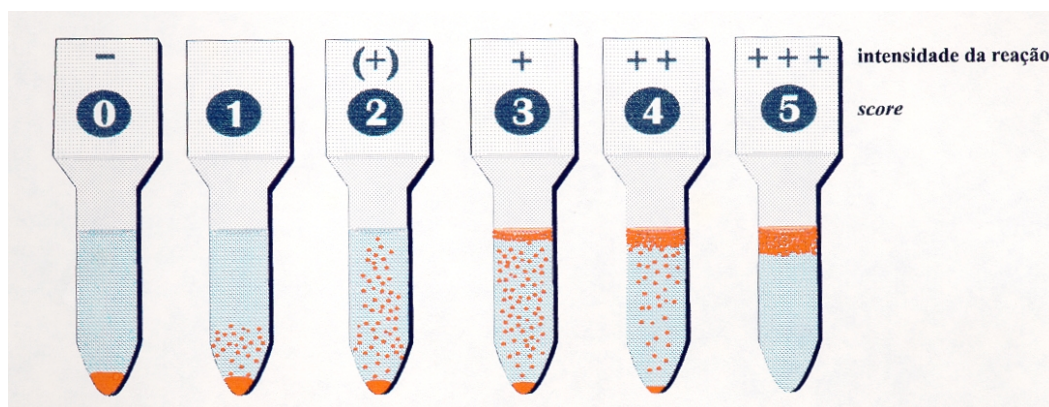
### ***Critérios para a Leitura do aglutinação em gel***

Os cartões foram avaliados macroscopicamente, posicionados contra pano de fundo, de cor branca, para identificação do padrão de aglutinação.

Os aglutinados foram separados das hemácias não aglutinadas pelo gel:

- em uma reação positiva as hemácias são retidas na parte superior do gel ou na superfície (Fig. 5– quinto e sexto tubos)
- em uma reação fracamente positiva, os aglutinados são distribuídos na suspensão do gel (Fig. 5 – segundo, terceiro e quarto tubos)
- um aglomerado de hemácias no fundo do microtubo com gel traduz uma reação negativa (Fig. 5 – primeiro tubo)

A leitura foi quantificada segundo a **Figura 5**.



**Figura 5:** Leitura do gel teste (LAPIERRE et al., 1990).

### 3.2.2 - IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

#### ***Preparação das hemácias para imunofenotipagem***

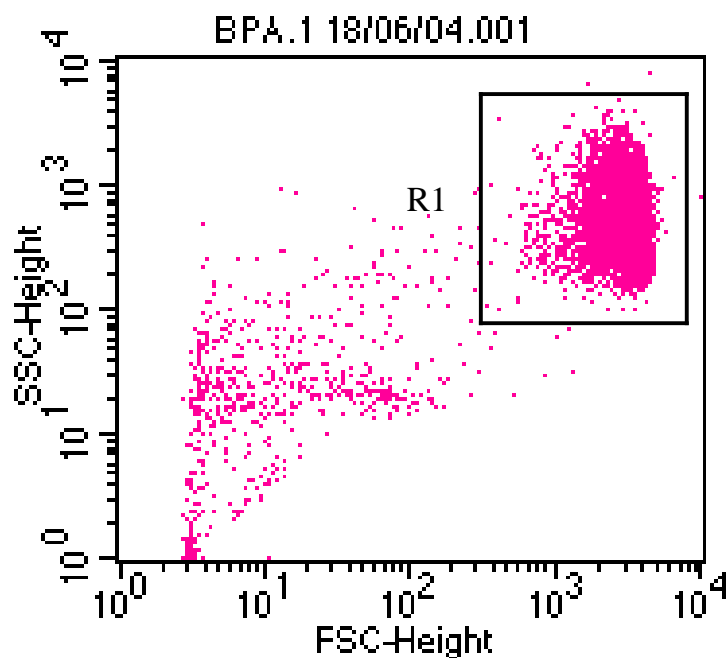
Para o início do experimento foi necessária a determinação da diluição mais adequada para o anticorpo secundário (1:50), obtendo a concentração saturada. Conseqüentemente, a intensidade de fluorescência das amostras pode ser relacionada com o número de ligações do anticorpo primário nas hemácias.

A técnica para marcação indireta de superfície dos antígenos eritrócitários foi a seguinte: 5 mL de CH foram lavadas com solução salina 0,9% e diluídas em concentração de  $1 \times 10^6$  de hemácias/mL. Foram incubadas 50  $\mu$ L da diluição de hemácia com 50  $\mu$ L de anticorpo primário específico para Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> e 80  $\mu$ L para S e s (*Gamma Biologicals Inc., Houston, TX, EUA*) por 20 minutos à 37°C em tubo Falcon poliestireno (*Becton Dickinson, New Jersey, EUA*). Após esta incubação, foram lavadas com 2 mL de solução salina 0,9% (três vezes) a 1.500 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado para o início da marcação com anticorpo secundário. 50  $\mu$ L de goat anti-humano IgG marcado com fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína) (*Jackson Immuno, West Grove, EUA*), diluído 1:50 em PBS 30% (tampão fosfato – 0,1% Azida, 0,1% BSA, pH = 7,4). Incubou-se por 20 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. Ressuspendeu-se em 2 mL de PBS e centrifugou-se a 1.500 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Ressuspendeu-se em 1 mL de PBS. Estando prontas para leitura no citômetro de fluxo. Foi utilizado como controle negativo hemácias não marcadas do próprio doador.

### **Aquisição e análise das hemácias por citometria de fluxo**

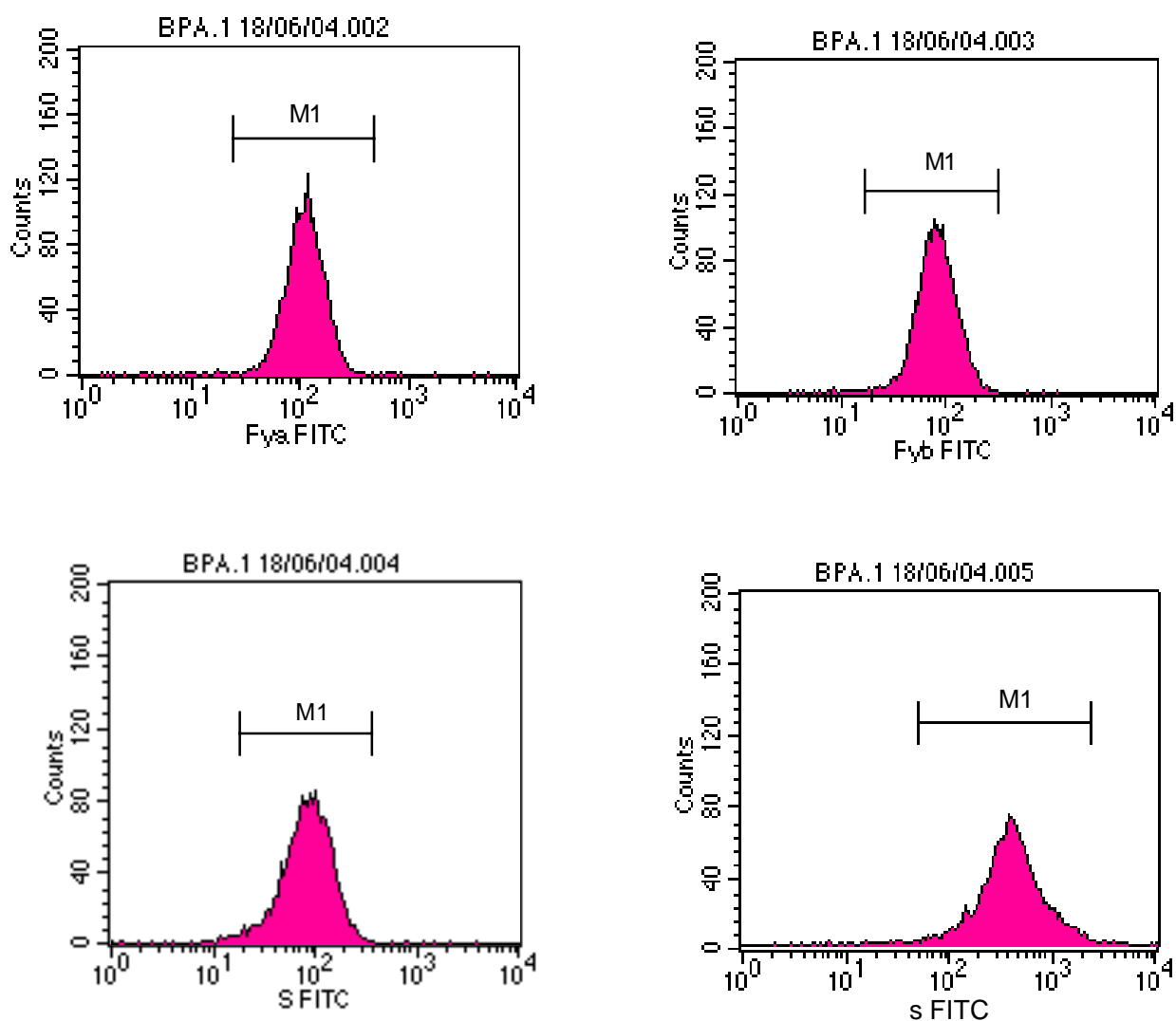
A aquisição das hemácias foi feita no citômetro de fluxo modelo *FACSCalibur™* (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) que foi calibrado com o kit *Calibrite™* beads (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) através do “software” *FACSCComp™* (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA). O programa usado para aquisição e análise dos dados foi o *CellQuest™* (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA).

As hemácias foram adquiridas utilizando-se parâmetros de dispersão frontal em escala logarítmica para FSC-H e SSC-H e a população foi identificada e então selecionada através de uma janela eletrônica (“gate”) (**Figura 6**).



**Figura 6:** Exemplo de um dot plot FSC-H x SSC-H com “gate” (R1) em hemácias.

A população de hemácias foi compensada, através dos detectores, amplificadores e da compensação das fluorescências, eliminando sobreposições. Foram adquiridas 10.000 células e para melhor análise dos resultados, os dados foram dispostos em histogramas e adotamos a intensidade de fluorescência (CMF) como parâmetro para o estudo estatístico da expressão antigênica (**Figura 7**).



**Figura 7:** Exemplo de histogramas dos antígenos  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ , S e s.

## **QIFIKIT™**

Foi utilizado o QIFIKIT™ (DakoCytomation Denmark A/S) para determinar o número de sítios antigênicos através da citometria de fluxo.

O QIFIKIT™ contém 5 populações de “beads” (diâmetro de 10 µm) cobertas com diferentes e definidas quantidades de anticorpos monoclonais (Mab). As “beads” imitam células com diferentes densidades antigênicas marcadas com Mab de camundongo, do tipo IgG.

As “beads” foram marcadas com anticorpos em concentrações saturadas. Conseqüentemente, a fluorescência está relacionada com a capacidade de ligação dos anticorpos em antígenos.

### **Técnica do QIFIKIT™**

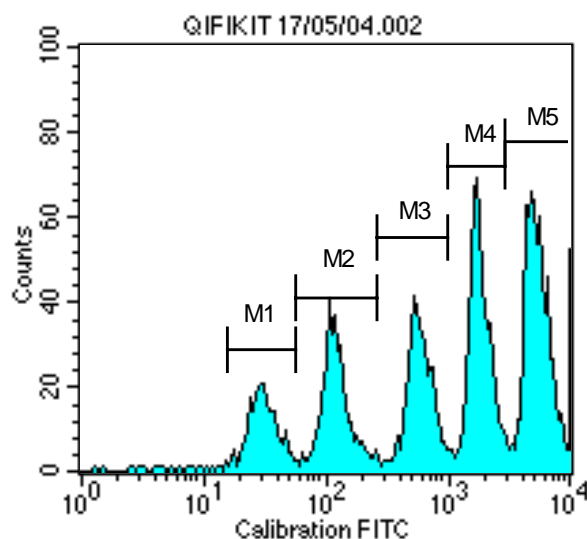
O kit é constituído por 3 itens:

- FRASCO 1 - *Set-Up Beads*: 2 populações de “beads”, uma sem marcação (A) e a outra com um alto número de Mab.
- FRASCO 2 - *Calibration Beads*: 5 populações de “beads” (B, C, D, E e F) marcadas com diferentes números de Mab. O número exato de MAb é fornecido pelo fabricante (**Tabela 5**).
- FRASCO 3 - *FITC Conjugate*: Fragmentos de FITC-Conjugado goat anti-mouse IgG F(ab')<sub>2</sub>



Em 1 tubo Falcon poliestireno foi colocado 100  $\mu$ L do FRASCO 1 e em outro tubo 100  $\mu$ L do FRASCO 2. Adicionou-se 3 mL de PBS-Azida (0,01 mol/L PBS, 0,1% BSA, 15mmol/L  $\text{NaN}_3$ , pH 7,4) e centrifugou-se a 1.725 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 100  $\mu$ L do FRASCO 3 (FITC diluído 1:50 em PBS Puro) e incubou-se por 45 minutos a 4°C protegido da luz. Foi acrescentado 2 mL de solução de lise (*FacsLysing<sup>TM</sup>*, *Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA*) e incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 1.725 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 3 mL de PBS-Azida e centrifugou-se novamente nas mesmas condições. Ressuspendeu-se a amostra em 500  $\mu$ L de PBS-Azida para aquisição no citômetro de fluxo.

