

Resumo de Tese / Thesis

Caracterização molecular das variantes do sistema Rh em pacientes portadores de anemia falciforme

Molecular characterization of the variants of the Rh blood group system in Sickle Cell Disease patients

Artemis Rodrigues

Orientadora:

Lilian M. de Castilho

Resumo

O sistema Rh é o maior, mais complexo e mais imunogênico sistema de grupos sanguíneos. Representa um dos sistemas de maior interesse clínico, por seu envolvimento na Doença Hemolítica Perinatal, nas Reações Transfusionais Hemolíticas e nas Anemias Hemolíticas Auto-Imunes.

Os antígenos do sistema Rh são codificados por dois genes altamente homólogos, *RHD* e *RHCE*. As bases moleculares da maioria dos fenótipos Rh foram determinadas nos últimos 10 anos e rearranjos gênicos, deleções e mutações de ponto podem ser responsáveis por algumas variantes dos antígenos *RHD* e *RhCE*.

A elucidação da base molecular das variantes Rh possibilitou o desenvolvimento de técnicas para a determinação de variantes que parecem ser predominantes em algumas populações. Desta forma, é possível estabelecer a correlação adequada entre os genótipos e os fenótipos e o esclarecimento da perda de expressão de alguns antígenos Rh comuns. A determinação da frequência das variantes Rh em populações distintas pode auxiliar na determinação de fenótipos raros que não são caracterizados sorologicamente.

Estudos envolvendo variantes Rh em pacientes falciformes politransfundidos poderão em futuro próximo auxiliar no melhor entendimento da correlação entre o fenótipo e o genótipo e aumentar a segurança transfusional destes pacientes que muitas vezes desenvolvem anticorpos após transfusão de sangue.

Tendo em vista a relevância que a caracterização molecular das variantes do sistema Rh pode vir a ter na segurança transfusional de pacientes falciformes, foram nossos objetivos: padronizar técnicas moleculares para realização da genotipagem *RHD* e *RHCE*; determinar a frequência do pseudogene *RHD* e do gene híbrido *RHD-CE-D^S* em pacientes com os fenótipos Ror e rr; verificar a frequência dos antígenos D parciais categorias D^{IIIa}, D^{Va} e DAR em pacientes RhD-positivo e determinar a ocorrência das variantes do antígeno Rhe em pacientes com o alelo *RH ce*.

A frequência do pseudogene *RHD* (*RHD Ψ*) e do gene híbrido *RHD-CE-D^S* em pacientes falciformes, foi estudada em amostras de DNA de 91 pacientes fenotipados como R0 r e rr através de 2 técnicas de PCR multiplex. Nossos resultados demonstraram que dezoito (19,8%) pacientes apresentaram o pseudogene *RHD* (*RHD Ψ*) e 2 (2%), o gene híbrido *RHD-CE-D^S*. Estes resultados em conjunto com publicações anteriores que mostram que o pseudogene *RHD* apresenta alta frequência em populações de origem africana sugerem que a determinação do genótipo *RHD* deve incluir ampla análise do gene *RHD*.

A frequência dos antígenos D parciais categorias D^{IIIa}, D^{Va} e DAR em pacientes falciformes RhD-positivo foi estudada em amostras de DNA de 130 pacientes pelas técnicas de PCR-RFLP e de sequenciamento. Vinte e cinco (19,2%) pacientes estudados apresentaram as variantes D^{IIIa}, D^{Va} e DAR. Em 4 (3,1%) destes pacientes foi identificada a variante D^{Va} e em 21 (16,1%) as variantes D^{IIIa} e DAR. A alta frequência destas variantes em pacientes falciformes,

principalmente de D^{IIIa} e DAR sugere um aumento no risco de aloimunização ao antígeno RhD, uma vez que estes indivíduos são classificados na rotina como RhD-positivos.

