



Biologia Molecular: ferramenta complementar para casos de pacientes e busca de sangue raro

Carla Luana Dinardo, MD, PhD

Divisão de Imunohematologia

Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo

Propósito del genotipado

Pacientes
crónicamente
transfundidos

Presencia de
auto-
anticuerpos



Proteínas
variantes(RhD
y RhCE)

Falta de
disponibilidad de
antisueros
comerciales

Propósito del genotipado

Falta de
disponibilidad
de antisueros
comerciales

Busqueda de
donantes
raros

Proteínas
variantes(RhD
y RhCE)



**QUAIS TÉCNICAS MOLECULARES
NÓS TEMOS?**

O que é o PCR?

- **La reacción en cadena de la polimerasa** es una técnica para hacer muchas copias de una determinada región de ADN
- La PCR depende de una ADN polimerasa, la **Taq polimerasa**, y requiere de **cebadores** de ADN diseñados específicamente para la región de ADN de interés
- En la PCR, la reacción se somete repetidamente a un ciclo de cambios de temperatura que permiten la producción de muchas copias de la región

Región a copiar

ADN molde

TATCAGATCCATGGAGT...GAGTACTAGTCCTATGAGT
 ATAGTCTAGGTACCTCA...CTCATGATCAGGATACTCA



Cebador 1

CAGATCCATGG →

← GATCAGGATACT

Cebador 2

ATAGTCTAGGTACCTCA...CTCATGATCAGGATACTCA

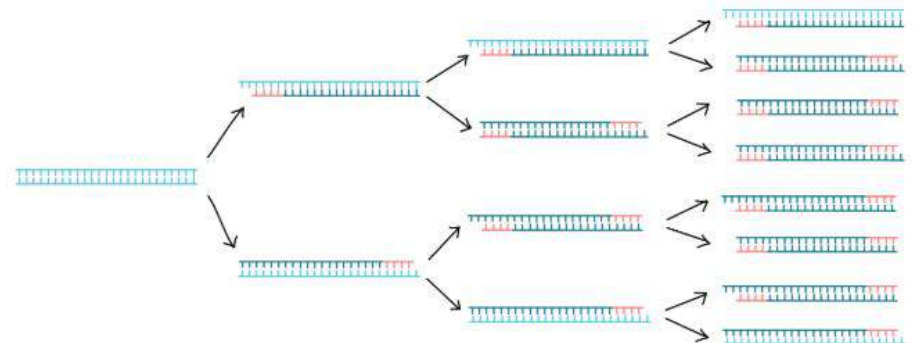
ADN molde



Cebadores se unen al molde



Taq polimerasa extiende cebadores

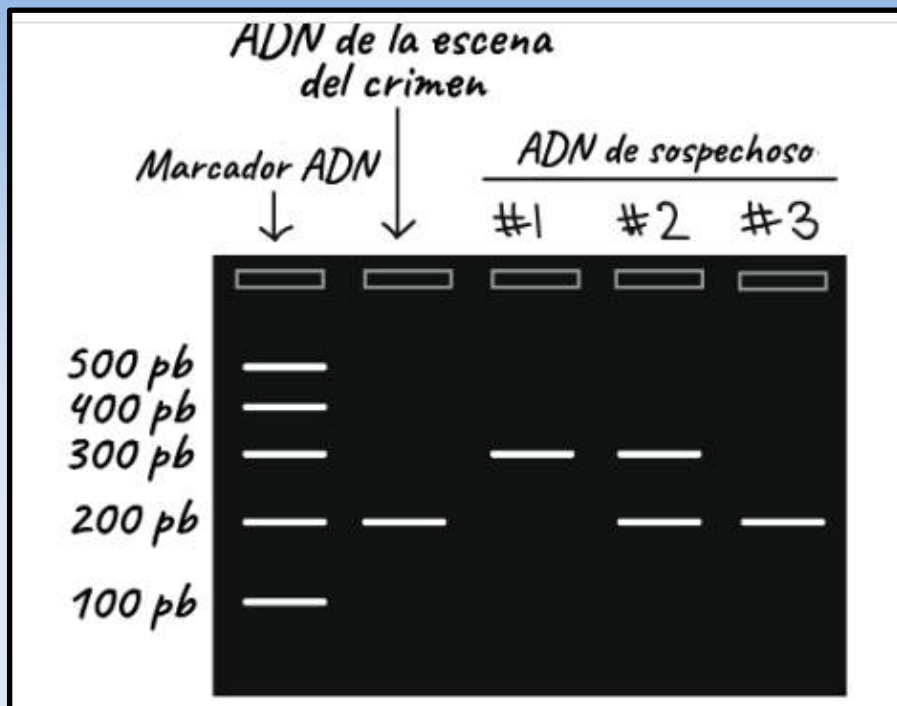


Ciclo:

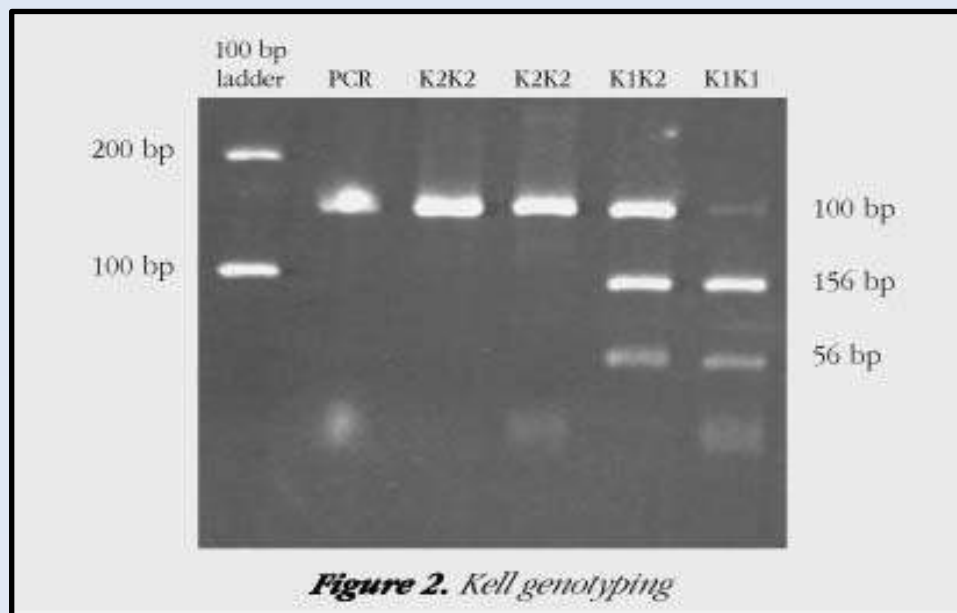
1

2

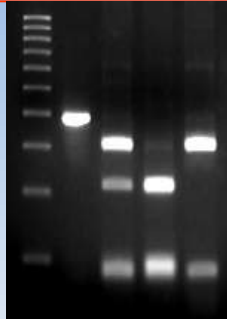
3



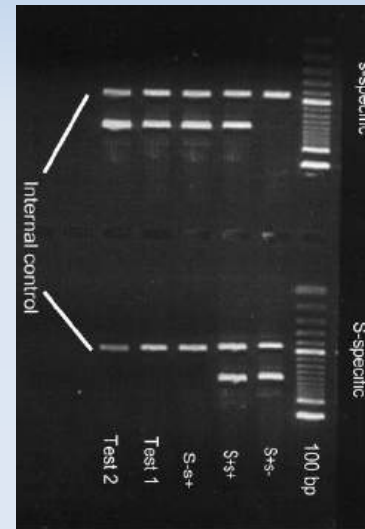
Técnicas Convencionais Moleculares



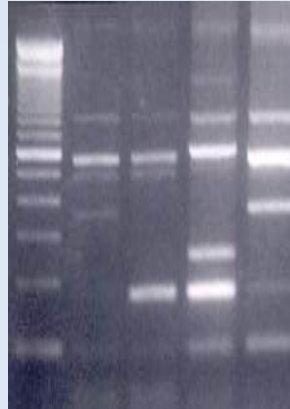
- PCR-RFLP



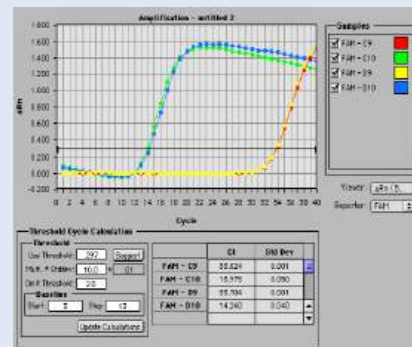
- PCR específico de alelo (AS-PCR)



- PCR Multiplex

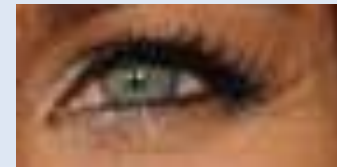
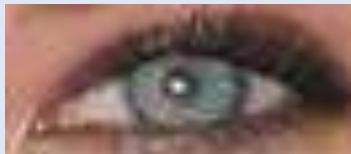


