



GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITÁRIOS POR PCR-SSP

Marília Gonçalves Quirino (PIBIC/CNPq/Uem), Cristiane Maria Colli (Docente DBS), Joana Maira Valentini Zacarias (Doutoranda PBF), Jeane Eliete Laguilha Visentainer (Co-orientadora), Ana Maria Sell (Orientadora), e-mail: anamsell@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

Ciências biológicas, Imunologia.

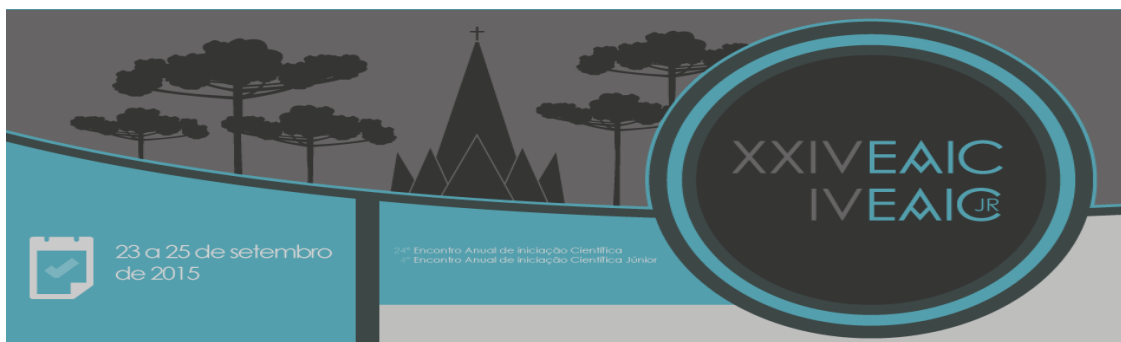
Palavras-chave: Sistema de grupo sanguíneo, técnicas de genotipagem, hematologia.

Resumo:

Conhecer antígenos eritrocitários é essencial na prática transfusional de forma a prevenir a aloimunização e permitir um melhor uso das unidades de hemocomponentes. Esta pesquisa teve por objetivo realizar a genotipagem dos antígenos eritrocitários por metodologia SSP, de acordo com o proposto por LIU *et al.* (2012). Para validação da técnica foram selecionadas 23 amostras de pacientes previamente genotipadas por PCR-RFLP, PCR-Multiplex ou Microarray, e os resultados foram comparados. As genotipagens dos alelos para Kidd, Kell, Duffy e RHCE foram definidas de acordo com a técnica proposta com modificações. Os resultados obtidos contribuíram para implantação, no Laboratório de Imunogenética/Uem, de uma metodologia para genotipagem de antígenos eritrocitários de menor custo e tempo de liberação dos laudos.

Introdução

As transfusões sanguíneas normalmente resultam na produção de aloanticorpos contra antígenos de superfície das células alogênicas, complicando as transfusões subsequentes. Estima-se que a probabilidade de um indivíduo produzir um ou mais anticorpos antieritrocitários é de aproximadamente 1% por unidade de sangue transfundida, e em pacientes transfundidos cronicamente a taxa de aloimunização pode atingir 50% (SANTOS *et al.*, 2007).



Técnicas como os testes de hemaglutinação são utilizados na rotina dos bancos de sangue e métodos moleculares vêm sendo implantados e aprimorados para que haja mais segurança na realização da transfusão sanguínea.

Os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados por antígenos na membrana dos eritrócitos com características funcionais e polimórficas definidas. Dentre os de importância transfusional podemos destacar ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd, Diego e MNS (MARTINS *et al.*, 2009).

Atualmente a genotipagem dos sistemas de grupo sanguíneo é realizada pelas técnicas de PCR-AS (*Polymerase Chain Reaction Allele-specific*), PCR-multiplex, PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e *microarray* (CASTILHO, 2008). As técnicas PCR-RFLP estão bem padronizadas, mas requerem o uso de enzimas, tempo de ciclagem diferentes e, portanto, demandam tempo maior para a liberação de laudos e maior custo. O objetivo deste trabalho foi padronizar no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (UEM) a metodologia de PCR-SSP para a genotipagem dos antígenos eritrocitários Kidd, Kell, Duffy e RHCE de acordo com LIU *et al.* (2012).

