

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PESQUISA DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS HUMANOS
EM MACACOS-PREGO (*Sapajus sp*) E EM MACACOS BUGIOS
(*Alouatta sp*)

ADAIZE PEREIRA DA SILVA

Botucatu – SP
2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PESQUISA DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS HUMANOS
EM MACACOS-PREGO (*Sapajus sp*) E EM MACACOS BUGIOS
(*Alouatta sp*)

ADAIZE PEREIRA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Animais Selvagens
para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Doutora Lucilene Silva
Ruiz e Resende

Co-orientadora: Doutora Patrícia Carvalho
Garcia

FICHA CATALOGráfICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Adaize Pereira da.

Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em
Macacos-Prego (*Sapajus sp*) e em Macacos Bugios (*Alouatta sp*)
/ Adaize Pereira da Silva. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Lucilene Silva Ruiz e Resende

Coorientador: Patrícia Carvalho Garcia

Capes: 40101053

1. Primatas. 2. Cebus. 3. Bugio. 4. Antígenos. 5. Sangue.
6. Grupos sanguíneos.

Palavras-chave: Antígenos eritrocitários; Macaco bugio;
Macaco-prego; Primatas brasileiros; Sangue.

Nome do autor: **Adaize Pereira da Silva**

**TÍTULO: PESQUISA DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS
HUMANOS EM MACACOS-PREGO (*Sapajus sp*) E EM
MACACOS BUGIOS (*Alouatta sp*)**

COMISSÃO EXAMINADORA

Professora Assistente-Doutora Lucilene Silva Ruiz e Resende

Presidente e Orientadora

Disciplina de Hematologia do Departamento de Clínica Médica

Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB – UNESP – BOTUCATU

Doutora Carolina Bonet Bub

Responsável Médica pelo Setor de Imuno-Hematologia do Banco de Sangue

Hospital Israelita Albert Einstein – SÃO PAULO

Professor Adjunto Luiz Carlos de Mattos

Biólogo Responsável pelo Laboratório de Imunogenética do Departamento de

Biologia Molecular – FAMERP – SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Data da Defesa: 29 de junho de 2017

Agradecimentos

A Deus pelo discernimento, sabedoria e paciência para a concretização desse objetivo.

Aos meus pais, Manoel e Diva (*in memoriam*), que me ensinaram a ousar, questionar, a ser forte e enfrentar qualquer situação com muita paciência e sabedoria.

Aos meus filhos amados Bruno, Diogo e Thaís que sempre me incentivaram nos meus estudos e estão sempre presentes.

Às minhas noras e genro: Michele, Melina e José William pelo apoio durante esses anos.

Aos amigos que são muitos, eterno carinho.

À Professora Doutora Lucilene Silva Ruiz e Resende, minha Orientadora, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela sensibilidade e confiança, e por ser minha maior incentivadora na superação dos meus limites.

À Professora Doutora Patrícia Carvalho Garcia, minha Co-orientadora, pela eficiência e ousadia, e por sempre levantar minha autoestima.

Ao Aluno de Medicina Francisco Sznechuk de Oliveira, bolsista FAPESP no projeto, pelo companheirismo nas horas de trabalho e estudo.

Aos Professores, Residentes e Funcionários do CEMPAS e da Pós-Graduação da FMVZ-UNESP pelo profissionalismo, eficiência e gentileza, em especial, a Natália Diez Murolo e Renato Rebecchi, que não mediram esforços para auxiliar na coleta dos materiais, e a Laís Melício sempre muito gentil, disponível e prestativa.

A todos os Profissionais e Amigos da Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas da FMB-UNESP, que sempre torceram por mim, em especial, à Doutora Valéria Nogueira Dias Paes Secco que, com carinho, sempre se fez presente.

Ao Médico Hemoterapeuta, Doutor José Mauro Zanini que, como Diretor da Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas da FMB-UNESP à época da elaboração deste projeto, apoiou incondicionalmente a sua execução.

Ao Laboratório BIO-RAD Laboratories (DiaMed Latino América S.A., Distrito Industrial, Lagoa Santa – MG, Brasil) e a sua Representante no Brasil, Empresa pH 7 Comércio e Representações Ltda, pela doação dos *kits* para imunofenotipagem eritrocitária e demais materiais de consumo utilizados no estudo.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 Breve histórico da evolução da transfusão sanguínea	7
2.2 Principais sistemas de grupos sanguíneos humanos e seus antígenos de maior importância transfusional.....	12
2.2.1 Sistemas de grupos sanguíneos ABO e H	14
2.2.2 Sistema de grupo sanguíneo Rh	15
2.2.3 Sistema de grupo sanguíneo Lewis	15
2.2.4 Sistema de grupo sanguíneo P	16
2.2.5 Sistema de grupo sanguíneo Kell	17
2.2.6 Sistema de grupo sanguíneo Duffy	17
2.2.7 Sistema de grupo sanguíneo Kidd	17
2.2.8 Sistema de grupo sanguíneo MNS	18
2.2.9 Sistema de grupo sanguíneo Lutheran	18
2.2.10 Sistema de grupo sanguíneo Diego	19
2.3 Os macacos-prego: gênero <i>Sapajus sp</i>	20
2.4 Os macacos bugios: gênero <i>Allouata sp</i>	20

2.5	Revisão sobre fenotipagem eritrocitária em macacos do Novo Mundo	21
.....		
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo Geral	26
3.2	Objetivos Específicos	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Animais e ambiente de experimentação	28
4.2	Contenção química dos animais	29
4.3	Material e Métodos	29
4.3.1	Técnica da Prova Direta para tipagem ABO (antígenos A, B e AB) e Rh (antígeno D)	31
4.3.2	Técnica de tipagem A ₁ e H	32
4.3.3	Técnica de Prova Reversa para tipagem ABO (anticorpos anti-A ₁ e anti-B)	33
4.3.4	Técnica de fenotipagem Rh (antígenos C, E, c, e) e Kell (antígeno K)	34
4.3.5	Técnica de fenotipagem para “PERFIL – I” (antígenos P ₁ , Le ^a , Le ^b , Lu ^a , Lu ^b , Controle) e “PERFIL – II” (antígenos k, Kp ^a , Kp ^b , Jk ^a , Jk ^b , Controle)	35
4.3.6	Técnica de fenotipagem para “PERFIL – III” (antígenos M, N, S, s, Fy ^a e Fy ^b)	36
4.3.7	Técnica de fenotipagem para o grupo Diego (antígeno Di ^a)	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Resultados referentes aos macacos-prego (<i>Sapajus sp</i>)	39
5.2	Resultados referentes aos macacos bugios (<i>Alouatta sp</i>)	54
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÕES	85
8	REFERÊNCIAS	87

9 ANEXOS	96
10 PUBLICAÇÃO.....	110

Lista de Abreviaturas

Sapajus sp - gênero *Sapajus sp* (macaco-prego)

A. guariba – espécie *Alouatta guariba* (macaco bugio ruivo)

A. caraya–espécie *Alouatta caraya* (macaco bugio preto)

FMB – Faculdade de Medicina de Botucatu

UNESP – Universidade Estadual Paulista

PC – Prova de Compatibilidade

Fy^a, Fy^b – Antígenos do Sistema Duffy (Duffy a, Duffy b)

sp– espécie

CEMPAS – Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Rh – Fator Rh, derivado de Rhesus

A, A₁, B, AB – Antígenos do Sistema ABO

D, C, c, E, e – Antígenos do Sistema Rh

K, k, Kp^a, Kp^b – Antígenos do Sistema Kell, também designados por Kell ou K1, Cellano ou K2, K3 e K4, respectivamente

Jk^a, Jk^b – Antígenos do Sistema Kidd (Kidd a, Kidd b)

Le^a, Le^b -Antígenos do Sistema Lewis (Lewis a, Lewis b)

P₁ – Antígeno do Sistema P

M, N, S, s – Antígenos do Sistema MNS

Lu^a, Lu^b – Antígenos do Sistema Lutheran (Lutheran a, Lutheran b)

Di^a – Antígeno do Sistema Diego (Diego a)

H – Antígeno do Sistema H

FUT1 – Gene relacionado à produção do antígeno H, situado no cromossomo 19

Se – Gene Secretor

FUT2 – Gene relacionado à produção do antígeno H-Se, situado no

cromossomo 19

RhD – Proteína integral da membrana do eritrócito onde estão situados os antígenos do Sistema Rh

RhCE - Proteína integral da membrana do eritrócito onde estão situados os antígenos do Sistema Rh

RHD – Gene que codifica para a proteína RhD, situado no cromossomo 1

RHCE – Gene que codifica para a proteína RhCE, situado no cromossomo 1

RhAG – Glicoproteína Rh associada

RHAG – Gene que codifica para a proteína RhAG

FUT3 -Gene relacionado à produção dos antígenos Lewis, situado no cromossomo 19

(a+b+) – Designação para fenótipo decorrente de 2 genes alelos presentes

(a+b-) ou **(a-b+)** - Designação para fenótipo decorrente de 1 gene presente

(a-b-) -Designação para fenótipo decorrente de 2 genes alelos ausentes

H-Se – Antígeno H secretor

B3GALT3 – Gene situado no cromossomo 3

KEL – Gene que codifica para as proteínas Kell (antígenos), situado no cromossomo 7

XK – Proteína precursora que interage com as glicoproteínas Kell

FY - Gene que codifica para as proteínas Duffy (antígenos), situado no cromossomo 1

Darc – *Duffy Antigen Receptor for Chemokines*

JK - Gene que codifica para as proteínas Kidd (antígenos), situado no cromossomo 18

GYPA, GYPB, GYPE - Genes que codificam para as proteínas MNS (antígenos), situado no cromossomo 4

GPA, GPB, GPE – Glicoforinas A, B e E

Lu – Proteína relacionada ao Sistema Lutheran

B-CAMB -Proteína relacionada ao Sistema Lutheran

LU – Gene que codifica para as proteínas Lutheran (antígenos), situado no

cromossomo 19

SLC4A1 -Gene que codifica para a Banda 3 da membrana eritrocitária, relacionada às proteínas Diego (antígenos), situado no cromossomo 17

Di^b – Antígeno do Sistema Diego (Diego b)

HCO₃⁻ - íon bicarbonato

Cl⁻ - íon cloreto

CPB/ICMBio—Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

AcMo - Anticorpos monoclonais

CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

IBAMA – Instituto Brasileiro do meio Ambiente e Recursos Renováveis

INCT-CAS – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência dos Animais Selvagens

mG/Kg – miligramas por quilo

K₂ EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético di-potássico

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

BIO-RAD Laboratories – Laboratório fabricante de produtos para diagnósticos clínicos e pesquisa das ciências da vida

μL – microlitro

LISS - Solução de Baixa Força Iônica

rpm— rotações por minuto

NaCl – Cloreto de sódio

Plasmodium sp – Gênero *Plasmodium sp*

CAM- Molécula de adesão celular

HUT11 – Gene que codifica proteína transportadora de ureia relacionada às proteínas Kidd, situado no cromossomo 18

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

Lista de Figuras

Figura 1. Macaco-prego (<i>Sapajus sp</i>) na natureza.....	3
Figura 2. Macaco bugio ruivo (<i>Alouatta guariba</i>) na natureza.....	4
Figura 3. Macaco bugio preto (<i>Alouatta caraya</i>) em cativeiro.....	4
Figura 4. Papa Inocêncio VIII (papado de 1484 a 1492).....	7
Figura 5. 5A: Jean Baptiste Denys (1643 – 1704); 5B: Transfusão heteróloga de carneiro para humano.....	8
Figura 6.6A: James Blundell (1791 – 1878); 6B: Ilustração de transfusão homóloga direta entre humanos.....	9
Figura 7. 7A: Ilustração de técnica para transfusão de sangue braço-a-braço; 7B: Aparelho tipo Jubé para transfusão de sangue braço-a-braço (Paris, 1900 – 1945).....	9
Figura 8.8A: Karl Landsteiner (1868 – 1943); 8B: Macaco Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>).....	11
Figura 9. Esquema da membrana do eritrócito com suas proteínas integrais (Banda 3 e glicoforinas) [seta azul] e proteínas do citoesqueleto celular (α e β espectrina, actina, tropomiosina, proteína 4.1). Notar moléculas ligadas a proteínas integrais, correspondendo a alguns antígenos de diferentes grupos sanguíneos (seta verde).....	13
Figura 10. Representação esquemática de antígenos de grupos sanguíneos conforme suas funções biológicas. Alguns grupos representados não foram investigados no presente estudo.....	13
Figura 11. Macaco-Prego (<i>Sapajus sp</i>) na jaula do CEMPAS	39
Figura 12. 12A: Sistema ABO (tipagem direta sem bromelina - pesquisa dos antígenos A e B ausente (setas verdes) e pesquisa do antígeno AB presente (seta azul) nas hemácias do <i>Sapajus sp</i> 3 (setas azuis); 12B: Sistema ABO (tipagem direta com bromelina - pesquisa do antígeno A presente nas hemácias do <i>Sapajus sp</i> 3 (seta e círculo azul); 12C: Pesquisa do antígeno A ₁ negativa nos <i>Sapajus sp</i> 1 a 6 (setas azuis); 12D: Pesquisa do antígeno H negativa nos <i>Sapajus sp</i> 1 a 6 (setas azuis); 12E: Anticorpos para o sistema ABO (tipagem reversa – pesquisa dos anticorpos anti-A ₁ negativa e anti-B positiva no soro do <i>Sapajus sp</i> 3 (setas azuis).....	41

Figura 13. Sistema Rh (pesquisa do antígeno D negativa na amostra do <i>Sapajus sp</i> 5 – seta azul).....	43
Figura 14. Sistema Rh (pesquisa do antígeno E negativa nas amostras dos <i>Sapajus sp</i> 1 a 9 – setas azuis; pesquisa dos antígenos C, c, e positiva fraca nas amostras dos <i>Sapajus sp</i> 1 a 9 – setas verdes).....	44
Figura 15. 15A: Sistema P (pesquisa do antígeno P ₁ negativa no <i>Sapajus sp</i> 8 – seta azul); sistema Lewis (pesquisa dos antígenos Le ^a e Le ^b negativa no <i>Sapajus sp</i> 8 - setas azuis); sistema Lutheran (pesquisa dos antígenos Lu ^a e Lu ^b negativa no <i>Sapajus sp</i> 8 – setas azuis); 15B: Sistema M, N, S (pesquisa dos antígenos M, N, S, e s negativa no <i>Sapajus sp</i> 8 (setas azuis).....	46
Figura 16. Sistema Diego (pesquisa do antígeno Dia positiva nos <i>Sapajus sp</i> 1 a 6 – setas azuis).....	48
Figura 17. 17A: Sistema Kell (pesquisa do antígeno k positiva e pesquisados antígenos Kp ^a e Kp ^b negativa no <i>Sapajus sp</i> 1 – setas azuis); 17B: Sistema Kell (pesquisa do antígeno K negativa no <i>Sapajus sp</i> 1 – seta azul); 17C: Sistema Kidd (pesquisa do antígeno Jk ^a positiva e do antígeno Jk ^b negativa no <i>Sapajus sp</i> 3 – setas verdes); 17D: Sistema Duffy (pesquisa do antígeno Fy ^a negativa e do antígeno Fy ^b positiva no <i>Sapajus sp</i> 5 – setas vermelhas).....	50
Figura 18. Macaco bugio ruivo (<i>A. guariba</i>) capturado na jaula do CEMPAS e sedado para coleta de amostra sanguínea.....	54
Figura 19.19A: Sistema ABO (tipagem direta - pesquisa dos antígenos A, B e AB negativa) ausente nas hemácias do <i>Alouatta sp</i> 1 (setas azuis); 19B: anticorpos para o sistema ABO (tipagem reversa – pesquisa dos anticorpos anti-A ₁ e anti-B positiva) positivos no soro dos <i>Alouatta sp</i> 1 (setas azuis) e 2 (setas verdes); 19C: pesquisa do antígeno A ₁ negativa nos <i>Alouatta sp</i> 1 a 6 (setas azuis); 19D: pesquisa do antígeno H negativa nos <i>Alouatta sp</i> 1 a 6 (setas azuis).....	55
Figura 20.20A: Sistema Rh (pesquisa do antígeno D negativa no <i>Alouatta sp</i> 1 – seta azul); 20B: Sistema Rh (pesquisa dos antígenos C, c, E, e negativa no <i>Alouatta sp</i> 1 - setas azuis); 20C: Sistemas Lewis (pesquisa dos antígenos Le ^a e Le ^b negativa no <i>Alouatta sp</i> 1 – setas azuis) e sistema Lutheran (pesquisa dos antígenos Lu ^a e Lu ^b negativa no <i>Alouatta sp</i> 1 – setas verdes).....	57
Figura 21. 21A: Sistema P (pesquisa do antígeno P ₁ positiva no <i>Alouatta sp</i> 1 – seta azul); 21B: Sistema Diego (pesquisa do antígeno Di ^a positiva nos <i>Alouatta sp</i> 1 a 6 - setas azuis).....	59

Figura 22.22A: Sistema Kell (pesquisa do antígeno K negativa no *Alouatta sp* 1 – seta azul); **22B:** Sistema Kell (pesquisa dos antígenos Kp^a e Kp^b negativa no *Alouatta sp* 1 – setas azuis); Sistema Kidd (pesquisa do antígeno Jk^b negativa no *Alouatta sp* 1 – seta verde); **22C:** Sistema Duffy (pesquisa do antígeno Fy^a negativa no *Alouatta sp* 1 – seta azul)..... 61

Figura 23.23A: Sistema Kell (pesquisa do antígeno k positiva no *Alouatta sp* 1 – seta azul); Sistema Kidd (pesquisa do antígeno Jk^a positiva no *Alouatta sp* 1 – seta verde); **23B:** Sistema Duffy (pesquisa do antígeno Fy^b positiva no *Alouatta sp* 5 – seta azul)..... 62

Figura 24.24A: Sistema MNS (antígenos M e N negativos no *Alouatta sp* 3 – setas azuis); **24B:** Sistema MNS (antígeno S positivo no *Alouatta sp* 5 – seta azul); **24C:** Sistema MNS (antígeno S e s positivos no *Alouatta sp* 4 – setas azuis)..... 64

Lista de Tabelas

Tabela 1. Pesquisa de antígenos do sistema ABO através das técnicas direta (pesquisa de antígenos nas hemácias) e reversa (pesquisa de anticorpos no soro), e pesquisa do antígeno do sistema H, em 9 macacos-prego (<i>Sapajus sp</i>), mostrando 5 animais com fenótipo A, 4 com negatividade para antígenos ABO, antígeno H negativo em todos, e tipagem reversa compatível com a tipagem direta (exceto no filhote)	42
Tabela 2. Pesquisa dos antígenos do sistema Rh em 9 macacos-prego (<i>Sapajus sp</i>), mostrando concordância completa entre todos os animais, com negatividade para os antígenos D e E, e positividade fraca para os antígenos C, c, e.....	45
Tabela 3. Pesquisa dos antígenos dos sistemas Lewis, P, MNS e Lutheran em 9 macacos-prego (<i>Sapajus sp</i>), mostrando concordância completa entre os animais, com negatividade para todos os antígenos.....	47
Tabela 4. Pesquisa do antígeno Di ^a do sistema Diego em 9 macacos-prego (<i>Sapajus sp</i>), mostrando concordância completa entre os animais, com positividade para o antígeno.....	49
Tabela 5. Pesquisa de antígenos dos sistemas Kell, Kidd e Duffy em 9 macacos-prego (<i>Sapajus sp</i>), mostrando concordância completa entre todos os animais com positividade para os antígenos k, Jk ^a e Fy ^b , e negatividade para os demais.....	51
Tabela 6. Caracterização de 11 sistemas sanguíneos humanos em eritrócitos de 9 macacos-prego (<i>Sapajus sp</i>) segundo a presença completa e homogênea do antígeno do sistema (vermelho), a presença incompleta e homogênea dos antígenos do sistemas (azul), a presença incompleta e parcialmente homogênea/parcialmente heterogênea dos antígenos do sistema (rosa), e ausência completa e homogênea dos antígenos dos sistemas (verde).....	53
Tabela 7. Pesquisa de antígenos do sistema ABO através das técnicas direta (pesquisa de antígenos nas hemácias) e reversa (pesquisa de anticorpos no soro), e pesquisa do antígeno H, em 10 macacos bugios (<i>Alouatta sp</i>), mostrando concordância completa entre os animais, com negatividade para todos os antígenos, além de tipagem ABO reversa concordante com a tipagem ABO direta	56

Tabela 8. Pesquisa dos antígenos dos sistemas Rh, Lewis e Lutheran em 10 macacos bugios (<i>Alouatta sp</i>), mostrando concordância completa entre os animais, com negatividade para todos os antígenos.....	58
Tabela 9. Pesquisa dos antígenos dos sistemas P e Diego em 10 macacos bugios (<i>Alouatta sp</i>), mostrando concordância total entre os animais, com expressão de ambos os antígenos.....	60
Tabela 10. Pesquisa de antígenos dos sistemas Kell, Kidd e Duffy em 10 macacos bugios (<i>Alouatta sp</i>), mostrando concordância completa entre todos os animais com positividade para os antígenos k, Jk ^a e Fy ^b , e negatividade para os demais.....	63
Tabela 11. Pesquisa dos antígenos do sistema MNS em 10 macacos bugios (<i>Alouatta sp</i>), mostrando concordância completa entre os animais em relação aos antígenos M e N, com discordância parcial em relação aos antígenos S e S.....	65
Tabela 12. Caracterização de 11 sistemas sanguíneos humanos em eritrócitos de 10 macacos bugios (<i>Alouatta sp</i>) segundo a presença completa e homogênea dos antígenos dos sistemas (vermelho), a presença incompleta e homogênea dos antígenos dos sistemas (azul), a presença incompleta e parcialmente homogênea/parcialmente heterogênea dos antígenos do sistema (rosa), e ausência completa e homogênea dos antígenos dos sistemas (verde).....	67

DA SILVA, A.P. Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Prego (*Sapajus sp*) e em Macacos Bugios (*Alouatta sp*). Botucatu, 2017. 128p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Pesquisaram-se 28 antígenos eritrocitários pertencentes aos sistemas de grupos sanguíneos humanos ABO, H, Rh, Kell, Duffy, Kidd, Lewis, P, MNS, Lutheran e Diego, nos eritrócitos de 9 macacos-prego (*Sapajus sp*) e 10 macacos bugios (*Alouatta sp*). A maioria dos antígenos humanos pesquisados não foi observada nos 2 gêneros de macacos, correspondendo a 19/28 antígenos negativos nos *Sapajus sp*, e 20/28 antígenos negativos nos *Alouatta sp*. A fenotipagem eritrocitária foi bastante semelhante em cada grupo de animais, sendo que 5 macacos-prego diferiram dos outros 4 apenas no sistema ABO, e 3 macacos bugios diferiram dos demais 7 somente no sistema MNS. Houve diferenças antigênicas entre os gêneros em apenas 4 sistemas de grupos pesquisados (P, ABO, Rh, MNS). Constataram-se, nos animais, alguns antígenos eritrocitários com frequências semelhantes e outros com frequências opostas às observadas em humanos ou etnias humanas. Em comparação com estudos prévios envolvendo macacos-prego e macacos bugios, observou-se concordância quanto à presença ou ausência de alguns antígenos eritrocitários, e discordância em relação a outros. Que seja do nosso conhecimento, o presente estudo é o mais completo já realizado quanto ao número de antígenos eritrocitários pesquisados em macacos do Novo Mundo, especialmente em macacos brasileiros.

Palavras-chave: Primatas brasileiros; Macaco-prego; Macaco bugio; Antígenos eritrocitários; Sangue

DA SILVA, A.P. Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Prego (*Sapajus sp*) e em Macacos Bugios (*Alouatta sp*). Botucatu, 2017. 130p.Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the presence of 28 erythrocyte antigens of 11 human blood groups systems (ABO, H, Rh, Kell, Duffy, Kidd, Lewis, P, MNS, Lutheran and Diego) on erythrocytes of 9 nail monkeys (*Sapajus sp*) and 10 howler monkeys (*Alouatta sp*). Most of the human erythrocyte antigens were not observed in the 2 genera of monkeys, corresponding to 19/28 negative antigens in *Sapajus sp*, and 20/28 negative antigens in *Alouatta sp*. Erythrocyte phenotyping was very similar in each group, being that 5 nail monkeys differed from the other 4 only for the ABO system, and 3 howler monkeys differed from the other 7 only for the MNS system. Antigenic differences between the 2 genera were observed only for 4 blood groups systems (P, ABO, Rh, MNS). This study revealed that some monkey erythrocyte antigens were similar in frequency, and others were in opposite frequency from those observed in human or human ethnicities. When this study is compared with previous similar studies some concordance and some disagreement of findings are found, but as far as we known our study is the most complete in relation to the number of investigated erythrocyte antigens in New World monkeys, specially in the Brazilian ones.

Key words: Brazilian primates; Nail monkey; Howler monkey; Erythrocyte antigens; Blood

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O avanço de técnicas transfusionais em humanos, do início do século XX aos dias atuais, permitiu o desenvolvimento paralelo das transfusões sanguíneas em medicina veterinária. Tal procedimento vem gradualmente se tornando prática rotineira, tanto na clínica de pequenos quanto de grandes animais, sobretudo a partir dos anos 90 (SILVA, 2011). No Brasil, os testes para tipagens sanguíneas de animais não costumam ser disponíveis, sendo rotineiramente realizada apenas a prova de compatibilidade ou prova cruzada entre o sangue dos potenciais doadores e o sangue do receptor, para se prever eventuais reações transfusionais. A ocorrência de aglutinação da amostra do receptor nesse teste, indica transfusão incompatível, não devendo a mesma ser realizada (ROCHA et al, 2009).

Estudos mais detalhados, envolvendo a caracterização da fenotipagem eritrocitária de algumas espécies animais já têm sido realizados, inclusive no Brasil, sendo hoje conhecidos diferentes grupos sanguíneos de felinos, caninos, suínos, caprinos, ovinos, equinos e bovinos, bem como de algumas aves domésticas (REICHMAN & DEARO, 2001; MARTINS, 2011; ARRUDA, 2014; FOSSET & BLAIS, 2014; SILVA et al, 2016). Entretanto, estudos sobre transfusões e/ou fenótipos eritrocitários em animais selvagens ainda são incomuns (SILVA, 2011; ARRUDA, 2014; NOVAIS et al, 2005; RAMIS et al, 2013) e, na maioria das vezes, se referem também a transfusões baseadas apenas em provas de compatibilidade (PC), incluindo transfusões interespecies (REICHMAN e DEARO, 2001; ARRUDA, 2014).

No Brasil, encontramos estudo da tipagem sanguínea de gatos mouriscos, jaguatiricas e gatos palheiros (SILVA, 2011), pesquisa de antígenos eritrocitários em lobos-guará e cachorros-do-mato (NOVAIS et al, 2005) e dos antígenos eritrocitários Fy^a e Fy^b (Sistema Duffy) em tatus (SILVA et al, 2005).