- PCR en tiempo real



Permite la evaluación de pocos antígenos en cada reacción

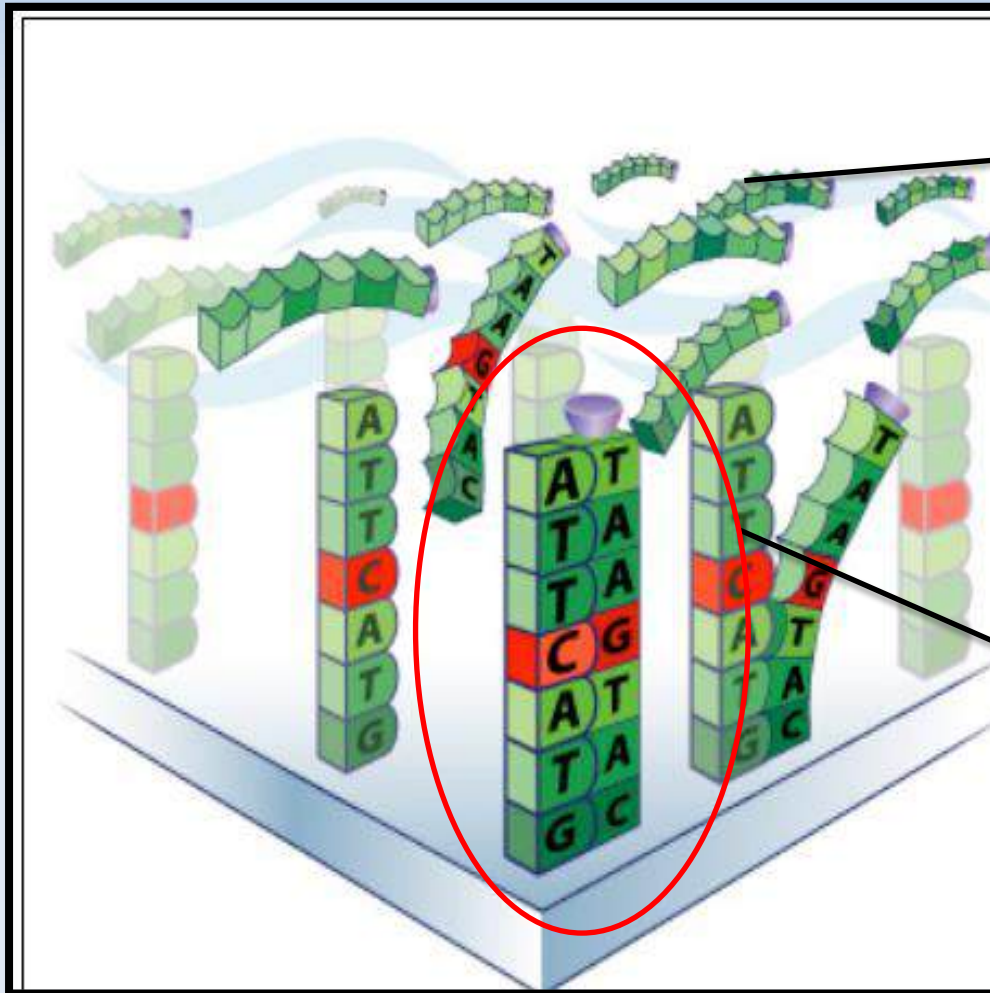
Útil para la resolución puntual de casos inmunohematológicos



Técnica que requiere mucho tiempo para su aplicación en el genotipado de antígenos múltiples

PLATAFORMAS MULTIPLEX

Permitir la detección de múltiples
polimorfismos conocidos (SNP) qui codifican los antígenos
de grupos sanguíneos de relevancia transfusional



ADN de
paciente
o donador

Oligonucleótido para
hibridación

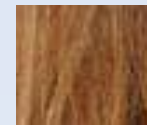
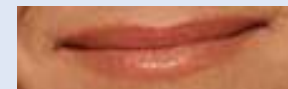
**Permitir la determinación del fenotipo deducido del genotipo
para los principales antígenos eritrocíticos
independientemente de**

Transfusión reciente
Indisponibilidad de antisueros
Prueba de Antiglobulina directa positiva

No debe utilizarse indiscriminadamente
Serología fuerte y protocolos bien establecidos

Limitaciones

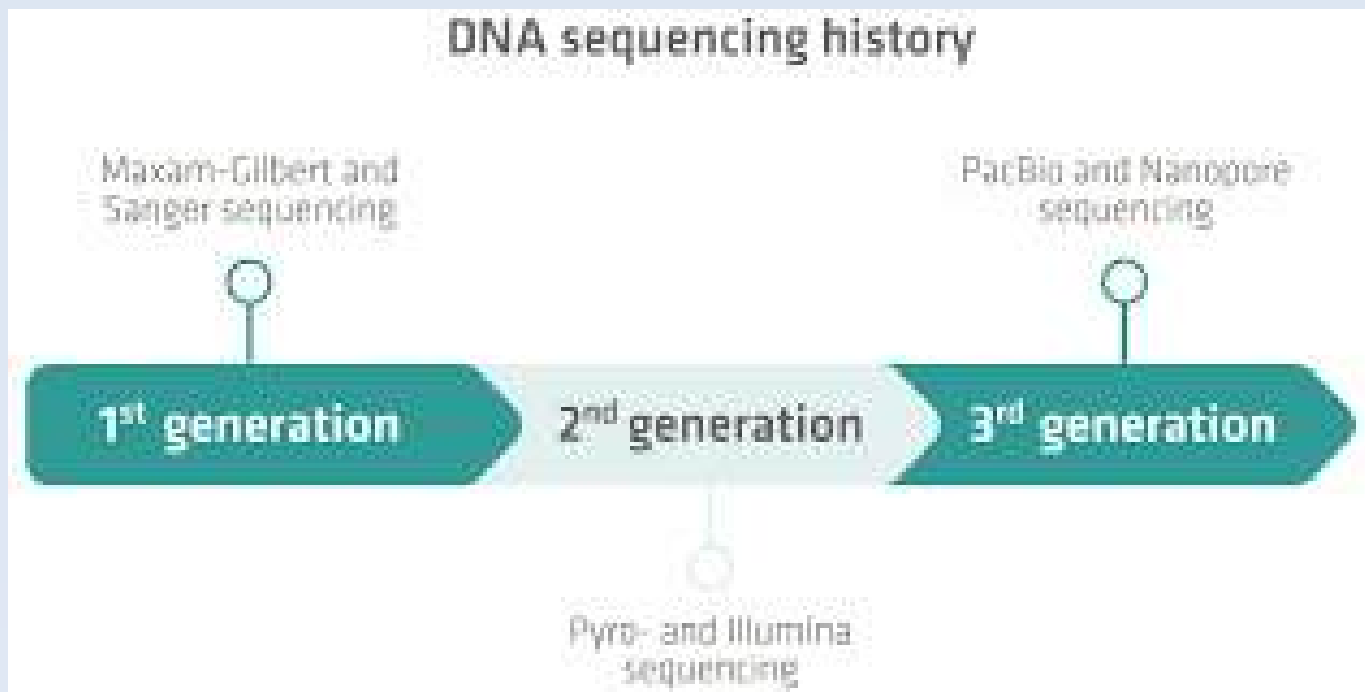
- ✓ No se pueden incluir todas las variantes de expresión en un ensayo
 - ✓ Falso positivo si no se incluyen mutaciones nulas
 - ✓ Pueden ser nuevas mutaciones
- ✓ Poco eficaz en inserciones, deleciones y genes híbridos

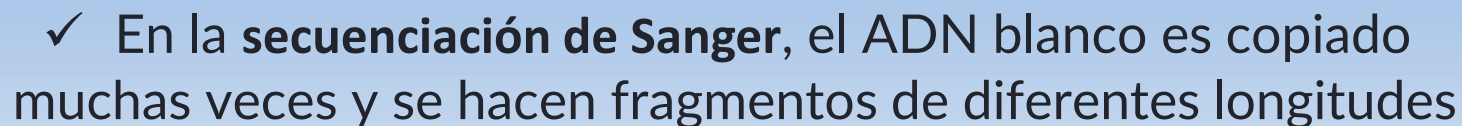


SECUENCIACIÓN

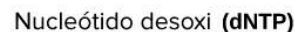
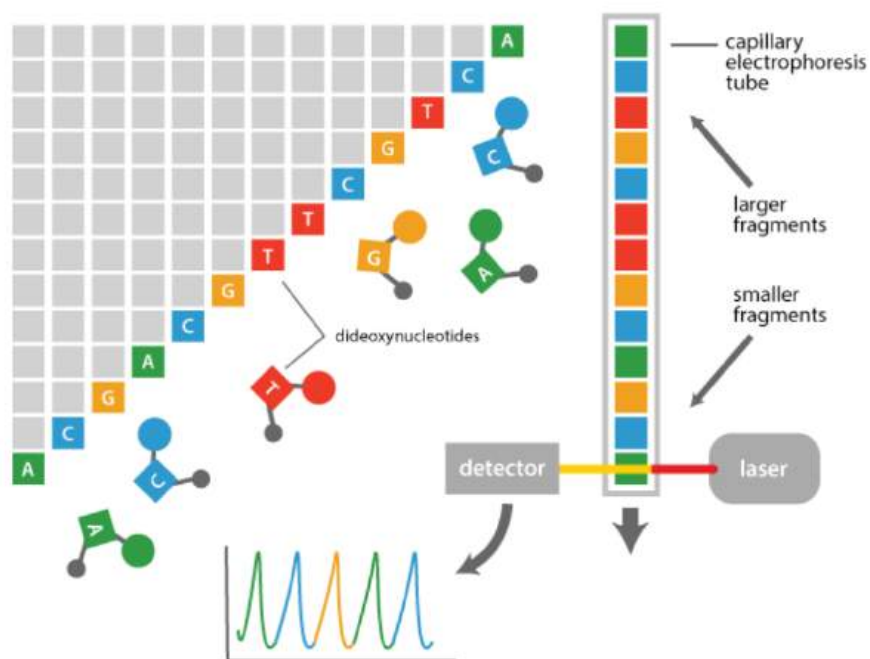
O que é?