A ocorrência das variantes do antígeno Rhe em pacientes falciformes com o alelo *RHce* associadas às mutações 48C (Cysl6) e 733G (VS) foi investigada em 58 amostras de DNA de pacientes portadores de anemia falciforme previamente fenotipados para os antígenos RhD, C/c, E/e e VS pelas técnicas de PCR alelo específico e PCR-RFLP. Dos 58 pacientes estudados, 56 apresentaram a mutação 48C (Cysl6) e 50 a mutação 733G (antígeno VS). A ocorrência simultânea destas mutações foi observada em 50 pacientes. Estas mutações encontravam-se em heterozigose, sugerindo que estes pacientes apresentavam a mutação 48C em um alelo e a mutação 733G em outro alelo. A ocorrência simultânea destas mutações levou a uma fraca expressão do antígeno Rhe nas hemácias destes pacientes demonstrada pelo resultado negativo da fenotipagem Rhe com a utilização de 3 anti-soros monoclonais anti-e. Diante destes resultados recomenda-se que a rotina de fenotipagem Rh de pacientes falciformes seja realizada com a utilização de pelo menos dois anti-soros monoclonais ou com um anti-soro policlonal e outro monoclonal, melhorando desta forma o atendimento à necessidade de transfusão pelo aumento da disponibilidade de sangue.

Em conclusão, a caracterização molecular das variantes Rh deve ser recomendada em pacientes falciformes dependentes de transfusão, pois permite a seleção correta do sangue a ser transfundido. Auxilia ainda, na prevenção da aloimunização, podendo diminuir os efeitos de potenciais reações hemolíticas.

Abstract

The Rh blood group system is one of the most polymorphic and immunogenic systems known in humans. In the past decade, intense investigation has yielded considerable knowledge of the molecular background of this system. The genes encoding 2 distinct Rh proteins that carry C or c together with either E or e antigens, and the D antigen, have been cloned, and the molecular bases of many of the antigens and of the phenotypes have been determined. Gene

rearrangements, deletions, or point mutations may cause partial D and CE antigens.

The purpose of this study was to investigate the presence of the RHD pseudogene or RHD Ψ , the hybrid RHD-CE-D^S, partial D antigens such as D^{IIIa}, D^{Va} and DAR and the association of Cys16 and/or VS with the RHce alleles in Sickle Cell Disease (SCD) patients due to their ethnical origin.

DNA samples from 91 SCD patients phenotyped as rr and Ror were tested for RHD Ψ and RHD-CE-D^S hybrid gene by two different multiplex-PCR. Eighteen of the 91 SCD patients studied had the RHD Ψ , 2 had the RHD-CE-D^S hybrid gene and 3 completely lack the RHD. These data confirm that the inclusion of two different multiplex PCRs for RHD genotype is essential to test the D-negative SCD patients.

We also investigated the occurrence of D^{IIIa}, D^{Va} and DAR in a cohort of SCD patients phenotyped as D+. DNA samples from 130 SCD patients were tested for 455A>C, 667T>G, and 1025T>C by PCR-RFLP. The PCR-RFLP results showed that 3 samples were heterozygous D^{IIIa}, 4 were heterozygous DAR, 4 samples were homozygous D^{Va}, and 105 were normal RHD. The remaining 14 samples were heterozygous D^{IIIa} and DAR. Anti-D was detected in the serum of two of these patients. These results show that D^{IIIa} and DAR are prevalent in SCD patients and may occur concomitantly in the same patient. We believe that this is the first description of concomitant occurrence of D^{IIIa} and DAR alleles. Thus, genotyping for both D^{IIIa} and DAR is useful for the management of SCD patients.

DNA samples from 58 SCD patients were tested for 48 G>C transversion encoding for Cysl 6 and for VS status by allele-specific PCR and PCR-RFLP. Fifty-six of the 58 SCD patients studied had Cys16. Of these 56, 50 of them were also heterozygous for 245Val (VS). These 50 samples showed a weak "e" expression on RBCs with three monoclonal anti-e. We found a high incidence of Cysl6 associated with the RHce allele in our SCD cohort. Interestingly, we observed that a high percentage of these patients also carried VS in a heterozygous manner resulting in a weak expression of e antigen on RBCs.

In conclusion, genotyping for RHD and RHCE variants is useful for the management of SCD patients.

Recebido – 24/02/2002

Aceito – 15/05/2002