Em relação aos primatas, alguns autores investigaram a presença de antígenos eritrocitários humanos nos eritrócitos de primatas não-humanos

do Velho Mundo, incluindo gorilas, gibões, orangotangos, chimpanzés, macacos Rhesus, babuínos e cinomolgos (PALATINK & ROWE, 1984; SOCHA & RUFFIÉ, 1990; WESTHOFF, 1993; BLANCHER et al, 1996; RAMIS et al, 2013; GAMBLE et al, 2010). Esse tipo de estudo é raro em macacos do Novo Mundo (PALATINK & ROWE, 1984; RAMIS et al, 2013).

No Brasil, são conhecidos 139 taxa de primatas, muitos deles em risco de extinção (CPB/ICMBio, 2013). Não encontramos estudos relacionados a antígenos eritrocitários conduzidos em primatas não-humanos brasileiros.

O presente estudo pretendeu investigar a presença de 28 antígenos eritrocitários de importância transfusional em humanos, nos eritrócitos dos primatas não-humanos conhecidos como macacos-prego (*Sapajus sp*) [Figura 1] e macacos bugios (*Alouatta sp*) [Figuras 2 e 3].



FIGURA 1 – Macaco-prego (*Sapajus sp*) na natureza.



FIGURA 2 – Macaco bugio ruivo (*Alouatta guariba*) na natureza.

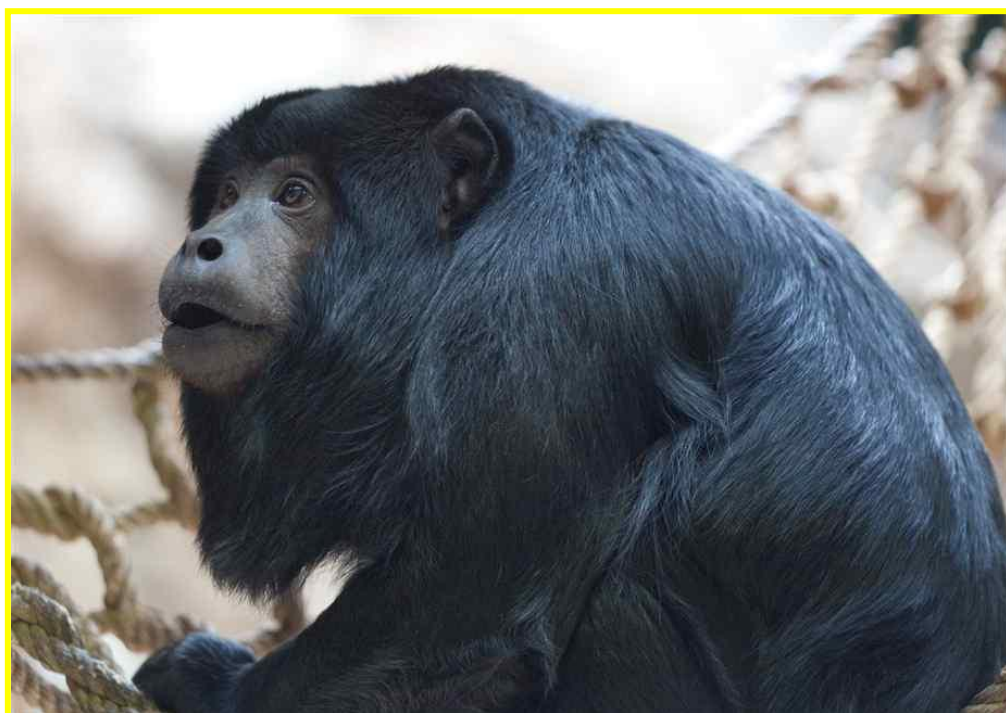


FIGURA 3 - Macaco bugio preto (*Alouatta caraya*) em cativeiro.

O CEMPAS – Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP - Botucatu recebe animais selvagens, incluindo espécies de primatas, capturados ilegalmente, com doenças ou agravos à saúde, para que recebam atendimento veterinário com suporte laboratorial e acompanhamento biológico, visando a plena recuperação dos mesmos. Há situações onde tais animais, incluindo espécies em risco de extinção, necessitam de transfusões sanguíneas, particularmente quando são vítimas de maus-tratos, atropelamentos, ou quando necessitam de intervenção cirúrgica.

A segurança na medicina transfusional envolve, além do uso de componentes sanguíneos de qualidade, a manutenção da integridade do processo de transfusão, que vai desde a coleta no doador, até a avaliação pós-transfusional no receptor. A determinação do perfil antigênico eritrocitário através da fenotipagem, tanto em doadores como em receptores de sangue, é importante para a prevenção de aloimunização e para a identificação de anticorpos irregulares adquiridos. Juntamente com a PC, a tipagem sanguínea é a principal forma de assegurar que uma transfusão seja bem sucedida.

Estudos como este, nos gêneros *Sapajus sp* e *Alouatta sp*, podem contribuir para o aperfeiçoamento das práticas transfusionais nos animais selvagens em geral, e nos primatas em particular, auxiliando no atendimento de excelência a tais animais e na preservação de suas espécies. Além disso, dada a importância filogenética existente entre primatas, humanos e não humanos, estudos como o presente podem resultar em descobertas importantes para a primatologia, tanto em aspectos científicos quanto em aspectos antropológicos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Breve histórico da evolução da transfusão sanguínea

A história da transfusão de sangue divide-se em dois períodos: um empírico, que vai até 1900, e outro científico, de 1900 em diante (JUNQUEIRA et al, 2005).

A crença de que o sangue sustenta a vida e é capaz de salvá-la vem de tempos remotos. Foram necessários séculos de empirismo e pesquisas, erros e acertos, para se descobrir a real importância do sangue e seu uso adequado. O escritor italiano Stefano Infessura (1435 – 1500) relatou que, em 1492, o Papa Inocêncio VIII (**Figura 4**) teria recebido sangue de três jovens doadores, por via oral, o que teria resultado na morte dos quatro indivíduos. Nessa época, os conceitos de circulação sistêmica e de injeção intravenosa ainda não eram conhecidos, já que foram descritas por Willian Harvey e Christopher Wren, respectivamente, apenas em 1628 e 1656 (MARTINS, 2011).



FIGURA 4 - Papa Inocêncio VIII (papado de 1484 a 1492).

No século XVII (1665), Richard Lower realizou transfusões de sangue heterólogas entre animais, em Oxford. Na mesma época, o médico francês Jean Baptiste Denys (**Figura 5A**) realizou infusão de sangue de carneiro (**Figura 5B**) em um doente mental, que veio a falecer. Denys defendia a transfusão heteróloga, argumentando que o sangue de origem animal era “menos contaminado por vícios e paixões”, podendo curar certos males humanos (ROCHA et al, 2009).



FIGURA 5–5A: Jean Baptiste Denys (1643 – 1704); **5B:** Transfusão heteróloga de carneiro para humano.



Em 1788, Pontick e Landois, realizaram transfusões homólogas bem sucedidas entre animais. A primeira transfusão homóloga entre humanos é atribuída a James Blundell (**Figura 6A**), em 1818. Tendo já utilizado tal técnica entre animais com sucesso, Blundell transfundiu mulheres com hemorragias pós-parto (**Figura 6B**) [ROCHA et al, 2009].

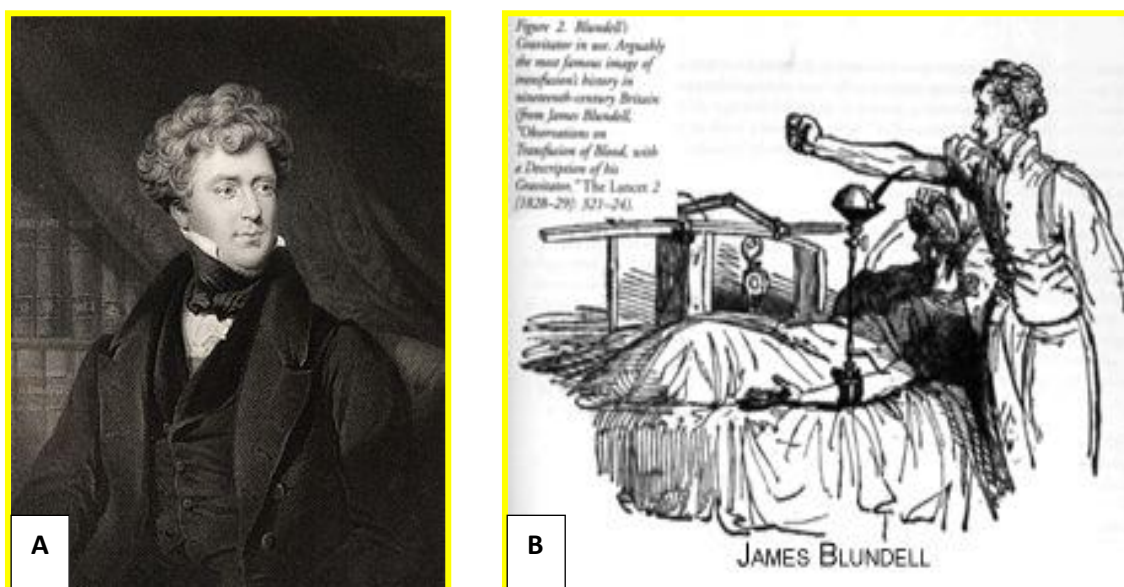


FIGURA 6–6A:James Blundell (1791– 1878); **6B:** Ilustração de transfusão homóloga direta entre humanos.

Apesar dos avanços, problemas relacionados à coagulação do sangue e a reações adversas continuavam a desafiar os pioneiros na técnica da transfusão. Em 1869, Braxton Hicks indicou o uso de fosfato de sódio como um anticoagulante supostamente atóxico. Paralelamente, desenvolviam-se técnicas e equipamentos (**Figuras 7A e 7B**) para realizar transfusões diretas e indiretas, tendo as primeiras ficado conhecidas como transfusão braço-a-braço (ROCHA et al, 2009).

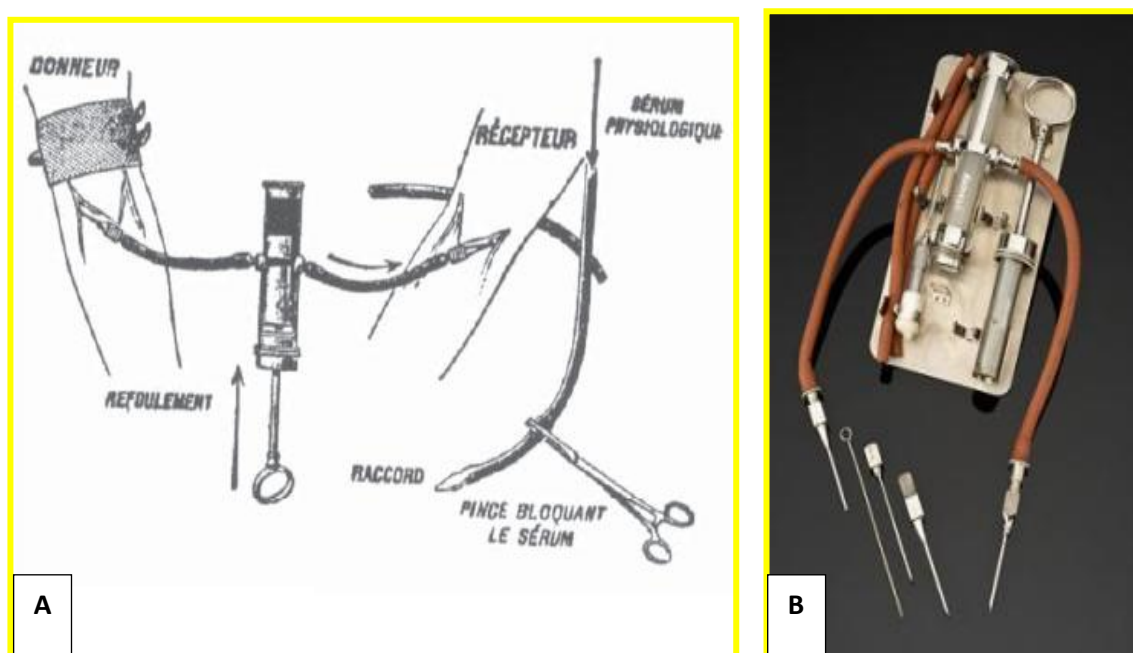


FIGURA 7– 7A: Ilustração de técnica para transfusão de sangue braço-a-braço; **7B:** Aparelho tipo Jubé para transfusão de sangue braço-a-braço (Paris, 1900 – 1945).

A era científica da transfusão de sangue teve início com o imunologista austríaco Karl Landsteiner, em 1901 (JUNQUEIRA et al, 2005). Ele observou que, ao se misturar o soro de uma pessoa ao sangue de outra poderia haver coagulação, descobrindo assim, o primeiro e mais importante sistema de grupos sanguíneos existente no homem: o ABO. Ele identificou os tipos sanguíneos A, B e O, e tal descoberta rendeu-lhe o Prêmio Nobel de Fisiologia em 1930 (ROCHA et al, 2009).

No ano seguinte, Decastello e Von Sturli (1902) identificaram o grupo sanguíneo AB, caracterizado pela presença simultânea dos antígenos A e B na superfície das hemácias (DECASTELLO & VON STURLI, 1902, citados por BLANCHER & SOCHA, 1997).

A primeira transfusão precedida da realização de PC foi realizada em 1907, por Reuben Ottenber (ROCHA et al, 2009).

Em 1913, Von Dungern e Hirszfeld encontraram antígenos semelhantes aqueles do sistema ABO humano, descritos por Landsteiner, em hemácias de chimpanzés (VON DUNGERN & HIRSZFELD, 1911, citados por BLANCHER & SOCHA, 1997).

Em 1914, Hustin relatou o emprego de citrato de sódio e de glicose, respectivamente como anticoagulante e solução diluente do sangue para transfusões. Dessa forma, as transfusões de sangue tornavam-se progressivamente mais praticáveis e menos danosas para os receptores (ROCHA et al, 2009).

Em 1927, Landsteiner e Levine descobriram o sistema MN humano (LANDSTEINER & LEVINE, 1927, citado por SOCHA & BLANCHER, 1997), confirmado em grandes macacos antropóides e outros macacos, por Landsteiner & Wiener em 1937 (LANDSTEINER & WIENER, 1937, citado por SOCHA & BLANCHER, 1997).

Em 1940, Karl Landsteiner e Wiener descreveram um anticorpo produzido no soro de coelhos e de cobaias, induzido pela imunização desses animais com hemácias do macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) **[Figuras 8A e 8B]**. Tal anticorpo era capaz de aglutinar as hemácias de 85% das amostras

obtidas de um grupo de caucasianos americanos. O anticorpo produzido no sangue dos animais foi denominado de anti-Rh, sendo o “Rh” derivado de Rhesus, em homenagem ao primata. Indivíduos que apresentavam as hemácias aglutinadas pelo anticorpo anti-Rh, foram classificados como sendo Rh positivos, por possuírem o antígeno *monkey type*, enquanto os que não apresentavam a aglutinação, foram chamados de Rh negativos (BLANCHER& SOCHA, 1997a).

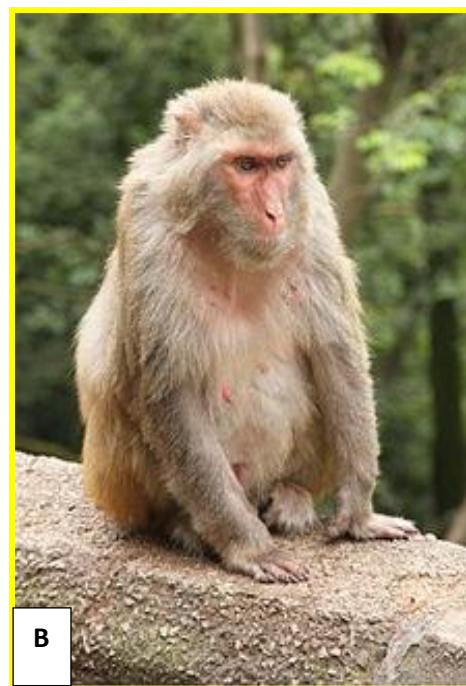


FIGURA 8–8A:Karl Landsteiner (1868–1943); **8B:** Macaco Rhesus (*Macaca mulatta*).

A descoberta de novas soluções anticoagulantes e conservantes, aliada ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de equipamentos de refrigeração, permitiu a organização de centros de armazenamento de sangue. O primeiro banco de sangue data de 1936, tendo sido estabelecido em Barcelona (ROCHA et al, 2009). Mais tarde, o sangue total passou a ser fracionado em hemocomponentes, proporcionando melhor aproveitamento das doações e otimização das respectivas transfusões.

O desenvolvimento da imuno-hematologia humana foi progressivo, com a descoberta de numerosos grupos sanguíneos e, mais recentemente, a preocupação com a transmissão de doenças infecciosas pelo

sangue tem tido destaque, com implementação de técnicas acuradas e legislação rigorosa sobre as agências transfusionais, objetivando a redução de riscos e proporcionando um produto de alta qualidade para os receptores de hemocomponentes e hemoderivados.

2.2 Principais sistemas de grupos sanguíneos humanos e seus antígenos de maior importância transfusional

Desde a descoberta dos antígenos do sistema ABO por Landsteiner, em 1901, 352 antígenos eritrocitários humanos, agrupados em 36 sistemas, já foram descritos e reconhecidos pelo Comitê para Terminologia de Antígenos Eritrocitários da Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (DANIELS& REID, 2010; MARTINS et al, 2009; ISBT, 2017). Dez desses sistemas possuem antígenos potencialmente capazes de causar reações transfusionais hemolíticas clinicamente significativas. São eles: ABO, Rh, Lewis, P, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran e Diego, abrangendo 28 antígenos [sistema ABO (antígenos A, A₁, B) – sistema Rh (antígenos D, C, c, E, e) – sistema Kell (antígenos K, k, Kp^a, Kp^b) – sistema Duffy (antígenos Fy^a, Fy^b) – sistema Kidd (antígenos Jk^a, Jk^b) – sistema Lewis (antígenos Le^a, Le^b) – sistema P (antígeno P₁) – sistema MNS (antígenos M, N, S, s) – sistema Lutheran (antígenos Lu^a, Lu^b) – sistema Diego (antígeno Di^a)] (STORRY et al, 2013). Por sua relação com os sistemas ABO e Lewis, o sistema H com seu antígeno H, também é muito importante, sendo incluído neste estudo.

Os antígenos eritrocitários humanos são estruturas polimórficas herdadas geneticamente e definidas sorologicamente por um anticorpo complementar. São macromoléculas como proteínas, glicoproteínas ou glicolipídeos que, muitas vezes, compõem os conhecidos complexos proteicos presentes na membrana dos eritrócitos, sendo expostos na sua superfície externa (**Figura 9**). Podem exercer função estrutural, de transporte, de receptores de membrana/moléculas de adesão, enzimática, ou de controle do complemento (STORRY et al, 2013) [**Figura 10**].

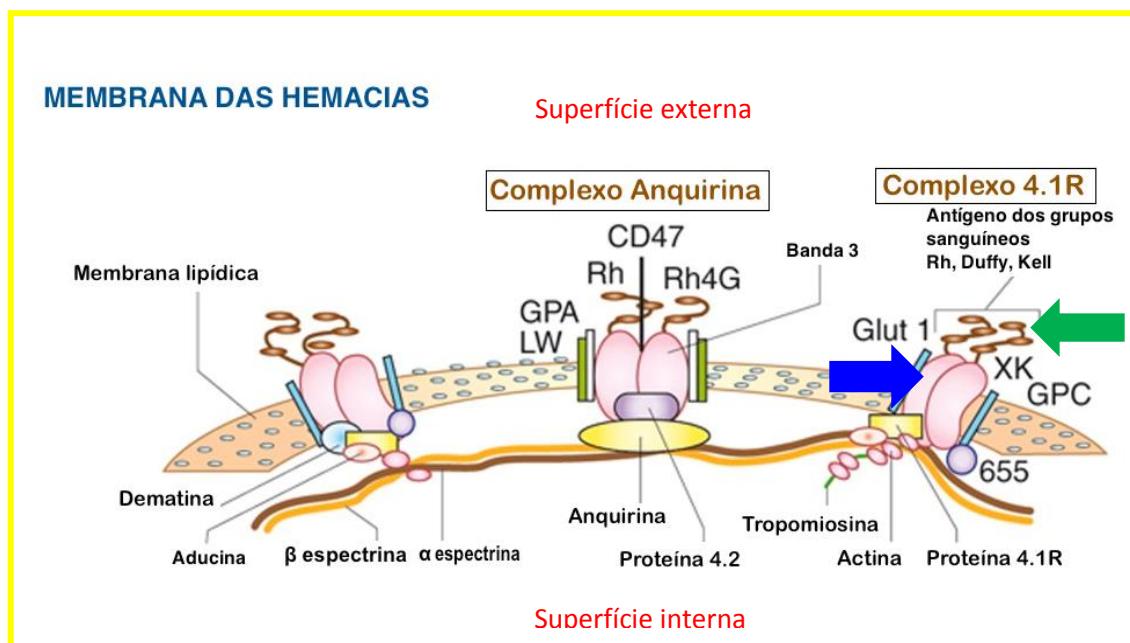


FIGURA 9—Esquema da membrana do eritrócito com suas proteínas integrais (Banda 3 e glicoforinas) [seta azul] e proteínas do citoesqueleto celular (α e β espectrina, actina, tropomiosina, proteína 4.1). Notar moléculas ligadas a proteínas integrais, correspondendo a alguns antígenos de diferentes grupos sanguíneos (seta verde).

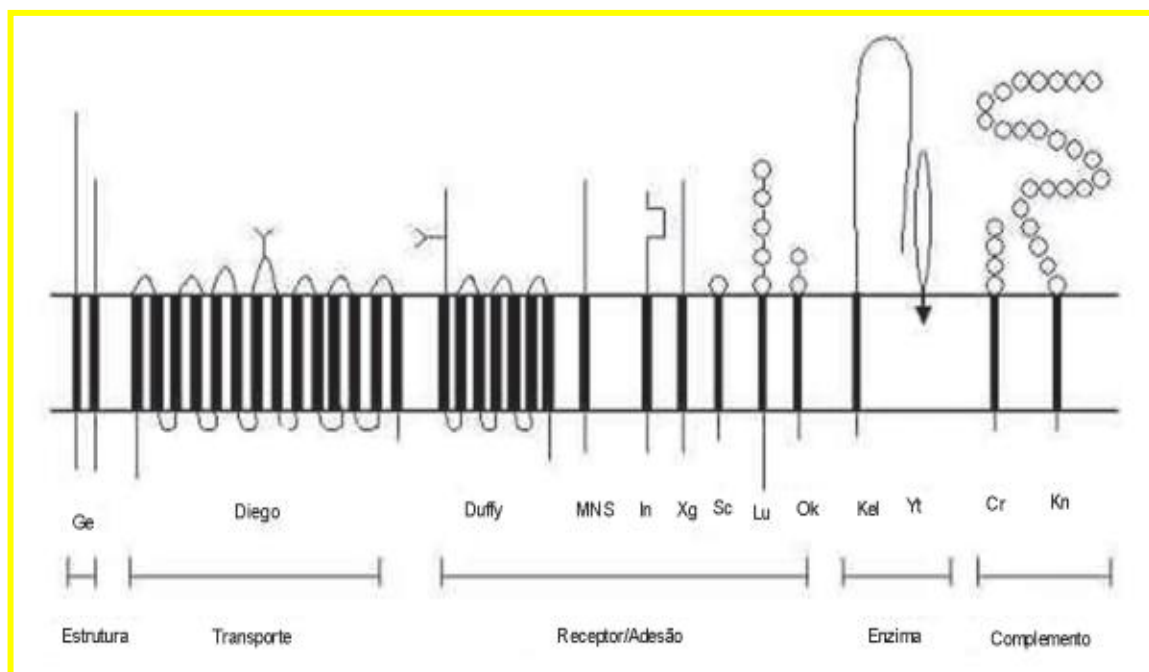


FIGURA 10 - Representação esquemática de antígenos de grupos sanguíneos conforme suas funções biológicas. Alguns grupos representados não foram investigados no presente estudo.

A seguir, será apresentado um resumo dos principais sistemas de grupos sanguíneos humanos, com seus antígenos mais importantes do ponto de vista transfusional.

2.2.1 Sistemas de grupos sanguíneos ABO e H:

É o mais importante sistema na prática transfusional. Os antígenos ABO são resíduos terminais de carboidratos sintetizados por glicosiltransferases codificadas pelo gene ABO, no cromossomo 9 (9q34.1-q34.2). A heterogeneidade fenotípica do sistema sanguíneo ABO se deve à diferença estrutural do gene respectivo, que origina a glicosiltransferase A [$\alpha(1-3)$ -N-acetilgalactosamina transferase] e/ou a glicosiltransferase B [$\alpha(1-3)$ -N-galactosil transferase]. Essas duas enzimas depositam resíduos específicos de carboidratos a uma substância precursora H presente na superfície do eritrócito (a glicosiltransferase A adiciona um resíduo de N-acetilgalactosamina e a glicosiltransferase B adiciona um resíduo de galactose) convertendo-a, respectivamente, em antígeno A ou antígeno B. O antígeno H é produto da adição de uma L-fucose nessa substância precursora H, através de uma fucosiltransferase (gene *FUT1*, cromossomo 19), sendo atualmente alocado no chamado sistema H (COVAS, 2013). O soro de indivíduos do tipo B contém dois tipos de anticorpos, o anti-A e o anti-A₁. Indivíduos cujos eritrócitos reagem apenas com o anticorpo anti-A, mas não com o anticorpo anti-A₁, são classificados como sendo do grupo A₂. A N-acetilgalactosamina que se liga à substância H é a mesma nos subgrupos A₁ e A₂, entretanto, no subgrupo A₂, a ligação ocorre em número mais restrito de estruturas, que estão presentes em menor densidade (COVAS, 2013). Existem muitas outras variantes de grupos A e B (designados subgrupos A e B), e todas se caracterizam por ligações mais fracas dos respectivos antígenos com os anticorpos anti-A ou anti-B, observada na forma de menor aglutinação das hemácias nos testes imuno-hematológicos (COVAS, 2013).

O antígeno H, que serve de substrato para os antígenos A e B, é um alelo dominante, chamado de *FUT*, de alta frequência em humanos. Indivíduos homozigotos recessivos (hh) são muito raros, não produzem a

substância precursora H e não apresentam o antígeno H em suas hemácias. Tal fenótipo é conhecido como Bombaim. Oitenta por cento dos indivíduos com fenótipo H nas hemácias também apresentam esse antígeno em suas secreções corporais, sendo designados ABH-secretores, pois, ao apresentarem os antígenos H e A e/ou B, também apresentam H e A e/ou B nas secreções. O caráter secretor (Se) da substância H é determinado pelo gene *FUT2*, localizado no cromossomo 19 (19q13.3) (COVAS, 2013).