- La **secuenciación de ADN** es el proceso de determinar la secuencia de nucleótidos (As, Ts, Cs y Gs) de un fragmento de ADN

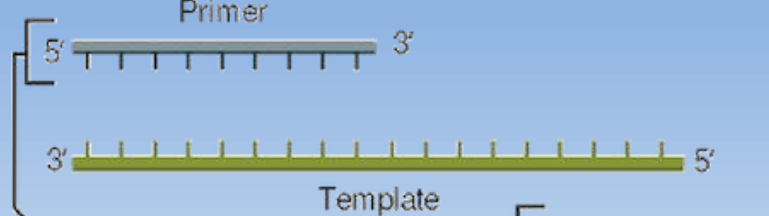




- ✓ Nucleótidos fluorescentes que actúan como "terminadores de cadena" marcan los extremos de los fragmentos y permiten la determinación de la secuencia

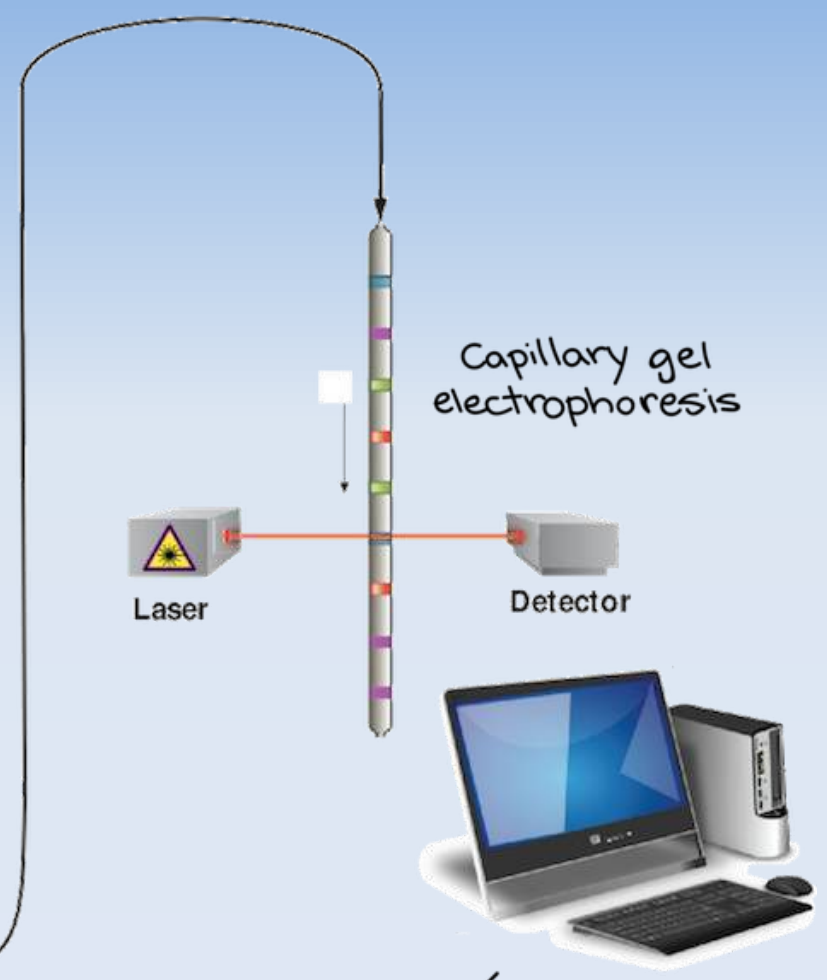


Separación por tamaño de la cadena en electroforesis capilar



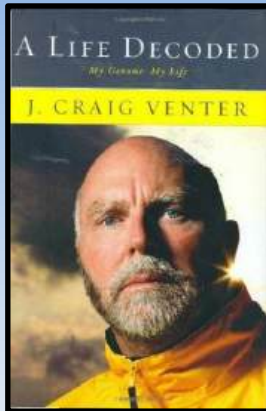
- dNTPs**
- ddTTP (red dot)
 - ddCTP (blue dot)
 - ddATP (green dot)
 - ddGTP (purple dot)

Primer extension and chain termination



Chromatogram

GGTCATAGC ← Sequence



Secuenciación de múltiples fragmentos de ADN

Rápido y menos dependiente del operador

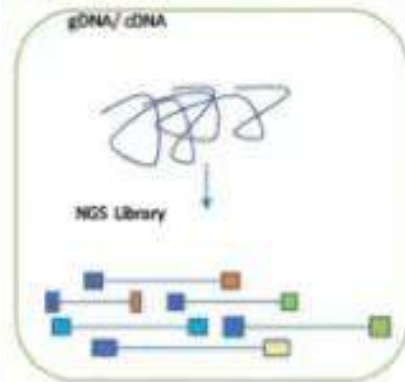


Secuenciación de próxima generación (Next Generation Sequencing)

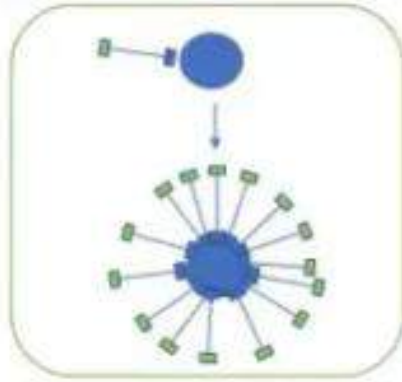
- Secuenciación por síntesis ("Secuenciación por síntesis")
- Procesamiento de millones de reacciones de secuenciación en paralelo
- Más rápido y económico que la secuenciación convencional

Secuenciación de Segunda Generación

1. Construct Library



2. Clonal Amplification



3. Sequence Library



4. Analyze Data



Fig: Next-Generation Sequencing workflow | Image Source: <https://www.thermofisher.com/in/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/what-is-next-generation-sequencing.html>

Ventajas de NGS

- **Altamente paralelas:** ocurren muchas reacciones de secuenciación al mismo tiempo.
- **Microescala:** las reacciones son diminutas y se pueden hacer muchas a la vez en un chip.
- **Rápidas:** puesto que las reacciones se realizan en paralelo, los resultados están listos mucho más rápido.
- **Bajo costo:** secuenciar un genoma es más barato que con la secuenciación de Sanger.
- **Longitudes más cortas**

Next-generation sequencing is a credible strategy for blood group genotyping

Table I. Target genes, design and experimental coverage in the coding DNA sequences (CDSs).

Blood group system	Gene	Accession number	Target design coverage (%)	CDS (bp)	CDS coverage		design coverage		CDS experimental coverage	
					bp	%	bp	%	bp	%
ABO	<i>ABO</i>	NM_020469.2	90.25	1065	1065	100.00	0	0.00		
MNS	<i>GYP A</i>	NM_002099.6	68.91	453	416	91.83	453	100.00		
	<i>GYP B</i>	NM_002100.4	51.61	276	233	84.42	270	97.83		
	<i>GYP E</i>	NM_002102.3	16.03	237	237	100.00	237	100.00		
Lutheran	<i>BCAM</i>	NM_005581.3	86.98	1887	1868	98.99	1766	93.59		
Kell	<i>KEL</i>	NM_000420.2	100.00	2199	2199	100.00	2199	100.00		
Duffy	<i>ACKR1</i>	NM_002036.3	100.00	1011	1011	100.00	1011	100.00		
Kidd	<i>SLC14A1</i>	NM_015865.5	82.06	1170	1159	99.06	1162	99.32		
Diego	<i>SLC4A1</i>	NM_000342.3	92.45	2736	2736	100.00	2736	100.00		
Yt	<i>ACHE</i>	NM_015831.2	97.03	1848	1845	99.84	1653	89.45		
Scianna	<i>ERMAP</i>	NM_018538.3	83.66	1428	1421	99.51	1422	99.58		
Dombrock	<i>ART4</i>	NM_021071.2	100.00	945	945	100.00	945	100.00		
Colton	<i>AQP1</i>	NM_198098.2	95.77	810	810	100.00	793	97.90		
Landsteiner-Wiener	<i>ICAM4</i>	NM_001544.3	72.64	816	816	100.00	815	99.88		
Cromer	<i>CD55</i>	NM_001114752.1	91.21	1323	1170	88.44	1106	83.60		
Knops	<i>CR1</i>	NM_000651.4	62.35	6120	4919	65.85	5169	69.20		
Rh	<i>RHD</i>	NM_016124.3	64.53	1254	1252	99.84	1254	100.00		
	<i>RHCE</i>	NM_020485.4	96.35	1254	1235	98.48	1254	100.00		
Total	—	—	80.57	28 182	25 337	89.90	24 245	86.03		

Table III. Comparison of the expected (Exp.) and observed (Obs.) most common alleles in four reference samples.

