



**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR COMO  
FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO PARA AUXILIAR OS HEMOCENTROS  
AFILIADOS AO HEMEPAR NA GENOTIPAGEM DOS ANTÍGENOS  
ERITROCITÁRIOS *Kell, Duffy E MN***

Ana Luiza Carvalho Vieira (Universidade Estadual de Maringá)

Amanda de Amorim Fernandes Toledo Martins (Universidade Estadual de Maringá)

Quirino Alves de Lima Neto (Universidade Estadual de Maringá)

ra117114@uem.br

**Resumo:**

As glicoforinas A (GPA) e B (GPB), codificadas pelos genes *GYP A* e *GYP B* no cromossomo 4, são cruciais para a determinação dos grupos sanguíneos, proteção contra parasitas e manutenção estrutural dos eritrócitos. Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Kell, expressos na glicoproteína Kell, são produtos do gene *KEL* no cromossomo 7 e regulam o tono vascular. O gene *FY*, no locus 1q22-q23, codifica a glicoproteína Duffy, importante na infecção por *Plasmodium vivax* e *P. knowlesi* e na resposta inflamatória. Este estudo objetivou realizar a genotipagem dos antígenos Kell e Duffy e padronizar a técnica de PCR para o antígeno MN, visando auxiliar os hemocentros afiliados ao Hemepar. A metodologia incluiu a extração de DNA de pacientes do Hemepar e do Hospital do Câncer de Maringá, utilizando o kit Mini Spin Plus DNA. A PCR foi realizada com primers específicos e *Taq DNA Polymerase*, seguida de eletroforese em gel de agarose 2%. A padronização da genotipagem de MN envolveu a testagem de diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub>. Os resultados mostraram a presença e ausência dos alelos de Kell e Duffy e a determinação da melhor concentração de MgCl<sub>2</sub> para a PCR-SSP dos primers de MN. Concluiu-se que a PCR-SSP é eficaz na genotipagem de alelos de antígenos eritrocitários, necessitando padronização para maior precisão diagnóstica.

**Palavras-chave:** PCR-SSP; Antígenos eritrocitários; Kell; Duffy; MN.



## 1. Introdução

As glicoforinas A (GPA) e B (GPB), codificadas pelos genes *GYP A* e *GYP B* no cromossomo 4, são cruciais para a determinação dos grupos sanguíneos, proteção contra parasitas e manutenção estrutural dos eritrócitos, fundamentais para a compatibilidade em transfusões e resistência a infecções pelo *Plasmodium falciparum* (Bonifácio et al., 2009). Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Kell, expressos na glicoproteína Kell, são produtos do gene *KEL* no cromossomo 7 e regulam o tono vascular, pois possui sequência homóloga com a família de endopeptidases neutras, uma enzima conversora de endotelina 3, podendo clivar também os precursores de endotelinas 1 e 2, porém com menos eficiência (Bonifácio et al., 2009). O gene *FY*, no locus 1q22-q23, codifica a glicoproteína *Duffy* (DARC), importante na infecção por *Plasmodium vivax* e *P. knowlesi* e na resposta inflamatória, uma vez que liga, regula e transporta quimiocinas (Bonifácio et al., 2009).

As mutações que ocorrem entre *GYP A* e *GYP B* envolvem a troca de Ser1Leu (UUG/UCG) e Gly5Glu (GGG/GAG) nos alelos de *GYP A* e Met29Thr (AUG/AGC) nos alelos de *GYP B*. Já as mutações nos genes *KEL* e *Duffy* envolvem trocas de aminoácidos específicas que distinguem diferentes alelos. No caso do gene *KEL*, a mutação Thr193Met (AGC/AUG) está associada aos alelos *KEL*\*01 e *KEL*\*02. Da mesma forma, no gene *Duffy*, a mutação Gly42Asp (GGU/GAU) ocorre entre os alelos *FY*\*01 e *FY*\*02 (Daniels, 2013).

