

## Resumo de Tese

**Biologia molecular de grupos sanguíneos aplicada à medicina transfusional**  
*Molecular biology of the blood groups applied to transfusional medicine*

Eliseo J. Sekiya

**Orientador:**

Cármino A. de Souza

**Resumo**

Com a finalidade de avaliarmos se as técnicas moleculares atualmente utilizadas na genotipagem de grupos sanguíneos poderiam ser utilizadas com segurança em uma população com antecedentes étnicos diversos, foram estudadas 250 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, previamente fenotipadas para os sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd.

Nossos resultados demonstraram concordância entre o fenótipo e o genótipo, indicando que os *primers* utilizados e que foram desenhados de acordo com as sequências genômicas obtidas de indivíduos com ancestrais caucasianos e que incluíram regiões de introns, podem ser empregados na determinação dos genótipos de grupos sanguíneos em populações com antecedentes étnicos diversos. No sistema Duffy, 66% das amostras genotipadas como FY B foram fenotipadas como Fy(b-), devido à mutação no motivo GATA-1 do promotor eritróide, o que demonstra que estes indivíduos são de fato *FY B*.

Com o objetivo ainda de correlacionar os resultados dos fenótipos e genótipos dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd, em pacientes

politransfundidos, e pelo fato de acreditarmos que a genotipagem molecular pode ser um alternativa importante na determinação do perfil antigênico de pacientes portadores de anemias, em esquema de transfusão de sangue fenotipado, selecionamos dez pacientes portadores de  $\beta$  talassemia e 40 pacientes portadores de anemia falciforme. A fenotipagem eritrocitária foi realizada por testes de hemaglutinação em gel, enquanto que a genotipagem foi realizada pelas técnicas de AS-PCR e PCR-RFLP.

Discrepâncias entre o fenótipo e o genótipo foram encontradas em nove dos dez pacientes portadores de  $\beta$  talassemia (90%) e, em seis dos 40 pacientes portadores de anemia falciforme (15%). Para uma maior segurança de nossos resultados, em todos os pacientes que apresentaram resultados discrepantes entre a fenotipagem e a genotipagem, novas análises foram realizadas empregando-se DNA extraído de células do epitélio bucal e, todas confirmaram os resultados previamente obtidos. Nestes casos, tivemos a oportunidade de realizar nova determinação do fenótipo nas amostras das unidades de sangue transfundidas e pudemos verificar que os fenótipos pertenciam aos doadores e não aos receptores.

Nossos resultados sugerem que a genotipagem de grupos sanguíneos contribui, substancialmente, na qualidade da transfusão de sangue fenotipado, sobretudo em pacientes que necessitam de transfusões de repetição, como por exemplo, pacientes portadores de anemia falciforme ou talassemia. Nos casos onde a discrepância de resultados foi identificada, a nova conduta hemoterápica possibilitou um aumento na sobrevida das hemácias transfundidas e um aumento nos níveis de hemoglobina dos pacientes.

Em conclusão, a genotipagem de grupos sanguíneos deve ser recomendada em pacientes dependentes de transfusão, pois permite a seleção correta do sangue a ser transfundido. Auxilia, portanto, na prevenção da aloimunização podendo diminuir os efeitos de potenciais reações hemolíticas.

**Palavras-chave:** Fenótipos, PCR, hemaglutinação,  $\beta$  talassemia e anemia falciforme

### Abstract

*Accurate phenotyping of red blood cells (RBCs) can be difficult in transfusion-dependent patients such as those with thalassemia and sickle cell anemia because of the presence of previously transfused RBCs in the patient's circulation. Recently, the molecular basis associated with the expression of many blood group antigens was established. This allowed the development of a plethora of polymerase chain reaction (PCR)-based tests for identification of the blood group antigens by testing DNA. These new technologies complement phenotyping and overcome some of the limitations of hemagglutination assays. These molecular assays were developed on the basis of DNA sequences of individuals of Caucasian ancestry. The present study addresses the concern that these genotyping assays may not be suitable for populations of highly diverse ancestry because of variability in intronic regions or because of unrecognized alleles. We determined both,*

*phenotypes and genotypes for RH D, RH Cc, RH Ee, K 1/K 2, JK A/JK B, FY A/ FY B-GATA in 250 normal blood donors using PCR. Phenotype and genotype results agreed in 100% of the cases, indicating that molecular genotyping protocols can be effectively applied to populations with a highly diverse genetic background. However, genotyping for Duffy antigens provided information that could not be obtained by phenotyping. Essentially, 30.5 % of the donors with the FY B gene typed as Fy(b-) because of mutations in the GATA box. This information is very useful for the management of transfusion-dependent patients.*

*We also evaluated the usefulness of DNA genotyping for RBC antigens as a tool for the management of polytransfused patients with  $\beta$  thalassemia and Sickle Cell disease (SCD) to overcome the limitations of hemagglutination assays. We studied blood samples from 10 patients with  $\beta$  thalassemia and 40 SCD patients using hemagglutination and Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) for the Rh (D, C/c, E/e), Kell, Kidd and Duffy systems. We found discrepancies between hemagglutination and DNA typing test results in nine patients with  $\beta$  thalassemia (90%) and in six SCD patients (15%). In these 15 patients, DNA typing results by PCR-RFLP from buccal cells were identical with those from peripheral blood leukocytes, ruling out a potential role for microchimerism due to contaminating donor leukocytes. DNA typing of samples from segments of transfused units confirmed the blood group phenotype of blood donors to these patients. In conclusion, DNA typing of blood groups by PCR-RFLP in peripheral blood leukocytes contributes to the better management of transfusions in patients with  $\beta$  thalassemia and in SCD patients by allowing more accurate selection of donor units with consequent prevention of alloimmunization and potential hemolytic reactions.*

**Key words:** Phenotypes, PCR, hemagglutination,  $\beta$  thalassemia and sickle cell disease