Gene	Exon/UTR	Nucleotide change*	Sample 31		Sample 32		Sample 33		Sample 34	
			Exp	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs
<i>GYP A</i>	2	c.59C>T	-/-	<i>LD</i>	-/-	<i>LD</i>	T/T	T/T	-/T	<u>T/T</u>
	2	c.71G>A	-/-	<i>LD</i>	-/-	<i>LD</i>	A/A	A/A	-/A	<u>A/A</u>
	2	c.72T>G	-/-	<i>LD</i>	-/-	<i>LD</i>	G/G	G/G	-/G	<u>G/G</u>
<i>GYP B</i>	3	c.143C>T	-/T	-/T	-/T	-/T	-/-	-/-	-/T	-/T
<i>RHCE</i>	1	c.48C>G	-/G	-/G†	-/G	<u>C/G†</u>	G/G	G/G	G/G	G/G
	2	c.150T>C	-/C	<u>C/C</u>	-/C	<u>C/C</u>	C/C	C/C	C/C	C/C
	2	c.178A>C	-/C	<u>C/C</u>	-/C	<u>C/C</u>	C/C	C/C	C/C	C/C
	2	c.201G>A	-/A	<u>A/A</u>	-/A	<u>A/A</u>	A/A	A/A	A/A	A/A
	2	c.203G>A	-/A	<u>A/A</u>	-/A	<u>A/A</u>	A/A	A/A	A/A	A/A
	2	c.307T>C	-/C	<u>C/C</u>	-/C	<u>C/C</u>	C/C	C/C	C/C	C/C
	5	c.676G>C	-/-	-/-	-/-	-/-	-/C	-/C	-/-	-/-
<i>KEL</i>	6	c.578C>T	-/T	-/T	-/-	-/-	-/-	-/-	-/T	-/T
<i>ACKRI</i>	5'-UTR	c.-67T>C	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/C	-/C
	2	c.125A>G	-/-	-/-	-/G	-/G	-/-	-/-	-/-	-/-
	2	c.265C>T	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>SLC14A1</i>	9	c.838G>A	-/-	-/-	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A

Dificultad con los genes *RHD/RHCE* y *GYP A/GYP B* por homología

Cambios en la estrategia de la biblioteca

ABO: múltiples exones compuestos de homopolímeros
Disminución de la calidad de lectura



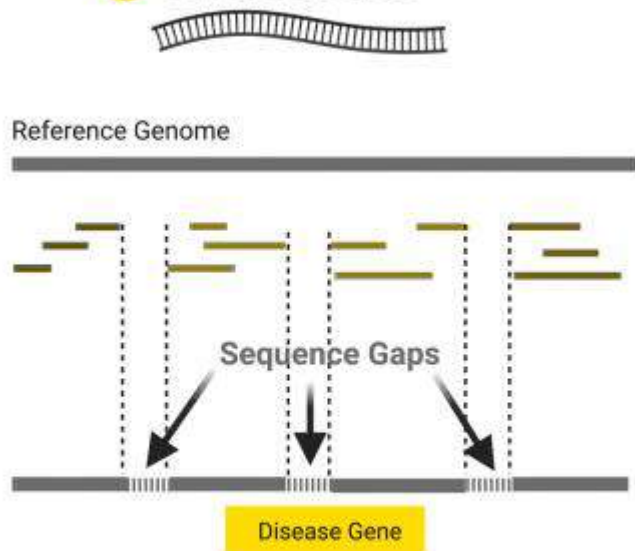
News Feature | Published: 12 January 2023

Method of the year: long-read sequencing

[Vivien Marx](#) 

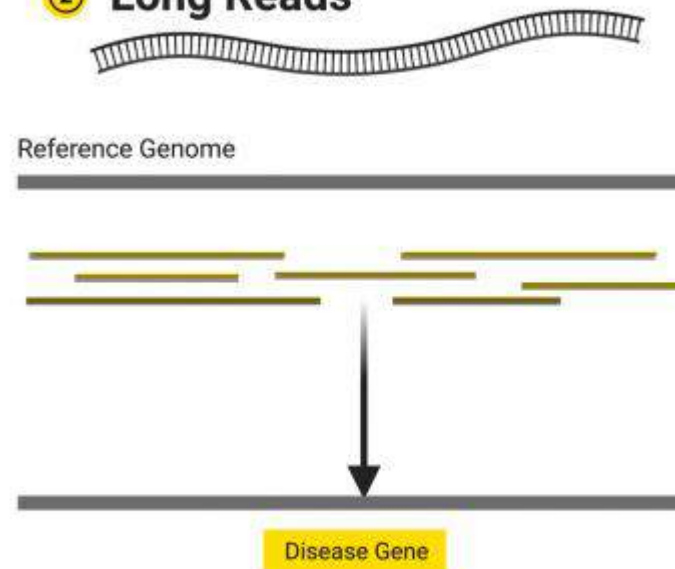
[Nature Methods](#) **20**, 6–11 (2023) | [Cite this article](#)

① Short Reads



Missing sequence data leads to gaps in genome coverage and limits variant detection

② Long Reads

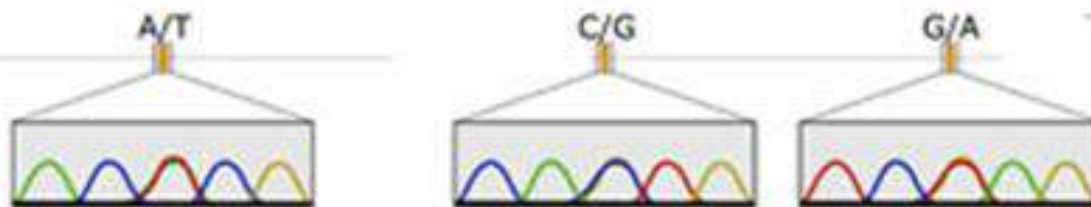


Long reads map uniquely and span large variants providing comprehensive variant detection



Sanger sequencing
1st generation

No phase information

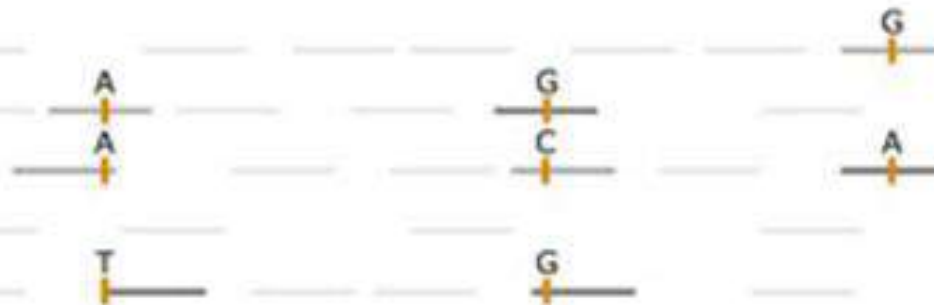


2^3 possible haplotypes

... A ... C ... G ...
 ... A ... G ... G ...
 ... A ... C ... A ...
 ... A ... G ... A ...
 ... T ... C ... G ...
 ... T ... G ... G ...
 ... T ... C ... A ...
 ... T ... G ... A ...