Materiais e métodos

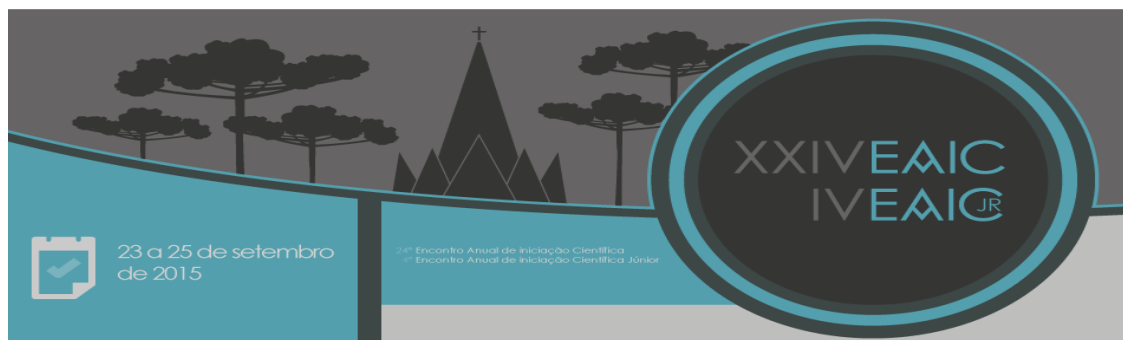
Padronização da PCR-SSP:

Para a reação de genotipagem dos alelos para Kidd, Kell, Duffy e RHCE por PCR-SSP, as condições de reação, tais como as concentrações de reagentes e condições de temperaturas de ciclagem, foram realizadas inicialmente de acordo com o proposto por LIU *et al.* (2012). Modificações nas concentrações de $MgCl_2$ e nas ciclagens foram feitas quando necessário. Todas as reações ocorreram em um volume final de 10 μL , contendo tampão 10X (200 mM Tris-HCL pH 8,4, 500 mM KCL), 0,2 mM de dNTP, 0,4U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, USA), 50-100 nmol de DNA e 2 ng/ μL dos iniciadores específicos e do controle interno (HGH). As concentrações de $MgCl_2$ e os ciclos da PCR variaram de um alelo para outro (Tabela 1).

Como padrões de reação, foram selecionadas algumas amostras com genotipagem previamente conhecidas e definidas por técnica de PCR-RFLP e PCR-Multiplex, padronizadas em nosso laboratório.

Validação da técnica:

Para validação da técnica foram selecionadas 13 amostras previamente genotipadas por PCR-RFLP (genótipos *RHCE*Ee*, *RHCE*ee*, *RHCE*EE* *FY*01/FY*01*, *FY*01/FY*02*, *FY*02/FY*02*, *KEL*01/KEL*01*, *KEL*01/KEL*02*,



*KEL*02/KEL*02*, *JK*01/JK*01*, *JK*01/JK*02*, *JK*02/JK*02*) ou por PCR-multiplex (genótipos *RHCE*cc*, *RHCE*Cc*, *RHCE*CC*) e 10 amostras genotipadas por *microarray*. Os resultados da técnica de PCR-SSP padronizada foram comparados com os resultados conhecidos.

Tabela 1: Condições finais de amplificação para cada alelo.