2.2.2 Sistema de grupo sanguíneo Rh:

O sistema Rh é considerado o mais polimórfico de todos os sistemas de grupos sanguíneos, é exclusivamente eritrocitário e possui grande capacidade de induzir resposta imunológica. Mais de 50 antígenos já foram descobertos no sistema, sendo os principais o D, C, c, E, e, responsáveis pela maioria dos problemas clínicos (NARDOZZA et al, 2010). A presença ou ausência do antígeno D nas hemácias corresponde, respectivamente, aos fenótipos RhD positivo e RhD negativo. Nem todas as pessoas possuem o antígeno D, porém, todas expressam os antígenos C/c e E/e (MARTINS et al, 2009; NARDOZZA et al, 2010; CASTILHO et al, 2015). Os antígenos do sistema Rh estão presentes em duas proteínas integrais de membrana (RhD e RhCE) originadas de dois genes altamente homólogos (genes *RHD* e *RHCE*, cromossomo 1 (1p34-p36). A proteína RhD expressa o antígeno D e a proteína RhCE expressa os antígenos CE em várias combinações (ce, Ce, cE ou CE). A expressão dos antígenos Rh na superfície dos eritrócitos depende da presença da glicoproteína RhAG (glicoproteína Rh-associada, produto do gene *RHAG*, braço curto do cromossomo 6). Juntos, em combinações específicas para cada indivíduo, os antígenos D, C, c, E, e formam o complexo Rh na membrana dos eritrócitos (CASTILHO et al, 2015).

2.2.3 Sistema de grupo sanguíneo Lewis:

A expressão fenotípica dos antígenos Lewis depende do gene secretor (Se) do antígeno H (*FUT2*), e do gene Lewis (*FUT3*), ambos situados

no cromossomo 19 (19q13.3), e geralmente herdados de forma independente (GIRELLO & KÜHN, 2011). O sistema Lewis é considerado associado aos sistemas ABO e H, uma vez que seus antígenos são compartilhados por moléculas complexas específicas, como glicolipídios e glicoproteínas de membranas de células variadas, incluindo hemácias. Apesar de já serem produzidos durante a vida fetal, os antígenos Lewis têm expressão mínima nas hemácias ao nascimento, determinando que a maioria dos recém-nascidos apresentem o fenótipo Le (a-b-) (BONIFACIO & NOVARETTI, 2009). Os genes *FUT2* e *FUT3* codificam para duas fucosiltransferases (2-alfa-fucosiltransferase e 4-alfa-fucosiltransferase, respectivamente) que produzem, respectivamente, os antígenos H-Se e Le^a. Se o antígeno H for secretado (H-Se) e estiver presente nas secreções do indivíduo, a fucosiltransferase 3 adiciona uma fucose ao antígeno H-Se, produzindo o antígeno Le^b. Se o antígeno H-Se não for produzido e não estiver presente nas secreções do indivíduo, a fucose é adicionada a uma molécula precursora H, formando o antígeno Le^a. Portanto, a maioria dos indivíduos H-secretadores apresentam o fenótipo Le (a-b+), enquanto aqueles não H-secretadores apresentam-se como Le (a+b-). Os antígenos Lewis são sintetizados por células epiteliais e mesodérmicas, atingem o plasma e são posteriormente adsorvidos à superfície das hemácias (GIRELLO & KÜHN, 2011; MATTOS, 2016). Como a maioria das pessoas é H-secretora, o fenótipo mais comum em humanos é o Le (a-b+) (MATTOS & MATTOS, 2017).

2.2.4 Sistema de grupo sanguíneo P:

Os antígenos do sistema P são glicolipídios da membrana eritrocitária, formados de maneira idêntica aos antígenos ABO, H e Lewis a partir da mesma estrutura básica precursora, uma lactosilceramida. Originalmente chamado de P, o antígeno teve seu nome mudado para P₁, sendo o único oficialmente reconhecido no sistema P. O P₁ é produto do gene *B3GALNT1*, localizado no cromossomo 3 (3q26.1) (BONIFACIO & NOVARETTI, 2009).

2.2.5 Sistema de grupo sanguíneo Kell:

Localizado no cromossomo 7 (7q33), o gene *KEL* controla antígenos expressados de forma independente ou agrupados, incluindo os conjuntos K(K1)/k(K2) e o Kp^a(K3)/Kp^b(K4), dentre outros. Os 35 antígenos desse sistema estão localizados em uma glicoproteína N-glicosilada (glicoproteína Kell) que interage com uma outra proteína precursora denominada XK. Mutações em ponto geram as diferenças antigênicas e o polimorfismo do sistema Kell. A glicoproteína Kell pertence à subfamília das endopeptidases zinco-dependentes, cuja principal função é ativação de peptídeos bioativos por clivagem enzimática. A função da proteína precursora XK não é conhecida, mas parece estar ligada a mecanismos de transporte de membrana. Os antígenos Kell se apresentam nos eritrócitos em baixa densidade, e podem também estar presentes em outros tecidos. O antígeno K é mais frequente em brancos do que em negros, é comum em árabes e é raro no Oriente (China, Japão e Coreia). O antígeno k é frequente em todas as populações (GIRELLO & KÜHN, 2011).

2.2.6 Sistema de grupo sanguíneo Duffy:

O locus do gene *FY* localiza-se no cromossomo 1 (1q22-23), codificando para uma glicoproteína multipasso que pode originar 5 antígenos distintos, incluindo o Fy^a e o Fy^b. A glicoproteína Duffy é quimiorreceptora/molécula de adesão para diversas substâncias na superfície dos eritrócitos, como interleucinas, sendo também conhecida como *Duffy Antigen Receptor for Chemokines (Darc)*. A frequência fenotípica dos antígenos varia conforme a população estudada. Negros africanos costumam ter o fenótipo Fy (a-b-) [DANIELS & REID, 2010].

2.2.7 Sistema de grupo sanguíneo Kidd:

O gene *JK* localiza-se no cromossomo 18 (18q12-q21), codificando para uma glicoproteína integral multipasso que tem função de

transporte de uréia através da membrana citoplasmática, preservando a estabilidade osmótica e a deformabilidade do eritrócito. Possui 3 antígenos, dentre eles, o Jk^a e o Jk^b (BONIFACIO & NOVARETTI, 2009).

2.2.8 Sistema de grupo sanguíneo MNS:

Possui 48 antígenos codificados por dois genes altamente homólogos (*GYP A* e *GYP B*), e por um terceiro gene homólogo (*GYPE*), no cromossomo 4 (4q28-q31). Os antígenos do sistema MNS estão associados às sialoglicoproteínas transmembranados eritrócitos, denominadas glicoforina A (GPA) e glicoforina B (GPB). A GPE não é expressa em condições normais, sendo que o gene *GYPE* participa de rearranjos gênicos, fazendo surgir as formas alélicas variantes. A formação da maioria dos antígenos desse sistema decorre de substituição de nucleotídeos, perda de exons ou mecanismos de recombinação gênica, que dão origem às glicoforinas híbridas GPA e GPB (GIRELLO & KÜHN, 2011). Os antígenos M e N estão localizados na GPA e diferem entre si em dois aminoácidos. Os antígenos S e s estão localizados na GPB e diferem em apenas um aminoácido. A função das sialoglicoproteínas parece ser a manutenção do afastamento entre os eritrócitos, impedindo a sua agregação espontânea. São, portanto, importantes na manutenção do potencial zeta, o potencial elétrico de repulsão entre as hemácias. Alguns autores relatam que as sialoglicoproteínas também podem ser receptoras para complemento, citocinas, bactérias, vírus, etc. Os antígenos se encontram na forma simples ou dupla: MM, NN, MN, SS, Ss, ss. Em negros pode-se encontrar o fenótipo S-s- (CASTILHO et al, 2015).

2.2.9 Sistema de grupo sanguíneo Lutheran:

Os antígenos do sistema Lutheran estão expressos em duas proteínas, Lu e B-CAM, produtos do gene *LU* (cromossomo 19q13.2), que diferem entre si no tamanho do domínio intracitoplasmático. Ambas as proteínas possuem a extremidade N-terminal extracelular contendo cinco domínios da superfamília das imunoglobulinas, ligados por pontes dissulfeto. As glicoproteínas Lu/B-CAM estão amplamente expressas em outros tecidos, e

nos eritrócitos são receptoras para laminina, uma proteína presente em todas as membranas celulares. Os eritrócitos de pacientes com doença falciforme expressam aproximadamente mais da metade das glicoproteínas Lu/B-CAM do que eritrócitos normais, o que é associado às crises vaso-oclusivas nesses pacientes, devido à aderência dos eritrócitos às células do endotélio vascular. Estudos têm demonstrado que as glicoproteínas Lu/B-CAM também estão expressas em maior quantidade em diferentes tumores malignos, podendo estar envolvidas, junto com outras proteínas de adesão, com a ocorrência de metástases tumorais (BONIFACIO & NOVARETTI, 2009).

2.2.10 Sistema de grupo sanguíneo Diego:

Os antígenos desse sistema derivam de um gene (*SLC4A1*, cromossomo 17 (17q21-q22), que codifica para a proteína Banda 3 da membrana eritrocitária. Essa proteína é uma glicoproteína multipasso que apresenta domínios N-terminal intracitoplasmáticos, domínios transmembrana e domínios C-terminal também intracitoplasmáticos. Os antígenos mais conhecidos são o Di^a/Di^b . Mutação em ponto no gene que origina o fenótipo Di^b faz com que ocorra alteração para o fenótipo Di^a . A função dos antígenos Diego corresponde ao transporte de ânions (HCO^{3-} e Cl^-) através da membrana, e à manutenção da integridade das hemácias através da ligação do seu domínio N-terminal citoplasmático ao citoesqueleto celular. Também parece estar implicado na formação de antígenos senescentes, que são marcadores na membrana dos eritrócitos que devem ser retirados da circulação pelos histiócitos do sistema fagocítico mononuclear (BONIFACIO & NOVARETTI, 2009). A frequência do antígeno Di^a é alta em índios sul-americanos (36%), sendo que, no Brasil, estudos comprovam a incidência desse fenótipo em até 76% dos membros de alguns povos indígenas (GIRELLO & KÜHN, 2011). Também é prevalente é encontrado em 20,4% dos indígenas mexicanos e em 10,2% de mexicanos residentes nos Estados Unidos. Sua frequência em povos de origem asiática varia de 5% a 15% (japoneses e chineses, respectivamente). Está presente em 1: 4462 europeus (raro) e 1: 827 negros norte-americanos (muito raro).

2.3 Os macacos-prego: gênero *Sapajus sp*

Os macacos-prego são primatas neotropicais que habitam as Américas do Sul e Central. Pesam menos de 5 Kg, são onívoros, e vivem em *habitats* diversificados. Pertencem à família *Cebidae*, que contém os gêneros *Saimirisp*, *Cebus sp* e *Sapajus sp* (CPB/ICMBio, 2013; SILVEIRA et al, 2008).

Os gêneros *Cebus sp* e *Sapajus sp* são conhecidos como macacos-prego. O gênero *Sapajus sp* é constituído por 9 espécies (CPB/ICMBio, 2013; SILVEIRA et al, 2008). No presente estudo incluímos o gênero *Sapajus sp*, entretanto, sem a classificação das respectivas espécies.

2.4 Os macacos bugios: gênero *Alouatta sp*

Os macacos bugios são primatas neotropicais cujo *habitat* se estende desde o México até o sul da América do Sul. Pesam de 5 a 12 Kg, são arborícolas e predominantemente folívoros-frugívoros. Pertencem à família *Atelidae*, e ao gênero *Alouatta*, que compreende 10 espécies (CPB/ICMBio, 2013). A característica morfológica mais marcante do gênero é a presença do osso hioide bastante desenvolvido, que age como ressonador para o seu ronco, originando vocalização rouca, grave e de longo alcance, razão de ser também conhecido como macaco roncador. Sua nomenclatura popular inclui os termos bugio, roncador, barbado, guariba, carajá e congo, dependendo da região do país (GREGORIN et al, 2008).

No presente estudo, foram incluídos os *Alouatta guariba* que correspondem aos macacos bugios ruivos (CPB/ICMBio, 2013), e os *Alouatta caraya* que correspondem aos macacos bugios pretos (CPB/ICMBio, 2013), por estarem disponíveis no CEMPAS à época da coleta de amostras sanguíneas.

2.5 Revisão sobre fenotipagem eritrocitária em macacos do Novo Mundo

Landsteiner e pesquisadores contemporâneos da primeira metade do século XX, foram os pioneiros na identificação de antígenos homólogos presentes nas hemácias de humanos e de macacos, dando início a estudos comparativos entre primatas humanos e não-humanos (SOCHA & BLANCHER, 1997a).

Socha & Ruffié (1983), estudando antígenos eritrocitários de humanos, macacos antropoides, macacos não antropoides do Novo e do velho Mundo, e prosímios, deduziram que grupos sanguíneos são compartilhados, parcial ou totalmente, por todos os primatas, como produto de evolução filogenética (SOCHA & RUFFIÉ, 1983, citados por SOCHA & BLANCHER, 1997).

Em 1997, Blancher et al publicaram compilação de pesquisas de antígenos dos sistemas sanguíneos humanos ABO, H, Rh, Lewis, MNS e Duffy em eritrócitos de macacos antropoides, de macacos do Velho e do Novo Mundo e de prosímios (BLANCHER et al, 1997).

Os achados referentes aos macacos do Novo Mundo foram os seguintes (BLANCHER et al, 1997):

Em relação às tipagens ABO e H:

Pela técnica de hemoaglutinação em salina com anticorpos policlonais anti-A, anti-B e anti-AB de coelhos: macacos-aranha de diferentes espécies (n=15) apresentaram tipagens A, B ou O; macacos-esquilo (macaco-de-cheiro) de espécie única (n=11) apresentaram tipagens A, AB ou O; macacos-capuchinho (macacos-prego) de diferentes espécies (n=9) apresentaram tipagens A, B ou O; macacos bugios, sem referência a espécies (n=52), apresentaram tipagem B; saguis de diferentes espécies (n=45) apresentaram tipagem A; concluíram que polimorfismo ABO foi observado em 3/5 grupos de macacos; as tipagens ABO diretas foram confirmadas pelas

tipagens reversas, embora as últimas tenham sido fracas ou ausentes nos macacos-esquilo (macaco-de-cheiro); também foram detectados antígenos H e/ou A e/ou B na secreção salivar de todos os macacos, exceto por antígeno H muito fraco ou ausente em saguis; observou-se, ainda, um antígeno *B-like* nos eritrócitos de todos os grupos de macacos, independentemente da tipagem salivar.

Pela técnica de hemoaglutinação com anticorpos monoclonais (AcMo): foram testados diferentes tipos de anticorpos, com resultados variados. Treze tipos de AcMo anti-A não detectaram o antígeno A nos macacos, exceto nos saguis, onde confirmou o antígeno A previamente detectado com o anticorpo policlonal; 10 tipos de AcMo anti-B resultaram em negatividade para o antígeno B, não havendo o reconhecimento do antígeno *B-like* detectado anteriormente pelo anticorpo policlonal; de 5 tipos de AcMo anti-AB testados, apenas um aglutinou eritrócitos de macacos Tamarin (*Saguinus imperator*); relataram, entretanto, que esses testes revelaram “diferenças individuais” entre os saguis, sem maior detalhamento; com 10 tipos de AcMo anti-H utilizados, houve aglutinação variável nas hemácias dos macacos.

Em relação à tipagem Rh:

Pela técnica de hemoaglutinação em salina com anticorpos policlonais de coelhos: não foram pesquisados os antígenos D, C, c, E, e.

Pela técnica de hemoaglutinação com AcMo: não foram testados AcMo anti-D, anti-C, anti-c, anti-E e anti-e.

Relataram, entretanto, que estudos prévios mostraram anticorpo anti-D uniformemente negativo e anti-c esporadicamente positivo dentre macacos do Novo Mundo, e que positividade para anti-E e anti-e nunca foi constatada em nenhum primata testado.

Em relação à tipagem Lewis:

Pela técnica de hemoaglutinação em salina com anticorpos policlonais anti-Le^a de coelhos: a pesquisa do antígeno Le^a foi efetuada apenas na saliva dos animais, sendo negativa em 5 macacos-aranha, 4 macacos-prego, 4 macacos-esquilo (macaco-de-cheiro) e 31 saguis.

Pela técnica de hemoaglutinação com AcMo: testaram 5 tipos de AcMo anti-Le^a nos macacos, todos com resultados negativos; AcMo anti-Le^b não foi testado.

Em relação à tipagem MNS:

Pela técnica de hemoaglutinação em salina com anticorpos policlonais anti-M, anti-N, anti-S e anti-s de coelhos: o antígeno M foi pesquisado apenas em macacos-prego, com resultado negativo; os antígenos N, S e s não foram pesquisados.

Pela técnica de hemoaglutinação com AcMo: testaram 4 tipos de AcMo anti-M, com resultado negativo em macacos-esquilo (macaco-de-cheiro), saguis e macacos Tamarin; 6 tipos de AcMo anti-N não detectaram o antígeno N em macacos-esquilo (macaco-de-cheiro), saguis e macacos Tamarin; não foram testados AcMo anti-S e anti-s.

Em relação à tipagem Duffy:

Pela técnica de hemoaglutinação em salina com anticorpos policlonais anti-Fy^a e anti-Fy^b de coelhos: os antígenos Fy^a e Fy^b não foram pesquisados nos macacos do Novo Mundo.

Pela técnica de hemoaglutinação com AcMo: não foram testados AcMo anti-Fy^a e anti-Fy^b.

Relatam, apenas, que o fenótipo Fy (a-b-) é comum nos macacos do Novo Mundo.

Não encontramos estudos sobre fenotipagem eritrocitária em macacos brasileiros.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de antígenos eritrocitários de importância transfusional em humanos, nos eritrócitos de macacos-pregos (*Sapajus sp*) e de macacos bugios (*Alouatta sp*).

3.2 Objetivos Específicos

a - Investigar a presença de 28 antígenos eritrocitários pertencentes aos grupos sanguíneos humanos ABO (antígenos A, A₁, B, AB), H (antígeno H), Rh (antígenos D, C, E, c, e), Kell (antígenos K, k, Kp^a, Kp^b), Duffy (antígenos Fy^a, Fy^b), Kidd (antígenos Jk^a, Jk^b), Lewis (antígenos Le^a, Le^b), P (antígeno P₁), MNS (antígenos M, N, S, s), Lutheran (antígenos Lu^a, Lu^b) e Diego (antígeno Di^a), nos eritrócitos de macacos-prego (*Sapajus sp*) e de macacos bugios (*Alouatta sp*);

b - Comparar o fenótipo eritrocitário dos animais do estudo com a literatura sobre fenotipagem eritrocitária de humanos e de primatas do Novo Mundo dos gêneros *Sapajus sp* e *Alouatta sp*, previamente estudados.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e ambiente de experimentação

A metodologia adotada no desenvolvimento do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Botucatu, sob nº 121/2015-CEUA em 02/10/2015 (Anexo I), modificada sob o nº 0177/2016-CEUA em 10/11/2016 (Anexo II). O projeto obteve também autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, divisão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, sob nº 50606-1, Código de Autenticação 89734145 - licença válida de 04/09/2015 a 03/10/2016 (Anexo III), renovada sob o nº 50606-3, Código de Autenticação 98561487 - licença válida de 11/10/2016 a 10/11/2017 (Anexo IV), para atividades com finalidade científica.

Foram utilizados 9 macacos-prego (*Sapajus sp*) saudáveis, sendo 4 fêmeas e 5 machos. Um dos machos correspondia a um filhote de 3 meses. Os *Sapajus sp* não foram classificados segundo as espécies. Também foram utilizados 10 macacos bugios, adultos e saudáveis, correspondendo a 6 fêmeas e 4 machos. Seis macacos bugios pertenciam à espécie *Alouatta guariba* – bugios ruivos (3 fêmeas e 3 machos), e 4 pertenciam à espécie *Alouatta caraya* – bugios pretos (3 fêmeas e 1 macho).

Seis macacos-prego pertenciam a um único grupo, onde havia consanguinidade, tendo sido resgatados de um cativeiro ilegal no Estado de São Paulo. Outros 3 animais (amostras 1, 2 e 7) eram provenientes de Rifaina, Franca e Itatinga, todos municípios paulistas. Não foi possível saber a procedência específica dos *Alouatta sp*, porém, todos eram provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo.

Os 19 animais estavam mantidos em cativeiro, em jaulas com dimensões especificadas pelo IBAMA, no Centro de Estudo em Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens - CEMPAS, UNESP - Botucatu. Eram

alimentados com ração comercial para primatas, com verduras e frutas, e recebiam água fresca *ad libitum*.

4.2 *Contenção química dos animais*

Após 12 horas de jejum, os animais foram capturados em suas jaulas com auxílio de um puçá. Receberam injeção intramuscular de cloridrato de quetamina a 10% (7 mG/kg) e midazolam (0,5 mG/kg), aplicada por anestesiolista veterinário, que também monitorizou clinicamente os animais durante o procedimento de coleta sanguínea. As coletas de amostras sanguíneas foram realizadas por médico veterinário do CEMPAS. Depois da coleta, os referidos animais foram monitorados por anestesiolista veterinário durante a recuperação pós-anestésica. Em seguida, retornaram ao cativeiro de origem no CEMPAS, onde foram monitorados clinicamente durante as 24 horas subsequentes à coleta.

4.3 *Material e Métodos*

Após antissepsia, utilizando-se seringa e agulha estéreis descartáveis, foram coletados 2,0mL de sangue periférico da veia braquial ou jugular dos macacos. O sangue foi colocado em tubo padrão de hemograma contendo o anticoagulante K₂ EDTA, para ser utilizado na pesquisa dos antígenos eritrocitários.

Os tubos com as amostras de sangue foram colocados em caixa plástica resistente e apropriada, contendo o símbolo que caracteriza “Risco Biológico”, sendo transportados até o Laboratório de Imuno-hematologia, da Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP.

Todas as normas de biossegurança foram rigorosamente obedecidas durante o manuseio das amostras heterólogas (coleta, transporte, técnicas de bancada, cuidados com bancada e equipamentos, descarte dos dejetos e do material de uso), conforme preconizado para a rotina de trabalho

com sangue humano, sabidamente com potencial infectante. A Bióloga, aluna de Pós-Graduação, executou todas as técnicas devidamente paramentada com avental, gorro, luvas, máscara e óculos de proteção. Nenhum material de bancada utilizado nos testes foi reutilizado (tubos, microtubos, ponteiros de micropipetas, reagentes, etc), sendo encaminhados para incineração em recipientes lacrados, juntamente com todos os dejetos do estudo. A bancada utilizada na pesquisa foi espacialmente isolada daquela utilizada nos testes da rotina transfusional, e todas as amostras e material de uso foram devidamente identificados, evitando-se qualquer troca de amostras. O processamento das amostras dos macacos foi realizado em horário fora do expediente rotineiro do laboratório. A assepsia e descontaminação da bancada e equipamentos utilizados foram realizadas conforme procedimentos-padrão do laboratório em questão. Ressalte-se que todo procedimento prático foi supervisionado, *in loco* e em tempo real, pela Biomédica Co-orientadora e pela Médica Hematologista Orientadora, também devidamente paramentadas. O Aluno de graduação em Medicina da FMB - UNESP, bolsista FAPESP, também esteve presente, atuando ativamente na realização dos testes para tipagens ABO e Rh.

Os anticorpos monoclonais utilizados para a pesquisa dos antígenos eritrocitários utilizados compõem kits ABO / Rh / Perfil I / Perfil II / Perfil III / Diego fabricados pelo Laboratório BIO-RAD Laboratories (DiaMed Latino América S.A., Distrito Industrial, Lagoa Santa – MG, Brasil) e, juntamente com os demais materiais de consumo necessários no presente estudo, foram fornecidos gratuitamente pela Empresa pH 7 Comércio e Representações Ltda (Representante da BIO-RAD Laboratories no Brasil). Os anticorpos são produzidos a partir de antígenos eritrocitários humanos [Anticorpos monoclonais de origem humana e respectivas linhagens dos clones – anticorpos anti-A: LM297/628 (LA-2), anti-B: LM306/686 (LB-2), **AB**: ES131 (ES-15), Birma-1, ES-4, anti-D: ESD-1M, 175-2, TH-28, MS201/MS-26; anti-C: MS-24; anti-c: MS-33; anti-E: MS-260; anti-e: MS-16, MS-21, MS-63; anti-K: MS-56; anti-P₁: 650, anti-Le^a: P3N20V3+LM112/161; anti-Le^b: LM129/181; anti-Jk^a: MS-15; anti-Jk^b: MS-8; anti-M: LM110/140 (LM-1); anti-N: 1422 C7; Anticorpos policlonais de origem humana - anticorpos anti-Lu^a, anti-Lu^b, anti-k, anti-Kp^a, anti-Kp^b, anti-S, anti-s, anti-Fy^a, anti-Fy^b, anti-Di^a;

Proteínas do extrato da semente de *Dolichos biflorus* – lectina anti-A₁; Proteínas do extrato da semente de *Ulex europeus* - lectina anti-H] (NOVARETTI et al, 2002; MS, 2014). Todos, entretanto, apresentam especificidade contra antígenos eritrocitários humanos, sendo rotineiramente utilizados nos serviços de imuno-hematologia.

A metodologia utilizada foi a de aglutinação em coluna, composta por cartões com 6 microtubos de gel-teste (Técnica em Gel-centrifugação - BioRad – ID Micro Typing System) contendo os anticorpos complementares aos antígenos pesquisados. As amostras foram processadas segundo as técnicas descritas abaixo.

4.3.1 Técnica da Prova Direta para tipagem ABO (pesquisa de antígenos A, B e AB) e Rh (pesquisa do antígeno D)

- 1 – Foi feita a identificação dos cartões que receberiam as hemácias;
- 2 – Colocaram-se 19 gotas (950µL) de LISS (Solução de Baixa Força Iônica) no tubo para a diluição das hemácias do macaco;
- 3 – O tubo original da coleta do sangue do macaco (tubo de coleta com anticoagulante), foi centrifugado para a separação entre plasma e hemácias;
- 4 - Com micropipeta, foram aspirados 50µl de hemácias (do item 3), colocadas no tubo preparado anteriormente (do item 2); em seguida, 50µL dessa diluição foram adicionados aos respectivos microtubos (cartões) correspondentes aos anticorpos Anti-A, Anti-B, Anti-AB, Anti-D e Controle-Rh;
- 5 – Os cartões foram centrifugados a 3400 rpm durante 10 minutos, a leitura foi efetuada e os resultados anotados.

Interpretação do resultado da Prova Direta para tipagem ABO:

O quadro abaixo mostra o padrão de positividade antigênica esperado nas hemácias de tipos sanguíneos O (1), A (2), B (3) e AB (4). O sinal + indica aglutinação das hemácias pelos anticorpos humanos, e o sinal –

indica ausência de aglutinação das hemácias pelos anticorpos humanos. Na suspeita de possíveis subgrupos A ou B adicionou-se a enzima proteolítica bromelina para melhor visualização do antígeno.