Após a aquisição do kit e disposição dos dados em histogramas obtivemos um gráfico com a demonstração das 5 populações. **(Figura 8)**

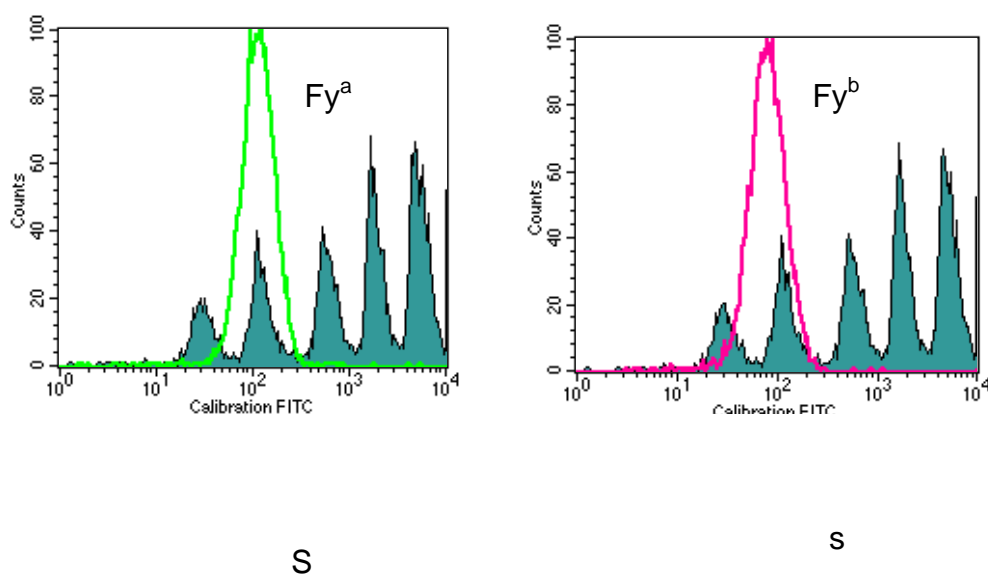


**Figura 8:** Histogramas das 5 populações de “beads”

**Tabela 5:** Número de Mab das populações de “beads” fornecido pelo fabricante (DakoCytomation) com o CMF correspondente obtido através da citometria de fluxo.

<b>Beads</b>	<b>Valores de Mab</b>	<b>CMF</b>
B	3100	30,14
C	14000	118,07
D	68000	563,05
E	207000	1726,19
F	623000	5088,55

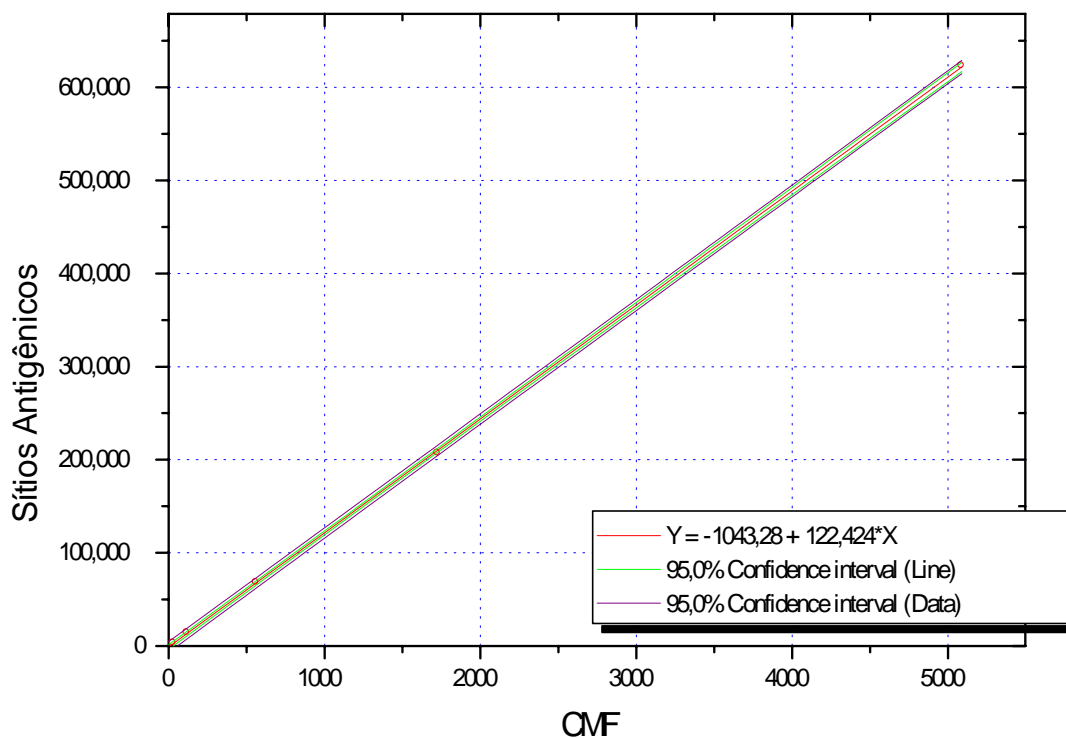
Para uma análise mais precisa foi realizada uma sobreposição dos histogramas do QIFIKIT™ e dos antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s (**Figura 9**) que permitiu a melhor visualização do pico de intensidade de fluorescência de cada antígeno.



**Figura 9:** Sobreposição dos histogramas do *QIFIKIT™* e dos antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s.

Foi realizada uma regressão linear com os valores de CMF, das 5 populações de ‘beads”, adquiridos através da citometria de fluxo (eixo x) e o número de sítios antigênicos, correspondentes, fornecidos pelo *QIFIKIT™* (eixo y) (**Tabela 5**). Com a regressão linear foi obtida uma fórmula para determinação do número de sítios antigênicos das amostras (**Figura 10**).

A fórmula para o cálculo obtida foi:  $Y = -1043,28 + 122,424 * X$ ; onde Y é o número de sítios antigênicos e X é o valor de CMF. Portanto, foi possível calcular o número de sítios antigênicos de cada antígeno.



**Figura 10:** Curva de calibração para determinação do número de sítios antigênicos.

### **Análise Estatística**

Foi utilizado o programa estatístico *WinStat Statistics for Windows (Kalmia Co. Inc.)*. Foi realizada a análise descritiva dos parâmetros obtidos. O efeito do tempo de armazenamento e leucodepleção sobre a intensidade de expressão dos antígenos foram analisados através da comparação das duas sub-unidades de CH em cada tempo de armazenamento. Para essa verificação foi aplicado o Teste T-Dependente.

# ***RESULTADOS***

A princípio foi realizado um estudo piloto com 18 unidades e notou-se não haver diferenças entre os resultados quando analisado a expressão dos antígenos (Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s) obtidos pelas técnicas de hemaglutinação em gel e tubo nos diferentes dias de armazenamento.

A análise dos resultados, deste estudo piloto, de hemaglutinação em tubo e aglutinação em gel, em nenhum dos casos, demonstrou influência da leucodepleção pré-armazenamento na expressão dos antígenos (Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s) durante o período de armazenamento. A expressão dos diferentes antígenos também permaneceu no mesmo padrão do grupo controle. Por esse motivo, a partir da unidade 19 de concentrado de hemácias não foram realizadas as técnicas de hemaglutinação em tubo e aglutinação em gel nos dias 14, 28 e 35 de armazenamento.

Em uma segunda fase, foi realizada apenas a técnica de aglutinação em gel no dia 1 de armazenamento, como triagem dos antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s. A citometria de fluxo foi realizada nos dias 1 e 35 de armazenamento totalizando 48 unidades de CH de doadores Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> e 49 unidades de CH de doadores S e s.

### ***Estudo da expressão dos antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s pela técnica de hemaglutinação em tubo***

No estudo piloto de 18 unidades de CH, a técnica de hemaglutinação em tubo mostrou durante o período de armazenamento resultados com medianas dos “scores” (MARSH, 1972) que variaram de 7 (várias aglutinações grandes) a 12 (um único aglutinado) para os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>. Somente em doadores heterozigotos, o antígeno Fy<sup>a</sup>, do grupo controle, no dia 1 apresentou “score” 5 (pequenas

aglutinações) e que não se manteve nos outros dias de análise. Os resultados obtidos pela técnica de hemaglutinação em tubo dos antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> estão representados na **Tabela 6**.

E para os antígenos S e s as medianas dos “scores” variaram de 8 (várias aglutinações grandes) a 10 (grandes aglutinados) durante o período de armazenamento. Os resultados obtidos pela técnica de hemaglutinação em tubo dos antígenos S e s estão representados na **Tabela 7**.

Em **Anexos** encontra-se a lista completa dos 18 doadores Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup> (**Anexo 2**), S e s (**Anexo 3**), do estudo piloto, com seus respectivos resultados da hemaglutinação em tubo.

**Tabela 6** Medianas dos “scores” de doadores heterozigotos e homozigotos para antígenos Fy<sup>a</sup> e/ou Fy<sup>b</sup> obtidas pela técnica de hemaglutinação em tubo durante o período de armazenamento.

Dias de armazenamento	1		14		28		35	
	C	D	C	D	C	D	C	D
n = 18 doadores	C	D	C	D	C	D	C	D
Hetero Fy <sup>a</sup> (8)	<b>8</b> (5 -10)	<b>10</b> (5 – 12)	<b>10</b> (5 – 12)	<b>9</b> (5 – 12)	<b>8</b> (5 -10)	<b>7</b> (5 -10)	<b>9</b> (5 -10)	<b>8</b> (5 -10)
Hetero Fy <sup>b</sup> (8)	<b>9</b> (5 – 12)	<b>10</b> (5 – 12)	<b>8</b> (5 – 12)	<b>8</b> (5 – 12)	<b>9</b> (5 – 12)	<b>9</b> (5 – 12)	<b>10</b> (5 – 12)	<b>8</b> (5 -10)
Homo Fy <sup>a</sup> (5)	<b>8</b> (8-8)	<b>8</b> (5-10)	<b>8</b> (5-10)	<b>5</b> (5-10)	<b>8</b> (8-8)	<b>10</b> (8-10)	<b>10</b> (5-10)	<b>8</b> (5-10)
Homo Fy <sup>b</sup> (5)	<b>12</b> (10-12)	<b>10</b> (10-12)	<b>10</b> (8-10)	<b>10</b> (8-12)	<b>12</b> (8-12)	<b>12</b> (10-12)	<b>10</b> (8-12)	<b>10</b> (10-12)

C = Bolsa Controle; D = Bolsa Leucodepletada



**Tabela 7:** Medianas dos “scores” de doadores heterozigotos e homozigotos para antígenos S e/ou s obtidas pela técnica de hemaglutinação em tubo durante o período de armazenamento.

Dias de armazenamento	1		14		28		35	
	C	D	C	D	C	D	C	D
n = 18 doadores	C	D	C	D	C	D	C	D
Hetero S (16)	<b>10</b> (5-12)	<b>10</b> (8-12)	<b>10</b> (5-12)	<b>10</b> (5-12)	<b>10</b> (5-12)	<b>10</b> (5-12)	<b>10</b> (5-12)	<b>10</b> (5-12)
Hetero s (16)	<b>10</b> (8-12)	<b>10</b> (5-12)	<b>10</b> (5-12)	<b>10</b> (5-12)	<b>9</b> (8-10)	<b>8</b> (5-10)	<b>9</b> (8-12)	<b>10</b> (8-12)
Homo S (1)	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>8</b>
Homo s (1)	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

C = Bolsa Controle; D = Bolsa Leucodepletada

### ***Estudo da expressão dos antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s pela técnica de aglutinação em gel***

Os resultados obtidos em 18 unidades de CH, do estudo piloto, pela técnica de aglutinação em gel para os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> durante o período de armazenamento estão representados na **Tabela 8**. Observamos que não houve diferença na leitura das 18 unidades de CH controle e leucodepletada. Em todos os dias de análise, o “score” 4 se manteve, segundo LAPIERRE et al. (1990).

E durante o período de armazenamento, foi observado para o antígeno S a mediana de “score” 3 e para o antígeno s “score” 5 (LAPIERRE et al., 1990). Os resultados obtidos pela técnica de aglutinação em gel para os antígenos S e s durante o período de armazenamento estão representados na **Tabela 9**.

Em **Anexos** encontra-se a lista completa dos 18 doadores Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup> (**Anexo 4**), S e s (**Anexo 5**), do estudo piloto, com seus respectivos resultados da aglutinação em gel.

**Tabela 8:** Medianas dos “scores” de doadores heterozigotos e homozigotos para antígeno Fy<sup>a</sup> e/ou Fy<sup>b</sup> obtidas pela técnica de aglutinação em gel durante o período de armazenamento.

Dias de armazenamento	1		14		28		35	
n = 18 doadores	C	D	C	D	C	D	C	D
Hetero Fy <sup>a</sup> (8)	4	4	4	4	4	4	4	4
	(3-4)	(3-4)			(3-4)	(3-4)		
Hetero Fy <sup>b</sup> (8)	4	4	4	4	4	4	4	4
	(3-5)	(3-5)	(4-5)			(4-5)	(3-5)	(4-5)
Homo Fy <sup>a</sup> (5)	4	4	4	4	4	4	4	4
			(3-4)	(3-4)				
Homo Fy <sup>b</sup> (5)	4	4	4	4	4	4	4	4
						(4-5)		

C = Bolsa Controle; D = Bolsa Leucodepletada

**Tabela 9:** Medianas dos “scores” de doadores heterozigotos e homozigotos para antígeno S e/ou s obtidas pela técnica de aglutinação em gel durante o período de armazenamento.