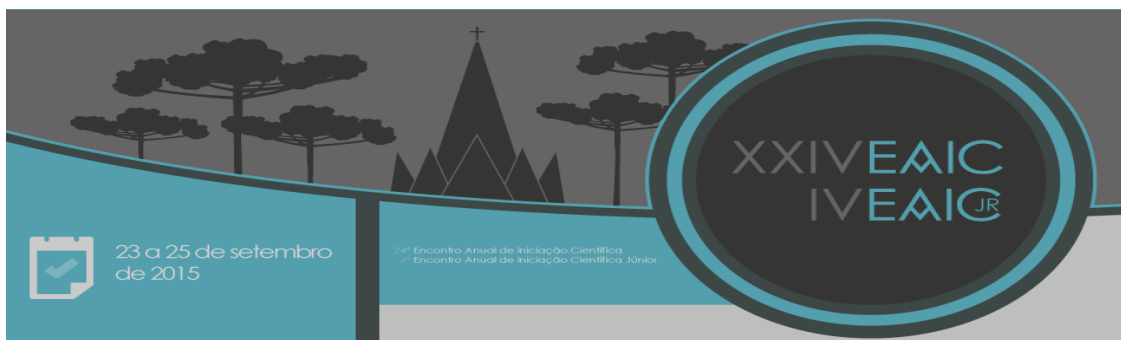
Alelos	[MgCl ₂]	Ciclagem	
<i>RHCE*C</i>	1,5 mM	1 CICLO	94°C – 2 min
<i>RHCE*c</i>	1,5 mM	10 CICLOS	94°C – 10 s
<i>RHCE*E</i>	1,5 mM		65°C – 1 min
<i>FY*02</i>	1,0 mM	22 CICLOS	94°C – 30 s
<i>KEL*01</i>	1,5 mM		61°C – 1 min
<i>KEL*02</i>	1,0 mM		72°C – 30 s
		1 CICLO	72°C – 5 min
<i>RHCE*e</i>	0,6 mM	1 CICLO	94°C – 2 min
<i>JK*01</i>	0,8 mM		94°C – 30 s
<i>JK*02</i>	0,8 mM	30 CICLOS	65°C – 1 min
<i>FY*01</i>	1,0 mM		72°C – 30 s
		1 CICLO	72°C – 5 min

Resultados e Discussão

Para os alelos *RHCE*C*, *RHCE*c* e *KEL*01*, os resultados esperados foram alcançados quando foram utilizadas as condições de reação propostas por LIU *et al.* (2012), sem necessidade de readequações.

Para o alelo *RHCE*E*, os resultados obtidos demonstraram a ausência de produto amplificado na reação, portanto algumas alterações na temperatura de anelamento, nas concentrações de MgCl₂, primers e Taq DNA Polymerase foram feitas visando o aumento sensibilidade da reação, contudo não foi possível à obtenção das bandas específicas. Ao analisar novamente a referência utilizada, notou-se que houve uma troca na identificação dos primers *RHCE*E* e *RHCE*e* no artigo de LIU *et al.* (2012), o que foi notificado ao editor da revista (COLLI *et al.*, 2015). Após o uso correto dos iniciadores foi possível a amplificação do produto desejado.

Para os alelos *RHCE*e*, *FY*01*, *FY*02*, *KEL*02*, *JK*01* e *JK*02* os resultados obtidos demonstraram a formação de bandas inespecíficas na reação, sendo necessárias algumas alterações na temperatura de anelamento e nas concentrações de MgCl₂, visando o aumento especificidade da reação (Tabela 1). Para a padronização de novas técnicas moleculares em um



laboratório são necessárias adequações que requerem conhecimento e empenho do pesquisador.

Todas as amostras utilizadas para validação apresentaram os mesmos resultados encontrados com as metodologias comparadas (PCR-RFLP, PCR-multiplex e *microarray*).

Conclusões

A genotipagem por PCR-SSP mostrou-se eficaz e segura, com vantagens quando comparada as outras metodologias moleculares, uma vez que requer um menor custo e tempo de realização.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao PIBIC/CNPq-FA-UEM e LIG-UEM.

Referências

CASTILHO, L. Aplicações da biologia molecular em imunohematologia eritrocitária. Lagoa Santa: **DIAMED**, p. 22, 2008. Disponível em: <http://www.imunohematologia.com.br/ello_plugins/content/images/file/19_apostila_genotipagem.pdf> Acesso em 14 jun. 2015.

COLLI, C.M.; QUIRINO, M.G.; SELL, A.M.; VISENTAINER, J.E. Letter Concerning: "Genotyping for Kidd, Kell, Duffy, Scianna, and *RHCE* Blood Group Antigens Polymorphisms in Jiangsu Chinese Han". **Chin Med J**, 128:1704, 2015.

LIU, Z.; ZENG, R.; CHEN, Q.; et al. Genotyping for Kidd, Kell, Duffy, Scianna, and *RHCE* blood group antigens polymorphisms in Jiangsu Chinese Han. **Chin Med J**, 125(6):1076-81, 2012.

MARTINS, M.L.; CRUZ, K.V.D.; SILVA, M.C.F.; et al. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.31, n.4, 2009.

SANTOS, F.W.R.; MAGALHÃES, S.M.M.; et al. Post-transfusion red cell alloimmunization in patients with acute disorders and medical emergencies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, 369, 2007.