Pacientes	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Tipagem ABO
1	-	-	-	O
2	+	-	+	A
3	-	+	+	B
4	+	+	+	AB

Interpretação do resultado para a tipagem Rh (antígeno D):

Positivo: presença de linha vermelha na superfície do gel ou hemácias dispersas ao longo do gel (aglutinação das hemácias) - indica a presença do antígeno

Negativo: botão compacto de hemácias no fundo do microtubo com gel (ausência de aglutinação das hemácias) – indica a ausência do antígeno.

4.3.2 Técnica de tipagem A₁ e H nos macacos:

- 1 – Foram identificados 2 microtubos do cartão de gel NaCl, sendo 1 microtubo para o antígeno A₁ e outro para antígeno H;
- 2 - Colocaram-se 19 gotas (950µL) de LISS (Solução de Baixa Força Iônica) no tubo para a diluição das hemácias do macaco;

- 3 - O tubo original da coleta do sangue do macaco (tubo de coleta com anticoagulante), foi centrifugado para a separação entre plasma e hemácias;
- 4 - Com micropipeta, foram aspirados 10 μ l de hemácias (do item 3), colocadas no tubo preparado anteriormente (do item 2); em seguida, 50 μ L dessa diluição foram adicionados aos respectivos microtubos do cartão;
- 5 - Adicionaram-se 25 μ L dos antissoros anti- A₁ e anti-H nos respectivos microtubos (do item 1);
- 6 - Os cartões foram centrifugados a 3400 rpm durante 10 minutos, a leitura foi efetuada e os resultados anotados.

Interpretação do resultado para a fenotipagem A₁ e H:

Positivo: presença de aglutinação de hemácias

Negativo: ausência de aglutinação de hemácias

4.3.3 Técnica de Prova Reversa para tipagem ABO (pesquisa de anticorpos anti-A₁ e anti-B nos macacos)

- 1 – Foram identificados 2 microtubos do cartão de gel NaCl, sendo 1 microtubo para hemácias A₁ e outro para hemácias B;
- 2 – Foram pipetados 50 μ L de hemácias-testes A₁ e B, nos microtubos correspondentes, para cada macaco;
- 3 – Em seguida, foram adicionados 50 μ L de plasma de cada macaco, nos 2 microtubos com hemácias A₁ e B;
- 4 – Os cartões foram centrifugados a 3400 rpm durante 10 minutos, a leitura foi efetuada e os resultados anotados.

Interpretação do resultado da Prova Reversa para tipagem ABO:

O quadro abaixo mostra o padrão de positividade para anticorpos (ou aglutininas ou hemolisinas), séricos ou plasmáticos, esperado em humanos de tipos sanguíneos O (1), A (2), B (3) e AB (4). O sinal + indica aglutinação ou hemólise de hemácias por anticorpos presentes no soro ou plasma, e o sinal – indica ausência de aglutinação ou hemólise de hemácias (anticorpos ausentes no soro ou plasma).

Pacientes	Hemácia A ₁	Hemácia B	Anticorpos (ou aglutininas ou hemolisinas)	Tipagem ABO
1	+	+	Anti-A e Anti-B	O
2	-	+	Anti-B	A
3	+	-	Anti-A	B
4	-	-	Ausentes	AB

4.3.4 Técnica de fenotipagem Rh (antígenos C, E, c, e) e Kell (antígeno K)

- 1 – Foi feita a identificação dos cartões que receberiam as hemácias;
- 2 - Colocaram-se 19 gotas (950µL) de LISS (Solução de Baixa Força Iônica) no tubo para a diluição das hemácias do macaco;
- 3 - O tubo original da coleta do sangue do macaco (tubo de coleta com anticoagulante), foi centrifugado para a separação entre plasma e hemácias;
- 4 - Com micropipeta, foram aspirados 25µL de hemácias (do item 3), colocadas no tubo preparado anteriormente (do item 2); em seguida, 10µL dessa diluição foram adicionados aos respectivos microtubos (cartões) correspondentes aos anticorpos Anti-C, Anti-E, Anti-c, Anti-e e Anti-K;

- 5 - Os cartões foram centrifugados a 3400 rpm durante 10 minutos, a leitura foi efetuada e os resultados anotados.

Interpretação do resultado para a fenotipagem Rh (antígenos C, E, c, e) e Kell (antígeno K):

Positivo: presença de aglutinação de hemácias

Negativo: ausência de aglutinação de hemácias

4.3.5 Técnica de fenotipagem para “PERFIL – I” (antígenos P₁, Le^a, Le^b, Lu^a, Lu^b, Controle) e “PERFIL – II” (antígenos k, Kp^a, Kp^b, Jk^a, Jk^b, Controle)

- 1– Foi feita a identificação dos cartões que receberiam as hemácias;
- 2– Colocaram-se 500µL de bromelina (ID-Diluent 1) no tubo para a diluição das hemácias do macaco;
- 3- O tubo original da coleta do sangue do macaco (tubo de coleta com anticoagulante), foi centrifugado para a separação entre plasma e hemácias;
- 4- Com micropipeta, foram aspirados 25µl de hemácias (do item 3), colocadas no tubo preparado anteriormente (do item 2); em seguida, 10µL dessa diluição foram adicionados aos respectivos microtubos (cartões) correspondentes aos anticorpos do PERFIL – I” (antígenos P₁, Le^a, Le^b, Lu^a, Lu^b, Controle) e do “PERFIL – II” (antígenos k, Kp^a, Kp^b, Jk^a, Jk^b, Controle);
- 5– Os cartões foram centrifugados a 3400 rpm durante 10 minutos, a leitura foi efetuada e os resultados anotados.

Obs.: Essa amostra foi utilizada, no máximo, 15 minutos após a incubação do item 4.

Interpretação do resultado para a fenotipagem “PERFIL – I” (antígenos P₁, Le^a, Le^b, Lu^a, Lu^b, Controle) e “PERFIL – II” (antígenos k, Kp^a, Kp^b, Jk^a, Jk^b, Controle)

Positivo: presença de aglutinação de hemácias

Negativo: ausência de aglutinação de hemácias

4.3.6 Técnica de fenotipagem para “PERFIL – III” (antígenos M, N, S, s, Fy^a e Fy^b)

- 1 - Foi feita a identificação dos cartões que receberiam as hemácias;
- 2 - Colocaram-se 19 gotas (950µL) de LISS (Solução de Baixa Força Iônica) no tubo para a diluição das hemácias do macaco;
- 3 - O tubo original da coleta do sangue do macaco (tubo de coleta com anticoagulante), foi centrifugado para a separação entre plasma e hemácias;
- 4 - Com micropipeta, foram aspirados 10µL de hemácias (do item 3), colocadas no tubo preparado anteriormente (do item 2);
- 5 - Em seguida, 50µL dessa diluição foram colocados nos respectivos microtubos (cartões), sendo adicionados 50µL dos antissoros correspondentes aos anticorpos Anti-M, Anti-N, Anti-S, Anti-s, Anti-Fy^a e Anti-Fy^b;
- 6 – Os cartões foram incubados a 37°C por 15 minutos;
- 7 - Em seguida, foram centrifugados a 3400 rpm durante 10 minutos, a leitura foi efetuada e os resultados anotados.

Interpretação do resultado para a fenotipagem para “PERFIL – III” (antígenos M, N, S, s, Fy^a e Fy^b)

Positivo: presença de aglutinação de hemácias

Negativo: ausência de aglutinação de hemácias

4.3.7 Técnica de fenotipagem para o grupo Diego (antígeno Di^a)

- 1 - Foi feita a identificação dos cartões que receberiam as hemácias;
- 2 - Colocaram-se 19 gotas (950µL) de LISS (Solução de Baixa Força Iônica) no tubo para a diluição das hemácias do macaco;
- 3 - O tubo original da coleta do sangue do macaco (tubo de coleta com anticoagulante), foi centrifugado para a separação entre plasma e hemácias;
- 4 - Com micropipeta, foram aspirados 10µl de hemácias (do item 3), colocadas no tubo preparado anteriormente (do item 2);
- 5 - Em seguida, 50µL dessa diluição foram colocados nos respectivos microtubos (cartões), sendo adicionados 25µL do antissoro correspondente ao anticorpo Anti-Di^a;
- 6- Os cartões foram incubados a 37°C por 15 minutos;
- 7- Em seguida, foram centrifugados a 3400 rpm durante 10 minutos, a leitura foi efetuada e os resultados anotados.

Interpretação do resultado para a fenotipagem Diego (antígeno Di^a)

Positivo: presença de aglutinação de hemácias

Negativo: ausência de aglutinação de hemácias

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Resultados referentes aos macacos-prego (*Sapajus sp*)

Estudaram-se 9 macacos-prego pertencentes ao gênero *Sapajus sp* (**Figura 11**), sendo 4 fêmeas e 5 machos. Um dos machos correspondia a um filhote de 3 meses. Os macacos não foram classificados quanto às espécies.



FIGURA 11: Macaco-Prego (*Sapajus sp*) na jaula do CEMPAS .

Quatro animais foram negativos para todos os antígenos eritrocitários dos sistemas AB (antígenos A, A₁, B, AB), correspondendo a 4 machos (3 adultos e 1 filhote). Tais animais também foram negativos para o antígeno H. Outros 5 macacos,

correspondendo a 4 fêmeas e 1 macho, mostraram hemácias positivas para os antígenos A e AB, e negativas para os antígenos A₁ e B. Igualmente, esses 5 animais também foram negativos para o antígeno H. A tipagem ABO realizada pela prova reversa foi compatível com a realizada pela prova direta em 8 macacos, exceto no filhote (**Figura12**). Tais achados podem ser observados na **Tabela1**.

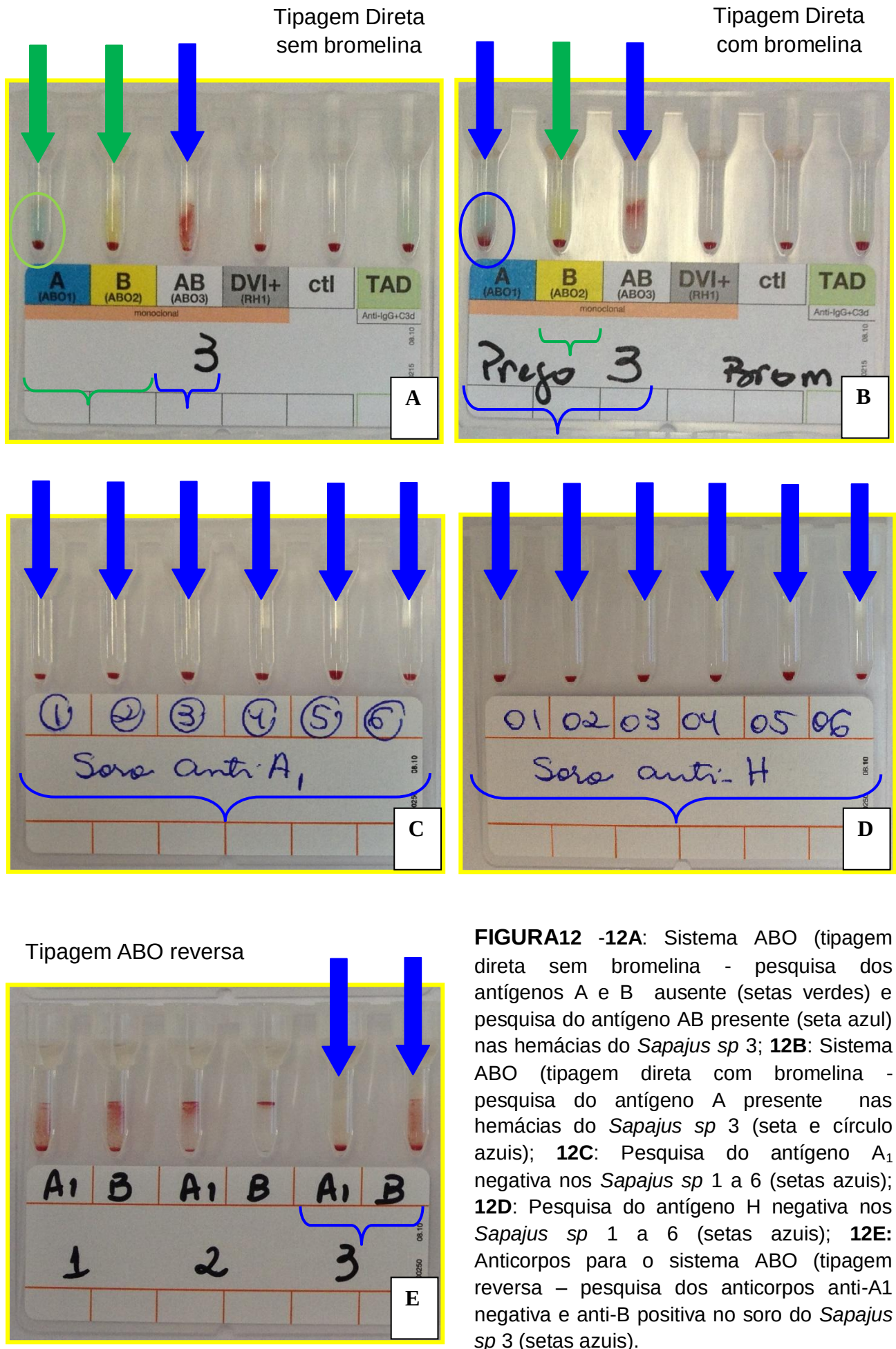


TABELA 1 – Pesquisa de antígenos do sistema ABO através das técnicas direta (pesquisa de antígenos nas hemácias) e reversa (pesquisa de anticorpos no soro), e pesquisa do antígeno do sistema H, em 9 macacos-prego (*Sapajus sp*), mostrando 5 animais com fenótipo A, 4 com negatividade para antígenos ABO, antígeno H negativo em todos, e tipagem reversa compatível com a tipagem direta (exceto no filhote).

Animal	Gênero	Sexo	Tipagem ABO direta				Tipagem ABO reversa		Ag H
			Ag	Ag	Ag	Ag	Ac	Ac	
			A	A ₁	B	AB	anti-A ₁	anti-B	
1	<i>Sapajus sp</i>	M	-	-	-	-	+	+	-
2	<i>Sapajus sp</i>	M	-	-	-	-	+	+	-
3	<i>Sapajus sp</i>	F	+	-	-	+	-	+	-
4	<i>Sapajus sp</i>	F	+	-	-	+	-	+	-
5	<i>Sapajus sp</i>	M	+	-	-	+	-	+	-
6	<i>Sapajus sp</i>	M	-	-	-	-	+	+	-
7*	<i>Sapajus sp</i>	M	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>Sapajus sp</i>	F	+	-	-	+	-	+	-
9	<i>Sapajus sp</i>	F	+	-	-	+	-	+	-

Ag: antígeno; Ac: anticorpo; *: filhote

Em relação aos antígenos do sistema Rh, todos os animais foram negativos de forma concordante para os antígenos D (**Figura 13**) e E, e fracamente positivos, também de forma concordante, para os antígenos C, c, e (**Figura 14**). Tais achados podem ser observados na **Tabela 2**.

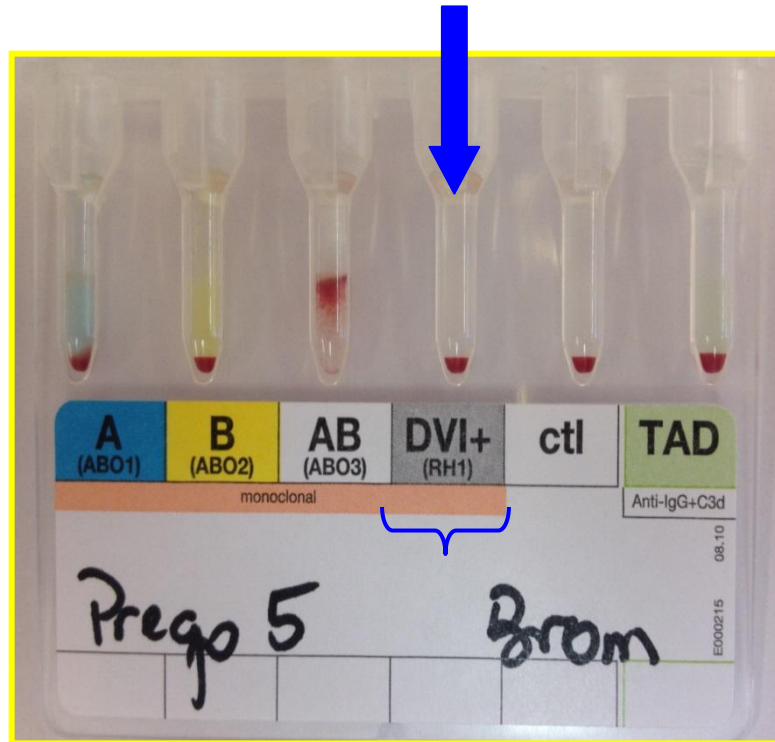


FIGURA 13 – Sistema Rh (pesquisa do antígeno D negativa na amostra do *Sapajus sp* 5 – seta azul).



FIGURA 14 – Sistema Rh (pesquisa do antígeno E negativa nas amostras dos *Sapajus* sp1 a 9 – setas azuis; pesquisa dos antígenos C, c, e positiva fraca nas amostras dos *Sapajus* sp 1 a 9 – setas verdes).

TABELA 2 – Pesquisa dos antígenos do sistema Rh em 9 macacos-prego (*Sapajus sp*), mostrando concordância completa entre todos os animais, com negatividade para os antígenos D e E, e positividade fraca para os antígenos C, c, e.

Animal	Gênero	Sexo	Tipagem Rh				
			Ag D	Ag C	Ag c	Ag E	Ag e
1	<i>Sapajus sp</i>	M	-	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w
2	<i>Sapajus sp</i>	M	-	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w
3	<i>Sapajus sp</i>	F	-	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w
4	<i>Sapajus sp</i>	F	-	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w
5	<i>Sapajus sp</i>	M	-	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w
6	<i>Sapajus sp</i>	M	-	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w
7*	<i>Sapajus sp</i>	M	-	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w
8	<i>Sapajus sp</i>	F	-	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w
9	<i>Sapajus sp</i>	F	-	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w

Ag: antígeno; Ac: anticorpo; *: filhote; +^w: positivo fraco (*weak*)

Os 9 animais foram negativos, de forma concordante e completa, para todos os antígenos eritrocitários dos sistemas Lewis (antígenos Le^a e Le^b), P (antígeno P₁), MNS (antígenos M, N, S, s) e Lutheran (antígenos Lu^a e Lu^b) [Figura15]. Tais achados podem ser observados na **Tabela 3**.

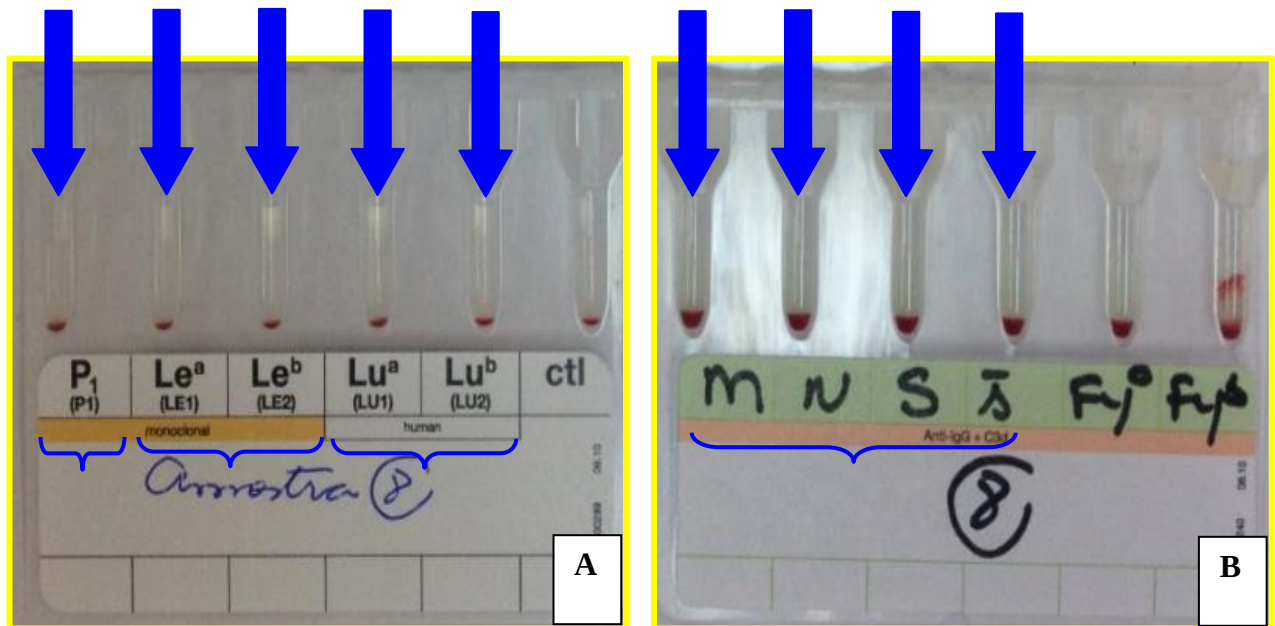


FIGURA 15 -15A: Sistema P (pesquisa do antígeno P₁ negativa no *Sapajus sp 8* – seta azul); sistema Lewis (pesquisa dos antígenos Le^a e Le^b negativa no *Sapajus sp 8* - setas azuis); sistema Lutheran (pesquisa dos antígenos Lu^a e Lu^b negativa no *Sapajus sp 8* – setas azuis); **15B** – Sistema M, N, S (pesquisa dos antígenos M, N, S, e s negativa no *Sapajus sp 8* (setas azuis).

TABELA 3 – Pesquisa dos antígenos dos sistemas Lewis, P, MNS e Lutheran em 9 macacos-prego (*Sapajus sp*), mostrando concordância completa entre os animais, com negatividade para todos os antígenos.

Animal	Gênero	Sexo	Sistema Lewis		Sistema P	Sistema MNS				Sistema Lutheran	
			Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag
			Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b
1	<i>Sapajus sp</i>	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>Sapajus sp</i>	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>Sapajus sp</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>Sapajus sp</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>Sapajus sp</i>	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>Sapajus sp</i>	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7*	<i>Sapajus sp</i>	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>Sapajus sp</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>Sapajus sp</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ag: antígeno; *: filhote

Todos os animais foram positivos, também de forma concordante, para o antígeno eritrocitário do sistema Diego (antígeno Di^a) [Figura 16]. Tais achados podem ser observados na **Tabela 4**.

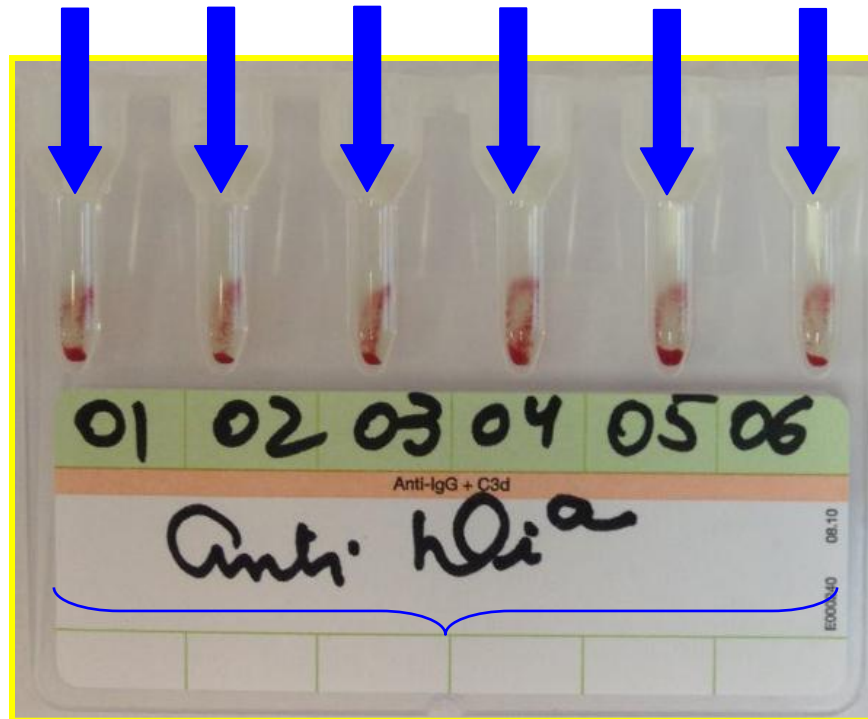


FIGURA 16 –Sistema Diego (pesquisa do antígeno Di^a positiva nos *Sapajus sp* 1 a 6 – setas azuis).

TABELA 4 – Pesquisa do antígeno Di^a do sistema Diego em 9 macacos-prego (*Sapajus sp*), mostrando concordância completa entre os animais, com positividade para o antígeno.

Animal	Gênero	Sexo	Sistema Diego
			Ag Di ^a
1	<i>Sapajus sp</i>	M	+
2	<i>Sapajus sp</i>	M	+
3	<i>Sapajus sp</i>	F	+
4	<i>Sapajus sp</i>	F	+
5	<i>Sapajus sp</i>	M	+
6	<i>Sapajus sp</i>	M	+
7*	<i>Sapajus sp</i>	M	+
8	<i>Sapajus sp</i>	F	+
9	<i>Sapajus sp</i>	F	+

Ag: antígeno; *: filhote

Em relação aos sistemas Kell, Kidd e Duffy, houve concordância completa nos 9 animais, que mostraram negatividade antigênica para os antígenos K, Kp^a e Kp^b e positividade para o antígeno k (sistema Kell), negatividade antigênica para o antígeno Jk^b e positividade para o antígeno Jk^a (sistema Kidd), negatividade para o antígeno Fy^a e positividade para o antígeno Fy^b (sistema Duffy) **[Figura17]**. Tais achados podem ser observados na **Tabela 5**.