Dias de armazenamento	1		14		28		35	
n = 18 doadores	C	D	C	D	C	D	C	D
Hetero S (16)	3	3	3	3	3	3	3	3
	(3-4)	(2-4)	(2-4)	(2-4)	(2-3)	(2-4)	(2-3)	(2-4)
Hetero s (16)	5	5	5	5	5	5	5	5
	(4-5)	(2-5)	(4-5)	(4-5)	(4-5)	(4-5)	(3-5)	(4-5)
Homo S (1)	3	3	3	3	3	3	3	3
Homo s (1)	5	5	5	5	5	5	5	5

C = Bolsa Controle; D = Bolsa Leucodepletada

### ***Estudo da expressão dos antígenos $Fy^a$ , $Fy^b$ , S e s pela técnica de Citometria de fluxo***

Os resultados das medianas das intensidades de fluorescência para os antígenos  $Fy^a$  e/ou  $Fy^b$  obtidas pela técnica de citometria de fluxo nos dias 1 e 35 de armazenamento estão representados na **Tabela 10** e para os antígenos S e s na **Tabela 11**.

**Tabela 10:** Medianas das intensidades de fluorescência de doadores para antígenos Fy<sup>a</sup> e/ou Fy<sup>b</sup> obtidas pela técnica de citometria de fluxo nos dias 1 e 35 de armazenamento.

Dias de armazenamento	1		35		Análise estatística Teste T-Dependente	
	C	D	C	D	C	D
<b>Fy<sup>a</sup> (34)</b>	<b>101,23</b> (14,94 – 482,13)	<b>110,61</b> (10,67 – 410,67)	<b>113,93</b> (29,65 – 280,64)	<b>117,45</b> (29,86 – 320,39)	p = 0,53	p = 0,89
<b>Fy<sup>b</sup> (36)</b>	<b>67,77</b> (29,68 – 197,25)	<b>70,06</b> (30,32 – 174,73)	<b>69,57</b> (18,73 – 198,09)	<b>71,68</b> (20,66 – 168,16)	p = 0,82	P = 0,36

C = Bolsa Controle; D = Bolsa Leucodepletada;

Fy<sup>a</sup> → 12 aumentaram; 7 diminuíram; 7 iguais; 8 inconclusivos

Fy<sup>b</sup> → 9 aumentaram; 11 diminuíram; 15 iguais; 1 inconclusivo

**Tabela 11:** Medianas das intensidades de fluorescência de doadores para antígenos S e/ou s obtidas pela técnica de citometria de fluxo nos dias 1 e 35 de armazenamento.

Dias de armazenamento	1		35		Análise estatística Teste T-Dependente	
	C	D	C	D	C	D
<b>S (35)</b>	<b>77,88</b> (10,08 – 619,67)	<b>97,19</b> (9,4 – 1025,43)	<b>123,08</b> (16,51 – 633,40)	<b>123,67</b> (17,31 – 431,99)	p = 0,55	p = 0,37
<b>s (46)</b>	<b>948,16</b> (28,19 – 3250,38)	<b>1011,52</b> (27,55 – 3064,30)	<b>700,22</b> (74,23 – 2755,45)	<b>878,81</b> (22,00 – 2690,91)	p = 0,12	p = 0,15

C = Bolsa Controle; D = Bolsa Leucodepletada;

S → 9 aumentaram; 9 diminuíram; 8 iguais; 9 inconclusivos

s → 10 aumentaram; 22 diminuíram; 9 iguais; 5 inconclusivos

A aplicação do Teste T-dependente possibilitou a comparação da intensidade de fluorescência entre as bolsas controle e leucodepletada para análise do efeito da leucodepleção na expressão dos antígenos  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ , S e s nos dias 1 e 35 de armazenamento. Somente o antígeno  $Fy^a$  apresentou uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,02$ ) quando comparado no dia 35 de armazenamento. A **Tabela 12** demonstra o estudo estatístico do efeito da leucodepleção.

Em **Anexos** encontra-se a lista completa dos 48 doadores  $Fy^a$  (**Anexo 6**),  $Fy^b$  (**Anexo 7**) e dos 49 doadores S (**Anexo 8**) e s (**Anexo 9**), com seus respectivos resultados da citometria de fluxo dos dias 1 e 35 de armazenamento.

**Tabela 12:** Estudo estatístico através do Teste T-dependente do efeito da leucodepleção nos antígenos  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ , S e s nos dias 1 e 35 de armazenamento

	$Fy^a$ D 1	$Fy^b$ D 1	S D 1	s D 1	$Fy^a$ D 35	$Fy^b$ D 35	S D 35	s D 35
$Fy^a$ C 1	$p = 0,31$							
$Fy^b$ C 1		$p = 0,76$						
S C 1			$p = 0,23$					
s C 1				$p = 0,83$				
$Fy^a$ C 35					$p = 0,02$			
$Fy^b$ C 35						$p = 0,21$		
S C 35							$p = 0,41$	
s C 35								$p = 0,66$

C = Bolsa Controle; D = Bolsa Leucodepletada; 1 e 35 = Dias de armazenamento

### **Quantificação de sítios antigênicos através de kit de calibração**

Através da realização de uma regressão linear com dados do QIFIKIT™ (kit de calibração) foi obtida a fórmula  $Y = -1043,28 + 122,424 * X$ ; onde Y é o número de sítios antigênicos e X é o valor de CMF. Esta fórmula possibilitou a determinação do número de sítios antigênicos das amostras. As medianas dos resultados obtidos para os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> estão representados na **Tabela 13** e para os antígenos S e s na

#### **Tabela 14.**

Em **Anexos** encontra-se a lista completa do número de sítios dos doadores Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> (**Anexo 10**) e dos doadores S e s (**Anexo 11**) dos dias 1, 14, 28 e 35 de armazenamento.

**Tabela 13:** Medianas do número de sítios antigênicos de Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, nos dias 1 de armazenamento, obtidas através da fórmula do kit de calibração (QIFIKIT™).

	<b>Antígenos</b>	<b>1</b>
<b>Doadores Heterozigotos</b>	<b>Fy<sup>a</sup> (22)</b>	<b>11332,9</b> (524,35 – 26.918,4)
	<b>Fy<sup>b</sup> (22)</b>	<b>7204,7</b> (4.405,81 – 11988,1)
<b>Doadores Homozigotos</b>	<b>Fy<sup>a</sup> (12)</b>	<b>23436</b> (6931,42 – 53606,8)
	<b>Fy<sup>b</sup> (14)</b>	<b>7868,8</b> (2629,44 – 21726,4)
<b>TOTAL: 48 doadores</b>		

**Tabela 14:** Medianas do número de sítios antigênicos de S e s, nos dias 1 de armazenamento, obtidas através da fórmula do kit de calibração (QIFIKIT™).

Antígenos		1
Doadores Heterozigotos	S (32)	<b>10387,1</b> (149,13 – 68819,8)
	s (32)	<b>100589</b> (2368,68 - 282788)
Doadores Homozigotos	S (3)	<b>21122,2</b> (769,81 - 45356)
	s (14)	<b>214340</b> (40077,1 - 383749)
<b>TOTAL: 49 doadores</b>		

***Comparação da fenotipagem pela aglutinação em gel e os resultados da citometria de fluxo***

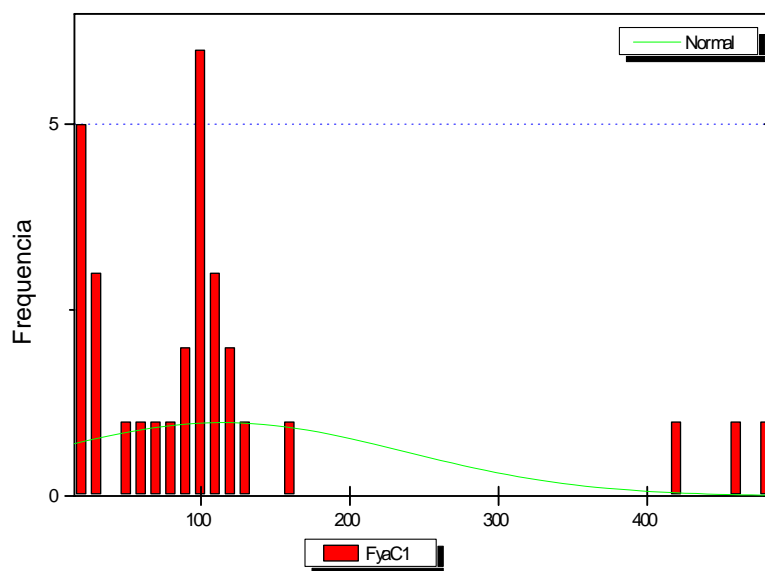
Devido à grande variação do número de sítios antigênicos que encontramos pela citometria de fluxo e a relativa uniformidade dos resultados obtidos em hemaglutinação em tubo e aglutinação em gel, analisamos a distribuição dos IMFs para cada antígeno. Para tanto, avaliamos 33 doadores S e s e 30 doadores Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>.

Para o antígeno Fy<sup>a</sup> notamos na **Figura 11** que houve um grupo de casos com distribuição Gaussiana com pico ao redor de 100 (doadores heterozigotos). Além disso, houve casos de CMF muito baixo ou muito alto. Estes extremos corresponderiam aos homozigotos Fy<sup>a</sup> (CMF mais alto) e Fy<sup>b</sup> (CMF muito baixo).

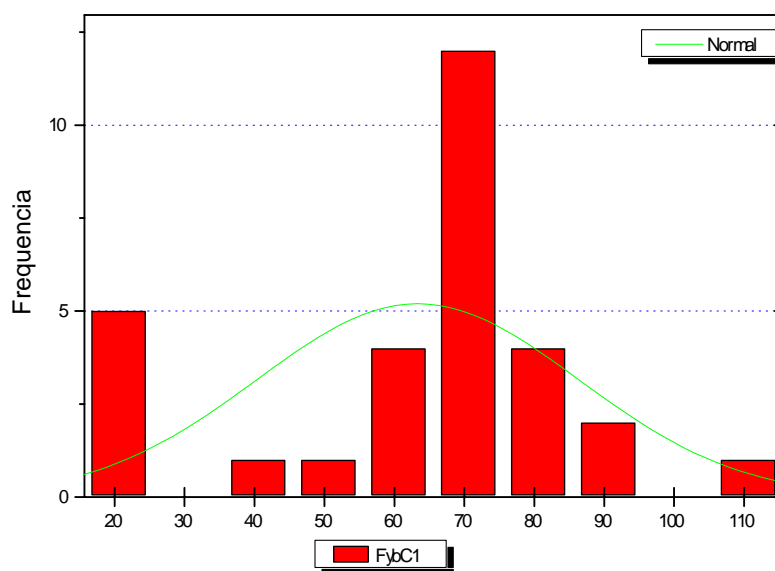
Em relação ao antígeno Fy<sup>b</sup>, obtivemos efeito semelhante, mas menos pronunciado (**Figura 12**).

As medianas de CMFs destes doadores Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup> estão representadas na **Tabela 15**.

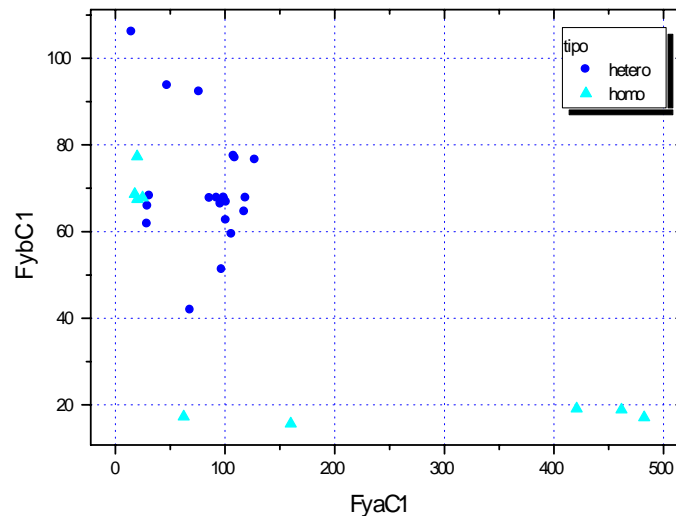




**Figura 11:** Histograma representando a frequência do CMF do antígeno Fy<sup>a</sup>.



**Figura 12:** Histograma representando a frequência do CMF do antígeno Fy<sup>b</sup>.



**Figura 13:** Dispersão dos doadores heterozigotos e homozigotos para os antígenos  $Fy^a$  e  $Fy^b$ .

**Tabela 15:** Medianas de CMF de doadores heterozigotos e homozigotos para antígeno  $Fy^a$  e/ou  $Fy^b$  obtidas pela técnica de citometria de fluxo no dia 1 de armazenamento.

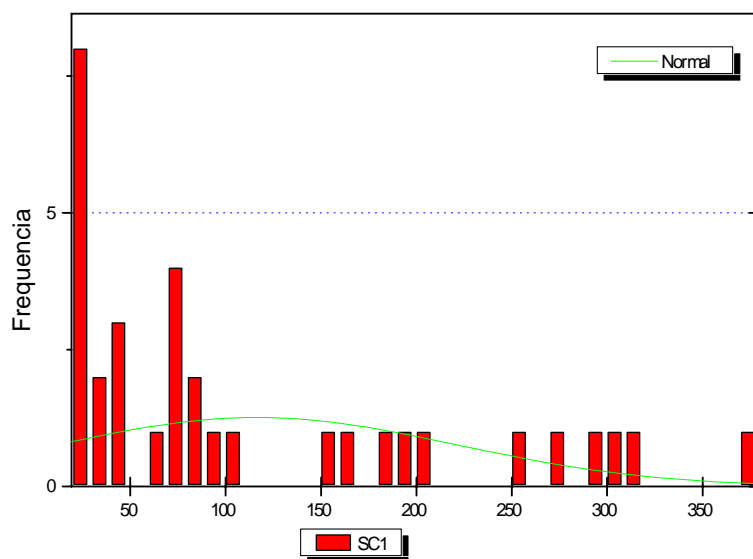
	Antígeno	Mediana CMF
<b>Doadores Heterozigotos</b>	<b><math>Fy^a</math> (21)</b>	<b>97,21</b> (14,94 – 127,28)
	<b><math>Fy^b</math> (21)</b>	<b>67,67</b> (41,93 – 106,11)
<b>Doadores Homozigotos</b>	<b><math>Fy^a</math> (5)</b>	<b>420,76</b> (62,30 – 482,13)
	<b><math>Fy^b</math> (4)</b>	<b>68,22</b> (67,46 – 77,34)
<b>TOTAL: 30 doadores</b>		

As medianas de CMFs dos doadores S e s, deste estudo piloto, estão representadas na **Tabela 16**.