Avanços na genotipagem alélica por SNPs em PCR oferecem diagnósticos específicos e sensíveis, sendo valiosos na prática clínica (Franceschi et al., 2009; Fernandes, 2005). Este trabalho objetivou realizar a genotipagem dos antígenos *Kell* e *Duffy* e padronizar a técnica de PCR para o antígeno MN, visando auxiliar os hemocentros afiliados ao Hemepar.

## 2. Metodologia

Este estudo faz parte do projeto: *ESTUDO DE GENES DE RESPOSTA IMUNE ENVOLVIDOS NAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS*. O projeto foi



aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá sob processo número 14508313.2.0000.0104 e parecer número 5.116.080.

#### *GENOTIPAGEM DE Kell E Duffy:*

A extração de DNA de pacientes do Hemepar e do Hospital do Câncer de Maringá foi realizada com o kit *Mini Spin Plus DNA*, com concentrações de 50 a 100 ng/ $\mu$ L e pureza de 1,8 a 2,1. Utilizando os primers KEL\*01 for (*forward*), KEL\*02 for (*forward*), KEL rev (*reverse*), FyA rev (*reverse*), FyB rev (*reverse*) e Fy for (*forward*) para os alelos *KEL\*01*, *KEL\*02*, *FY\*01* e *FY\*02*, respectivamente e HGH como controle positivo de reação, a PCR foi realizada com *Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* e 64°C na temperatura de anelamento. A eletroforese em gel de agarose a 2% foi conduzida sob 150W, 300mA e 150V. Um marcador de 50 pb (*Invitrogen*) foi usado para avaliar o tamanho das bandas, Os resultados foram visualizados em transiluminador UV (*QUANTUM, Vilber Lourmat*) e analisados com *Vision Capt (Vilber Lourmat)*.

#### *PADRONIZAÇÃO DE GENOTIPAGEM DE MN:*

A extração de DNA de 50 pacientes foi feita com kits e condições semelhantes aos dos alelos de *Kell* e *Duffy*. Os *primers* (Tabela 1) foram definidos com base no banco de dados *GenBank*. Para padronizar a técnica de PCR-SSP, concentrações de 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM e 1,50 mM de MgCl<sub>2</sub> foram testadas. As reações de PCR seguiram condições similares aos testes de *Kell* e *Duffy*, com gradientes de temperatura entre 58°C e 64°C. A eletroforese foi realizada nas mesmas condições dos testes anteriores, com resultados visualizados em um transiluminador UV e analisados pelo software *Vision Capt*.