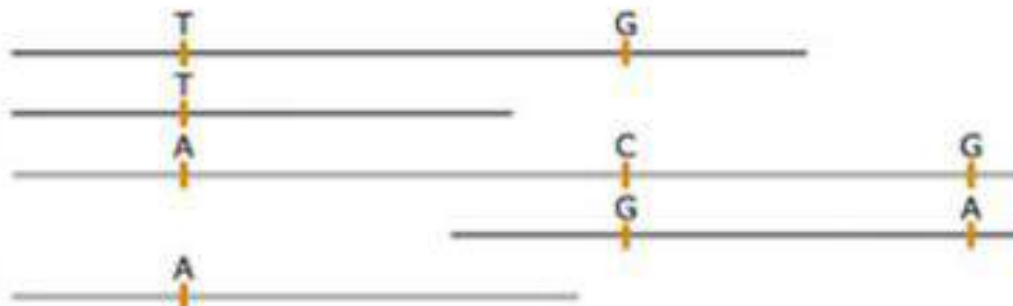
Short-read sequencing
2nd generation

Phase information
= read length



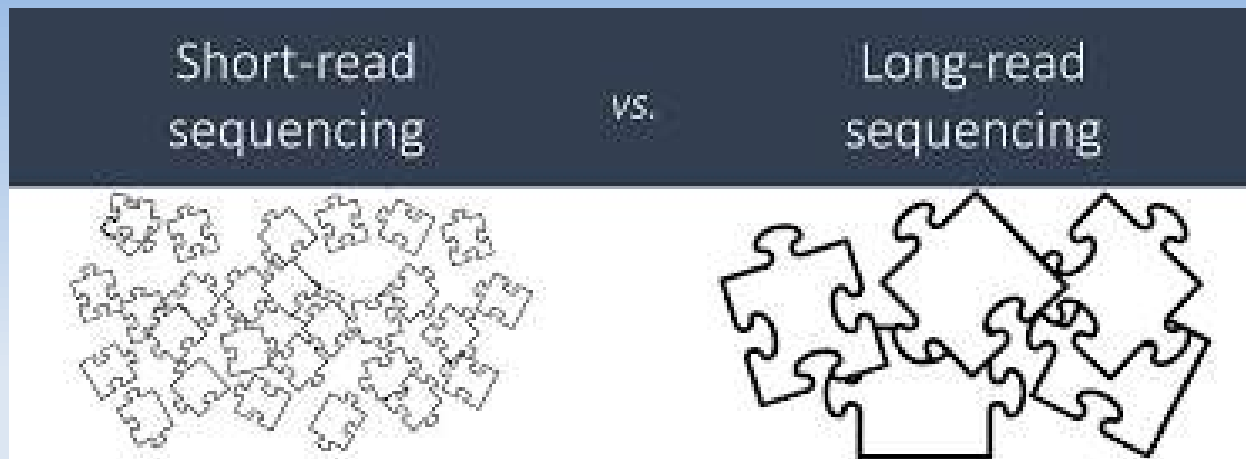
Long-read sequencing
3rd generation

Phase information
= read length



2 haplotypes

... A ... C ... G ...
 ... T ... G ... A ...



- ✓ These methods offered the ability to sequence DNA molecules directly and in real-time, without the need for amplification or labeling.
- ✓ They provided advantages in terms of long-read sequencing, detecting modifications in DNA, and facilitating the study of complex genomic regions



PACIENTES

Caso Clínico1

- Paciente con mielodisplasia en transfusión crónica
- RAI positivo
- Identificación de anticuerpos: Anticuerpo de especificidad indeterminada
 - No reactivo con glóbulos rojos tratados con DTT
 - Exclusión serológica de anticuerpos contra antígenos de Kell y Lutheran



Caso Clínico1

- Panel de glóbulos rojos genotipados: sospecha de anti-Do^b
- PCR alelo-especifico (convencional)
- Genotipado del paciente: Do(a+b-)
- Genotipado de donantes con compatibilidad cruzada negativa: Do(a+b-)



Caso Clinico 2

- Paciente de 65 años, linfoma no-Hodgkin
- RAI: positivo
- Identificación de anticuerpos irregulares:
 - Panaglutinación fuerte intensidad
 - Autocontrol negativo
 - Reacción negativa con Rhnull y D-- glóbulos rojos

La biología molecular convencional
no será suficiente...



Caso Clínico 3

- Genotipado por array
 - *RHD* sin mutaciones y *RHCE***ce*/**ce*
- Secuenciación de Sanger
 - *RHCE***ceMO* en homocigosidad
 - hrS y Hr neg; hrB y HrB neg



Caso Clínico 3

- Donadora desde Chile, mujer
- Tipada como O RhD-
- En el tipaje Rh con outro reactivo:
 - RhD+ (3+ de aglutinación com anti-D)



Biología molecular
convencional?



NO

Caso Clínico 3

- PCR-real time
 - RHD intron4 y exon 7 → NEGATIVO
 - RhD- predicto
- RHCE DNA-array
 - *RHCE*cE/*ceAR*
 - *RHCE*ce48C,712G,733G,787G,800A,916G*
- *Predicto: RhD-; rr'' (C-, c+, e+, E+)*



Que extraño es eso

Caso Clínico 3

- Secuenciación Sanger
 - *RHD**deletado/*deletado
 - *RHCE**cE /
 - *RHCE* *ce697G,712G,733G,744C

BLOOD GROUP GENOMICS

Identification of six new *RHCE* variant alleles in individuals of diverse racial origin

Mindy Goldman,¹ Arantxa Cemborain,² Jacqueline Cote,¹ Rachid El Hamss,³ Robert L. Flower,⁴
Adirane Garaizar,³ Felix Garcia-Sanchez,⁵ Catherine A. Hyland,⁴ Monica Kalvelage,⁶
Donatella Londero,⁷ Genghis H. Lopez,⁴ Nicoletta Revelli,⁸ Pablo Rodriguez-Wilhelmi,²
Antonietta Villa,⁸ and Gorka Ochoa-Garay⁹

*RHCE**ce697G,712G,733G,744C

Case 5

The phenotype of a Caucasian prenatal patient by tube and gel column methods was C-, c+, E-, e+. In addition, RBCs were weakly reactive with an anti-D reagent (see Materials and Methods). In apparent contrast, genotyping on BLOODchip Reference found both *RHD* alleles to be deleted. Genotyping also detected *RHCE**c and *RHCE**e alleles and variant sequence at positions c.712 and c.733. Full-gene *RHCE* sequencing identified heterozygous c.697C/G (p.Gln233Glu), c.712A/G (p.Met238Val), c.733C/G (p.Leu245Val), and c.744T/C (p.Ser248Ser) on a *RHCE**ce background. Sequencing of a c.697G- and c.744C-specific PCR product found all four variant positions to be in *cis* (data not shown). Although CE>D substitutions at positions c.697, c.712, and/or c.733 are typically found in Blacks (e.g. *RHCE**ceAR), they have also been reported in Caucasians, as exemplified by the *RHCE**cE(697G,712G,733G) allele.^{6,7} Of note, most *RHCE* alleles with c.697G, c.712G, and/or c.733G reported in Blacks also carry the c.48C sequence. *RHCE**ceCF, a variant allele found in people of African descent and reported to encode a partial D-like antigen,⁸ shares c.697G and c.733G with *RHCE**ce697G,712G,733G,744C. This suggests that c.697G and/or c.733G play a key role in the formation of a D-like epitope.

“...Formation of a D like epitope”



Caso Clinico 4

- Mujer embarazada sensibilizada con Ac contra antígeno de alta frecuencia
 - Anti-Vel??
 - Muestra para investigación molecular
- Recién nacido con anemia profunda
 - Aumento rápido de la bilirrubina
 - Necesidad urgente de transfusión



¡Hay! Faltaba la latina

Panel- GR	AGH /Liss	Papaína
1	3+	4+
2	3+	4+
3	3+	4+
4	3+	4+
5	3+	4+
6	3+	4+
7	3+	4+
8	3+	4+
9	3+	4+
10	3+	4+
11	3+	4+
AC	0	0



Predicción del fenótipo
mediante genotipificación:

Vel+

Biología molecular – DNA array

- *RHCE*ceAR/*ceAR*
- Fenotipo previsto: hrS y Hr negativos



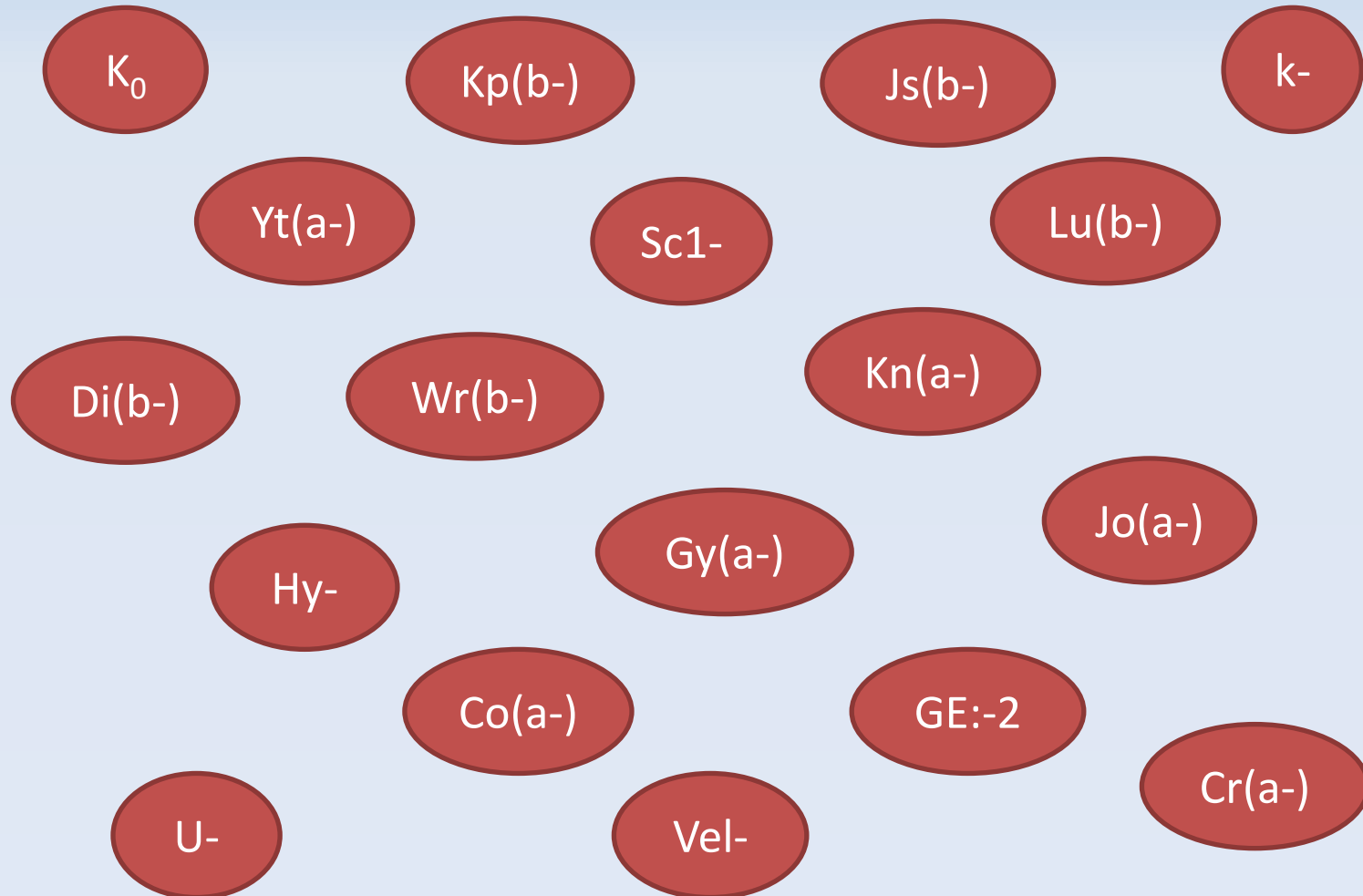
¿Existe alguna otra alternativa?