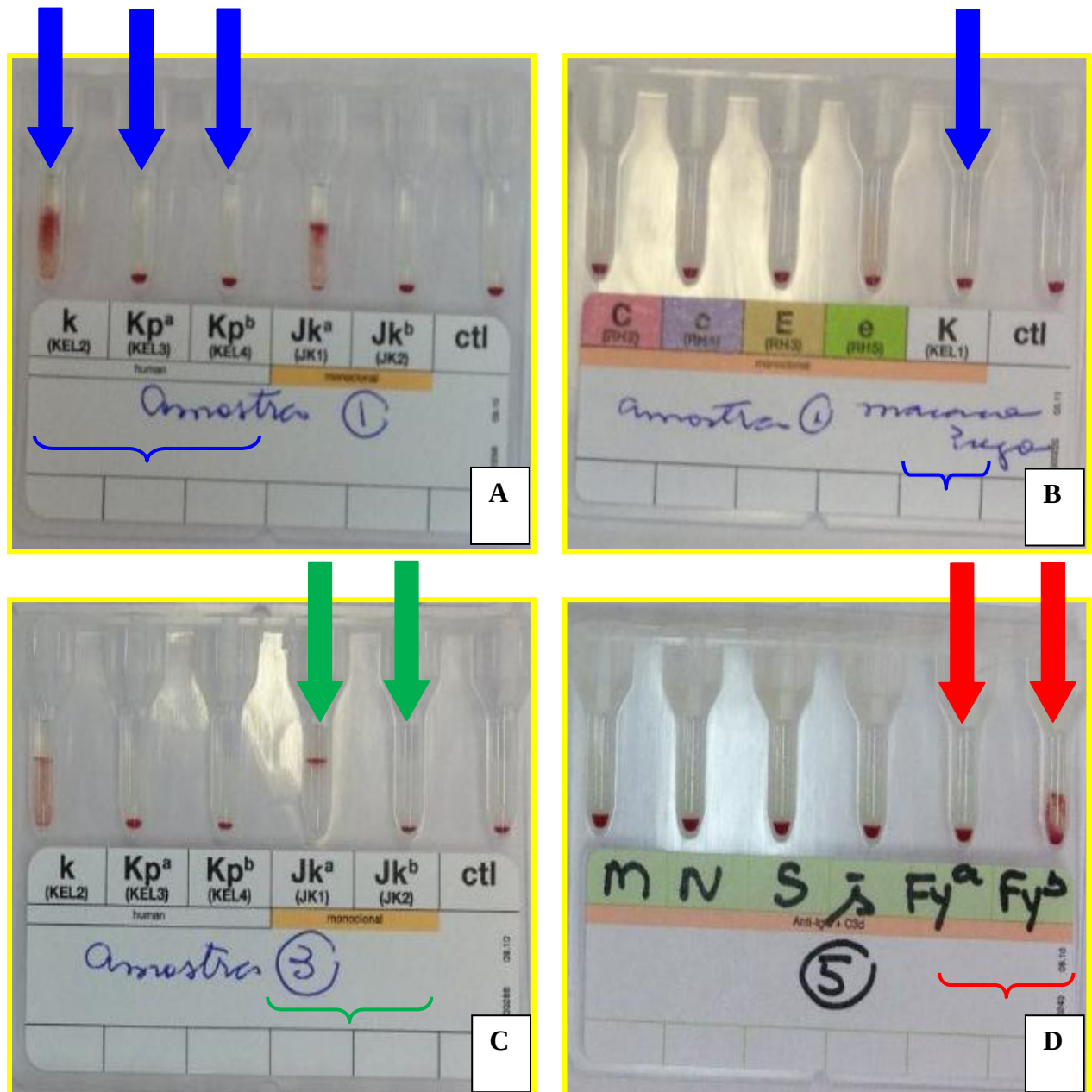


FIGURA 17 – 17A: Sistema Kell (pesquisa do antígeno k positiva e pesquisados antígenos Kp^a e Kp^b negativa no *Sapajus* sp 1 – setas azuis); **17B:** Sistema Kell (pesquisa do antígeno K negativa no *Sapajus* sp 1 – seta azul); **17C:** Sistema Kidd (pesquisa do antígeno Jk^a positiva e do antígeno Jk^b negativa no *Sapajus* sp 3 – setas verdes); **17D:** Sistema Duffy (pesquisa do antígeno Fy^a negativa e do antígeno Fy^b positiva no *Sapajus* sp 5 – setas vermelhas).

TABELA 5 – Pesquisa de antígenos dos sistemas Kell, Kidd e Duffy em 9 macacos-prego (*Sapajus sp*), mostrando concordância completa entre todos os animais com positividade para os antígenos k, Jk^a e Fy^b, e negatividade para os demais.

Animal	Gênero	Sexo	Sistema Kell				Sistema Kidd		Sistema Duffy	
			Ag K	Agk	Ag Kp ^a	Ag Kp ^b	Ag Jk ^a	Ag Jk ^b	AgFy ^a	AgFy ^b
1	<i>Sapajus sp</i>	M	-	+	-	-	+	-	-	+
2	<i>Sapajus sp</i>	M	-	+	-	-	+	-	-	+
3	<i>Sapajus sp</i>	F	-	+	-	-	+	-	-	+
4	<i>Sapajus sp</i>	F	-	+	-	-	+	-	-	+
5	<i>Sapajus sp</i>	M	-	+	-	-	+	-	-	+
6	<i>Sapajus sp</i>	M	-	+	-	-	+	-	-	+
7*	<i>Sapajus sp</i>	M	-	+	-	-	+	-	-	+
8	<i>Sapajus sp</i>	F	-	+	-	-	+	-	-	+
9	<i>Sapajus sp</i>	F	-	+	-	-	+	-	-	+

Ag: antígeno; *: filhote

A **Tabela 6** agrupa as características dos 28 antígenos eritrocitários dos 11 sistemas sanguíneos humanos pesquisados, observadas nos 9 macacos-prego (*Sapajus sp*). O grupo sanguíneo Diego (em vermelho) teve seu antígeno presente de forma completa e homogênea, em todos os animais. Os sistemas sanguíneos Kell, Kidd e Duffy (em azul) tiveram antígenos presentes de forma incompleta, porém, homogênea – antígenos presentes em todos os macacos e antígenos ausentes em todos os macacos. Em rosa, observam-se antígenos dos sistemas ABO e Rh, presentes de forma incompleta, parcialmente homogênea (antígenos C, c, e presentes de forma completa; antígenos A₁, B, D, E ausentes de forma completa) e parcialmente heterogênea (antígenos A e AB). Os demais sistemas (H, Lewis, P, MNS e Lutheran), em verde, mostraram ausência completa e homogênea de seus antígenos.

TABELA 6 – Caracterização de 11 sistemas sanguíneos humanos em eritrócitos de 9 macacos-prego (*Sapajus sp*) segundo a presença completa e homogênea do antígeno do sistema (vermelho), a presença incompleta e homogênea dos antígenos do sistemas (azul), a presença incompleta e parcialmente homogênea / parcialmente heterogênea dos antígenos do sistema (rosa), e ausência completa e homogênea dos antígenos dos sistemas (verde).

Sistemas sanguíneos	Diego	Kell	Kidd	Duffy	Rh			ABO		ABO		H	Lewis		P	MNS				Lutheran		Rh		Kell			Kidd	Duffy
Ags Pregos	Di ^a	k	Jk ^a	Fy ^b	C	c	e	A	AB	A ₁	B	H	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	D	E	K	Kp ^a	Kp ^b	Jk ^b	Fy ^a
1																												
2																												
3																												
4																												
5																												
6																												
7*																												
8																												
9																												

Ags: antígenos; Cor cinza-forte: Ag presente; Cor cinza-intermediário: Ag presente de forma fraca; Cor cinza-claro: Ag A revelado apenas pela bromelina; Cor bege: Ag ausente; *: filhote

5.2 Resultados referentes aos macacos bugios (*Alouatta sp*)

Estudaram-se 10 macacos bugios (*Alouatta sp*) adultos, sendo 6 fêmeas e 4 machos. Destes, 6 animais pertenciam à espécie *Alouatta guariba* (bugios ruivos), correspondendo a 3 fêmeas e 3 machos, e outros 4 pertenciam à espécie *Alouatta caraya* (bugios pretos), correspondendo a 3 fêmeas e 1 macho (**Figura18**).



FIGURA18: 18A e 18B- Macaco bugio-ruivo (*A. guariba*) capturado na jaula do CEMPAS e sedado para coleta de amostra sanguínea.

Os 10 animais foram negativos, de forma concordante e completa, para todos os antígenos eritrocitários dos sistemas AB (antígenos A, A₁, B, AB) e H (antígeno H). A tipagem ABO realizada pela prova direta foi compatível com a realizada pela prova reversa (**Figura19**). Tais achados podem ser observados na **Tabela 7**.

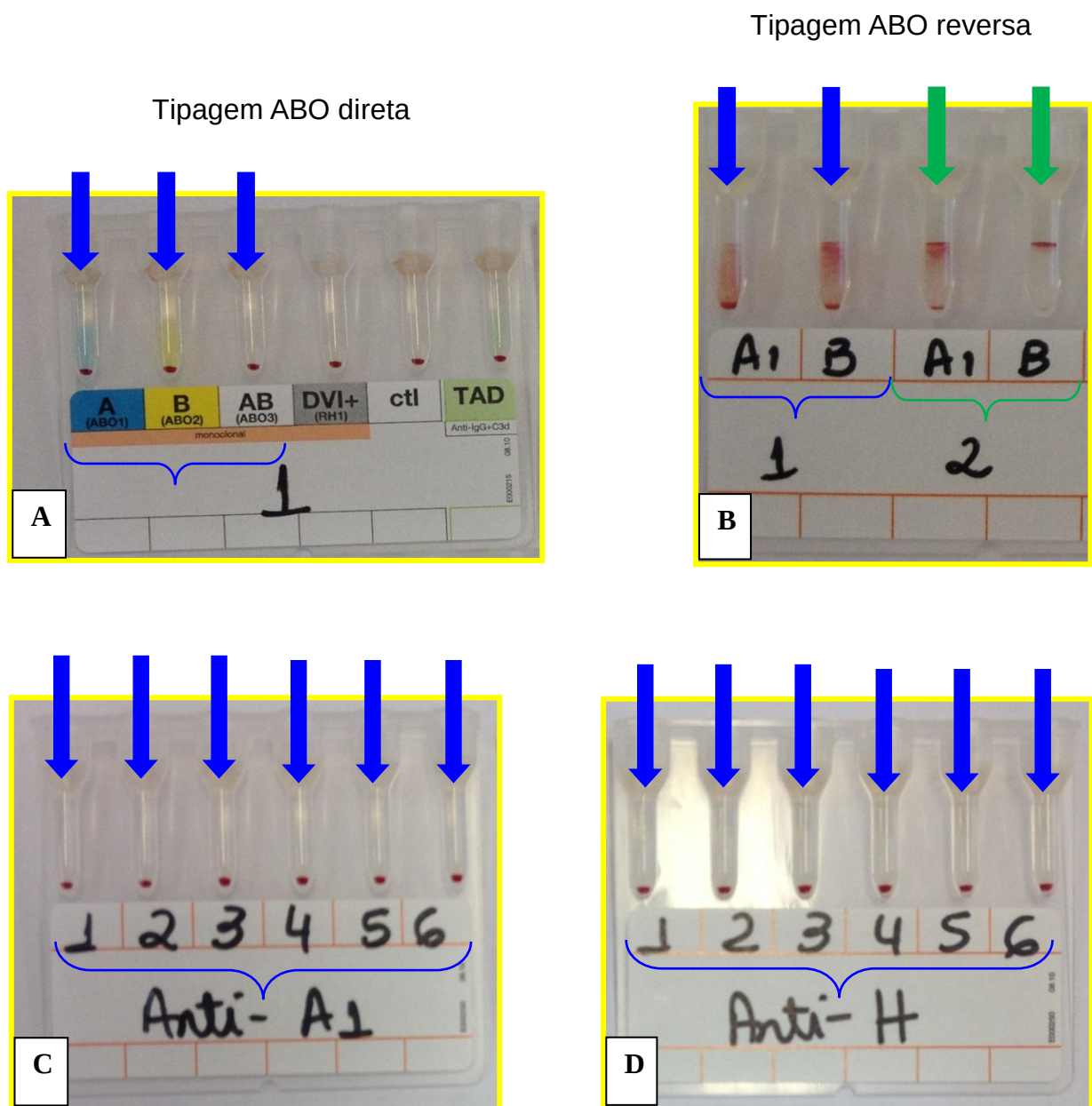


FIGURA 19 -19A: Sistema ABO (tipagem direta - pesquisa dos antígenos A, B e AB negativa) ausente nas hemácias do *Alouatta sp* 1 (setas azuis); **19B:** anticorpos para o sistema ABO (tipagem reversa – pesquisa dos anticorpos anti-A₁ e anti-B positiva) positivos no soro dos *Alouatta sp* 1 (setas azuis) e 2 (setas verdes); **19C:** pesquisa do antígeno A₁ negativa nos *Alouatta sp* 1 a 6 (setas azuis); **19D:** pesquisa do antígeno H negativa nos *Alouatta sp* 1 a 6 (setas azuis).

TABELA 7 – Pesquisa de antígenos do sistema ABO através das técnicas direta (pesquisa de antígenos nas hemácias) e reversa (pesquisa de anticorpos no soro), e pesquisa do antígeno H, em 10 macacos bugios (*Alouatta sp*), mostrando concordância completa entre os animais, com negatividade para todos os antígenos, além de tipagem ABO reversa concordante com a tipagem ABO direta.

Animal	Gênero	Sexo	Tipagem ABO direta				Tipagem ABO reversa		Ag H
			Ag	Ag	Ag	Ag	Ac	Ac	
			A	A ₁	B	AB	anti-A ₁	anti-B	
1	<i>A.guariba</i>	M	-	-	-	-	+	+	-
2	<i>A.guariba</i>	F	-	-	-	-	+	+	-
3	<i>A.guariba</i>	M	-	-	-	-	+	+	-
4	<i>A.guariba</i>	F	-	-	-	-	+	+	-
5	<i>A.guariba</i>	M	-	-	-	-	+	+	-
6	<i>A.guariba</i>	F	-	-	-	-	+	+	-
7	<i>A.caraya</i>	F	-	-	-	-	+	+	-
8	<i>A.caraya</i>	F	-	-	-	-	+	+	-
9	<i>A.caraya</i>	M	-	-	-	-	+	+	-
10	<i>A.caraya</i>	F	-	-	-	-	+	+	-

Ag: antígeno; Ac: anticorpo

Os 10 animais foram negativos, de forma concordante e completa, para todos os antígenos eritrocitários dos sistemas Rh (antígenos D, C, c, E, e), Lewis (antígenos Le^a e Le^b) e Lutheran (antígenos Lu^a e Lu^b) [Figura 20]. Tais achados podem ser observados na Tabela 8.

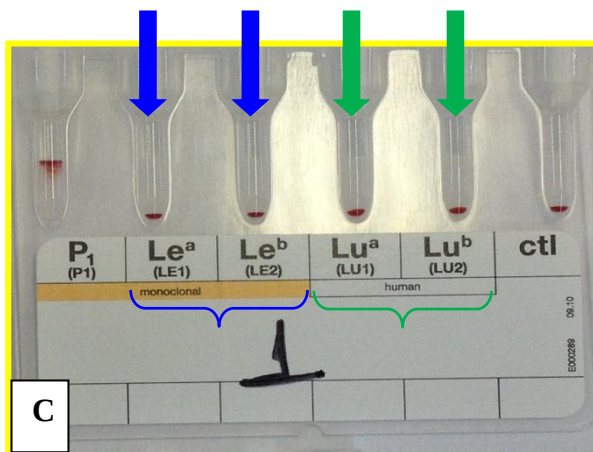
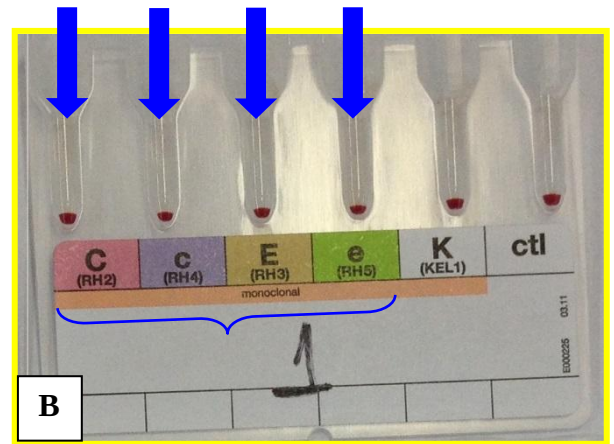
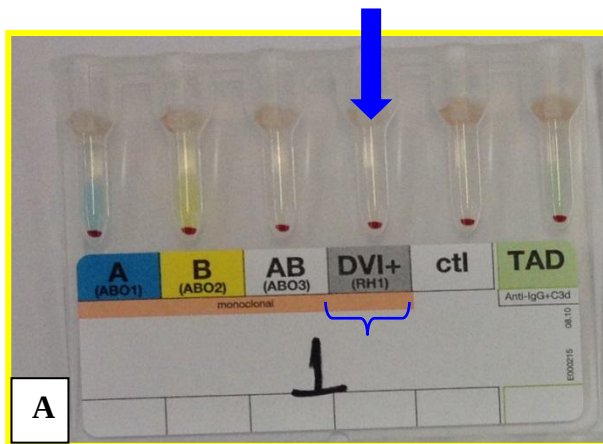


FIGURA 20 -20A: Sistema Rh (pesquisa do antígeno D negativa no *Alouatta sp 1* – seta azul); **20B:** Sistema Rh (pesquisa dos antígenos C, c, E, e e negativa no *Alouatta sp 1* - setas azuis); **20C:** Sistema Lewis (pesquisa dos antígenos Le^a e Le^b negativa no *Alouatta sp 1* – setas azuis) e sistema Lutheran (pesquisa dos antígenos Lu^a e Lu^b negativa no *Alouatta sp 1* – setas verdes).

TABELA 8 – Pesquisa dos antígenos dos sistemas Rh, Lewis e Lutheran em 10 macacos bugios (*Alouatta sp*), mostrando concordância completa entre os animais, com negatividade para todos os antígenos.

Animal	Espécie	Sexo	Sistema Rh					Sistema Lewis		Sistema Lutheran	
			Ag D	Ag C	Ag c	Ag E	Ag e	Ag Le ^a	Ag Le ^b	Ag Lu ^a	Ag Lu ^b
1	<i>A.guariba</i>	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>A.guariba</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>A.guariba</i>	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>A.guariba</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>A.guariba</i>	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>A.guariba</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>A. caraya</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>A. caraya</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>A. caraya</i>	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>A. caraya</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ag: antígeno

Todos os animais foram positivos, também de forma concordante e completa, para os antígenos eritrocitários dos sistemas P (antígeno P_1) e Diego (antígeno Di^a) [Figura 21]. Tais achados podem ser observados na Tabela 9.

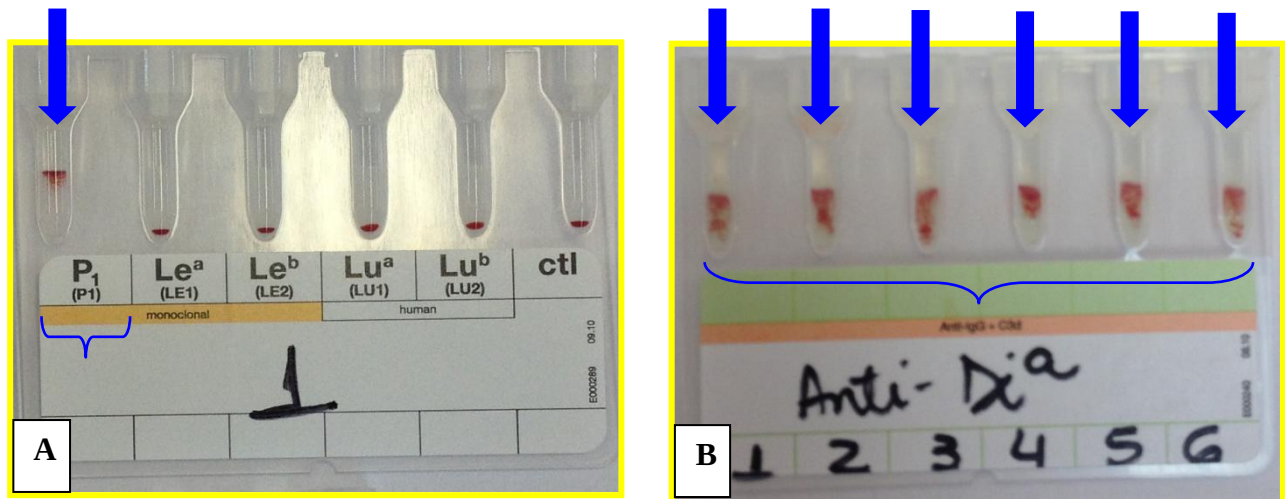


FIGURA – 21A: Sistema P (pesquisa do antígeno P_1 positiva no *Alouatta sp 1* – seta azul); **21B:** Sistema Diego (pesquisa do antígeno Di^a positiva nos *Alouatta sp 1* a 6 - setas azuis).

TABELA 9 – Pesquisa dos antígenos dos sistemas P e Diego em 10 macacos bugios (*Alouatta sp*), mostrando concordância total entre os animais, com expressão de ambos os antígenos.

Animal	Espécie	Sexo	Sistema P	Sistema Diego
			Ag P ₁	Ag Di ^a
1	<i>A.guariba</i>	M	+	+
2	<i>A.guariba</i>	F	+	+
3	<i>A.guariba</i>	M	+	+
4	<i>A.guariba</i>	F	+	+
5	<i>A.guariba</i>	M	+	+
6	<i>A.guariba</i>	F	+	+
7	<i>A. caraya</i>	F	+	+
8	<i>A. caraya</i>	F	+	+
9	<i>A. caraya</i>	M	+	+
10	<i>A. caraya</i>	F	+	+

Ag: antígeno

Em relação aos sistemas Kell, Kidd e Duffy, houve concordância completa nos 10 animais, que mostraram negatividade para os antígenos K, Kp^a e Kp^b e positividade para o antígeno k (sistema Kell), negatividade para o antígeno Jk^b e positividade para o antígeno Jk^a (sistema Kidd), negatividade para o antígeno Fy^a e positividade para o

antígeno Fy^b (sistema Duffy) [Figuras 22 e 23]. Tais achados podem ser observados na Tabela 10.

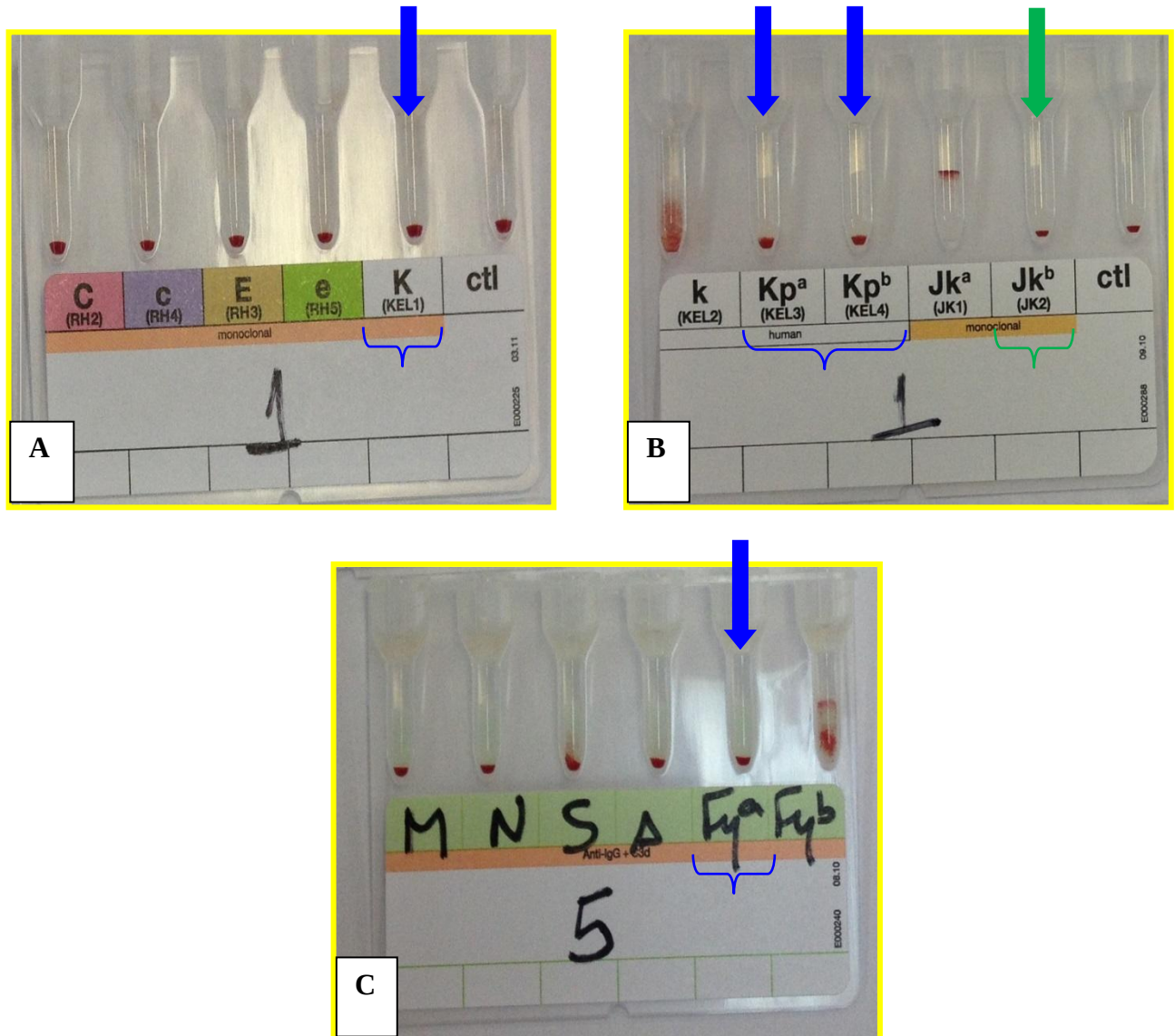


FIGURA 22 – 22A: Sistema Kell (pesquisa do antígeno K negativa no *Arouatta sp 1* – seta azul); **22B:** Sistema Kell (pesquisa dos antígenos Kp^a e Kp^b negativa no *Arouatta sp 1* – setas azuis); Sistema Kidd (pesquisa do antígeno Jk^b negativa no *Arouatta sp 1* – seta verde); **22C:** Sistema Duffy (pesquisa do antígeno Fy^a negativa no *Arouatta sp 1* – seta azul).

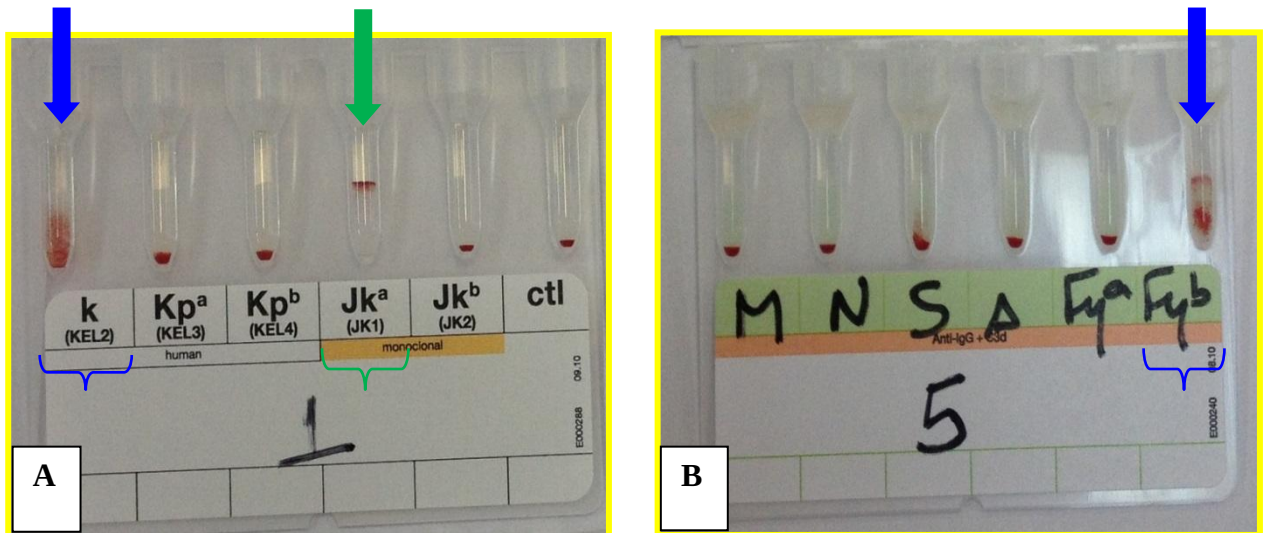


FIGURA 23 – 23A: Sistema Kell (pesquisa do antígeno k positiva no *Alouatta sp* 1 – seta azul); Sistema Kidd (pesquisa do antígeno Jk^a positiva no *Alouatta sp* 1 – seta verde); **23B:** Sistema Duffy (pesquisa do antígeno Fy^b positiva no *Alouatta sp* 5 – seta azul).