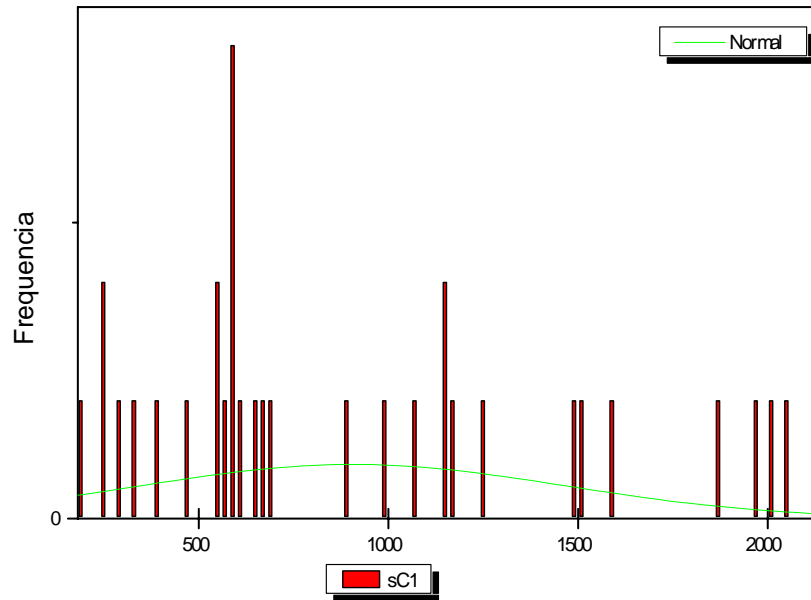
Fizemos o mesmo processo em relação aos antígenos S e s (**Figuras 14-16**).

**Tabela 16:** Medianas de CMF de doadores heterozigotos e homozigotos para antígeno S e/ou s obtidas pela técnica de citometria de fluxo no dia 1 de armazenamento.

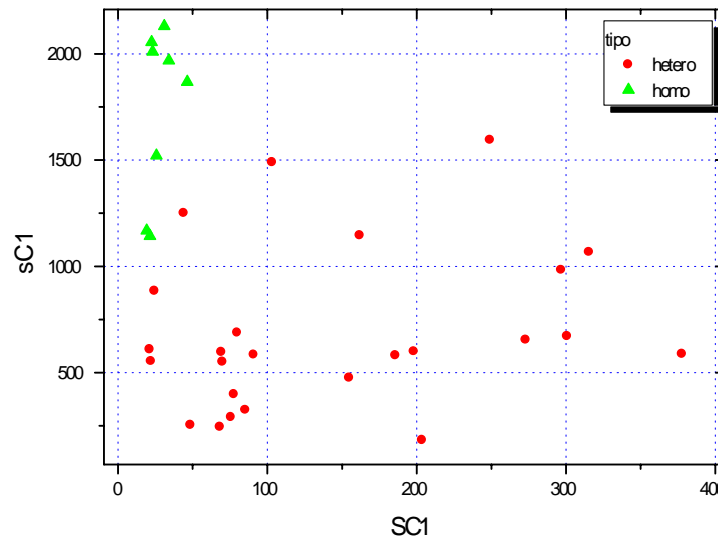
	Antígeno	Mediana CMF
<b>Doadores Heterozigotos</b>	<b>S (25)</b>	<b>91,02</b> (21,38 – 377,70)
	<b>s (25)</b>	<b>595,58</b> (181,05 – 1592,96)
<b>Doadores Homozigotos</b>	<b>s (8)</b>	<b>1917,54</b> (1141,70 – 2129,69)
<b>TOTAL: 33 doadores</b>		



**Figura 14:** Histograma representando a frequência do CMF do antígeno S.



**Figura 15:** Histograma representando a frequência do CMF do antígeno s.



**Figura 16:** Dispersão dos doadores heterozigotos e homozigotos para os antígenos S e s.

Em **Anexos** encontra-se a lista completa dos 30 doadores  $Fy^a$ ,  $Fy^b$  (**Anexo 12**) e dos 33 doadores S e s (**Anexo 13**), do estudo de comparação da fenotipagem pela aglutinação em gel e citometria de fluxo, com seus respectivos resultados da citometria de fluxo.

# ***DISCUSSÃO***

Os anticorpos anti-Fy<sup>a</sup>, anti-Fy<sup>b</sup>, anti-S e anti-s podem ser responsáveis por reações transfusionais hemolíticas tardias (PINEDA et al., 1978; ROSENFELD et al., 1950). O risco de um paciente politransfundido ter reações transfusionais é muito maior que o paciente transfundido esporadicamente, devido ao número maior de exposições aos antígenos imunogênicos.

SNYDER e colaboradores (1983) estudaram a estabilidade de alguns antígenos eritrocitários (A, B, c, D, K, Lea, Fy<sup>a</sup>, M e P1) durante armazenamento prolongado em CPD (citrato, fosfato, dextrose) e ADSOL (adenina, cloreto de sódio e manitol) (56 dias) e a reatividade destes antígenos foi mantida adequadamente. E MYHRE et al. (1984) publicaram que os antígenos Lewis e P durante o armazenamento tiveram uma pequena diminuição de reatividade detectado em testes de hemaglutinação. Devido a literatura escassa, resolvemos estudar a alteração da expressão dos antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s. Essa possível diferença na densidade antigênica é importante na produção de reagentes eritrocitários utilizados na investigação da prática transfusional.

No presente trabalho, a citometria de fluxo foi escolhida para a determinação de densidade antigênica devido a algumas vantagens. A citometria de fluxo consiste no processo mediante o qual células em suspensão conseguem passar uma a uma por uma região de medição, permitindo uma análise rápida, quantitativa e multiparamétrica, como tamanho, granularidade e intensidade de fluorescência. Portanto, uma técnica de alta sensibilidade e precisão. Além disso, a marcação indireta permite um aumento na sensibilidade de ligação do anticorpo secundário ao antígeno, devido ao tempo prolongado de incubação. E a mensuração de densidade

antigênica por citometria de fluxo depende da suposição que a intensidade de fluorescência é proporcional à densidade antigênica e que a concentração do anticorpo secundário esteja saturada.

Os nossos resultados de hemaglutinação em tubo, do estudo piloto de 18 unidades, para os antígenos  $Fy^a$  e  $Fy^b$  variaram de 5 a 10 (“scores”), que representam uma aglutinação de moderada para forte intensidade. Para os antígenos S e s os “scores” variaram de 8 a 10, que também demonstra uma reação forte.

Pela técnica da aglutinação em gel foi possível obter forte reatividade nas 18 unidades avaliadas para os antígenos  $Fy^a$  e  $Fy^b$ . Por outro lado, para o antígeno S foi obtida uma média intensidade de reação, representada pelo “score” 3 e para o s um “score” 5, que demonstra reação de moderada intensidade.

A citometria de fluxo permitiu a visualização do aumento da expressão apenas do antígeno  $Fy^a$ , quando comparamos o grupo controle com o leucodepletado no dia 35 de armazenamento ( $p = 0,02$ ). Este resultado não foi observado nos outros antígenos durante o período de armazenamento. A análise da expressão dos antígenos S e s pela citometria de fluxo não demonstrou diferenças estatísticas durante o período de armazenamento. Quando analisamos todos os casos juntos não obtivemos diferença significativa de expressão após 35 dias de armazenamento. Para o antígeno  $Fy^a$  encontramos  $p = 0,53$  no grupo controle e  $p = 0,89$  no grupo leucodepletado; para o  $Fy^b$   $p = 0,82$  no grupo controle e  $p = 0,36$  no leucodepletado; para S  $p = 0,55$  no controle e  $p = 0,37$  no leucodepletado; e para o antígeno s  $p = 0,12$  no grupo controle e  $p = 0,15$  no grupo leucodepletado. As hipóteses descritas



na literatura não foram confirmadas quando analisamos os resultados através da citometria de fluxo.

Com as técnicas de hemaglutinação em tubo e aglutinação em gel foi possível confirmar a reatividade, mas não a alteração de expressão dos antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s durante o período de armazenamento. A citometria de fluxo se trata de um teste mais sensível e quantitativo, pois pudemos avaliar que há uma grande variabilidade de densidade dos antígenos na membrana das hemácias.

Não há relatos na literatura sobre a quantificação de antígenos durante o período de armazenamento através da citometria de fluxo. MASOURIDES e colaboradores (1980) utilizaram marcação por imunoferritina e microscopia eletrônica para quantificar o número de sítios antigênicos (Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a,U</sup> e Di<sup>b</sup>) em hemácias. Os resultados deste estudo foram de 6.900 sítios/célula para o antígeno Fy<sup>a</sup> (doadores heterozigotos) e 13.300 para doadores homozigotos. E para o antígeno Fy<sup>b</sup> (doadores homozigotos) 13.300 sítios/célula.

Em nosso trabalho, quantificamos o número de sítios antigênicos através da citometria de fluxo, especificamente para antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s, utilizando um sistema de calibração (*QIFIKIT<sup>TM</sup>*). Este kit é válido para qualquer anticorpo secundário utilizado e uma curva de calibração é suficiente para todo o experimento. O antígeno Fy<sup>a</sup> (doadores heterozigotos) apresentou 11.300 a 13.000 sítios/célula e em doadores homozigotos 13.000 a 23.000 sítios/célula. Para o antígeno Fy<sup>b</sup> (doadores heterozigotos) 7.200 a 7.400 sítios e para doadores homozigotos 7.800 a 10.400 sítios. Os resultados de densidade antigênica diferem dos descritos por MASOURIDES e colaboradores (1980), provavelmente pelo fato dos autores terem

utilizado uma técnica de menor sensibilidade e a quantificação em um número limitado de células. A citometria de fluxo nos permitiu a análise de 10.000 eventos por amostra, tornando os resultados mais confiáveis.

Os antígenos S e s são carregados por glicoforinas B (GPB), que são proteínas intrínsecas de membrana eritrocitária. Não encontramos estudos na literatura que demonstrem o número de sítios destes antígenos e sim quantificação de GPB, impossibilitando uma comparação adequada e confiável. DAHR (1981) mensurou a quantidade de GPB em hemácias usando coloração PAS (periodic acid Schiff) e leitura colorimétrica. Através desta técnica o autor encontrou aproximadamente 1.5 vezes mais GPB em indivíduos homozigotos para SS que em indivíduos homozigotos ss e, uma quantidade intermediária no fenótipo Ss. ISLA et al. (2003) estimou através de citometria de fluxo que existem 21.000 a 114.000 cópias de GPB por hemácia. Os nossos resultados para o antígeno S, em doadores heterozigotos, foram de 8.400 a 14.000 sítios/hemácia e em doadores homozigotos 75.400 a 98.000 sítios. E para o antígeno s (doadores heterozigotos) 19.000 a 49.000 sítios/hemácia e em doadores homozigotos 138.000 a 220.000 sítios. DAHR (1981) mediu a porção hidrocarboneto da GPB e nosso presente estudo a parte protéica dos antígenos S e s, portanto não houve possibilidade de comparações entre as quantificações.

Durante o armazenamento, pode ocorrer degranulação, fragmentação ou apoptose dos leucócitos com liberação de produtos que podem promover reações febris transfusionais. Estudos sugerem que a remoção de leucócitos seja realizada nas primeiras 24 horas de armazenamento, antes que a lise das células proporcione

a liberação de enzimas que possam interferir na apresentação do antígeno na membrana da hemácia (BUCHHOLZ et al., 1994; HEDDLE & KELTON, 2001). Não se sabe exatamente qual é a ação destes produtos liberados pelos leucócitos sobre os antígenos eritrocitários e se propiciam maior exposição destes antígenos durante o período de armazenamento. Não encontramos alteração da expressão dos antígenos durante o período de armazenamento após a leucodepleção. Comparamos a bolsa controle com a leucodepletada no dia 1 e depois no dia 35 de armazenamento de todos os antígenos em questão. Somente o antígeno Fy<sup>a</sup> apresentou aumento de expressão ( $p = 0,02$ ) da bolsa controle com a leucodepletada no dia 35 de armazenamento. Talvez no final do período de armazenamento houve alterações na membrana eritrocitária, causadas por fatores ainda desconhecidos, que expôs a glicoproteína Duffy, permitindo maior marcação do anticorpo secundário e conseqüentemente, aumento da intensidade de fluorescência.

Sugerimos um novo estudo, com uma casuística maior, para realização de fenotipagem através da citometria de fluxo e genotipagem através de técnicas de biologia molecular para confirmação destes achados.

# ***CONCLUSÕES***

---

1. Pelas técnicas usadas, não detectamos alteração significativa na densidade dos antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s na superfície das hemácias durante o período de armazenamento (35 dias) nas condições usuais de armazenamento em Banco de Sangue.
2. Por estas mesmas técnicas, não conseguimos detectar alteração significativa na densidade dos antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s na superfície das hemácias leucodepletadas nos dias 1 e 35 de armazenamento em relação ao CH controle.
3. O antígeno Fy<sup>a</sup> apresentou aumento de intensidade de fluorescência após 35 dias de armazenamento quando comparados grupo controle e leucodepletado.
4. A técnica da citometria de fluxo permitiu estimar o número de sítios antigênicos para Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s a partir da intensidade de fluorescência usando um sistema de calibração que consiste em partículas padrões com número de sítios conhecidos.
5. A citometria de fluxo demonstrou ser uma técnica sensível e capaz de detectar alterações não perceptíveis com os outros métodos. Foi mais reprodutível, estável e adequada para os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> que para os antígenos S e s. Isto talvez seja devido às características dos soros anti-S e anti-s disponíveis comercialmente.
6. A importância do estudo da expressão antigênica durante o período de armazenamento e a estimativa do número de sítios antigênicos está relacionada ao controle de qualidade e validade de reagentes eritrocitários utilizados na prática transfusional.

# ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

ALGORA, M.; BARBOLLA, L.; CONTRERAS, M. Naturally occurring anti-D, anti-K, anti-Fy(a), and anti-Le(ab). **Vox Sang**, 61: 141, 1991.

BADAKERE, S.S.; BHATIA, H. M.; SHARMA, R. S.; BHARUCHA, Z. Anti-Fy<sup>b</sup> (Duffy) as a cause of transfusion reaction. Case report. **Indian J Med Sci**, 24: 565-7, 1970.

BAKER, J.B.; GREWAR, D.; LEWIS, M.; AYUKAWA, H.; CHOWN, B. Haemolytic disease of the newborn due to anti-Duffy (Fy<sup>a</sup>). **Arch Dis Child**, 31: 298-9, 1956.

BEATTIE, K.M. The Duffy Blood Group System. In PIERCE, S.R.; MACPHERSON, C. R. (eds): *Blood Group Systems: Duffy, Kidd and Lutheran*. Arlington, VA: **American Association of Blood Banks**, 1-25, 1988.

BLACK, F.L.; SALZANO, F.M.; LAYRISSE, Z.; FRANCO, M.H.L.P.; HARRIS, N.S.; WEIMER, T.A. Restriction and persistence of polymorphisms of HLA and other blood genetic traits in the Parakanã Indians of Brazil. **Am J Phys Anthropol**, 52: 119-132, 1980.

BORDIN, J.O.; BARDOSSY, L.; BLAJCHMAN, M.A. Growth enhancement of established tumors by allogeneic blood transfusion in experimental animals and its amelioration by leukodepletion: the importance of the timing of the leukodepletion. **Blood**, 84: 344-8, 1994.

BRUIL, A.; BEUGELING, T.; FEIJEN, J.; VAN AKEN, W.G. The mechanisms of leukocyte removal by filtration. **Transfus Med Rev**, 9: 145-66, 1995.

BUCHHOLZ, D.H.; AUBUCHON, J.P.; SNYDER, E.L.; KANDLER, R.; PISCITELLI, V.; PICKARD, C.; NAPYCHANK, P.; EDBERG, S. Effects of white cell reduction on

the resistance of blood components to bacterial multiplication. **Transfusion**, 34: 852-7, 1994.

CASTILHO, L.; RIOS, M.; PELLEGRINO Jr., J; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F.; REID, M.E. A novel FY allele in Brazilians. **Vox Sang**, 87: 190-5, 2004.

CHAUDHURI, A.;POLYAKOVA, J.;ZBRZEZNA, V.;WILLIAMS, K.;GULATI, S.;POGO, A.O. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90: 10793-7, 1993.

CHOWN, B.; LEWIS, M.; KAITA, H. The Duffy Blood Group System in Caucasians: Evidence for a New Allele. **Am J Hum Genet**, 17: 384-9, 1965.

CUTBUSH, M.; MOLLISON, P. L.; PARKIN, D. M. A new human blood group. **Nature**, 165: 188-9, 1950.

DAHR, W. Serology, genetics and chemistry of the MNSs blood group system. **Rev Franc Transf Immunohematol**, 24: 85-95, 1981.

DANIELS, G.L.;FLETCHER, A.;GARRATTY, G.;HENRY, S.;JORGENSEN, J.;JUDD, W.J.;LEVENE, C.;LOMAS-FRANCIS, C.;MOULDS, J.J.;MOULDS, J.M.;MOULDS, M.;OVERBEEKE, M.;REID, M.E.;ROUGER, P.;SCOTT, M.;SISTONEN, P.;SMART, E.;TANI, Y.;WENDEL, S.;ZELINSKI, T. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. **Vox Sang**, 87: 304-16, 2004.



DONAHUE, R.P.;BIAS, W.B.;RENEWICK, J.H.;MCKUSICK, V.A. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 61: 949-55, 1968.

FREIESLEBEN, E.; Fatal hemolytic transfusion reaction due to anti-Fya ('Duffy'). **Acta Path Microbiol Scand**, 29: 283-6, 1951.

GIBLETT, E.R.; HILLMAN, R.S.; BROOKS, L.E. Transfusion reaction during marrow suppression in a thalassemic patient with a blood group anomaly and an unusual cold agglutinin. **Vox Sang**, 10: 448-59, 1965.

GOLDMAN, M.;DELAGE, G. The role of leukodepletion in the control of transfusion-transmitted disease. **Transfus Med Rev**, 9: 9-19, 1995.

GOODRICK, M.J.; HADLEY, A. G.; POOLE, G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fya and the potencial clinical value of Duffy genotyping in pregnancies at risk. **Transfusion Med**, 7: 301-4, 1997.

GORLIN, J. B., ed. **Standards for blood banks and transfusion services**. 21 st ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2002.

GREENWALT, T. J.; SASAKI, T.; SANGER, R.; SNEATH, J.; RACE, R. R. An allele of the S (s) blood group genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 40: 1126-9, 1954.

GREENWALT, T.J.; SASAKI, T.; GAJEWSKI, M. Further examples of haemolytic disease of the newborn due to anti-Duffy (anti-Fy<sup>a</sup>). **Vox Sang**, 4: 138-43, 1959.

HARDMAN, J.T.; BECK, M.L. Hemagglutination in capillaries: correlation with blood group specificity and IgG subclass. **Transfusion**, 21: 343-6, 1981.

HEDDLE, N. M.; KELTON, J. G. **Febrile nonhemolytic transfusion reactions.** 2<sup>nd</sup> ed. Bethesda, MD: AABB Press, 45-82, 2001.

HITZEROTH, H.W.; BENDER, K.; BURCKHARDT, K. South African Negroes: serogenetic polymorphisms (ABO, Rhesus, MNS, Duffy and Kell) and inter-ethnic genetic distances. **Acta Anthropogenet**, 6: 171-93, 1982.

HUANG, C. -H., BLUMENFELD, O. O. MNSs blood groups and major glycoporphins. In: CARTRON, J. -P.; ROUGER, P. **Molecular basis of major human blood group antigens.** New York: Plenum Press, 153-83, 1995.

IKIN, E.W.; MOURANT, A.E.; PETTENKOFER, H.J.; BLUMENTHAL, G. Discovery of the expected haemagglutinin, anti-Fyb. **Nature**, 168: 1077-8, 1951.

ISLA, N.G.;RIQUELME, B.D.; RASIA, R.J.; VALVERDE, J.R.; STOLTZ, J.F. Quantification of glycophorin A and glycophorin B on normal human RBCs by flow cytometry. **Transfusion**, 43:1145-52, 2003.

JUDSON, P.A.; ANSTEE, D.J. Comparative effect of trypsin and chymotrypsin on blood group antigens. **Med Lab Sci**, 34: 1-6, 1 977.

LANGHI Jr, D.M. **Estudo do sistema de grupo sanguíneo Duffy em habitantes de região endêmica para malária e doadores de sangue.** São Paulo, 2004 (Tese - Doutorado - Universidade Federal de São Paulo).

LAPIERRE, Y.; RIGAL, D.; ADAM, J.; JOSEF, D.; MEYER, F.; GREBER, S.; DROT, C. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. **Transfusion**, 30: 109-13, 1990.

LEVINE, P.; KUHMICHEL, A. B.; WIGOD, M.; KOCH, E. A new blood factor, s, allelic to S. **Proc Soc Exp Biol NY**, 78: 218-20, 1951.

MALLINSON, G.; SOO, K.S.; SCHALL, T. J.; PISACKA, M.; ANSTEE, D.J. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup> antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. **Br J Haematol**, 90: 823-9, 1995.

MARSH, W.L. Scoring of hemagglutination reactions. **Transfusion**, 12: 352-3, 1972.

MARSH, W.L. Present status of the Duffy blood group system. **CRC Crit Clin Rev Lab Sci**, 5: 387-412, 1975.

MASOUREDIS, S.P.;SUDORA, E.;MAHAN, L.;VICTORIA, E.J. Quantitative immunoferritin microscopy of Fya, Fyb, Jka, U, and Dib antigen site numbers on human red cells. **Blood**, 56: 969-77, 1980.

MILLER, L.H.; MASON, S.J.; CLYDE, D.F.; MCGINNISS, M.H. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **N Engl J Med**, 295: 302-4, 1976.

MILLER, L.H.; MASON, S.J.; DVORAK, J.A.; MCGINNISS, M.H.;ROTHMAN, I.K. Erythrocyte receptors for (Plasmodium knowlesi) malaria: Duffy blood group determinants. **Science**, 189: 561-3, 1975.

MOLLISON, P.L.; ENGELFRIET, C.P.; CONTRERAS, M. **Blood transfusion in clinical medicine**. 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell, 1983.

MORAES-SOUZA, H.; BORDIN, J.O.; BARDOSSY, L.; MACPHERSON, D.W.; BLAJCHMAN, M.A. Prevention of transfusion-associated Chagas' disease: efficacy of white cell-reduction filters in removing *Trypanosoma cruzi* from infected blood. **Transfusion**, 35: 723-6, 1995.

MORTON, J.A. Some observations on the action of blood-group antibodies on red cells treated with proteolytic enzymes. **Br J Haematol**, 8: 134-48, 1962.

MOURANT, A.E.; KOPEC, A.C.; DOMANIEWSKA-SOBCZAK, K. **Distribution of Human Blood Groups and Other Polymorphisms**. 2<sup>th</sup>ed. Oxford University Press: London, 1976.

MYHRE, B.A.; DEMANIEW, S.; NELSON, E.J. Preservation of red cell antigens during storage of blood with different anticoagulants. **Transfusion**, 24: 499-501, 1984.

ORIOLE, R. ABH and related tissue antigens. **Biochem Soc Trans**, 15: 596-9, 1987.

PINEDA, A.A.; TASWELL, H.F.; BRZICA, S.M., JR. Transfusion reaction. An immunologic hazard of blood transfusion. **Transfusion**, 18: 1-7, 1978.

RACE, R. R.; SANGER, R. **Blood groups in man**. 6<sup>th</sup>ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.

RACE, R.R.; SANGER, R.; LEHANE, D. Quantitative aspects of the blood-group antigen Fy<sup>a</sup>. **Ann Eugen**, 17: 255-66, 1953.

REID, M. E.; LOOMIS-FRANCIS, C. **The blood group antigen factsbook**. London: Academic Press, 1997.

RESOLUÇÃO da Diretoria Colegiada – RDC n: 153, de 14 de junho de 2004 – **Diário Oficial da União** – DOU de 24 de junho de 2004.

ROSENFELD, R.E.; VOGEL, P.; RACE, R.R. [A new case of anti-Fya in human serum.]. **Rev Hematol**, 5: 315-7, 1950.

SALMON, C.; CARTRON, J. P.; ROUGER, P. The human Blood Groups. New York: **Masson**, 249-55, 1984.

SALZANO, F.M.; NEEL, J.V.; GERSHOWITZ, H.; MIGLIAZZA, E.C. Intra and intertribal genetic variation a linguistic group: the Ge-speaking indians of Brazil. **Am J Phys Anthropol**, 47(2): 337-47, 1977.

SANGER, R.; RACE, R.R.; JACK, J. The Duffy blood groups of New York negroes: the phenotype Fy (a-b-). **Br J Haematol**, 1: 370-4, 1955.

SNYDER, E. L.; HEZZEY, A.; JOYNER, R. et al. Stability of red cell antigens during prolonged storage in citrate-phosphate-dextrose and a new preservative solution. **Transfusion**, 23: 165-6, 1983.

SZABO, M.C.; SOO, K.S.; ZLOTNIK, A.; SCHALL, T.J. Chemokine class differences in binding to the Duffy antigen-erythrocyte chemokine receptor. **J Biol Chem**, 270: 25348-51, 1995.

SZYMANSKI, I.O.; HUFF, S.R.; DELSIGNORE, R. An autoanalyzer test to determine immunoglobulin class and IgG subclass of blood group antibodies. **Transfusion**, 22: 90-5, 1982.

Technical Manual AABB. 16<sup>th</sup> ed. **American Association of Blood Banks.** Bethesda, Maryland, 2005.

TOURNAMILLE,C.; COLIN, Y.; CARTRON, J.P.; LE VAN KIM, C. Disruption of a GATA motif in the *Duffy* gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nat Genet**, 10: 224-8, 1995.

UBIALI, E. M. A. **Estudo comparativo entre genótipo e o fenótipo do sistema sanguíneo Duffy em populações de brancos, negros e asiáticos.** Ribeirão Preto, 2003 (Dissertação - Mestrado - Universidade de São Paulo).

VETTER, O.; WEGNER, H. A further case of anti-Fyb and the frequency of Duffy-antigens in the population of the city of Leipzig. **Acta Genet**, 17: 338-40, 1967.

WALSH, R. J.; MONTGOMERY, C. M. A new human isoagglutinin subdividing the MNS blood groups. **Nature**, 160: 504-6, 1947.

WARD, R.H.; GERSHOWITZ, H.; LAYRISSE,M.; NEEL, J.V. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. XI. Gene frequencies for 10 blood groups and the ABH-Le secretor traits in the Yanomama and their neighbors; The uniqueness of the tribe. **Am J Hum Genet**, 27: 1-30, 1975.