- Mujer embarazada sensibilizada con Ab contra antígeno de alta frecuencia
 - Anti-Vel??
 - Muestra para investigación molecular
- *RHCE*ceAR* en homocigosidad
 - Anti-hrS y anti-Hr
- Recién nacido con anemia profunda
 - Aumento rápido de la bilirrubina
 - Transfusión de glóbulos rojos de la madre



BUSCA DE DOADORES RAROS

Ausencia de antígeno poblacional de alta frecuencia



Ausencia de antígeno poblacional de alta frecuencia

**Mayor relevancia
para transfusión**

K₀

Js(b-)

k-

Kp(b-)

Di(b-)

U-

Vel-

Hy-

GE:-2

Jo(a-)

**Relevancia para la transfusión
variable**

Yt(a-)

Sc1-

Lu(b-)

Co(a-)

Wr(b-)

Kn(a-)

Gy(a-)

Cr(a-)

Distribución en la población



Di(b-)

Js(b-)

Jo(a-)

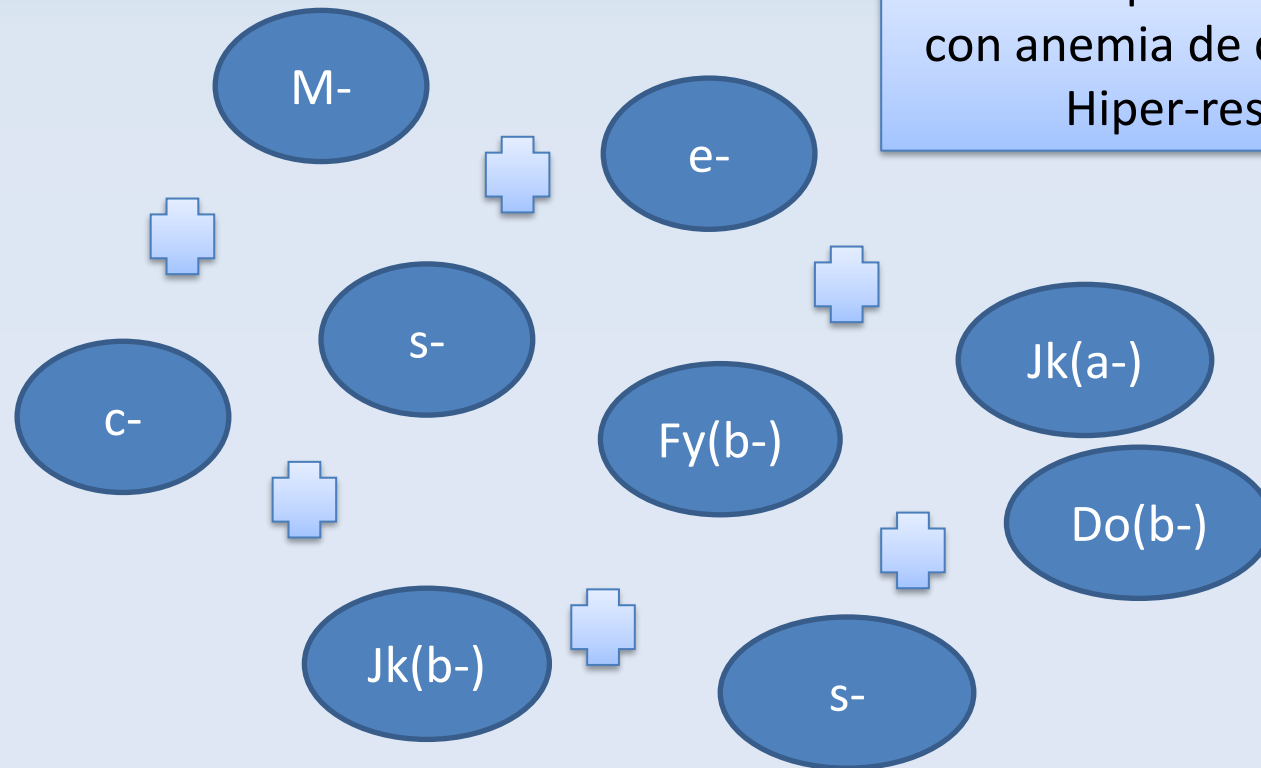
Hy-

U-



Población brasileña muy heterogénea
Raza autodeclarada de dudoso valor

Suma de múltiples fenotipos inusuales



Problema potencial en los pacientes
con anemia de células falciformes
Hiper-respondedores

Búsqueda de donantes raros

Fenotipado



Biología molecular

Microarray



PCR convencional

SNaqshot

Taqman Real Time PCR



Secuenciación



Métodos Moleculares - Microarray

Ventajas

Múltiples antígenos y donantes por ensayo

Independiente de antisueros

5000
donantes

PRÓ SANGUE
HEMOCENTRO DE SÃO PAULO



3 k-	2 Co(a-b+)
1 Kpa(a+b-)	9 Yt(a-b+)
6 Js(a+b-)	6 Kn(a-b+)
5 Lu(a+b-)	
1 Di(a+b-)	
1 Joa-	

Métodos Moleculares - Microarray

Desventajas

Costo de la extracción de ADN

Caracterización molecular de múltiples donantes
para identificar un caso raro

La asociación con la serología es esencial para
optimización de herramientas

Fenotipos de ascendencia africana

Raza autodeclarada



- R0r (C-, E-) + Jk(b-) + Fy(b-)
- Fy(a-b-)
- S-s-

Variantes
RHCE

Hy-, Jo(a-);U-; Js(b-)

Effectiveness of strategies to screen for blood donors with *RH* variants in a mixed population

[Fabio Augusto Abreu de Almeida](#) • [Marcia Regina Dezan](#) • [Valeria Brito Oliveira](#) • ... [Vanderson Rocha](#) • [Alfredo Mendrone-Júnior](#) • [Carla Luana Dinardo](#)   • [Show all authors](#)

Published: January 14, 2020 • DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102720> •



- 2.500 donantes
- 217 R0 o R1 negro autodeclarado
- 12 Donantes hrS o hrB negativos
-
- ~70% con fenotipo Duffy null Fy(a-b-)

Fenotipos varios

Screening con antiéticos
de baja frecuencia:

Kp(a+)

K+

Di(a+)

Lu(a+)



Screening con
antisueros

Vel-

Ge-2

Lu(b-)

Yt(a-)