TABELA 10 – Pesquisa de antígenos dos sistemas Kell, Kidd e Duffy em 10 macacos bugios (*Alouatta sp*), mostrando concordância total entre os animais, com negatividade para alguns antígenos e positividade para outros.

Animal	Espécie	Sexo	Sistema Kell				Sistema Kidd		Sistema Duffy	
			Ag K	Agk	Ag Kp ^a	Ag Kp ^b	Ag Jk ^a	Ag Jk ^b	AgFy ^a	AgFy ^b
1	<i>A.guariba</i>	M	-	+	-	-	+	-	-	+
2	<i>A.guariba</i>	F	-	+	-	-	+	-	-	+
3	<i>A.guariba</i>	M	-	+	-	-	+	-	-	+
4	<i>A.guariba</i>	F	-	+	-	-	+	-	-	+
5	<i>A.guariba</i>	M	-	+	-	-	+	-	-	+
6	<i>A.guariba</i>	F	-	+	-	-	+	-	-	+
7	<i>A. caraya</i>	F	-	+	-	-	+	-	-	+
8	<i>A. caraya</i>	F	-	+	-	-	+	-	-	+
9	<i>A. caraya</i>	M	-	+	-	-	+	-	-	+
10	<i>A. caraya</i>	F	-	+	-	-	+	-	-	+

Ag: antígeno

No sistema MNS (antígenos M, N, S, s), houve concordância completa em relação aos antígenos M e N, negativos nos 10 animais. Os antígenos S e s desse sistema foram os únicos parcialmente discordantes nos *Alouatta sp*: 7 bugios mostraram concordância completa, ou seja, foram negativos para ambos (4 bugios

ruivos e 3 bugios pretos), 2 foram apenas S positivo (1 bugio ruivo e 1 bugio preto), e 1 foi positivo para ambos (1 bugio ruivo) [Figura 24]. Tais achados podem ser observados na Tabela 11.

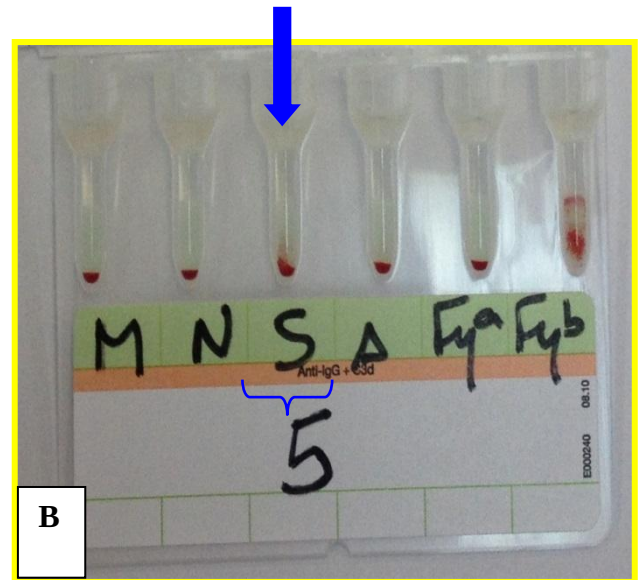
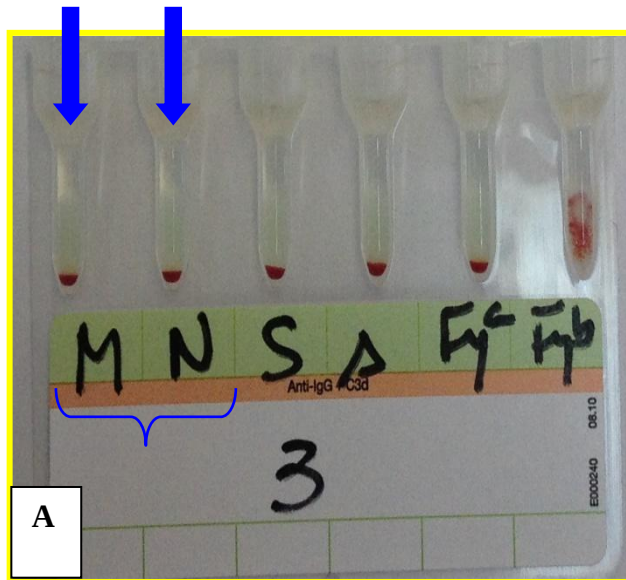


FIGURA 24 – 24A: Sistema MNS (antígenos M e N negativos no *Alouatta sp* 3 – setas azuis); **24B:** Sistema MNS (antígeno S positivo no *Alouatta sp* 5 – seta azul); **24C:** Sistema MNS (antígeno S e s positivos no *Alouatta sp* 4 – setas azuis).

TABELA 11 – Pesquisa dos antígenos do sistema MNS em 10 macacos bugios (*Alouatta sp*), mostrando concordância completa entre os animais em relação aos antígenos M e N, com discordância parcial em relação aos antígenos S e s.

Animal	Espécie	Sexo	Sistema MNS			
			Ag M	Ag N	Ag S	Ag s
1	<i>A.guariba</i>	M	-	-	-	-
2	<i>A.guariba</i>	F	-	-	-	-
3	<i>A.guariba</i>	M	-	-	-	-
4	<i>A.guariba</i>	F	-	-	+	+
5	<i>A.guariba</i>	M	-	-	+	-
6	<i>A.guariba</i>	F	-	-	-	-
7	<i>A. caraya</i>	F	-	-	-	-
8	<i>A. caraya</i>	F	-	-	-	-
9	<i>A. caraya</i>	M	-	-	+	-
10	<i>A. caraya</i>	F	-	-	-	-

Ag: antígeno

O **Tabela 12** agrupa as características dos 28 antígenos eritrocitários dos 11 sistemas sanguíneos humanos pesquisados, observadas nos 10 macacos bugios (*Alouatta sp*). Os grupos sanguíneos P e Diego (em vermelho) tiveram seus antígenos presentes de forma completa e homogênea, em todos os animais. Os sistemas sanguíneos Kell, Kidd e Duffy (em azul) tiveram antígenos presentes de forma incompleta, porém, homogênea - antígenos presentes em todos os macacos e antígenos ausentes em todos os macacos. Em rosa, observam-se antígenos do sistema MNS, presentes de forma incompleta, parcialmente homogênea (antígenos M e N), e parcialmente heterogênea (antígenos S e s). Os demais sistemas (ABO, H, Rh, Lewis e Lutheran), em verde, mostraram ausência completa e homogênea de seus antígenos.

TABELA 12 – Caracterização de 11 sistemas sanguíneos humanos em eritrócitos de 10 macacos bugios (*Alouatta sp*) segundo a presença completa e homogênea dos antígenos dos sistemas (vermelho), a presença incompleta e homogênea dos antígenos dos sistemas (azul), a presença incompleta e parcialmente homogênea / parcialmente heterogênea dos antígenos do sistema (rosa), e ausência completa e homogênea dos antígenos dos sistemas (verde).

Sistemas sanguíneos	P	Diego	Kell	Kidd	Duffy	MNS		ABO				H	Rh					Lewis		Lutheran		Kell			Kidd	Duffy	MNS	
Ags Bugios	P ₁	Di ^a	k	Jk ^a	Fy ^b	S	s	A	A1	B	AB	H	D	C	c	E	e	Le ^a	Le ^b	Lu ^a	Lu ^b	K	Kp ^a	Kp ^b	Jk ^b	Fy ^a	M	N
1																												
2																												
3																												
4																												
5																												
6																												
7																												
8																												
9																												
10																												

Ags: antígenos; Cor cinza: Ag presente; Cor bege: Ag ausente

DISCUSSÃO

Os 9 macacos-prego e os 10 macacos bugios deste estudo mostraram-se completamente concordantes e positivos para o sistema Diego, em relação ao antígeno Di^a pesquisado.

Em humanos os antígenos do sistema Diego situam-se na banda 3, a maior proteína da membrana eritrocitária, que corresponde a um canal de ânions com função no transporte de HCO₃⁻ e Cl⁻ através da membrana, e papel na manutenção da forma das hemácias (função estrutural), já que se liga a outras proteínas do citoesqueleto das células eritroides. A deficiência de banda 3 é responsável por grande parte dos casos de esferocitose hereditária em humanos, condição onde as hemácias se tornam esféricas, causando doença hemolítica extravascular de gravidade variável. A banda 3 também parece relacionar-se com a formação de antígenos senescentes na superfície das hemácias, responsáveis pelo reconhecimento e destruição das mesmas por histiócitos do sistema monocítico-macrofágico, particularmente, no baço (hemocaterese fisiológica). Portanto, o sistema Diego encontra-se relacionado a uma proteína de membrana (banda 3) com funções absolutamente vitais para as hemácias, que garante sua sobrevivência com forma e funções preservadas e destruição fisiológica no momento adequado (COVAS, 2013; BONIFACIO & NOVARETTI, 2009).

Acredita-se, ainda, que o antígeno Di^a faça parte de um complexo de adesão para parasitas da malária (*Plasmodium sp*) à superfície das hemácias e, subsequentemente, ao endotélio vascular, favorecendo a infecção humana por tais protozoários (JAROLIN et al, 1998; MURADOR & DEFFUNE, 2007). Há relatos de malária por *Plasmodium knowlesi* em macacos [COSTA, 2016]. São Thiago (2003) relatou casos de malária em macacos-prego e macacos bugios, dentre outros primatas não humanos, no Sul do Brasil (SÃO THIAGO, 2003). Embora os plasmódios envolvidos tenham sido o *Plasmodium simium* (em bugios) e o *Plasmodium brasilianum* (em bugios e pregos), tais parasitas parecem se assemelhar ao *Plasmodium ovale* e ao *Plasmodium malarie*, respectivamente. Portanto, pode ser que o antígeno Di^a, observado nos primatas desse estudo, também possa ter algum papel favorecedor em eventual infecção por malária nesses animais.

O antígeno Di^a é considerado um marcador antropológico. Sua frequência em caucasianos (Europa e EUA) e negros (África) é de 1%, sendo muito mais comum em asiáticos (6 – 15%), e muito frequente em indígenas (> 30%), particularmente, nos sul-americanos (em 36.1% dos índios Carajás, 45.8% dos índios Kaiagangues e 75.7% dos índios Parakanãs do Brasil) [COSTA, 2016; FABRON-JR & BALEOTTI-JR, 2007].

Não encontramos referência à pesquisa de antígenos do sistema Diego em grandes macacos antropoides, em macacos não antropoides do Velho e do Novo Mundo ou em prosímios.

Os 9 macacos-prego e os 10 macacos bugios deste estudo mostraram-se completamente concordantes e negativos nos sistemas H, Lewis e Lutheran, em relação aos antígenos pesquisados, respectivamente, H, Le^a, Le^b e Lu^a, Lu^b.

O antígeno H das hemácias recentemente passou a integrar o chamado sistema H (DANIELS & REID, 2010). Esse antígeno se origina pela adição de uma L-fucose a uma galactose terminal (substância precursora) na superfície do eritrócito, com auxílio da fucosiltransferase H (codificada pelo gene *FUT1* no cromossomo 19). O antígeno H serve de substrato para transferases A e B, que produzirão os antígenos A e/ou B sobre uma galactose terminal de sua própria molécula. Portanto, para se ter antígenos A e/ou B (do sistema ABO), é necessário se ter o antígeno H como substrato na membrana do eritrócito. Indivíduos que apresentam apenas o antígeno H, sem resíduos A e/ou B adicionados, pertencem ao grupo sanguíneo O. Os indivíduos H negativos são portadores do chamado fenótipo Bombaim(O_h), extremamente raro (0.01%) em humanos (COVAS, 2013; BONIFACIO & NOVARETTI, 2009; VIZZONI & COTIAS, 2013). Tais indivíduos apresentam potente anticorpo anti-H sérico capaz de desencadear grave reação transfusional (COZAC, 2007). O antígeno H, entretanto, é de alta prevalência, estando presente nos eritrócitos de 99.9% e nas secreções de 80% dos humanos. Esses últimos são chamados de indivíduos H secretores, por secretarem também a fucosiltransferase Se(além da fucosiltransferase H), codificada pelo gene *FUT2*, no mesmo cromossomo 19 (VIZZONI e COTIAS, 2013).

No presente estudo, verificamos que todos os animais, macacos-prego e macacos bugios, foram negativos para o antígeno H. Poderíamos dizer que todos os animais estudados apresentaram fenótipo semelhante ao Bombaim (O_h) humano (Bombaim *like*). Isso poderia decorrer da ausência, nesses primatas, de um gene similar ao *FUT1*, que codifica para a fucosiltransferase implicada na produção do antígeno H humano. Entretanto, já foram relatados primatas não humanos, incluindo macacos-prego e macacos bugios do Novo Mundo, pertencentes aos tipos sanguíneos A, B e O (BLANCHER & SOCHA, 1997b). Portanto, parece correto supor que tais animais apresentassem o antígeno H, analogamente aos humanos. Portanto, deveriam apresentar um gene similar ao *FUT1* humano. Vale ressaltar, que existem humanos deficientes do gene *FUT1*, portadores do fenótipo chamado para-Bombaim (A_h , B_h , e AB_h). Tais indivíduos se caracterizam por apresentarem quantidades mínimas dos antígenos A e B nos seus eritrócitos, além de pouco ou nenhum antígeno H. Nesse fenótipo, ao contrário do Bombaim, a fucosiltransferase H está presente com atividade muito fraca, sendo que apequena quantidade de substância H produzida é convertida em antígenos A e/ou B pelas respectivas transferases A e B (BATISSOCO & NOVARETTI, 2003). Os macacos-prego deste estudo poderiam, talvez, ser caracterizados como portadores do fenótipo para-Bombaim, já que não revelaram antígeno H, mas, ou pertenciam ao grupo sanguíneo A, ou não tiveram o sistema ABO detectado. Essa hipótese é reforçada pelo fato dos antígenos A dos 5 animais fenotipados como A, só terem sido demonstrados após tratamento das hemácias com a enzima bromelina, o que sugere ocorrência de pequena quantidade de antígenos A na superfície das mesmas, sendo necessária exposição enzimática dos mesmos para ligação com os anticorpos correspondentes. Esse raciocínio, contudo, não se aplicaria aos 10 macacos bugios, que foram H negativos e ABO negativos, tendo se comportado laboratorialmente como portadores do fenótipo Bombaim(O_h) humano (Bombaim *like*). O fato de já terem sido descritos macacos bugios com fenótipos H e B positivos previamente (BLANCHER & SOCHA, 1997b), entretanto, leva à inferência de que, talvez, os macacos bugios deste estudo apresentem eventual modificação estrutural nas moléculas de seus antígenos H decorrente de polimorfismo gênico, comparativamente aos humanos de

forma a não ter havido reconhecimento das mesmas pelo anticorpo monoclonal anti-H utilizado neste estudo, que é produzido a partir da lecitina de *Ulex europeus*. A pesquisa do anticorpo anti-H, não realizada nos 2 grupos de primatas, teria sido importante para esclarecimento dessa questão.

O antígeno H está presente nos eritrócitos de 99.9% e nas secreções de 80% dos humanos de todas as etnias.

Blancher & Socha (1997) relataram presença do antígeno H em diferentes macacos do Novo Mundo, incluindo macacos-prego e macacos bugios (BLANCHER & SOCHA, 1997b).

Os antígenos carboidratos do sistema ABO, H e Lewis são considerados sistemas de histocompatibilidade. Estes carboidratos além de ter uma grande diversidade estrutural, atuam como receptores potenciais de microorganismos patogênicos e não patogênicos que influenciam a susceptibilidade e resistência infecções e doenças. Acredita-se que essa diversidade estrutural resulte da pressão ambiental e desempenhe um papel importante no contínuo comensalismo, parasitismo e simbiose. (HENRY, 2001; IMBERTY & VARROT, 2008; MATTOS, 2016).

No presente estudo, todos os animais, macacos-prego e macacos bugios, apresentaram fenotipagem Le (a-b-). Se considerarmos a hipótese anteriormente levantada, de que esses primatas fossem H secretores (para-Bombaim no caso dos macacos-prego, ou com antígeno H estruturalmente modificado e não reconhecido pelos anticorpos anti-H utilizados no caso dos macacos bugios), esperaríamos que os mesmos apresentassem o antígeno Le^b em suas hemácias sendo, portanto, portadores do fenótipo Le (a-b+). Por outro lado, se considerarmos que os mesmos não revelaram o antígeno H por serem não-secretores (Bombaim *like*, no caso dos macacos bugios), esperaríamos que tais animais exibissem o antígeno Le^a em suas hemácias. Entretanto, nenhuma dessas condições foi observada, o que pode sugerir que tais primatas sejam Le (a-b-), eventualmente, por não apresentarem um gene similar ao *FUT3* humano. Não consideramos a hipótese dos macacos serem negativos para os antígenos Lewis por ainda não terem iniciado a produção

desses antígenos, como os recém-nascidos humanos, pois os 18 animais adultos apresentaram fenótipo Lewis idêntico ao único filhote do grupo.

Em humanos, em todas as etnias, a ocorrência dos fenótipos Lewis é a seguinte: Le (a-b+) > Le (a+b-) > Le (a-b-) > Le (a+b+). O antígeno Le^b promove a adesão da bactéria *Helicobacter pylori* à mucosa gástrica (MATTOS & MATTOS, 2017). O fenótipo *null*, como observado nos macacos deste estudo, parece associar-se a maior risco de doença isquêmica cardíaca em humanos com anemia falciforme, podendo exercer alguma influência também na rejeição de órgãos transplantados (COZAC, 2007).

Blancher & Socha (1997) relataram pesquisa negativa do antígeno Le^a na saliva de alguns macacos do Novo Mundo, incluindo 4 macacos-prego, através de anticorpos anti-Le^a policlonais. Igualmente, não se encontrou o antígeno Le^a em macacos do Novo Mundo, com a utilização da técnica de hemoaglutinação com AcMo (BLANCHER & SOCHA, 1997b).

Em relação ao sistema Lutheran humano, seus antígenos estão expressos em duas glicoproteínas, a Lu e a B-CAM, codificadas pelo gene *LU*, situado no cromossomo 19. As proteínas da família CAM constituem-se em moléculas de adesão celular. Sabe-se que pacientes com anemia falciforme expressam mais dessas glicoproteínas Lu/B-CAM do que indivíduos sem a doença, o que parece estar associado com a aderência dos eritrócitos falcizados ao endotélio vascular e, conseqüentemente, com as crises vasoclusivas dessa condição mórbida. Tais proteínas também estão aumentadas em diferentes tumores malignos e podem estar envolvidas, junto com outros receptores, com a ocorrência de metástases (BONIFACIO & NOVARETTI, 2009). No presente estudo, todos os animais dos 2 gêneros, mostraram-se Lu^a e Lu^b negativos, o que poderia sugerir que tais espécies não apresentem um gene similar ao *LU* humano.

O antígeno Lu^b é de alta frequência em humanos, estando presente em 99.8% de todas as populações.

Não encontramos referência à pesquisa de antígenos do sistema Lutheran em grandes macacos antropoides, e em outros macacos do Velho e do Novo Mundo ou em prosímios.

Os 9 macacos-prego e os 10 macacos bugios mostraram-se completamente concordantes nos sistemas Kell, Kidd e Duffy, sendo todos positivos para os antígenos k (sistema Kell), Jk^a (sistema Kidd) e Fy^b (sistema Duffy), e todos negativos para os antígenos K, Kp^a e Kp^b (sistema Kell), JK^b (sistema Kidd) e Fy^a (sistema Duffy).

A proteína Kell pertence ao grupo de antígenos que desempenham função enzimática (zinco endopeptidases) com atividade formadora de pequenos peptídeos bioativos vasoconstrictores, podendo estar implicados na regulação do tônus vascular e da pressão arterial (COVAS, 2013; BONIFACIO & NOVARETTI, 2009; LANGHI-JR et al, 2007).

Os animais deste estudo foram negativos para o antígeno K e positivos para o antígeno k (Cellano), de forma similar aos humanos (fenótipo K-k+). Entretanto, mostraram-se negativos para o antígeno Kp^a e Kp^b, num padrão parcialmente oposto aos humanos, que exibem o fenótipo Kp (a-b+) em 98 a 100% dos indivíduos. Eventual polimorfismo no gene *KEL*, no cromossomo 7, poderia explicar as diferenças de frequências desses animais em relação aos humanos.

O antígeno k (Cellano) apresenta frequência de 91% em caucasianos e de 98% em negros, enquanto o antígeno K está presente em 9% dos caucasianos e 2% dos negros [COSTA, 2016; LANGHI-JR et al, 2007]. Os fenótipos Kp (a+b-) e Kp (a-b+) são observados, respectivamente, em menos de 2% e 98 a 100% dos humanos.

Não encontramos referência à pesquisa de antígenos do sistema Kell em grandes macacos antropoides, em outros macacos do Velho e do Novo Mundo ou em prosímios.

A proteína Kidd humana localiza-se numa proteína transportadora de ureia, codificada pelo gene *SLC14A1* (cromossomo 18), sendo expressa nos eritrócitos e nas células endoteliais da medula renal. Sabe-se que se trata

uma proteína transportadora constitutiva de ureia, que evita a desidratação das hemácias na sua passagem pela medula renal. Os dois antígenos mais importantes do sistema Kidd, o Jk^a e o Jk^b, ocorrem em frequências semelhantes em caucasianos, sendo que, o Jk^a é mais prevalente em negros. O fenótipo Jk (a-b-) é raro, caracterizando-se por não apresentar as proteínas Kidd nas hemácias. Seus portadores apresentam deficiência no transporte de uréia através da membrana do eritrócito (COVAS, 2013; BONIFACIO & NOVARETTI, 2009; LANGHI-JR et al, 2007).

Os animais deste estudo apresentaram o fenótipo Jk (a+b-), também observado em humanos, sobretudo na raça negra.

Nos seres humanos, o fenótipo Jk (a+b+) é o mais prevalente (40 a 50% em todas as populações). Já o Jk (a+b-) é mais prevalente em negros, o Jk (a-b+) predomina em caucasianos e asiáticos, e o Jk (a-b-) é raríssimo (< 1%) [LANGHI-JR et al, 2007].

Não encontramos referência à pesquisa de antígenos do sistema Kidd em grandes macacos antropoides, e em outros macacos do Velho e do Novo Mundo ou em prosímios.

O sistema Duffy humano compõe o sistema de adesão/receptores de membrana das hemácias. Seus dois principais antígenos, o Fy^a e o Fy^b, ocorrem em frequência nos caucasoides, estando ausentes em 60% dos negros africanos e em 90% dos asiáticos. Os antígenos Fy^a e Fy^b estão envolvidos no mecanismo de entrada do *Plasmodium vivax* nas hemácias humanas, e do *Plasmodium knowlesi* nas hemácias humanas e de macacos. Além disso, foi já demonstrado que a adição de anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b bloqueiam a entrada do *Plasmodium knowlesi* em eritrócitos humanos que contêm os antígenos Duffy. Negros americanos e africanos com fenótipo Fy (a-b-) são resistentes à infecção por *Plasmodium vivax* (COVAS, 2013; COSTA, 2016; VIZZONI & COTIAS, 2013; LANGHI-JR et al, 2007). Na África Ocidental, a infecção por *Plasmodium vivax* é praticamente ausente, acreditando-se que a seleção de indivíduos Fy (a-b-) seja uma resposta adaptativa de resistência à malária (LANGHI-JR et al, 2007).

Neste estudo, todos os 19 animais apresentaram fenótipo Fy (a-b+), que é relativamente frequente tanto em caucasianos quanto em negros. São Thiago (2003) relatou ocorrência de malária em macacos-prego e macacos bugios no Sul do Brasil (SÃO THIAGO, 2003). Não se pode descartar um papel do sistema Duffy, particularmente do antígeno Fy^b detectado neste estudo, como potencial favorecedor para essa infecção em tais gêneros de primatas.

Em humanos caucasianos e negros, o fenótipo Fy (a+b+) ocorre em 49% e 1%, o fenótipo Fy (a-b+) ocorre em 34% e 22%, o fenótipo Fy (a+b-) ocorre em 17% e 9%, e o fenótipo Fy (a-b-) ocorre em < 1% e 68%, respectivamente (LANGHI-JR et al, 2007).

Pogo & Chaudhuri (1997) relataram que o fenótipo Fy (a-b-) é comum em macacos do Novo Mundo (POGO & CHAUDHURI, 1997). Não encontramos referência à pesquisa de antígenos do sistema Duffy em grandes macacos antropóides, e em outros macacos do Velho e do Novo Mundo ou em prosímios.

Os 9 macacos-prego e os 10 macacos bugios deste estudo mostraram-se completamente discordantes no sistema P, sendo que todos os macacos-prego foram negativos para o antígeno P₁, e todos os macacos bugios foram positivos para o mesmo.

O antígeno P₁ é uma proteína (globosídeo) codificada pelo gene *B3GALNT1*, localizado no cromossomo 3, correspondendo a um receptor para o eritrovírus B19, que infecta progenitores eritróides (BONIFACIO & NOVARETTI, 2009), podendo originar quadros graves de aplasia eritroide em humanos. Estudos mais recentes, entretanto, sugerem que o antígeno P₁ é necessário mas não suficiente para a entrada do parvovírus nos precursores eritroides (SAAD & BARJAS-CASTRO, 2007).

Neste estudo, os macacos-prego foram 100% negativos para o antígeno P₁, enquanto os macacos bugios foram 100% positivos. Pode ser que os macacos-prego apresentem o fenótipo P₂, cujo antígeno não foi pesquisado neste estudo.

O antígeno P_1 ocorre em cerca de 80 a 90% dos indivíduos de todas as etnias. Cerca de 10% dos negros e 20% dos caucasianos, entretanto, apresentam o antígeno P_2 (COZAC, 2007).

Não encontramos referência à pesquisa do sistema P em grandes macacos antropoides, e em outros macacos do Velho e do Novo Mundo ou em prosímios.

Os 9 macacos-prego e os 10 macacos bugios mostraram-se parcialmente concordantes e parcialmente discordantes nos sistemas ABO, Rh e MNS.