WATKINS, W.M. Biochemistry and Genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. **Adv Hum Genet**, 10: 1-136, 379-85, 1980.

WEINSTEIN, L.; TAYLOR, E. S. Hemolytic disease of neonate secondary to anti-Fy(a). **Am J Obstet Gynecol**, 121: 643-5, 1975.

WIENER, A.S.; UNGER, L.J.; COHEN, L. Distribution and heredity of blood factor U. **Science**, 119: 734-5, 1954.

YAZDANBAKHSI, K.; RIOS, M.; STORRY, J.R.; KOSOWER, N.; PARASOL, N.; CHAUDHURI, A.; REID, M.E. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. **Transfusion**, 40: 310-320, 2000.

***ANEXOS***



## **Anexo 1: Termo de consentimento pós-informado**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO PARA O ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s EM CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS ARMAZENADOS PARA FINS TRANSFUSIONAIS**

Pesquisa: Estudo da expressão dos antígenos eritrocitários Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s em concentrados de hemácias armazenados para fins transfusionais.

Pesquisador (a): Soraia Buchignani.

#### **MAIOR DE IDADE**

Eu \_\_\_\_\_,  
\_\_\_\_\_ anos de idade, R.G. \_\_\_\_\_, HC \_\_\_\_\_,  
residente em \_\_\_\_\_.

autorizo a bióloga Soraia Buchignani, sob a coordenação da Profa. Dra. Irene Lorand-Metze, a utilizar a bolsa de sangue, doada por mim, no HEMOCENTRO – UNICAMP para o estudo dos grupos sanguíneos (antígenos eritrocitários Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S e s) em meu sangue armazenado para transfusão. Estou ciente que a bolsa de sangue será coletada de acordo com as normas internacionais de segurança para doadores de sangue e o sangue será coletado em quantidade de 450ml de uma veia periférica por meio de equipamentos estéreis e descartáveis. Fico ciente também, que o mesmo procedimento, não acarretará nenhum dano a minha saúde geral, pois se trata de uma doação normal. Os procedimentos serão realizados gratuitamente para mim e não terei nenhum prejuízo caso eu desista, em algum momento, de participar desta pesquisa. O sangue coletado será utilizado posteriormente para a realização de provas laboratoriais para melhor definição dos grupos sanguíneos (imunofenotipagem por hemaglutinação e citometria de fluxo) no Laboratório de Marcadores Celulares do HEMOCENTRO – UNICAMP. Os benefícios esperados dessa pesquisa são os de melhorar as condições de armazenamento do sangue para fins de transfusão. Todas as minhas perguntas relativas a esses procedimentos foram adequadamente respondidas e, minhas dúvidas esclarecidas. Será mantido sigilo e caráter confidencial sobre minha identidade quando do momento da exposição das conclusões e da publicação do projeto e de documentações.

Hemocentro/ Departamento de Hematologia – tel: (19) 3788 8740

Médica responsável: Profa. Dra. Irene Lorand Metze

Pesquisador (a): Soraia Buchignani – tel: (19)3237 6931

Comitê de Ética para Pesquisa - tel: (19) 3788 8936

**Anexo 2:** Lista dos doadores Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, do estudo piloto, com seus resultados da hemaglutinação em tubo.

Doador	Tipo	Fya 1 C	Fya 1 D	Fyb 1 C	Fyb 1 D	Fya 14 C	Fya 14 D	Fyb 14 C	Fyb 14 D	Fya 28 C	Fya 28 D	Fyb 28 C	Fyb 28 D	Fya 35 C	Fya 35 D	Fyb 35 C	Fyb 35 D
RPJ	hetero	8	10	5	10	10	5	8	5	10	8	5	5	10	8	5	8
BPA	hetero	5	10	5	8	10	8	8	10	5	5	10	8	8	5	10	8
LRE	hetero	10	10	8	10	12	10	8	8	10	10	5	10	10	10	10	8
MJB	hetero	10	8	5	5	12	12	5	5	10	8	8	8	8	5	5	8
JLS	hetero	10	12	12	12	8	10	8	10	10	5	8	8	10	8	12	10
CCM	homo	8	8			10	8			8	10			5	8		
GC	homo	8	10			5	5			8	10			10	10		
ES	homo	8	8			8	5			8	8			5	8		
RS	homo			10	10			8	8			12	12			10	10
GT	homo	8	5			10	10			8	10			10	10		
LFM	homo	8	8			8	5			8	8			10	5		
WJV	homo			10	10			10	12			10	12			8	10
CANS	hetero	5	10	12	12	10	10	12	12	5	5	12	10	8	5	10	10
DVL	hetero	5	5	12	12	5	8	10	8	5	10	10	10	5	10	8	10
LRGA	homo			12	12			10	12			12	12			10	12
RM	hetero	5	5	10	10	5	5	10	5	5	5	10	12	10	10	10	5
RSSV	homo			12	10			10	10			8	10			10	10
JR	homo			12	12			10	10			12	10			12	10

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1, 14, 28 e 35 = dias de armazenamento.

**Anexo 3:** Lista dos doadores S e s, do estudo piloto, com seus resultados da hemaglutinação em tubo.

Doador	Tipo	S 1 C	S 1 D	s 1 C	s 1 D	S 14 C	S 14 D	s 14 C	s 14 D	S 28 C	S 28 D	s 28 C	s 28 D	S 35 C	S 35 D	s 35 C	s 35 D
RPJ	hetero	8	8	10	5	8	5	10	8	12	8	10	10	8	8	12	8
BPA	hetero	8	12	12	12	10	10	8	8	10	8	10	10	8	8	12	10
LRE	hetero	8	8	12	12	10	10	5	5	5	8	8	10	10	10	8	10
MJB	hetero	5	10	12	12	10	10	12	10	10	10	10	10	5	5	10	12
JLS	hetero	8	12	10	10	10	10	12	8	10	10	10	10	10	10	8	10
CCM	hetero	12	10	12	12	8	10	12	12	10	10	10	8	8	5	8	10
GC	hetero	10	10	12	12	8	10	10	10	8	8	8	5	10	10	10	10
ES	homo			8	8			8	10			10	10			10	10
RS	hetero	10	10	10	10	10	10	10	10	12	12	10	10	10	8	10	8
GT	homo	10	10			10	10			8	10			10	8		
LFM	hetero	10	10	10	10	12	10	12	8	10	10	8	8	10	5	8	8
WJV	hetero	12	12	8	8	10	8	10	10	8	10	10	10	10	10	12	12
CANS	hetero	10	10	8	8	10	12	10	10	10	10	10	8	10	10	12	12
DVL	hetero	12	10	8	8	8	10	8	8	10	10	8	8	10	12	8	10
LRGA	hetero	10	10	8	8	8	8	12	8	5	5	8	8	12	5	8	10
RM	hetero	8	8	8	8	5	5	8	10	10	10	8	8	8	10	8	8
RSSV	hetero	10	10	8	10	10	5	8	10	10	8	8	8	10	12	10	10
JR	hetero	10	10	10	10	12	12	10	10	10	10	8	8	10	12	8	8

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1, 14, 28 e 35 = dias de armazenamento.

**Anexo 4:** Lista dos doadores Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, do estudo piloto, com seus resultados da aglutinação em gel.

Doador	Tipo	Fya 1 C	Fya 1 D	Fyb 1 C	Fyb 1 D	Fya 14 C	Fya 14 D	Fyb 14 C	Fyb 14 D	Fya 28 C	Fya 28 D	Fyb 28 C	Fyb 28 D	Fya 35 C	Fya 35 D	Fyb 35 C	Fyb 35 D
RPJ	hetero	4	4	3	3	4	4	5	4	3	3	4	4	4	4	5	5
BPA	hetero	4	3	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
LRE	hetero	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
MJB	hetero	4	4	5	5	4	4	4	4	4	4	4	5	4	4	4	4
JLS	hetero	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4
CCM	homo	4	4			4	4			4	4			4	4		
GC	homo	4	4			3	3			4	4			4	4		
ES	homo	4	4			4	4			4	4			4	4		
RS	homo			4	4			4	4			4	4			4	4
GT	homo	4	4			4	4			4	4			4	4		
LFM	homo	4	4			4	4			4	4			4	4		
WJV	homo			4	4			4	4			4	4			4	4
CANS	hetero	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4
DVL	hetero	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
LRGA	homo			4	4			4	4			5	4			4	4
RM	hetero	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4
RSSV	homo			4	4			4	4			4	4			4	4
JR	homo			4	4			4	4			4	4			4	4

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1, 14, 28 e 35 = dias de armazenamento.

**Anexo 5:** Lista dos doadores S e s, do estudo piloto, com seus resultados da aglutinação em gel.

Doador	Tipo	S 1 C	S 1 D	s 1 C	s 1 D	S 14 C	S 14 D	s 14 C	s 14 D	S 28 C	S 28 D	s 28 C	s 28 D	S 35 C	S 35 D	s 35 C	s 35 D
RPJ	hetero	3	3	4	2	3	3	5	4	2	4	4	4	3	3	4	4
BPA	hetero	4	2	5	4	3	3	5	5	3	3	5	5	3	3	5	5
LRE	hetero	3	3	4	4	3	3	5	5	3	3	5	5	3	3	5	5
MJB	hetero	3	4	4	4	3	3	5	5	3	3	5	5	3	2	5	5
JLS	hetero	3	3	5	5	4	3	5	5	3	3	5	5	2	2	5	5
CCM	hetero	3	3	5	5	3	2	5	5	3	3	5	4	3	2	5	5
GC	hetero	3	3	5	5	2	2	4	5	3	3	5	5	3	3	3	5
ES	homo			5	5			5	5			5	5			5	5
RS	hetero	3	3	5	5	3	3	5	5	3	3	5	5	3	3	5	5
GT	homo	3	3			3	3			2	3			3	3		
LFM	hetero	3	3	5	5	3	3	5	5	3	3	5	5	3	4	5	5
WJV	hetero	3	3	5	5	3	3	5	5	3	3	4	5	3	3	5	5
CANS	hetero	3	3	5	5	3	3	5	5	2	2	4	4	3	3	5	5
DVL	hetero	3	3	4	4	3	3	5	4	3	3	5	5	3	2	5	5
LRGA	hetero	3	3	5	5	3	3	5	5	3	3	4	4	3	3	5	5
RM	hetero	3	3	5	5	3	3	5	5	3	3	4	4	3	3	5	5
RSSV	hetero	3	3	5	5	3	4	5	5	3	3	5	5	2	2	4	4
JR	hetero	3	3	5	5	2	2	4	4	3	3	5	5	2	2	4	4

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1, 14, 28 e 35 = dias de armazenamento.

**Anexo 6:** Lista completa dos doadores Fy<sup>a</sup> com seus resultados (CMF) da citometria de fluxo nos dias 1, 14, 28 e 35 de armazenamento.

Doador	Tipo	Produto	Fy <sup>a</sup> C1	Fy <sup>a</sup> D1	Fy <sup>a</sup> C14	Fy <sup>a</sup> D14	Fy <sup>a</sup> C28	Fy <sup>a</sup> D28	Fy <sup>a</sup> C35	Fy <sup>a</sup> D35	Variação
RPJ	hetero	PFC	68,44	73,79	73,1	71,19	91,52	97,28	112,18	102,12	a
BPA	hetero	CP	108,15	103,96	144,08	150,37	49,95	37,33	40,21	46,61	d
LRE	hetero	CP	86,11	88,9	99,52	93,43	27,93	33,45	80,34	88,2	i
MJB	hetero	CP	92,71	88,47	117,61	125,74	144,4	134,8	119,16	129,58	i
JLS	hetero	CP	99,08	105,73	29,56	30,53	73,91	82,86	90,4	103,98	i
CCM	homo	CP	75,93	80,1	120,2	118,42	66,97	84,59	86,61	100,79	
GC	homo	CP	189,86	185,32	162,25	156,59	363,62	219,77	186,53	258,92	a
ES	homo	CP	195,2	229,65	200,5	172,13	203,95	195,67	244,82	320,39	a
GT	homo	PFC	88,51	100,43	100,7	117,68	120,81	147,9	112,74	114,55	a
LFM	homo	PFC	245,14	239,38	240,27	259,83	278,77	277,84	203,04	181,2	i
CANS	hetero	PFC	109,24	113,47	93,07	147,22	113,11	116,17	112,75	123,11	a
DVL	hetero	CP	127,28	189,67	243,57	232,76	110,21	105,69	115,18	196,71	i
RM	hetero	PFC	118,87	113,45	205,74	137,03	86,12	87,86	115,44	117,09	i
SRS	hetero	CP	236,59	220,21	127,37	124,67	255,77	227,66	237,51	295,68	i
GCC	hetero	PFC	117,64	110,18	138,38	117,97	135,11	134,72	220,38	166,15	a
PCA	hetero	PFC	14,94	10,67			158,11	135,53	195,84	170,6	
JFC	hetero	CP	106,1	111,04	168,05	117,87	158,52	118,97	226,1	227,8	a
JRFJ	hetero	PFC	101,04	112,46	131,22	118,93	133,21	205,39	164,12	246,58	a
ALF	hetero	CP	97,21	109,22	202,37	175,94	21,93	29,71	133,15	124,42	
FCR	hetero	CP	29,53	28,78	149,93	135	25,52	13,72	118,24	118,9	
WDC	homo	PFC	482,13	410,67			198,26	161,27	117,21	119,81	d
JPS	hetero	PFC	99,43	88,47			141,26	154,17	114,6	112,63	a
RLA	hetero	PFC/CP	29,04	31,53			73,2	64,91	113,27	111,86	a
ARM	homo	PFC/CP	62,3	67,98			142,59	153,18	280,64	272,96	a
RRS	homo		420,76	333,24			288,02	220,86	45,68	33,94	
RSP	homo		461,55	397,99			209,76	261,85	30,46	62	
SG	hetero	PFC	95,91	111,99			17,71	17,03	29,65	29,86	d
JAD	homo	PFC	159,88	114,05			63,7	36,38	124,65	128,04	d
HSR	homo	PFC	116,3	121,58			32,76	40,17	70,19	101,84	d
NCF	hetero	PFC/CP	76,41	120,95			21,49	25,8	55,83	56,18	d
RRO	hetero	PFC	47,44	31,92			9,58	38,12	104,78	109,83	
AA	hetero	PFC/CP	31,19	30,4			35	58,24	101,73	117,82	a
MRCL	homo	PP	245,18	179,46			130,67	92,25	93,15	105,58	d
ATO	hetero	PFC/CP	101,42	98,14			133,84	140,07	33,67	53,01	

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1, 14, 28 e 35 = dias de armazenamento; a = aumento de CMF; d = diminuição de CMF; i = igualdade de CMF.