Confirmación
Molecular

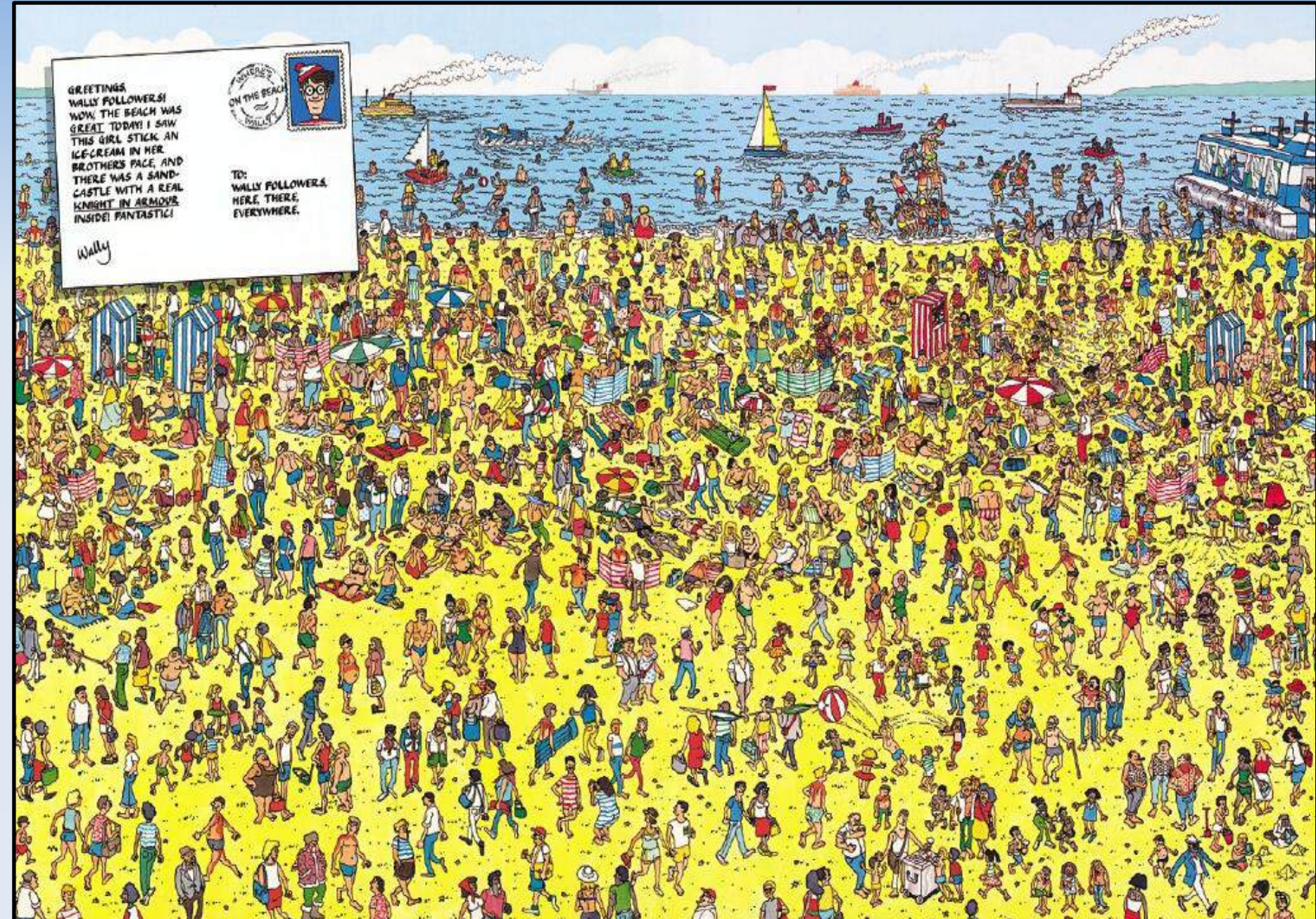


GREETINGS
WALLY FOLLOWERS!
WOW, THE BEACH
IS GREAT TODAY! I SAW
THIS GIRL STICK AN
ICE-CREAM IN HER
BROTHER'S FACE, AND
THERE WAS A SAND-
CASTLE WITH A REAL
KNIGHT IN ARMOR
INSIDE! FANTASTIC!

Wally

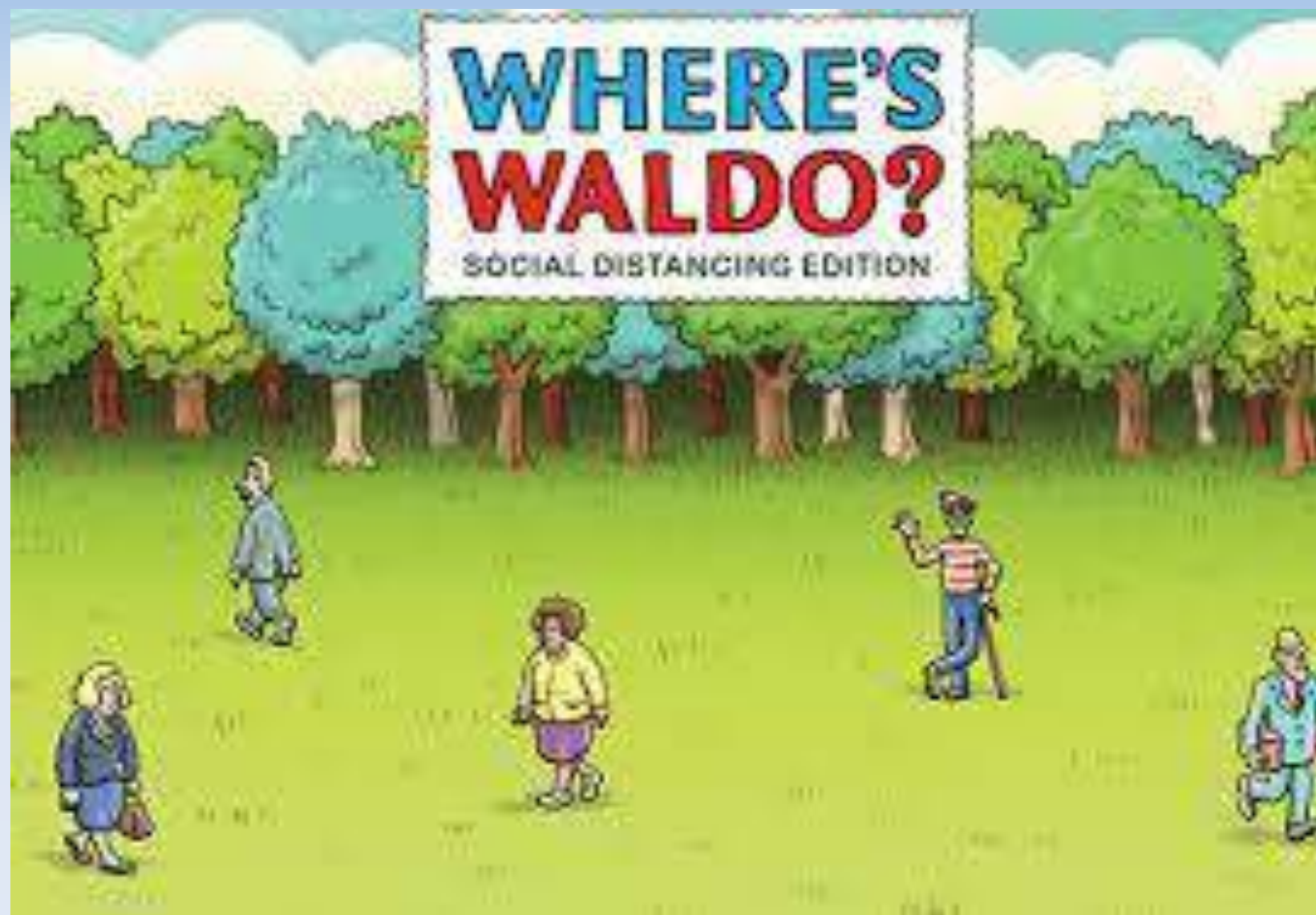


TO:
WALLY FOLLOWERS.
HERE, THERE,
EVERYWHERE.



WHERE'S WALDO?

SOCIAL DISTANCING EDITION



Real Time PCR



¿Por qué no buscar la ausencia
de los antígenos donantes
en pool?

Real Time PCR → Fenótipo Vel-

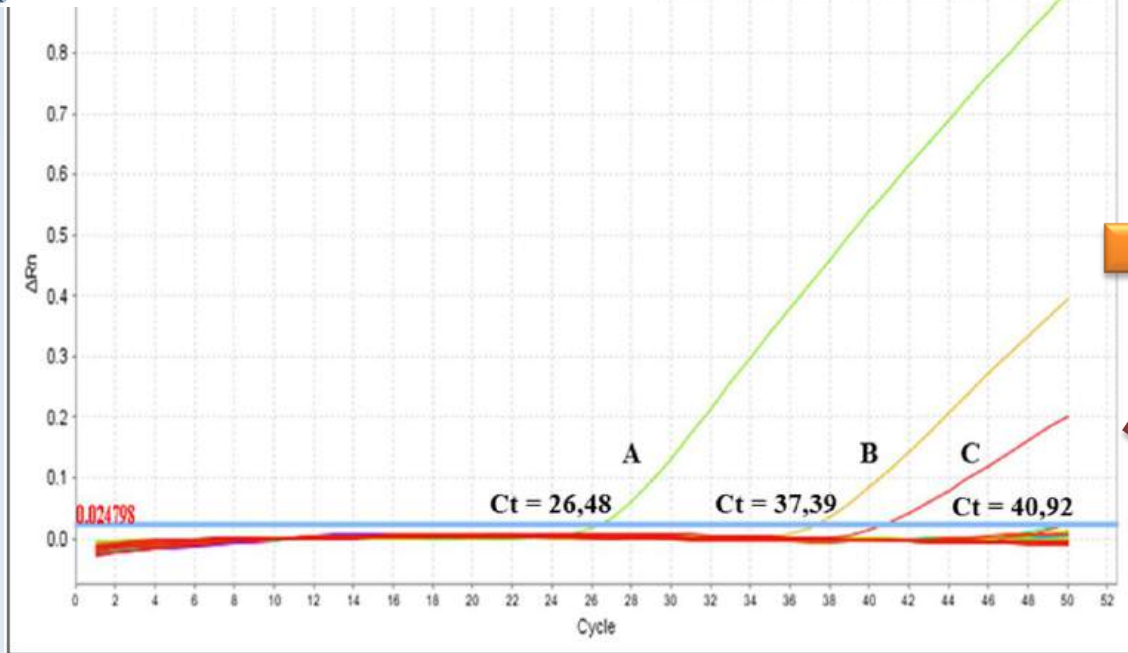
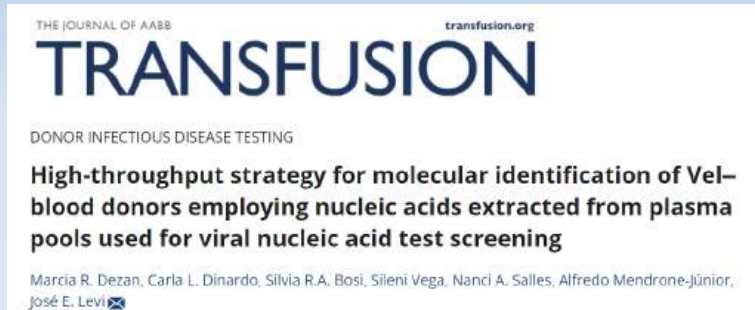
Fenótipo Vel- → Deleção 17nt éxon3 do gene SMIM1

```
CATCCGCTTGTTTTACAGTGAAGCCACAGCCTGGCCACCTGTCTTGATCTCCCCACCGAGAAGGCCCCGC  
CCCTCCCGCTGCAGCCCCACAGCATGCAGCCCCAGGAGAGCCACGTCCACTATAGTAGGTGGGAGGACGG  
CAGCAGGGACGGAGTCAGCCTAGGGGCTGTGTCCAGCACAGAAGAGGCCTCACGCTGCCGCAGGTGAGGG
```