Em relação ao sistema ABO, 4 macacos-prego, incluindo o filhote, e 10 macacos bugios, mostraram negatividade para os antígenos A, A_1 , B e AB, portanto, o sistema ABO não foi detectado nos mesmos. Cinco macacos-prego, entretanto, apresentaram positividade, inicialmente, apenas para o antígeno AB. O tratamento enzimático com a enzima bromelina, entretanto, revelou a presença do antígeno A nesses 5 animais, caracterizando-os como pertencentes ao tipo sanguíneo A. Os 19 animais, incluindo os 5 fenotipados como A, foram negativos para o antígeno A_1 . Isso sugere que, ou os 5 animais apresentam outro subgrupo de A, ou que o anticorpo anti- A_1 utilizado, produzido a partir da lecitina de *Dolichos biflorus*, foi ineficaz em detectar o antígeno A_1 nos eritrócitos dos mesmos. A tipagem ABO reversa foi absolutamente compatível com a tipagem ABO direta em 8/9 macacos-prego e nos 10 macacos bugios. No soro do filhote de macaco-prego, contudo, não foram detectados os esperados anticorpos naturais séricos anti- A_1 e anti-B, já que o mesmo não apresentou os antígenos A e B em suas hemácias.

Conforme já previamente exposto, sabe-se que o sistema ABO é relacionado ao sistema H. O antígeno H, quando presente na superfície das hemácias, serve de substrato para as transferases A e B, que produzem os antígenos A e/ou B sobre uma galactose terminal de sua molécula. Portanto, para se apresentar antígenos A e/ou B (do sistema ABO), é necessária a existência do antígeno H, como substrato, na membrana do eritrócito. Indivíduos que apresentam apenas o antígeno H, sem resíduos A e/ou B adicionados, pertencem ao grupo sanguíneo O. Os indivíduos H negativos são

designados portadores do fenótipo Bombaim (O_h) [COVAS, 2013; BONIFACIO & NOVARETTI, 2009; VIZZONI & COTIAS, 2013].

Quatro macacos-prego, incluindo o filhote, e os 10 macacos bugios foram negativos para os antígenos do sistema ABO. Como já referido, esses animais também foram negativos para o antígeno H. Em 5 macacos-pregos, entretanto, verificou-se positividade inicial para o antígeno AB, sem as esperadas positivities simultâneas para os antígenos A e/ou B. O tratamento das hemácias desses 5 animais com bromelina, enzima derivada do abacaxi, expôs os antígenos A das hemácias que, então, reagiram também com o anticorpo anti-A, e os macacos puderam ser caracterizados como pertencentes ao tipo sanguíneo A. A identificação do sistema ABO nesses 5 animais sugere, como nos humanos, a existência do antígeno H como substrato na membrana eritroide, pelo menos, no grupo dos *Sapajus sp.* Portanto, não parece possível que os macacos-prego sejam de fenótipo Bombaim (O_h), podendo ser, entretanto, do fenótipo para-Bombaim (A_h , B_h , e AB_h). Nesses casos, a fucosiltransferase H possui baixa atividade, sintetizando pouca substância H, que é total ou parcialmente transformada em poucos antígenos A e/ou B. Assim, o antígeno H costuma ser negativo, e a tipagem ABO costuma ser fracamente expressa nas hemácias do fenótipo para-Bombaim (BATISSOCO & NOVARETTI, 2003). Para os macacos bugios, contudo, não é possível fazer tal inferência, pois os mesmos se comportaram como portadores do fenótipo Bombaim (O_h) humano (Bombaim *like*). Contudo, já foram relatados primatas não humanos, incluindo macacos bugios do Novo Mundo, pertencentes ao tipo sanguíneo B (BLANCHER & SOCHA, 1997b), o que poderia conduzir ao mesmo raciocínio de fenótipo para-Bombaim nesses primatas (*Alouatta sp.*). O fato de já terem sido descritos macacos bugios com fenótipos H e B positivos previamente (BLANCHER & SOCHA, 1997b), entretanto, leva ao raciocínio de que, talvez, os macacos bugios deste estudo apresentem eventual modificação estrutural nas moléculas de seus antígenos H decorrente de polimorfismo gênico, comparativamente aos humanos, de forma a não ter havido reconhecimento das mesmas pela lectina anti-H utilizado neste estudo, que é produzido a partir do extrato de proteínas de *Ulex europeus*.

A prova de tipagem ABO reversa confirmou a tipagem direta em 8/9 macacos-prego e nos 10 macacos bugios, reforçando a ideia de que o uso dos anticorpos monoclonais na tipagem direta foi confiável. A prova reversa mostrou-se discordante apenas no filhote de *Sapajus sp.* No sistema ABO, o esperado é que indivíduos que não apresentem antígenos A, B ou AB nas suas hemácias, apresentem anticorpos séricos anti-A e anti-B, naturalmente. Isso não foi observado no filhote de *Sapajus sp.* Em humanos, os anticorpos contra o sistema ABO são produzidos apenas depois dos 3-6 meses de idade, com pico de produção dos 5 aos 10 anos, e com diminuição progressiva na velhice. Uma das explicações para o seu aparecimento seria a ampla distribuição de estruturas semelhantes aos antígenos A e B na natureza. As bactérias presentes no trato intestinal, na poeira e em alimentos promovem exposição constante de todos os indivíduos a estruturas semelhantes aos açúcares A e B, induzindo à formação dos anticorpos [VIZZONI & COTIAS, 2013]. Por essa razão, são chamados de anticorpos de ocorrência natural. Por se tratar de um filhote, é possível que o jovem *Sapajus sp* ainda não tivesse produzido os tais anticorpos naturais, conforme observado nos macacos-prego adultos, porém, por provável imaturidade imunológica idade-relacionada. Mesmo em cativeiro, a exposição a antígenos ambientais é grande em filhotes de primatas, diferentemente do que ocorre com bebês humanos.

No mundo, o fenótipo O é predominante (cerca de 50%) em caucasianos, negros e asiáticos, seguido pelos fenótipos A (cerca de 30 a 40%), B (10 a 25%) e AB (menos de 5%).Dentre os indivíduos tipo A, o subtipo A_1 é predominante (80%), seguido de A_2 (18%) e outros subtipos (2%) [COZAC, 2007].

Blancher & Socha (1997) relataram a presença de macacos-prego A, B e O, e de macacos bugios B, no Novo Mundo (BLANCHER & SOCHA, 1997b). Entretanto, citaram presença de subgrupos A_1 e A_2 apenas em grandes macacos antropoides (BLANCHER & SOCHA, 1997b). Não encontramos estudos sobre tipagem ABO reversa em grandes macacos antropoides, e em outros macacos do Velho e do Novo Mundo ou em prosímios.

Em relação ao sistema Rh, os 9 macacos-prego não mostraram os antígenos D e E. Entretanto, todos revelaram os antígenos C, c, e, porém, com aglutinação muito fraca. Os macacos bugios não revelaram nenhum dos antígenos do sistema Rh (D, C, c, E, e). A ausência do antígeno D caracterizou os 19 animais como Rh negativos.

O sistema Rh é o mais complexo do homem, tendo 5 de seus 57 antígenos rotineiramente identificados: D, C, c, E, e. Esses 5 antígenos são herdados em conjunto, pois os genes que os codificam estão muito próximos, não ocorrendo recombinação entre eles. Formam 8 complexos gênicos conhecidos como haplótipos *RH* (DCe, dce, DcE, Dce, dcE, dCe, DCE, dCE). A presença do antígeno D determina um indivíduo como sendo Rh positivo. A condição na qual as hemácias não apresentam nenhum dos antígenos Rh é caracterizada como Rh *null* (COVAS, 2013). As proteínas Rh apresentam homologia e similaridade com a família de proteínas transportadoras de amônia em bactérias, leveduras e plantas, fazendo com que o mecanismo de transporte de amônia seja extensivamente estudado em relação a esse sistema. Parece que as proteínas Rh também funcionam como um complexo integrado de troca O_2/CO_2 (BONIFACIO & NOVARETTI, 2009). O sistema Rh ainda mantém relação com a banda 3, e esse complexo protéico relaciona-se com o citoesqueleto das hemácias, o que leva indivíduos com o fenótipo Rh *null* a apresentarem um quadro de estômato-esferocitose hereditária de intensidade variável, cronicamente hemolisante (COVAS, 2013; BONIFACIO & NOVARETTI, 2009; CASTILHO, 2007).

Os *Sapajus sp* deste estudo exibiram o seguinte fenótipo no sistema Rh: ddCcee (complexos antigênicos dCe/dce). Ou seja, não expressaram os antígenos D e E, e expressaram apenas fracamente os antígenos C, c, e. O fato de ter havido positividade fraca para os antígenos C, c, e pode sugerir que os *Sapajus sp* estudados apresentem alguma modificação estrutural na molécula dos respectivos antígenos, comparativamente aos humanos, decorrente de polimorfismo gênico, de forma a não ter havido reconhecimento adequado das mesmas pelos anticorpos monoclonais utilizados neste estudo. São descritos haplótipos raros em humanos, com fraca expressão dos antígenos CcEe (CASTILHO, 2007).

Os *Alouatta sp* mostraram fenótipo semelhante ao Rh *null* humano. Em humanos, tal fenótipo decorre de mutações no *lócus RH* situado no cromossomo 1 (COVAS, 2013).

No Brasil, 85% da população apresenta o antígeno D, sendo caracterizada com o fenótipo Rh positivo. Em africanos e asiáticos, a frequência desse antígeno é maior que 90%. A ocorrência dos haplótipos *RH* varia conforme a população. Os complexos dCe e dce, como encontrados nos *Sapajus sp*, são observados em 1% e 39% dos caucasianos e em 2% e 26% dos afro-americanos, respectivamente. A prevalência de Rh *null* é raríssima em humanos, estando relacionada à consanguinidade, descrita em diferentes origens genéticas (COVAS, 2013; CASTILHO, 2007).

Blancher & Socha (1997) relataram que estudos prévios mostraram antígeno D uniformemente negativo e antígeno c esporadicamente positivo dentre macacos no Novo Mundo, e que o antígeno E, bem como o antígeno e, nunca se mostraram positivos em nenhum primata previamente estudado (BLANCHER & SOCHA, 1997a).

Em relação ao sistema MNS, os 9 macacos-prego foram completamente negativos para os antígenos M, N, S e s. Os 10 macacos bugios, entretanto, foram completamente negativos apenas para os antígenos M e N, porém, divergiram em relação aos antígenos S e s: 7 foram negativos para ambos, 1 foi positivo para ambos, e 2 foram positivos apenas para o S.

Em humanos, os antígenos do sistema MNS estão relacionados às glicoforinas, proteínas abundantes na membrana dos eritrócitos. Os antígenos MN estão expressos na glicoforina A (GPA) e os antígenos Ss estão localizados na glicoforina B (COVAS, 2013). Ambas as proteínas contêm resíduos de carboidratos com elevado conteúdo em ácido siálico, carregando alta carga negativa, que previne a aglutinação espontânea dos eritrócitos. Tal conteúdo de ácido siálico, principalmente da GPA, serve como ligante para vírus, bactérias e parasitas, consistindo num fator crítico no processo de infecção eritroide pelo *Plasmodium falciparum*. Células que não expressam a GPA e os antígenos MN são mais resistentes à invasão por esse parasita do que células que expressam (BONIFACIO & NOVARETTI, 2009).

Os 9 macacos-prego deste estudo foram negativos para os antígenos relacionados à glicoforina A (MN) e à glicoforina B (S, s). Talvez não possuam genes homólogos aos *GYPA* e *GYPB* humanos, ou talvez apresentem alguma modificação estrutural desses antígenos, fazendo com que os mesmos não tenham sido reconhecidos pelos anticorpos monoclonais utilizados. Em relação aos macacos bugios, todos foram negativos para os antígenos relacionados à GPA (M e N). Em relação à GPB, 7 animais foram negativos para S e s, 1 foi positivo para ambos, e 2 foram positivos apenas para o S. Portanto, no gênero *Alouatta sp*, os anticorpos monoclonais detectaram antígenos sabidamente relacionados à GPB, em 4 animais.

Em humanos, caucasianos e negros, o fenótipo M+N+ ocorre em 50 e 44%, o fenótipo M+N- ocorre em 28% e 26%, e o fenótipo M-N+ ocorre em 22% e 30%, respectivamente. Já a ocorrência de S+s+ é de 44% e 28%, a de S+s- é de 11% e 3%, e a de S-s+ é de 45% e 69%, respectivamente, nessas mesmas etnias. O ocorrência de M-N- e de S-s-, como observado em 16 animais deste estudo, é incomum em humanos (FABRON-JR & BALEOTTI-JR, 2007).

Socha & Blancher (1997) relatam pesquisa do antígeno M do sistema MNS em macacos-prego do Novo Mundo, cujo resultado foi negativo. Utilizando AcMo, não foram detectados antígenos M e N em algumas outras espécies de macacos do Novo Mundo (SOCHA & BLANCHER, 1997b).

No presente estudo, as pequenas diferenças antigênicas constatadas dentro de cada gênero não se relacionaram com o sexo dos animais, tampouco com as espécies *Alouatta guariba* e *Alouatta caraya*, ou com eventuais espécies dentro do gênero *Sapajus sp*. Poder-se-ia aventar que a semelhança antigênica observada no grupo de macacos-prego decorresse de consanguinidade, entretanto, o mesmo não se aplicaria aos macacos bugios, que não eram aparentados e também exibiram grande semelhança fenotípica. Desde que devidamente respeitadas as necessárias provas de compatibilidade e pesquisas de anticorpos irregulares, o pequeno polimorfismo fenotípico observado dentro de cada gênero permite inferir que sejam possíveis transfusões de hemácias, incluindo transfusões intra-espécies no caso dos

Alouatta sp., pelo menos em parte dos animais, sem hemólise ou aloimunização consequentes.

O ambiente exerce pressão constante sobre os seres vivos e os leva a criar diversidade para evoluir e perpetuar-se na natureza, mantendo a diversidade regulada pela seleção da melhor adaptação. Como a diversidade resulta diretamente das variações genéticas, os microorganismos e as doenças são fatores essenciais que atuam na seleção e manutenção da diversidade de espécies e a presença ou ausência dos antígenos dos grupos sanguíneos deve exercer um papel importante para essa evolução (MATTOS, 2016; RAHIM et al., 2008).

Embora tenhamos utilizado AcMo de altas sensibilidade e especificidade, faz-se necessário salientar que os mesmos foram produzidos com especificidade para antígenos humanos, incluindo aqueles oriundos de lecitinas de sementes vegetais (anti-A₁ e anti-H). Não se pode descartar que tenha ocorrido eventual falsa positividade (por se tratarem de anticorpos altamente sensíveis) e/ou falsa negatividade (por se tratarem de anticorpos altamente específicos) de antígenos nos animais do presente estudo.

Os primatas sempre despertaram grande interesse evolutivo e permitiram enormes progressos na ciência. Estudos prévios sugerem que grupos sanguíneos podem ser compartilhados, parcial ou integralmente, por primatas não-humanos e humanos (SOCHA & RUFFIÉ, 1983, citado por SOCHA & BLANCHER, 1997). Mecanismos de diversificação gênica, mantiveram paleosequências e criaram neosequências de DNA em muitas espécies, gerando a evolução de polimorfismos e diversidade transespécies, com consequente diferenciação fenotípica relacionada aos sistemas sanguíneos (RUFFIÉ et al, 1982, citado por SOCHA & BLANCHER, 1997). Algumas doenças tiveram papel importante na seleção de certos genes relacionados a grupos sanguíneos em humanos e, provavelmente, também nos primatas.

O Brasil possui um dos maiores números de espécies de primatas do mundo, subestudadas, e sujeitas à biopirataria estrangeira. O presente

estudo é original no nosso país, pretendendo ser completo em relação aos antígenos humanos pesquisados nos gêneros *Sapajus sp* e *Alouatta sp*.

Além do interesse científico sobre o tema, acreditamos que este trabalho possui relevância na ecologia, na primatologia, na antropologia e na filogenética. Também é uma forma de prestar um tributo aos primatas não-humanos, que tanto auxiliaram no desenvolvimento da biologia e da medicina humana.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1 - A maioria dos antígenos humanos pesquisados não foi observada nos 2 gêneros de macacos, correspondendo a 19/28 antígenos negativos nos *Sapajus sp*, e 21/28 antígenos negativos nos *Alouatta sp*;
- 2 - A fenotipagem eritrocitária foi bastante homogênea em cada gênero de animais;
- 3 - As pequenas diferenças antigênicas constatadas dentro de cada gênero não parecem se relacionar com o sexo dos animais, tampouco com as espécies *Alouatta guariba* e *Alouatta caraya*, ou com eventuais espécies dentro do gênero *Sapajus sp*;
- 4 - Os resultados indicam que os animais fenotipicamente idênticos em cada gênero e nas 2 espécies *Alouatta sp*, possam ser transfundidos entre si, sem reações hemolíticas ou aloimunizações consequentes;
- 5 - Pelo menos nos macacos bugios, pode-se afirmar que o padrão fenotípico eritrocitário homogêneo não se explica por consanguinidade entre os animais;
- 6 - No sistema ABO, o filhote de macaco-prego comportou-se como os recém-nascidos humanos;
- 7 – Ao se comparar os 2 gêneros de animais, a fenotipagem eritrocitária mostrou semelhanças, diferindo apenas em 4 sistemas pesquisados;
- 8–Nos 2 gêneros, constatarem-se antígenos eritrocitários com frequências semelhantes e com frequências opostas às observadas em humanos/etnias humanas;
- 9–Em relação aos macacos-prego e macacos bugios previamente estudados, o presente estudo pesquisou maior número de antígenos eritrocitários, mostrando concordância na presença de alguns antígenos e discordância em outros, nos 2 gêneros, em relação à literatura.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

Silva TDP. Tipagem e teste de compatibilidade sanguínea, caracterização hematológica e bioquímica em felinos selvagens e domésticos [Dissertação]. Goiânia: Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás; 2011.

Rocha JR, Merlini GP, Simas RC, Scaramucci CP, Avante ML, Dias LGGG et al. Histórico, evolução e correlação da transfusão sanguínea com os principais animais domésticos: revisão literária. Rev Cient Elet Med Vet. 2009; 7(13):6p.

Reichman P, Dearo ACO. Transfusão de sangue e seus derivados em grandes animais. Sem Cien Agr. 2001; 22(2):223-8.

Martins SB. Tipagem sanguínea de cães e gatos [seminário]. Goiânia: Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás; 2011.

Arruda DR. Estudo da Transfusão Sanguínea em Serpentes [Monografia]. São Paulo: Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan; 2014.

Fosset FT, Blais MC. Prevalence of feline blood groups in the Montreal area of Quebec, Canada Can Vet J. 2014; 55(1):1225-8.

Silva PB, Monteiro MVB, Silva RR, Albuquerque MR, Pereira ACA, Carreira AS et al. Frequência dos tipos sanguíneos de gatos domésticos oriundos do Estado do Pará, Brasil. Acta Vet Brasília. 2016; 20(4):378-82.

Novais AA, Fagliari JJ, Santana AE. Valores sanguíneos de referência e investigação sobre a presença de antígenos eritrocitários caninos (DEA – dog erythrocyte antigen) em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cachorros-domato (*Cerdocyon thous*). Vet Not. 2005; 11(1):59-67.

Ramis G, Martínez-Alarcon L, Quereda JJ, Mrowiec A, Funes C, Ríos A et al. Non-ABO blood group systems phenotyping in non-human primates for blood banking laboratory and xenotransplantation. *Lab Animals*.2013; 47:100–5.

Silva EA, Rosa PS, Arruda MSP, Rúbio EM. Determination of Duffy Phenotype of Red Blood Cell in *Dasypus novemcinctus* and *Cabassous* sp. *Braz J Biol*.2005; 65(3):555-7.

Palatink M, Rowe AW. Duffy and Duffy-related Human Antigens in Primates.*J Hum Evol*.1984; 13:173-9.

Socha WW, Ruffié J. Monoclonal antibodies directed against human Rh antigens in tests with the red cells of nonhuman primates. *Rev Fr Transfus Hemobiol*. 1990; 33:39-48.

Westhoff CM. Investigation of the Rh Blood Group System in Humans and Non-Humans Primates [Dissertação]. Lincoln: Faculty of the Graduate College, University of Nebraska; 1993.

Blancher A, Socha WW, Roubinet F, Ruffié J. Monoclonal antibodies directed against human Rh antigens in tests with red cells of non-human primates. *TCB*.1996; 6:339-45.

Gamble KC, Moyse JA, Lovstad JN, Ober CB, Thompson EE. Blood Groups in the Species Survival Plans, European Endangered Species Program, and Managed *In Situ* Populations of Bonobo (*Pan paniscus*), Common Chimpanzee (*Pan troglodytes*), Gorilla (*Gorilla ssp.*), and Orangutan (*Pongo pygmaeus ssp.*). *Zoo Biol*. 2010; 29:1–18.

Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros – CPB. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio. Primatas

Brasileiros [Internet]. 2013; [1p]. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cpb/primatas-brasileiros.html>

Junqueira PC, Rosenblit J, Hamerschlak N. História da Hemoterapia no Brasil. Rev bras hematol hemoter. 2005; 27(3):201-7.

Decastello A, Von Sturli (1902) cited by Blancher A, Socha WW. The ABO, Hh and Lewis Blood Group in Humans and Nonhuman Primates. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates. Berlim: Springer-Verlag; 1997. p.30-92.

Von Dungern E, Hirszfeld L (1911) cited by Blancher A, Socha WW. The ABO, Hh and Lewis Blood Group in Humans and Nonhuman Primates. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates. Berlim: Springer-Verlag; 1997. p.30-92.

Landsteiner K, Levine P (1927) cited by Socha WW, Blancher A. The MNSs Blood group System. Serology and Formal genetics. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates. Berlim: Springer-Verlag; 1997. p.93-146.

Landsteiner K, Wiener AS (1937) cited by Socha WW, Blancher A. The MNSs Blood group System. Serology and Formal genetics. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates. Berlim: Springer-Verlag; 1997. p.93-146.

Blancher A, Socha WW. The Rhesus System. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates. Berlim: Springer-Verlag; 1997a. p.147-218.

Daniels G, Reid M. Blood groups: the past 50 years. Transfusion. 2010; 50(2):281-9.

Martins ML, Cruz KVD, Silva MCF, Vieira ZM. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária

de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. Rev bras hematol hemoter. 2009; 31(4):252-9.

Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel WA, Garratty G, de Haas Met al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Cancun report (2012). Vox Sanguinis. 2013; 45(5):1-7.

Covas DT. Antígenos Eritrocitários, Leucocitários e Plaquetários. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R (Eds). Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu; 2013. p.747-65.

Nardoza LMM, Szulman A, Barreto JA, Araujo E, Moron AF. Bases Moleculares do Sistema Rh e Suas Aplicações em Obstetrícia e Medicina Transfusional. Rev Assoc Med Bras. 2010; 56(6):724-8.

Castilho L, Pelegri-Junior J, Reid ME (Eds). Fundamentos da Imuno-hematologia. Rio de Janeiro: Atheneu; 2015. Cap.1. p.1-45.

Girello AL, Kühn TIBB (Eds). Fundamentos da Imuno-hematologia Eritrocitária. 3rd ed. São Paulo: Senac; 2011. Cap.7. p.127-222.

Bonifacio SL, Novaretti MCZ. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. Rev bras hematol hemoter. 2009;31(2):104-11.

ISBT-International Society of blood transfusion. Site: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>. Acesso em julho/2017.

Mattos LC. Structural diversity and biological importance of ABO, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2016; 38(4): 331-40.

Mattos CC, Mattos LC. Histo-blood group carbohydrates as facilitators for infection by Helicobacter pylori. Infection, Genetics and Evolution.2017; 53: 167-74.

Silveira G, Malta AJR, Pontes ARM. Gênero *Cebus* ERXLEBEN 1777. In: Reis NR, Peracchil AL, Andrade FR (Eds). *Primatas Brasileiros*. Londrina: Thecnical Books; 2008. p.25-39.

Gregorin R, Kugelmeier T, do Valle RR. Gênero *Alouatta* LACÉPÈDE 1799. In: Reis NR, Peracchil AL, Andrade FR (Eds). *Primatas Brasileiros*. Londrina: Thecnical Books; 2008. p.187-204.

Socha WW, Blancher A. Introduction. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). *Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates*. Berlim: Springer-Verlag; 1997a. p.27-9.

Socha WW, Ruffié (1983) cited by Socha WW, Blancher A. Introduction. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). *Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates*. Berlim: Springer-Verlag; 1997. p.27-9.

Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). *Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates*. Berlim: Springer-Verlag; 1997. 570p.

Henry SM. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood group related chart microorganism receptors. *Transfus Clin Biol*. 2001; 8: 226-30.

Imberty A, Varrot A. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol*. 2008; 18: 567-76.

Novaretti MCZ, Bueno VJ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Controle de qualidade interno de reagentes em imunohematologia – Aspectos práticos. *Rev bras hematol hemoter*. 2002;24(4):270-85.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. *Imuno-hematologia laboratorial*. Brasília (DF); 2014.

Jarolin P, Rubin HL, Zakova D, Storry J, Reid ME. Characterization of seven low incidence blood group carried by erythrocyte band 3 protein. *Blood*.1998; 92:4836–43.

Murador P, Deffune E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. *Rev bras hematol hemoter*. 2007; 29(2):168–78.

Costa DC. Investigação do polimorfismo de genes de grupos sanguíneos em doadores voluntários de sangue e em pacientes com hemopatias no Estado de Santa Catarina [Tese]. Florianópolis: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina; 2016.

São Thiago PT. História da Malária em Santa Catarina [Dissertação]. Florianópolis: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina; 2003.

Fabron-JrA, Baleotti-Jr W. Outros Sistemas de Grupos Sanguíneos. In: Bordin JO, Langhi-Jr DM, Covas DT (Eds). *Hemoterapia.Fundamentos e Prática*. São Paulo: Atheneu; 2007. p.161-9.

Rahim NG, Harismendy O, Topol EJ, Frazer KA. Genetic determinants of phenotypic diversity in humans. *Genome Biol*. 2008; 9:215.1-215.9.

Vizzoni AG, Cotias PMT. Imuno-hematologia eritrocitária. In: Oliveira MBSC, Ribeiro FC, Vizzoni AG (Eds). *Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia*. Rio de Janeiro: SPSJV; 2013. p.65-97.

Cozac APCNC. Sistema de Grupo Sanguíneo ABO. In: Bordin JO, Langhi-Jr DM, Covas DT (Eds). *Hemoterapia. Fundamentos e Prática*. São Paulo: Atheneu; 2007. p.125-36.

Blancher A, Socha WW. The ABO, Hh and Lewis Blood Group in Humans and Nonhuman Primates. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). *Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates*. Berlin: Springer-Verlag; 1997b. p.30-92.

Batissoco AC, Novaretti MCZ. Aspectos moleculares do Sistema Sanguíneo ABO. *Rev bras hematol hemoter.* 2003;25(1):47-58.