**Anexo 7:** Lista completa dos doadores Fy<sup>b</sup> com seus resultados (CMF) da citometria de fluxo nos dias 1, 14, 28 e 35 de armazenamento.

Doador	Tipo	Produto	Fy <sup>b</sup> C1	Fy <sup>b</sup> D1	Fy <sup>b</sup> C14	Fy <sup>b</sup> D14	Fy <sup>b</sup> C28	Fy <sup>b</sup> D28	Fy <sup>b</sup> C35	Fy <sup>b</sup> D35	Varição
RPJ	hetero	PFC	41,93	47,09	38,84	39,11	47,44	52,79	66,7	64,73	a
BPA	hetero	CP	77,45	80	83,44	89,18	22,23	22,04	30,09	31,01	d
LRE	hetero	CP	67,67	68,87	53,24	58,11	15,18	12,59	67,44	67,7	i
MJB	hetero	CP	67,74	66,84	56,02	62,17	58,29	70,51	84,22	73,99	i
JLS	hetero	CP	67,82	69,64	16,35	15,66	47,61	47,92	68,74	68,03	i
RS	homo	PFC	67,82	69,39	81,54	82,43	83,24	83,01	110,72	109,95	a
WJV	homo	CP	88,35	76,15	56,84	57,02	54,59	59,39	72,87	72,79	d
CANS	hetero	PFC	76,95	88,87	49,56	57,27	67,15	68,64	68,68	68,61	d
DVL	hetero	CP	76,57	97,05	82,15	82,12	63,86	64,84	65,09	69,12	d
LRGA	homo	CP	197,25	174,73	167,79	175,99	135,44	121,53	69,57	152,82	d
RM	hetero	PFC	67,74	74,36	75,26	68,05	47,1	61,3	61,07	67,82	i
RSSV	homo	CP	66,94	71	85,01	126,25	60,26	64,19	68,99	66,87	i
JR	homo	PFC	163,03	157,87	179,82	204,2	104,69	108,63	121,76	135,22	d
RSL	homo	PFC	67,46	66,73	65,58	64,79	59,48	57,49	50,27	66,65	i
ALS	homo	PFC	67,4	60,52	73,27	69,02	62,76	61,3	67,61	37,59	d
SRS	hetero	CP	84,45	105,58	58,48	58,71	85,19	92	99,19	90,82	
GCC	hetero	PFC	64,61	65,63	57,2	64,75	54,34	56,09	72,27	71,68	i
PCA	hetero	PFC	106,11	106,78	58,67	68,7	38,99	41,66	68,18	74,52	d
JFC	hetero	CP	59,37	65,15	43,93	43,52	64,46	65,3	82,38	82,02	a
JRFJ	hetero	PFC	62,6	62,85	47,53	47	61,18	77,98	69,05	69,78	a
PDA	homo	CP	29,68	30,32	110,06	119,07	117,37	157,97	198,09	168,16	a
NFA	homo	PFC	68,64	83,44	101,71	103,33	109,89	113,85	151,9	160,93	a
ALF	hetero	CP	51,26	64,23	75,92	78,23	86,06	73,64	100,05	93,96	a
FCR	hetero	CP	65,89	64,7	65,27	71,71	73,01	79,43	76,62	86,66	a
EJG	homo	PFC	77,34	84,79			117,17	135,46	88,47	100,46	a
JPS	hetero	PFC	67,42	67			63,27	69,48	69,88	68,69	i
RLA	hetero	PFC/CP	61,8	66,93			38,86	40,88	60,44	65,36	i
MHC	homo	PFC/CP	67,81	70,49			60,82	67,58	74,56	96,35	i
SG	hetero	PFC	66,4	67,45			67,86	61,3	81,99	70,44	i
AP	homo	PFC/CP	67,13	71,98			60,21	59,29	78,86	73,93	i
MTR	homo	PFC	168,15	141,91			124,58	137,07	114,81	134,82	d
NCF	hetero	PFC/CP	92,3	82,14			62	70,4	68,32	69,75	d
RRO	hetero	PFC	93,73	73,16			55,71	59,21	64,11	67,67	d
FRSC	homo	PFC/CP	101,13	94,33			88,64	83,86	93,32	94,58	i
AA	hetero	PFC/CP	68,23	65,38			48,91	63,81	57,54	59,52	i
ATO	hetero	PFC/CP	66,79	68,12			59,65	60,04	69,25	93,81	i

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1, 14, 28 e 35 = dias de armazenamento; a = aumento de CMF; d = diminuição de CMF; i = igualdade de CMF.

**Anexo 8:** Lista completa dos doadores S com seus resultados (CMF) da citometria de fluxo nos dias 1, 14, 28 e 35 de armazenamento.

Doador	Tipo	Produto	SC1 Novo	SD1 Novo	SC14 Novo	SD14 Novo	SC28 Novo	SD28 Novo	SC35 Novo	SD35 Novo	Varição
RPJ	hetero	PFC	77,88	81,14	95,79	65,32	160,54	114,68	192,02	277,49	a
BPA	hetero	CP	70,06	72,41	118,01	166,39	42,36	42,17	41,48	33,31	d
LRE	hetero	CP	75,93	70,01	132,84	155,26	35,58	29,68	87,25	82,98	i
MJB	hetero	CP	85,48	94,2	120,66	179,49	199,32	244,7	425,4	378,79	a
JLS	hetero	CP	69,42	71,23	35,05	38,95	100,68	67,88	69,11	72,3	i
CCM	hetero	CP	68,36	97,19	364,1	361,71	143,16	139,47	103,84	109,37	i
GC	hetero	CP	296,99	221,83	153,37	148,93	184,48	219,89	57,18	146,66	d
RS	hetero	PFC	24,69	24,36	30,79	25,91	199,61	283,43	55,66	68,47	
GT	homo	PFC	380,88	377,13	292,07	209,86	91,55	136,91	633,4	257,04	
LFM	hetero	PFC	185,99	139,59	144,03	34,93			157,65	124,24	d
WJV	hetero	CP	44,08	361,99	157,69	136	207,5	234,71	124,44	54,27	
CANS	hetero	PFC	315,64	547,11	320,77	335,24	191,93	288,88	129,24	123,62	d
DVL	hetero	CP	249,32		52,06	25,04	233,13	185,73	116,59	132,4	d
LRGA	hetero	CP	162,01	597,75	253,81	520,18	250,41	240,89	125,86	170,22	i
RM	hetero	PFC	103,45	1025,43	361,19	183,51	354,08	235,02	283,18	44,92	
RSSV	hetero	CP	273,19	268,85	44,07	108,54	163,02	174,02	123,08	217,87	d
JR	hetero	PFC	300,91	272,98	263,51	303,98	145,3	167,35	24,25	29,54	d
SRS	hetero	CP	77,7	116,09	69,66	82,99	284,04	144,98	266,91	301,92	a
GCC	hetero	PFC	121,73	50,12	295,79	269,87	273,13	309,4	264,79	233,36	a
PCA	hetero	PFC	10,08	9,4			26,13	294,97	75,31	281,95	
JFC	hetero	CP	19,67	23,16	7,61	11,05	5,94	8,15	17,95	17,31	i
JRFJ	hetero	PFC	224,63	33,02	167,01	17	46,89	17,61	69,38	68,62	
NFA	hetero	PFC	619,67	174,54	116,31	221,26			253,9	273,79	a
FCR	homo	CP	14,11	15,51	138,26	233,71			411,12	431,99	a
WDC	hetero	PFC	55,79	40,84			108,34	170,81	400,33	257,45	a
EJG	hetero	PFC	64,41	149,37			29,29	193,92	275,69	278,54	a
JPS	hetero	PFC	241,31	247,36			207,89	92,42	457,45	123,67	d
ARM	hetero	PFC/CP	21,55	19,45			109,31	106,73	277,69	269,02	a
RRS	hetero		85,28	52,79			258,98	274,57	20,88	22,81	
MHC	hetero	PFC/CP	27,84	58,08			227,05	305,01	18,19	20,07	i
AP	homo	PFC/CP	197,08	165,03			8,98	10,85	26,23	24,77	
MTR	hetero	PFC	65,47	163,92			7,66	7,41	26,91	18,57	d
HSR	hetero	PFC	27,62	29,87			6,99	7,08	22,62	21,55	i
FRSC	hetero	PFC/CP	15,21	20,06			7,47	7,35	157,57	272,45	
ATO	hetero	PFC/CP	437,24	192,16			297,71	270,98	16,51	25	i

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1, 14, 28 e 35 = dias de armazenamento; a = aumento de CMF; d = diminuição de CMF; i = igualdade de CMF.



**Anexo 9:** Lista completa dos doadores s com seus resultados (CMF) da citometria de fluxo nos dias 1, 14, 28 e 35 de armazenamento.

Doador	Tipo	Produto	sC1 Novo	sD1 Novo	sC14 Novo	sD14 Novo	sC28 Novo	sD28 Novo	sC35 Novo	sD35 Novo	Variação
RPJ	hetero	PFC	397,11	278,25	186,44	211,19	399,01	321,33	1056,97	933	
BPA	hetero	CP	549,32	585,55	534,1	620,51	95,19	79,69	74,23	69,67	
LRE	hetero	CP	290,29	279,39	411,76	356,72	64,62		259,62	278,85	i
MJB	hetero	CP	322,92	349,61	1262,23	646,64	597,67	640,01	2755,45	22	
JLS	hetero	CP	595,58	680,74	52,19	69,64	702,22	770,05	639,25	683,93	i
CCM	hetero	CP	243,51	255,06	1986,57	1109,32	434,35	458,48	467,65	488,42	a
GC	hetero	CP	981,91	996,14	411,37	452,2	473,48	528,23	930,37	971,41	i
ES	homo	CP	321,71	350,06	375,3	393,64	772,18	778,98	755,77	931,02	a
RS	hetero	PFC	883,94	977,21	1547,54	1319,2	286,71	416,23	1246,32	1730,65	i
LFM	hetero	PFC	579,92	655,81	380,55	351,84	1779,69	1395,86	624,37	837,63	i
WJV	hetero	CP	1249,53	1677,53	296,21	285,97	538,36	520	624,94	494,02	d
CANS	hetero	PFC	1065,78	1066,64	641,53	539,06	548,69	617,56	644,68	878,83	d
DVL	hetero	CP	1592,96	1626,11	2161,7	2607,76	612,23	469,18	542,05	943,1	d
LRGA	hetero	CP	1144,65	1636,08	1236,95	980,47	499,84	414,52	592,71	337,04	d
RM	hetero	PFC	1488,86	1641,95	1717,44	1164,19	596,15	851,28	1069,14	1049,42	d
RSSV	hetero	CP	653,11	1039,41	846,48	1126,93	406,57	506,72	809,43	1322,27	a
JR	hetero	PFC	670,41	837,25	663,99	680,01	302,6	306,52	480,42	544,9	d
RSL	homo	PFC	2125,4	2130,04	2529,64	2414,98	1901,75	1437,68	1976,47	1966,65	d
ALS	homo	PFC	2296,92	2350,36	2677,79	2922,74	1733,44	1399,09	1886,18	2105,46	d
SRS	hetero	CP	1034,86	635,42	421,87	423,6	1270,24	903,78	1110,5	1517,33	a
GCC	hetero	PFC	979,25	783,8	1186,42	1374,16	457,33	605,19	993,69	1049,29	i
PCA	hetero	PFC	28,19	27,55	791,66	657,17	400,93	468,69	1077,41	1591,48	a
JFC	hetero	CP	2130,38	2506,47	2082,5	2252,62	2378,43	1644,04	2406,09	2690,91	i
JRFJ	hetero	PFC	932,36	1518	802,93	637,05	971,68	1516,84	2175,38	1988,26	a
PDA	homo	CP	2401,48	3064,3	3382,76	3444,57	3128,25	2920,72	2268,03	2052,52	i
JS	homo	CP	2840,39	2526,7	2267,06	2362,55	3479,26	1243,05	2160,66	1852,47	d
NFA	hetero	PFC	697,66	952,73	596,99	619,43	272,08	391,2	540,22	376,46	d
ALF	homo	CP	1892,97	1701,8	1848,41	2437,18	388,29	1288,38	1137,37	1446,07	d
WDC	hetero	PFC	2360,25	1091			678,19	759,12	1059,11	1032,59	d
EJG	hetero	PFC	406	326,11			586,63	576,77	568,54	953,09	a
JPS	hetero	PFC	299,27	269,72			597,44	451,89	539,23	621,6	a
RLA	homo	PFC/CP	1766,89	716,51			439,11	369,88	1648,13	1476,03	
ARM	hetero	PFC/CP	967,85	1034,86			274,03	446,96	492,02	724,09	d
RRS	hetero		900,12	619,9			458,05	400,15	268,73	296,19	d
RSP	homo		2007,7	1901,26			1788,73	2423,66	534,23	702,35	d
MHC	hetero	PFC/CP	640,71	645,34			420,56	617,62	166,87	116,81	d
SG	homo	PFC	1808,85	1633,67			254,37	517,83	527,11	818,55	d
MTR	hetero	PFC	633,01	651,74			62,7	113,31	267,53	226,99	d
JAD	homo	PFC	911,71	1052,15			331,43	534,77	863,93	827,47	i
HSR	hetero	PFC	2738,14	1599,62			75,49	62,01	442,08	231,78	d
NCF	homo	PFC/CP	3250,38	3035,85			990,84	183,68	801,18	878,8	d
RRO	homo	PFC	497,2	1026,89			567,63	601,32	1395,27	1750,32	
FRSC	hetero	PFC/CP	209,8	130,15			243,65	224,48	641,93	868,9	a
AA	homo	PFC/CP	268,57	480,05			447,56	343,64	1260,25	1172,99	a
MRCL	homo	PP	1417,67	1497,9			406,73	667,24	395,36	797,67	d
ATO	hetero	PFC/CP	963,96	1038,91			562,24	652,73	275,55	183,06	d

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1, 14, 28 e 35 = dias de armazenamento; a = aumento de CMF, d = diminuição de CMF, i = igualdade de CMF.