Deleção 17nt



Real Time PCR → Fenotipo Vel-



Genotipagem em tempo real usada para detectar a deleção de 17 nt no éxon 3 do *SMIM1*.

A. gDNA Vel- B. DNA de plasma Vel- C. DNA de pool de plasma com 1 amostra Vel-.

gDNA Vel-

DNA plasma
Vel-

DNA plasmático
Pool 6 donantes
1 Vel-

PCR en tiempo real com ADN residual da rotina NAT viral

Genotipado de donantes en un pool por PCR en tiempo real con excedentes de ADN

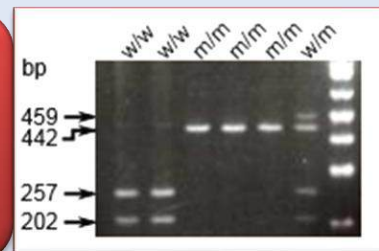
Pool +

Descomposición del pool:
extracción manual de ADN

Genotipado individual por PCR en tiempo real

Identificación del donante con la deleción de 17 nt

Genotipado de donantes por PCR RFLP



Confirmación de la deleción homocigota de 17nt

Real Time PCR

Ventajas

Económicamente muy atractivo

Permite el genotipado de múltiples donantes por ensayo

Genotipado de donantes en pools

Alternativa cuando hay una búsqueda de un fenotipo específico

Real Time PCR

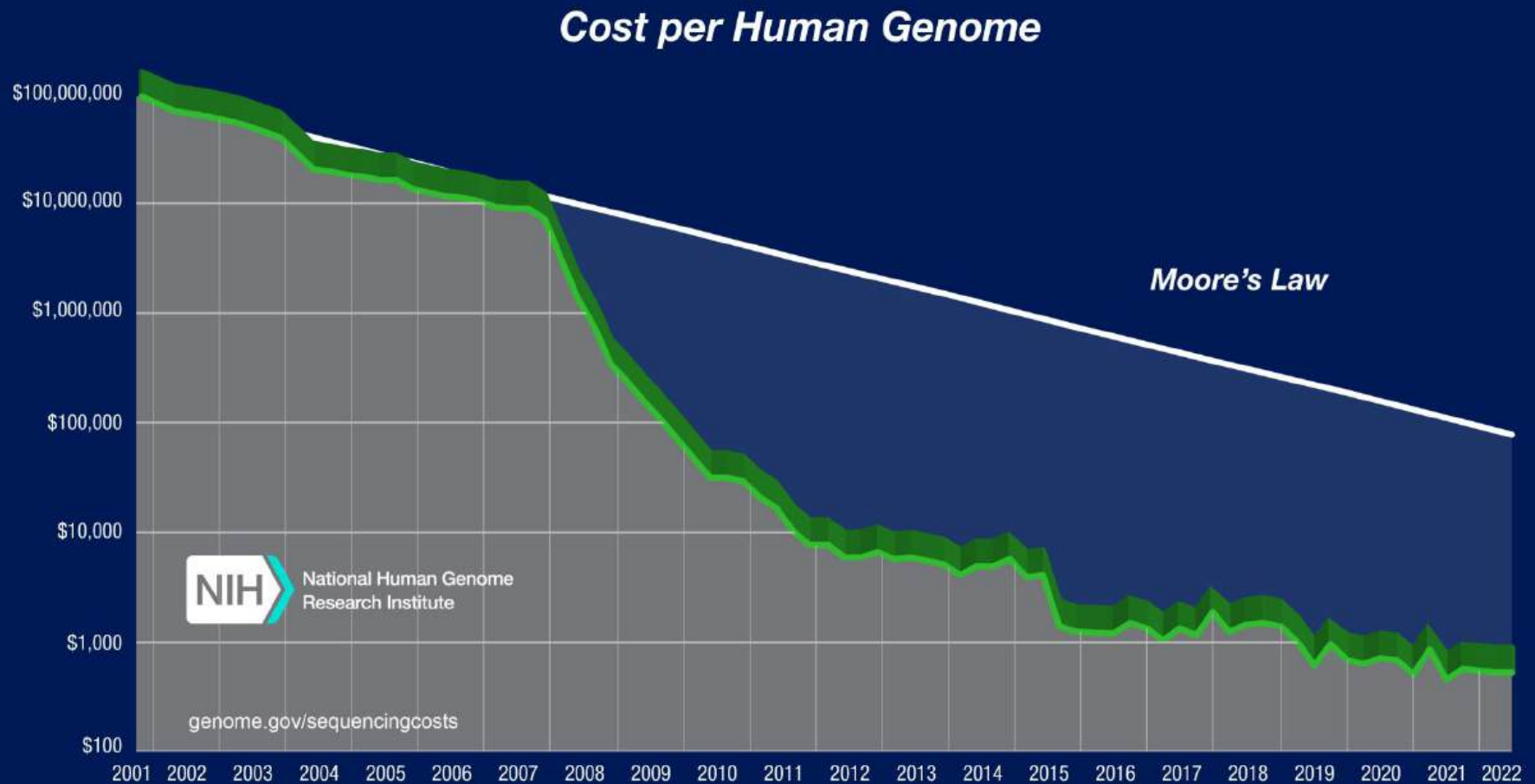
Desventajas

Difícil selección de antígenos

Solo unas pocas variaciones moleculares permiten este enfoque

No evalúa simultáneamente otros antígenos de eritrocitos

Sequenciamento Genoma Humano



Secuenciación del genoma completo

RESEARCH ARTICLE

Blood group typing from whole-genome sequencing data

Julien Paganini¹, Peter L. Nagy^{2a}, Nicholas Rouse², Philippe Gouret¹, Jacques Chiaroni³, Christophe Picard³, Julie Di Cristofaro^{3*}

93% de acuerdo con SNAp-shot

Necesita una profundidad 15x

Posibilidad de búsqueda de donantes raros

Table 2. Blood group typing by WGS analysis.

Gene	Polymorphism	Homozygous positions			Heterozygous positions		
		Correct typing	Incorrect typing	ND	Correct typing	Incorrect typing	ND
KEL	KEL (578C>T)	70		5	2	1	1
	KEL (1790T>C)	69		3			
ACKR1 (FY)	ACKR1 (-67T>C)	64		8			
	ACKR1 (125G>A)	32		3	26	1	3
	ACKR1 (265C>T)	61		4			
SLC14A1 (JK)	SLC14A1 (838G>A)	37		4	32	1	4
ACHE (YT)	ACHE (1057C>A)	60		8	10		1
ART4 (DO)	ART4 (793A>G)	36		3	31	1	1
	ART4 (323G>T)	68		4			
	ART4 (350C>T)	76		3			
CD44 (IN)	CD44 (137G>C)	70		2			
AQP1 (CO)	AQP1 (134C>T)	75		4			
SLC4A1 (DI)	SLC4A1 (2561C>T)	76		1	1	1	
ICAM4 (LW)	ICAM4 (299A>G)	71		1			
Total		865		53	102	5	10

Validation of WGS-based blood group typing according to SNApshot results (N: Number, ND: Not defined, unresolved).



Conclusões

Los métodos moleculares son herramientas importantes para la búsqueda de donantes raros y resolución de casos complejos

Técnica de Microarray

- ✓ Genotipado de antígenos eritrocitarios relevantes
- ✓ Opciones comerciales

Secuenciación del genoma completo

Identificación de nuevas variantes nulas
Precio progresivamente reducido



caludinardo@gmail.com

GRACIAS