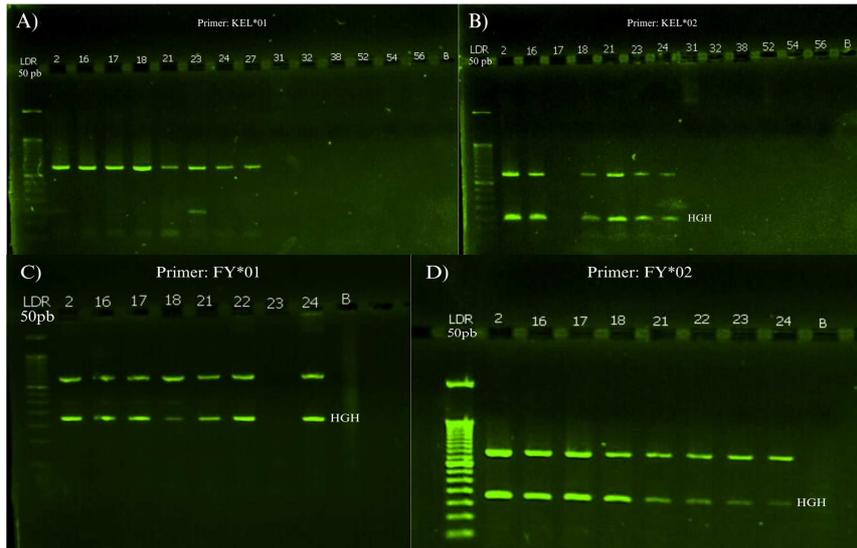
**Tabela 1.** Primers MN

<i>Pares de base</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
22	MNS_GYPA_F1 ( <i>Forward</i> )	GTGAGGGAATTTGTCTTTTGCA
27	MNS_GYPA_N_R1 ( <i>Reverse</i> )	AAGAAGTTGAAGTGTGCATTGCCACCT
19	MNS_GYPA_M_R2.1 ( <i>Reverse</i> )	TGCCACCCAGTGGTACTTG

### **3. Resultados e Discussão**

Após as técnicas de PCR-SSP nas amostras de *Kell* e *Duffy* (Figura 1, A, B, C e D), foi possível verificar a presença e a ausência dos alelos em estudo, através das bandas de identificação.

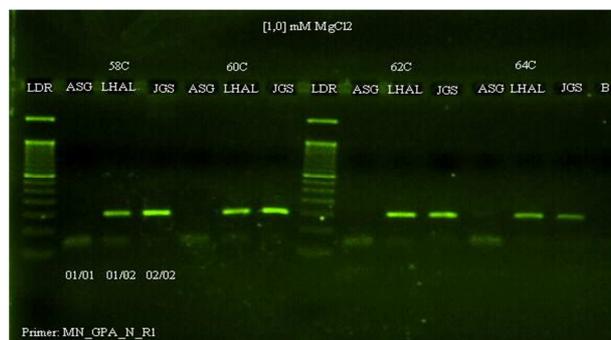
**Figura 1. Genotipagem *Kell* e *Duffy*.**



Fonte: o autor, 2024. Digital.

Da mesma forma, após a padronização da técnica de PCR-SSP nas amostras de MN (Figuras 3 e 4, E a J), foi possível determinar a melhor concentração de  $MgCl_2$  para os primers MNS\_GYPA\_N\_R1 e MNS\_GYPA\_M\_R.1, sendo 1,0 mM em ambas as reações.

**Figura 3. Padronização de Genotipagem *N*, com *primer* MNS\_GYPA\_N\_R1**



Fonte: o autor, 2024. Digital.

**Figura 3. Padronização de Genotipagem *M*, com *primer* MNS\_GYPA\_M\_R2.1**



Fonte: o autor, 2024. Digital.

#### 4. Considerações

Nesse sentido, conclui-se que a PCR-SSP é uma ótima opção na genotipagem de alelos de antígenos eritrocitários e faz-se necessária a padronização de sua técnica para maior precisão e qualidade de diagnóstico.

#### Referências

BONIFÁCIO, Silvia L; MARCIA. **Funções biológicas dos antígenos eritrocitários**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 31, n. 2, p. 104–111, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbhh/a/C9QgymFQWwS6JsdLkH4Ncmp/>>. Acesso em: 18 julho 2024.

DANIELS, Geoff. **Human Blood Groups**. Bristol, UK. Wiley-Blackwell, 3º edição. 2013.

FERNANDES, Paula Rogério; SILVA, Andréa Caetano da; GAMBARINI, Maria Lúcia; *et al.* **Construção de iniciadores e otimização de ensaios de PCR e de nested-PCR para a detecção específica de *Tritrichomonas foetus***. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 17, n. 3, p. 133–138, 2008. Disponível em: <[https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/Dissertacao2005\\_Paula\\_Fernandes.pdf](https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/Dissertacao2005_Paula_Fernandes.pdf)>. Acesso em: 18 julho 2024.

FRANCESCHI, Danilo, *et al.* **Otimização de metodologia PCR-SSP para identificação de polimorfismos genéticos de TNF e IL2**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 31, n. 4, p. 241–246, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbhh/a/sdktVgDhym5jHvN78yWDgwh/#>>. Acesso em: 18 julho 2024.