**Anexo 10: Número de sítios antigênicos dos doadores Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> nos dias 1, 14, 28 e 35 de armazenamento.**

Doador	Tipo	mol Fy <sup>a</sup> 1	mol Fy <sup>b</sup> 1	mol Fy <sup>a</sup> 14	mol Fy <sup>b</sup> 14	mol Fy <sup>a</sup> 28	mol Fy <sup>b</sup> 28	mol Fy <sup>a</sup> 35	mol Fy <sup>b</sup> 35
RPJ	hetero	7662,9	4405,81	7789	3728,2	10513,54	5092	12074,45	7001,81
BPA	hetero	11940,4	8594,55	16980,59	9523,13	4299,3	1666,58	4271,15	2696,77
LRE	hetero	9669,43	7314,61	10767,58	5772,68	2713,91	656,58	9273,39	7228,91
MJB	hetero	10047,11	7194,63	13852,66	6191,37	16047,11	6840,83	14182,59	8641,07
JLS	hetero	11493,55	7370,92	2634,95	916,12	8552,93	4804,3	10855,11	7328,68
CCM	homo	8507,63		13563,13		8234,01		10427,85	
GC	homo	21922,24		18473,55		34667,19		26223,61	
ES	homo	24962,64		21766,15		23418,26		33554,36	
RS	homo		7355,62		8993,65		9133,21		12464,37
GT	homo	10522,12		12324,2		15405		12869,6	
LFM	homo	28615,16		29568,84		33027,93		22476,82	
WJV	homo		9026,09		5926,32		5933,66		7872,86
CANS	hetero	12589,24	9106,89	13665,35	5496	12991,41	7268,7	13394,18	7360,52
DVL	hetero	18357,86	9584,35	28113,83	9012,02	12172,39	6834,7	18048,13	7171,98
LRGA	homo		21726,36		20000,18		14686,37		12569,66
RM	hetero	13177,49	7654,95	19938,36	7729,01	9606,38	5592,1	13190,35	6846,33
RSSV	homo		7400,3		11888,37		6574,55		7272,98
JR	homo		18599,65		22463,35		12014,46		14686,98
RSL	homo		7170,76		6936,93		6116,69		6113,63
ALS	homo		6786,96		7666,58		6550,68		5396,22
SRS	hetero	26918,36	10588,84	14384,59	6130,15	28548,44	9802,87	31594,35	10587,61
GCC	hetero	12902,04	6928,97	14648,42	6421,52	15473,55	5716,36	22616,99	7768,19
PCA	hetero	524,36	11988,14		6753,29	16931,01	3893,47	21387,25	7691,67
JFC	hetero	12248,29	6578,84	16458,46	4309,71	15942,44	6899,59	26740,85	9019,97
JRFJ	hetero	12025,48	6635,77	14268,9	4743,09	19683,1	7474,98	24096,49	7454,78
PDA	homo		2629,44		12982,23		15810,83		21375,62
NFA	homo		8265,84		11507,63		12652,29		18105,67
ALF	hetero	11592,71	6026,09	22113,83	8392,55	2117,71	8732,28	14723,1	10832,46
FCR	hetero	2525,99	6950,4	16397,86	7341,54	1358,68	8287,88	13472,53	8951,42
WDC	homo	53606,8				20964,27		13465,19	
EJG	homo		8881,02				14420,71		10521,5
JPS	hetero	10458,45	7184,84			17040,58	7082,61	12865,92	7438,87
RLA	hetero	2664,33	6836,54			7410,71	3837,77	12737,38	6657,19
ARM	homo	6931,42				17061,39		32843,68	
RRS	homo	45110,57				30106,28		3830,42	
RSP	homo	51570,88				27824,91		4616,38	
MHC	homo		7422,34				6816,34		9418,46
SG	hetero	11682,69	7149,95			1083,22	6862,86	2599,45	8287,26
AP	homo		7471,92				6271,55		8309,3
MTR	homo		17936,11				14972,84		14237,07
JAD	homo	15724,52				5082,82		14424,38	
HSR	homo	13517,83				3420,91	-117,75	9487,02	1367,86
NCF	hetero	11037,52	9634,54			1851,44	7061,19	5813,08	7408,26
RRO	hetero	3814,5	9172,39			1876,53	5991,2	12093,43	7023,24
FRSC	homo		10921,22			-204,06	9515,79		10458,45
AA	hetero	2726,77	7135,26			4664,13	5856,54	12395,81	6122,2
MRCL	homo	24949,79				12602,1	493,75	11121,38	
ATO	hetero	11172,19	7214,83			15723,3	6283,18	4262,58	8937,95

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1, 14, 28 e 35 = dias de armazenamento

**Anexo 11: Número de sítios antigênicos dos doadores S e s nos dias 1, 14, 28 e 35 de armazenamento.**

Doador	Tipo	mol S 1	mol s 1	mol S 14	mol s 14	mol S 28	mol s 28	mol S 35	mol s 35
RPJ	hetero	8690,65	40296,86	8818,58	23296,45	15803,49	43050,17	27696,37	120766,77
BPA	hetero	7677,59	68424,38	16365,41	69632,7	4130,97	9661,47	3534,77	7765,13
LRE	hetero	7890	33827,98	16591,9	45996,92	2951,42	6583,74	9376,84	31917,54
MJB	hetero	9955,29	40123,63	17329,5	115802,47	26136,07	74717,59	48182,8	168969,98
JLS	hetero	7566,19	77082,82	3486,41	6414,18	9274,61	89077,31	7612,71	79951,21
CCM	hetero	9090,37	29475,19	43385	188462,33	16257,07	53608,63	12007,73	57479,68
GC	hetero	30714,73	120037,1	17461,11	51817,57	23709,02	60273,39	11434,17	115368,48
ES	homo		40077,11		46025,07		93906,32		102208,52
RS	hetero	1959,17	112881,4	2427,44	174435,61	28524,56	41985,08	6554,97	181183
GT	homo	45356,03		29680,86		12941,21		53462,34	
LFM	hetero	18886,12	74598,23	9911,22	43787,78	70808,59	193338,5	16211,77	88448,66
WJV	hetero	23813,08	178127,9	16934,07	34593,12	26025,28	63741,05	9895,92	67450,5
CANS	hetero	51767,37	129486,4	39112,41	71223	28388,06	70345,22	14434,79	92213,81
DVL	hetero	68819,82	196002,4	3676,17	290904,91	24595,98	65151,98	14197,9	89865,72
LRGA	hetero	45463,15	169170,8	46334,2	134689,42	29030,18	54926,52	17080,37	55868,58
RM	hetero	68057,73	190599,9	32298,9	175347,05	35016,71	87556,8	19040,38	128638,02
RSSV	hetero	32136,07	102559,3	8298,28	119753,09	19587,61	54861,03	19826,95	129442,34
JR	hetero	34085,68	91243,6	33693,92	81225,65	18094,65	36242,17	2249,31	61718,61
RSL	homo		259440,7		301626,81		203369,9		240322,98
ALS	homo		283426		341776,38		190705,1		243293
SRS	hetero	10818,99	101197,9	8300,73	50709,63	25217,89	132032,8	33775,94	159811,45
GCC	hetero	9476	106876,5	33581,9	155694,95	34614,55	63995,7	29449,48	124011,61
PCA	hetero	149,13	2368,68		87642,5	18611,89	52187,9	20825,32	162324,83
JFC	hetero	1578,43	282787,6	98,94	264318,09	-180,8	245180,2	1115,06	310954,28
JRFJ	hetero	14727,99	148948,1	10220,34	87100,77	2904,89	151284	7403,98	253821,44
PDA	homo		333528,1		416871,25		369226,3		263426,22
JS	homo		327487		282344,44		288018,8		244608,42
NFA	hetero	47571,9	99980,38	19620,05	73416,22	84,86	39557,42	31257,68	55068,53
ALF	homo		218999,8		261286,25		101589,1		157094,25
FCR	homo	769,82		21725,75		45,07		50565,17	
WDC	hetero	4871,64	210214,6			16044,05	86937,34	39220,75	126993,86
EJG	hetero	12042,62	43770,64			12619,85	70170,77	32882,25	92098,73
JPS	hetero	28869,19	33785,73			17339,29	63188,31	34528,24	70013,45
RLA	homo		150970,6				48476,62		190192,81
ARM	hetero	1466,41	121546,6			12180,96	43089,96	32421,93	73397,24
RRS	hetero	7408,26	92000,19			31616,38	51488,86	1631,07	33536,61
RSP	homo		238232				256805,5		74650,25
MHC	hetero	4216,05	77678,41			31525,18	62505,79	1298,69	16321,34
SG	homo		209680,3				46224,63		81327,26
AP	homo	21122,2				170,55		2078,53	
MTR	hetero	12998,14	77598,84			-120,82	9730,64	1740,64	29227,28
JAD	homo		119168,5				51978,55		102490,69
HSR	hetero	2475,8	264479,7			-182,03	7373,37	1660,45	40205,04
NCF	homo		383749,4			-388,31	70851,44		101791,66
RRO	homo		92249,32			-313,02	70510,48		191504,56
FRSC	hetero	1115,67	19765,74			-136,12	27611,89	25279,11	91437,65
AA	homo		44781,25			-346,69	47387,66		147900,2
MRCL	homo		177424,6			-253,03	64696,57		71984,48
ATO	hetero	37483,55	121556,4			33767,37	73327,46	1497,63	27029,15

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1, 14, 28 e 35 = dias de armazenamento

**Anexo 12:** Lista dos resultados de citometria de fluxo dos doadores Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> inclusos no estudo de comparação da fenotipagem pela aglutinação em gel e citometria de fluxo.

Doador	Tipo	Fy <sup>a</sup> C1	Fy <sup>b</sup> C1
RPJ	hetero	68,44	41,93
BPA	hetero	108,15	77,45
LRE	hetero	86,11	67,67
MJB	hetero	92,71	67,74
JLS	hetero	99,08	67,82
CANS	hetero	109,24	76,95
DVL	hetero	127,28	76,57
RM	hetero	118,87	67,74
RSL	homo	20,09	67,46
GCC	hetero	117,64	64,61
PCA	hetero	14,94	106,11
JFC	hetero	106,1	59,37
JRFJ	hetero	101,04	62,6
NFA	homo	17,66	68,64
ALF	hetero	97,21	51,26
FCR	hetero	29,53	65,89
WDC	homo	482,13	17,1
EJG	homo	19,84	77,34
JPS	hetero	99,43	67,42
RLA	hetero	29,04	61,8
ARM	homo	62,3	17,29
RRS	homo	420,76	19,15
RSP	homo	461,55	18,91
MHC	homo	24,76	67,81
SG	hetero	95,91	66,4
JAD	homo	159,88	15,68
NCF	hetero	76,41	92,3
RRO	hetero	47,44	93,73
AA	hetero	31,19	68,23
ATO	hetero	101,42	66,79

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1 = dia de armazenamento.

**Anexo 13:** Lista dos resultados de citometria de fluxo dos doadores S e s inclusos no estudo de comparação da fenotipagem pela aglutinação em gel e citometria de fluxo.

Doador	Tipo	SC1	sC1
RPJ	hetero	77,88	397,11
BPA	hetero	70,06	549,32
LRE	hetero	75,93	290,29
MJB	hetero	85,48	322,92
JLS	hetero	69,42	595,58
CCM	hetero	68,36	243,51
GC	hetero	296,99	981,91
RS	hetero	24,69	883,94
LFM	hetero	185,99	579,92
WJV	hetero	44,08	1249,53
CANS	hetero	315,64	1065,78
DVL	hetero	249,32	1592,96
LRGA	hetero	162,01	1144,65
RM	hetero	103,45	1488,86
RSSV	hetero	273,19	653,11
JR	hetero	300,91	670,41
RSL	homo	23,1	2009,36
ALS	homo	22,46	2054,12
SRS	hetero	80,01	687,64
GCC	hetero	154,92	474,81
JFC	homo	21,38	1141,7
JRFJ	hetero	198,29	597,79
PDA	homo	30,97	2129,69
NFA	hetero	377,77	586,37
ALF	homo	19,26	1167,34
WDC	homo	46,27	1866,65
EJG	hetero	48,77	253,44
JPS	hetero	203,91	181,05
RLA	homo	25,74	1520,99
ARM	hetero	21,38	608,2
RRS	hetero	91,02	583,31
RSP	homo	34,12	1968,42
MHC	hetero	22,29	552,11

Hetero = heterozigoto; Homo = homozigoto; C = bolsa controle; D = bolsa leucodepletada; 1 = dia de armazenamento.