Langhi-Jr DM, Boturão Neto E, Carvalho JCM. Sistemas de Grupos Sanguíneos Duffy, Kell e Kidd. In: Bordin JO, Langhi-Jr DM, Covas DT (Eds). *Hemoterapia. Fundamentos e Prática.* São Paulo: Atheneu; 2007. p.147-59.

Pogo AO, Chaudhuri A. The Duffy Blood group System and its Extensions in Nonhuman Primates. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds.). *Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates.* Berlim: Springer-Verlag; 1997. p.219-35.

Saad STO, Barjas-Castro ML. Antígenos Eritrocitários como Moléculas Funcionais. In: Bordin JO, Langhi-Jr DM, Covas DT (Eds). *Hemoterapia. Fundamentos e Prática.* São Paulo: Atheneu; 2007. p.117-23.

Castilho L. Sistema de Grupo Sanguíneo Rh. In: Bordin JO, Langhi-Jr DM, Covas DT (Eds). *Hemoterapia. Fundamentos e Prática.* São Paulo: Atheneu; 2007. p.137-45.

Socha WW, Blancher A. The MNSS Blood group System. Serology and Formal genetics. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). *Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates.* Berlim: Springer-Verlag; 1997b. p.93-146.

Ruffié et al(1982) cited by Socha WW, Blancher A. Introduction. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Eds). *Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates.* Berlim: Springer-Verlag; 1997. p.27-9.

ANEXOS

ANEXO 1 - Aprovação do projeto no CEUA – FMVZ – UNESP em 02 de outubro de 2015.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Pregos (Sapajus apela)**" Protocolo nº 121/2015 - CEUA, a ser conduzido por **Adaíze Pereira da Silva**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 02 de outubro de 2015.

Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO 2 -Solicitação ao CEUA-FMVZ-UNESP, pela Orientadora, para modificação do título do projeto e inclusão de um co-autor (Aluno de Graduação em Medicina, modalidade IC com bolsa FAPESP), com as devidas justificativas, em 19 de outubro de 2016.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Botucatu, 19 de outubro de 2016.

Aos Membros do CEUA
FMVZ – UNESP

Venho, através desta, solicitar a alteração no título do projeto de pesquisa de Mestrado de Adalza Pereira da Silva, sob minha orientação, no Programa de PG em Animais Selvagens – FMVZ – UNESP, bem como a inclusão de mais um autor no mesmo.

1 - O título anterior era "Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Pregos (*Sapajus apella*)" – aprovado no CEUA em 02/10/2015 (Protocolo nº 121/2015), bem como no IBAMA - SisBio (Nº 50606-1). Estamos solicitando a alteração para "Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Pregos (*Sapajus sp*) e em Macacos-Bugios (*Alouatta sp*)", para que possamos incluir também espécies de Macacos-Bugios no estudo.

2 - Também solicitamos a inclusão do Aluno de Medicina Francisco Szneczuk de Oliveira dentre os autores (Aluno de IC no projeto).

Informo que já obtivemos as respectivas alterações junto ao IBAMA – SisBio (Nº 50606-3), em outubro/16 (em anexo). Não houve nenhuma alteração metodológica em relação ao projeto original. Todos os animais serão oriundos do CEMPAS – FMVZ – UNESP. A parte da pesquisa relativa aos Macacos-Pregos está adiantada, porém, aguardamos a mudança no título do projeto para incluirmos os Macacos-Bugios. Fizemos novamente a tramitação oficial de submissão do projeto reformulado ao CEUA, por via on line, nesta mesma data.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Lucilene Silva Ruiz e Resende
Disciplina de Hematologia do Dep.to. de Clínica Médica da FMB – UNESP
Orientadora do Projeto

ANEXO 3 -Nova aprovação do CEUA, com as modificações solicitadas, em 10 de novembro de 2016.

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Pregos (*Sapajus* sp) e em Macacos- Bugios (*Alouatta* sp) " **Protocolo CEUA 0177/2016** , a ser conduzido por Adaize Pereira da Silva, responsável/orientador Lucilene Silva Ruiz e Resende, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	21/11/2016 a 17/10/2017
Nome Comum / Espécie / Linhagem	MACACO / ALOUATTA CARAYA / <i>Sapajus</i> sp + <i>Alouatta</i> sp
Raça	não se aplica
Nº de animais machos	10
Nº de animais fêmeas	10
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	5 Kg
Peso médio de animais fêmeas	4 Kg
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	5 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	CEMPAS da FMVZ

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 10/11/2016



PROFª. ASS. DRª. IBIARA CORREIA DE LIMA ALMEIDA PAZ
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO 4 -Aprovação do projeto no SISBIO – Autorização para atividades com finalidade científica (vigência de 04/09/2015 a 03/10/2016) – página 1



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50606-1	Data da Emissão: 04/09/2015 17:26	Data para Revalidação*: 03/10/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lucilene Silva Ruiz e Resende	CPF: 080.288.868-25
Título do Projeto: Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Pregos (Sapajus apella) e em Macacos Bugios-Ruivos (Alouatta guariba)	
Nome da Instituição: Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medicina	CNPJ: 48.031.918/0019-53

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e processamento técnico das amostras; arquivamento dos resultados	11/2015	01/2016
2	Análise dos resultados	02/2016	04/2016
3	Revisão completa da literatura pertinente	05/2016	07/2016
4	Redação do trabalho para apresentação em congresso e publicação	08/2016	10/2016
5	Previsão de apresentação da Dissertação de Mestrado à Banca Examinadora	11/2016	11/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO isenta o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.bama.gov.br (Serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade das populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contatar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Sheila Carnevale Rahal	Coleta de amostras dos animais do CEMPAS, Pesquisadora	033.175.738-99	11907190 SSP-SP	Brasileira
2	Adalze Pereira da Silva	Aluna de Mestrado (orientada), Pesquisadora	026.860.948-93	93652298 SSP-SP	Brasileira
3	Patrícia Carvalho Garcia	Co-orientadora do Mestrado, Pesquisadora	266.386.278-99	242193468 SSP-SP	Brasileira
4	CARLOS ROBERTO TEIXEIRA	Responsável pelo CEMPAS, Pesquisador	983.250.608-59	5373386 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 89734145



Página 1/4

- Aprovação do projeto no SISBIO – Autorização para atividades com finalidade científica (vigência de 04/09/2015 a 03/10/2016) – **página 2**



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50606-1	Data da Emissão: 04/09/2015 17:26	Data para Revalidação*: 03/10/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lucilene Silva Ruiz e Resende	CPF: 080.286.868-25
Título do Projeto: Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Pregos (<i>Sapajus apella</i>) e em Macacos Bugios-Ruivos (<i>Alouatta guariba</i>)	
Nome da Instituição: Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medicina	CNPJ: 48.031.918/0019-53

5	José Mauro Zanini	Responsável pela Divisão Hemocentro, Pesquisador	931.605.268-87	5369370 SSP-SP	Brasileira
6	Valéria Nogueira Dias Paes Secco	Coordenadora da Seção de Imunohematologia, Pesquisadora	068.089.708-90	83011699 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BOTUCATU	SP	CEMPAS - Fac. Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP	Fora de UC Federal
2	BOTUCATU	SP	Hematologia/Div Hemocentro-Fac Medicina de Botucatu-UNESP	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Sapajus apella</i> , <i>Alouatta guariba</i>

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primatas)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Primatas)	Outros métodos de captura/coleta (Captura dentro das jaulas do CEMPAS com pua)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medicina	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 89734145



Página 2/4

- Aprovação do projeto no SISBIO – Autorização para atividades com finalidade científica (vigência de 04/09/2015 a 03/10/2016) – **página 3**



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50606-1	Data da Emissão: 04/09/2015 17:26	Data para Revalidação*: 03/10/2016
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Lucilene Silva Ruiz e Resende		CPF: 080.268.868-25
Título do Projeto: Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Pregos (<i>Sapajus apella</i>) e em Macacos Bugios-Ruívos (<i>Alouatta guariba</i>)		
Nome da Instituição : Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medicina		CNPJ: 48.031.918/0019-53

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

[illegible]

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 89734145



Página 3/4

- Aprovação do projeto no SISBIO – Autorização para atividades com finalidade científica (vigência de 04/09/2015 a 03/10/2016) – **página 4**

 Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO		
Autorização para atividades com finalidade científica		
Número: 50606-1	Data da Emissão: 04/09/2015 17:26	Data para Revalidação*: 03/10/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		
Dados do titular		
Nome: Lucilene Silva Ruiz e Resende		CPF: 080.288.868-25
Título do Projeto: Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Pregos (<i>Sapajus apella</i>) e em Macacos Bugios-Ruivos (<i>Alouatta guariba</i>)		
Nome da Instituição: Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medici		CNPJ: 48.031.918/0019-53
* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.		
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).		
Código de autenticação: 89734145		
		Página 4/4

ANEXO 5 -Renovação do SISBIO (com solicitação de alteração no título do projeto e inclusão de um co-autor – Aluno de Graduação em Medicina, modalidade IC com bolsa FAPESP) – Autorização para atividades com finalidade científica (vigência de 11/10/2016 a 10/11/2017) – **página 1**



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50606-3	Data da Emissão: 11/10/2016 18:06	Data para Revalidação*: 10/11/2017
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Lucilene Silva Ruiz e Resende	CPF: 080.288.868-25
Título do Projeto: Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Pregos (<i>Sapajus</i> sp.) e em Macacos-Bugios (<i>Alouatta</i> sp.)	
Nome da Instituição: Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medicina	CNPJ: 48.031.918/0019-53

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e processamento técnico das amostras; arquivamento dos resultados	11/2015	01/2016
2	Análise dos resultados	02/2016	04/2016
3	Revisão completa da literatura pertinente	05/2016	07/2016
4	Redação do trabalho para apresentação em congresso e publicação	08/2016	10/2016
5	CRONOGRAMA DO 2º ANO: aguardar autorização pelo IBAMA, de alterações no projeto (solicitação atual)	10/2016	10/2016
6	Previsão de apresentação da Dissertação de Mestrado à Banca Examinadora	11/2016	11/2016
7	CRONOGRAMA DO 2º ANO: coletar e fazer estudo laboratorial dos 4 Macacos-Bugios de fêmeas	11/2016	11/2016
8	CRONOGRAMA DO 2º ANO: tabulação de todos os resultados (Pregos + Bugios)	12/2016	01/2017
9	CRONOGRAMA DO 2º ANO: análise de todos os resultados (Pregos + Bugios)	02/2017	03/2017
10	CRONOGRAMA DO 2º ANO: revisão completa da literatura pertinente	04/2017	05/2017
11	CRONOGRAMA DO 2º ANO: redação da Dissertação de Mestrado e trabalho científico (congr., publicação)	06/2017	09/2017
12	CRONOGRAMA DO 2º ANO: previsão de apresentação da Dissertação de Mestrado à banca examinadora	10/2017	10/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição <i>in situ</i> .
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Sheila Caneppe Rahal	Coleta de amostras dos animais do CEMPAS, Pesquisadora	033.175.738-99	11907190 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 98561487



- Renovação do SISBIO (com solicitação de alteração no título do projeto e inclusão de um co-autor – Aluno de Graduação em Medicina, modalidade IC com bolsa FAPESP) – Autorização para atividades com finalidade científica (vigência de 11/10/2016 a 10/11/2017) – **página 2**



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50606-3	Data da Emissão: 11/10/2016 18:06	Data para Revalidação*: 10/11/2017
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Lucilene Silva Ruiz e Resende	CPF: 080.258.868-25
Título do Projeto: Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos-Pregos (<i>Sapajus sp.</i>) e em Macacos-Bugios (<i>Alouatta sp.</i>)	
Nome da Instituição: Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medicina	CNPJ: 48.031.918/0019-53

#	Nome	Função	CPF	Registro Profissional	Estado
2	Adalze Pereira de Silva	Aluna de Mestrado (orientada), Pesquisadora	026.860.948-93	93652286 SSP-SP	Brasileira
3	Francisco Simeczuk de Oliveira	Aluno de Iniciação Científica	461.583.106-02	370478770 SSP-SP	Brasileira
4	Patrícia Carvalho Garcia	Co-orientadora do Mestrado, Pesquisadora	266.386.278-99	242193468 SSP-SP	Brasileira
5	CARLOS ROBERTO TEIXEIRA	Responsável pelo CEMPAS, Pesquisador	983.250.806-59	5373386 SSP-SP	Brasileira
6	José Mauro Zanini	Responsável pela Divisão Hemocentro, Pesquisador	931.605.268-87	5368370 SSP-SP	Brasileira
7	Valéria Nogueira Dias Paes Secco	Coordenadora da Seção de Imunohematologia, Pesquisadora	068.089.708-90	83011699 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BOTUCATU	SP	CEMPAS - Fac. Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP	Fora de UC Federal
2	BOTUCATU	SP	Hematologia/Div Hemocentro-Fac Medicina de Botucatu-UNESP	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Alouatta, Sapajus

Material e métodos

#	Material	Método
1	Amostras biológicas (Primates)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Primates)	Outros métodos de captura/coleta (Captura dentro das jaulas do CEMPAS com puca)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medicina	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 98561487

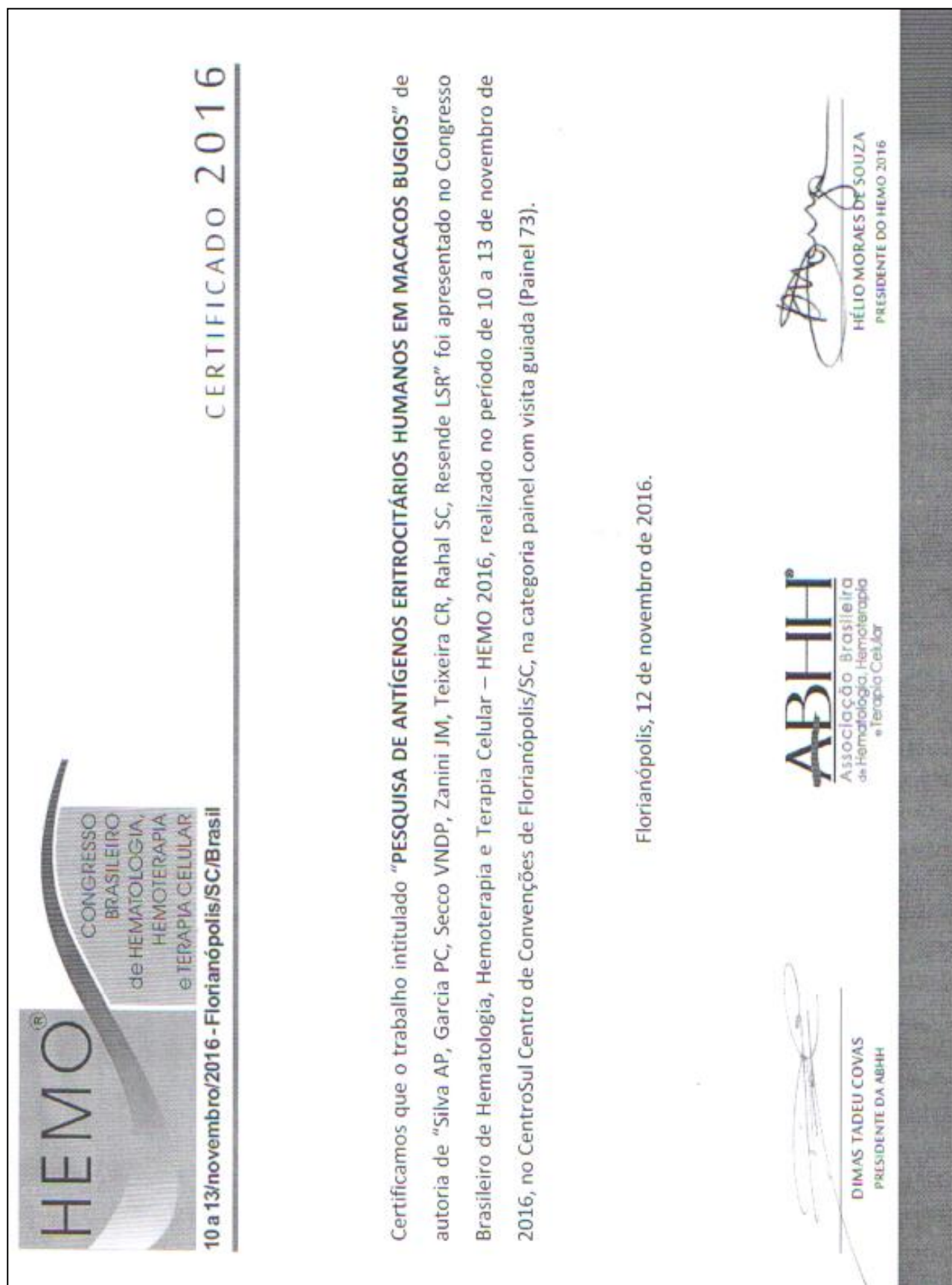


Página 2/3

- Renovação do SISBIO (com solicitação de alteração no título do projeto e inclusão de um co-autor – Aluno de Graduação em Medicina, modalidade IC com bolsa FAPESP) – Autorização para atividades com finalidade científica (vigência de 11/10/2016 a 10/11/2017) – **página 3**

[illegible]

ANEXO 6 -Apresentação de resultados parciais no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular- HEMO 2016, realizado de 10 a 13 de novembro de 2016, em Curitiba-PR.



ANEXO 7 -RESUMO PUBLICADO EM PERIÓDICO INDEXADO:

SILVA AP, GARCIA PC, SECCO VNDP, ZANINI JM, TEIXEIRA CR, RAHAL SC, RESENDE LSR. Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos em Macacos Bugios. Rev Bras Hematol Hemoter. 2016; 38(1):S336.

S336 Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2016

939. FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS REGULARES MATERNS IMUNODETECTÁVEIS EM ERITRÓCITOS DE RECÉM-NASCIDOS NO HOSPITAL NAVAL MARCÍLIO DIAS, NO PERÍODO 2011 A 2014

Machado LAF^{a,b}, Silva AP^a

^a Hospital Naval Marcílio Dias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Universidade Castelo Branco (UCB), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Introdução: A Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) é causada pela destruição das hemácias fetais por anticorpos maternos. Tais anticorpos são dirigidos contra antígenos herdados do pai presentes nas hemácias do feto. A DHPN por incompatibilidade ABO ocorre quando os anticorpos naturais e regulares maternos da classe IgG atravessam a placenta e reagem com os antígenos do Sistema ABO do feto, causando hemólise das hemácias fetais de gravidade variada. **Objetivo:** Verificar a prevalência dos anticorpos eritrocitários regulares maternos imunodetectáveis encontrados em amostras dos recém-nascidos com teste de aglutinação humana direta positiva (TAD), com a finalidade de definir o perfil imuno-hematológico das puérperas e dos neonatos. **Metodologia:** Realizou-se levantamento de dados retrospectivos nos arquivos de estudos imuno-hematológicos em recém-nascidos com TAD positivo, nascidos no Hospital Naval Marcílio Dias nos últimos 3 anos (2011-2014). **Resultados e discussões:** Foram realizados 3.942 TAD em recém-nascidos. Destes, 50 (1%) apresentaram resultado positivo para o referido teste, sendo 35 (70%) do grupo sanguíneo A, 14 (28%) do grupo sanguíneo B e apenas 1 (2%) pertencente ao grupo AB. Nos resultados de fenotipagem sanguínea das mães, cujos recém-nascidos apresentaram TAD positivo, foram encontradas 50 mães (100%) pertencentes ao grupo sanguíneo O. **Conclusão:** Os resultados de DHPN por incompatibilidade ABO encontrados no presente estudo demonstraram maior frequência de mães do grupo sanguíneo O e recém-nascidos pertencentes aos grupos A, B e AB, respectivamente, corroborando a literatura.

940. A FREQUÊNCIA DE ALOANTICORPOS EM DOADORES DE SANGUE NO SERVIÇO DE HEMOTERAPIA DO HOSPITAL NAVAL MARCÍLIO DIAS, NO PERÍODO DE 2013 A 2015

Gomes EGC^{a,b}, Silva AP^a

^a Hospital Naval Marcílio Dias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Universidade Castelo Branco (UCB), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Introdução: A frequência de aloanticorpos em doadores de sangue é um fato de ocorrência comum nos serviços de hemoterapia. São respostas imunológicas produzidas por indivíduos contra antígenos de grupos sanguíneos. **Objetivo:** O objetivo do presente trabalho foi identificar a frequência de aloanticorpos eritrocitários nos doadores de sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e avaliar o impacto na tomada de decisão do uso dos hemocomponentes oriundos destas doações, baseado na frequência de doadores com aloanticorpos e diante das seguintes condutas de direcionamento: transfusão fenótipo compatível; lavagem; ou descarte deste hemocomponente. **Metodologia:** No período entre os anos de 2013 e 2015 foram realizadas 12.345 Pesquisas de Anticorpos Irregulares nos doadores atendidos no serviço de hemoterapia do HNMD. **Resultados:** Destas, 12.283 (99%) foram negativas e 62 (0,5%) positivas, resultando na identificação de 75 aloanticorpos nas amostras dos doadores em questão. Os casos mais evidenciados nas amostras estudadas foram: anti-Le^a com 25 (33,3%); anti-M com 21 (28,0%); e anti-D com 6 (8,0%), totalizando 52 (69,3%). Em relação aos sistemas sanguíneos, 29 (38,7%) foram contra antígenos do sistema Lewis; 23 (30,7%) do sistema MNS; 13 (17,3%) do sistema Rh; e 10 (13,3%) de outros sistemas. **Conclusão:** Excluiu-se a possibilidade de fenotipar pacientes e o procedimento de lavagem dos concentrado de hemácias pode ser utilizado esporadicamente; dessa forma, fica evidenciada a opção de descartar o referido hemocomponente como a mais plausível, pelo custo ser menor em relação à transfusão fenótipo compatível e por não possuir os riscos inerentes à transfusão de uma bolsa lavada.

941. PESQUISA DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS HUMANOS EM MACACOS BUGIOS

Silva AP^{a,b}, Garcia PC^{a,b}, Secco VNDP^a, Zanini JM^a, Teixeira CR^a, Rahal SC^a, Resende LSR^a

^a Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

^b Hemocentro de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

^c Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

^d Disciplina de Hematologia, Departamento Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

Objetivos: Investigar a presença de 27 antígenos eritrocitários de importância transfusional em humanos, nos eritrócitos de macacos Bugios (*Alouatta* sp.); pesquisar a presença de auto/alto/heteroanticorpos nas amostras; e realizar a PC (prova de compatibilidade) intraespécie (macacos) e interespecies (macacos e humanos). **Material e métodos:** Coletaram-se amostras sanguíneas de 6 macacos Bugios adultos mantidos em cativeiro no CEMPAS (Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Silvestres) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, em parceria com o Hemocentro do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. Pesquisaram-se os seguintes antígenos eritrocitários humanos, pela técnica de Gel-centrifugação (BioRad - ID Micro Typing System): A, B, A₁, H, D, C, E, c, e, K, k, Kp^a, Kp^b, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, Le^a, Le^b, P₁, M, N, S, s, Lu^a, Lu^b e Di^a. TCD (teste de Coombs direto) e PAI (pesquisa de anticorpos irregulares) foram realizadas nas amostras, e PC intraespécie e interespecies. **Resultados:** Estudaram-se 3 macacos Bugios fêmeas e 3 machos. Todos os animais foram negativos para os antígenos eritrocitários A, B, A₁, H e D. Os antígenos C, c, E, e, K, k, Kp^a, Kp^b, Jk^a, Le^a, Le^b, Lu^a, Lu^b, Fy^a, M e N também foram negativos em todos os animais; e os antígenos k, P₁, Di^a Jk^a e Fy^b foram positivos em todos. Os únicos antígenos discordantes entre os animais foram o S e o s: 4 Bugios foram negativos para ambos; 1 foi positivo para ambos; e 1 foi S positivo. O TCD foi negativo em todos os Bugios, e a PAI foi positiva em todos. As PC entre os animais foram compatíveis. PC entre as hemácias animais e soros humanos A, B e O demonstraram incompatibilidade, assim como hemácias humanas com soro dos animais. **Discussão/Conclusões:** Os macacos Bugios revelaram padrão homogêneo de antígenos eritrocitários na maioria dos sistemas sanguíneos. Os antígenos P₁ e Di^a foram positivos em todos, e os sistemas Kell, Kidd e Duffy tiveram pelo menos um dos seus alelos positivos, sempre de forma concordante entre os animais. Chama a atenção a não expressão de 20 antígenos eritrocitários nos macacos, incluindo vários de alta frequência em humanos. Se tomarmos os humanos como referência, a ausência dos antígenos A, B, H, D, C, c, E, e nos macacos, foram caracterizados como portadores de fenótipos O, Bombay - Rh null. Não observamos autoanticorpos nas hemácias dos animais, mas a PAI foi positiva em todos eles, provavelmente devido à imunização por antígenos exógenos semelhantes aos dos eritrócitos humanos, gerando, por sua vez, heteroanticorpos solúveis em seus plasmas. A semelhança de fenótipos entre os animais parece justificar as PC compatíveis intraespécie. A diferença significativa desse fenótipo em relação aos humanos, portanto, justificaria a forte incompatibilidade da PC interespecies. Filogeneticamente, poderíamos inferir que, entre tal espécie de macacos e humanos, houve aquisição de um número considerável de antígenos eritrocitários, bem como ocorrência de heterogeneidade na frequência dos antígenos dentro dos diferentes sistemas.

942. A IMPORTÂNCIA DA GENOTIPAGEM NA IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES RHD EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Ribeiro IH^a, Oliveira VB^a, Dezan MR^a, Albiero AL^a, Suganuma L^b, Hencklaín G^a, Gualandro SFM^a, Rocha V^a, Junior AM^a, Dinardo CL^a

^a Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^b Disciplina de Hematologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

Introdução: Pacientes em regime crônico de transfusão, principalmente falcêmicos, possuem elevada taxa de aloimunização contra antígenos eritrocitários. A presença de variantes RHD é muito frequente e contribui para esse aumento. Para a determinação da tipagem Rhd são utilizados vários clones de antissoros anti-D, porém, muitas vezes, não é possível identificar variações na expressão deste antígeno, podendo levar à sua classificação incorreta e aloimunização do paciente. O uso de técnicas moleculares promove um resultado mais confiável e assertivo quanto à presença de variantes RHD, sendo altamente recomendada para o aumento da segurança transfusional desses pacientes. A descoberta das bases moleculares do gene RHD estabelece uma correlação correta entre

ANEXO 8– INICIAÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA AO PROJETO

BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – FAPESP

Processo: 2016/00220-9

Título do Projeto: Pesquisa de Antígenos Eritrocitários Humanos ABO e Rh em Macacos-Pregos (*Sapajus apella*) e em Macacos Bugios (*Alouatta sp*)

Beneficiário: Francisco Sznechuk de Oliviera

Aluno do 4º ano de Graduação em Medicina – FMB – UNESP

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Silva Ruiz e Resende

Disciplina de Hematologia do Depto de Clínica Médica – FMB – UNESP

Docente e Orientadora no Programa de PG em Animais Selvagens – FMVZ – UNESP

PUBLICAÇÃO

American Journal of Primatology

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-2345/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2345/homepage/ForAuthors.html)