



PESQUISA DOS GRUPOS SANGUÍNEOS KELL E DUFFY EM PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS ATENDIDOS NO HOSPITAL DO CÂNCER DE MARINGÁ

Laís Fernandes Gabriel (Universidade Estadual de Maringá)

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

Quirino Alves de Lima Neto (Universidade Estadual de Maringá)

ra123768@uem.br

Resumo:

A mutação V617F do gene *JAK2* está intimamente relacionada à ocorrência de três neoplasias mieloproliferativas: policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária. Estudos sugerem que há relação entre dados genótipos e fenótipos dos grupos sanguíneos Kell e Duffy e a ocorrência de certos tipos de neoplasias hematológicas. Buscando estabelecer uma correlação estatística entre a incidência da mutação V617F, relacionada às neoplasias acima mencionadas, e a frequência dos diferentes genótipos de antígenos para os sistemas Kell (*KEL*01/KEL*01*, *KEL*01/KEL*02* e *KEL*02/KEL*02*) e Duffy (*FY*01/FY*01*, *FY*01/FY*02* e *FY*02/FY*02*), desenvolveu-se a análise proposta nesta pesquisa. Foram utilizadas 51 amostras positivas para a mutação V617F de pacientes atendidos pelo Hospital do Câncer de Maringá, analisadas através da técnica de PCR alelo-específica (PCR-SSP) para alelos dos genes *KEL* (*KEL*01* e *KEL*02*) e *Duffy* (*FY*01* e *FY*02*). Foram selecionados também 28 pacientes saudáveis com espondilite anquilosante como controles para a ausência da mutação V617F. Para o gene *KEL*, os resultados encontrados para os genótipos *KEL*01/KEL*01*, *KEL*01/KEL*02* e *KEL*02/KEL*02* foram, respectivamente: 0 (0%), 8 (15,68%) e 43 (84,32%). Para o gene *Duffy*, os resultados encontrados para os genótipos foram: 8 (15,68%) para *FY*01/FY*01*, 16 (31,38%) para *FY*01/FY*02* e 27 (52,94%) para *FY*02/FY*02*. Para maiores esclarecimentos quanto à associação entre os sistemas Kell e Duffy e a mutação V617F, é necessária a realização de mais experimentos e estudos no futuro.

Palavras-chave: Reação em cadeia da Polimerase; Mutação *JAK2*; Genotipagem; Antígenos Eritrocitários.



1. Introdução

Existem três diferentes tipos clássicos de neoplasias mieloproliferativas (NMP) negativas para o teste BCR-ABL1: policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP) (BENCH et al, 2013). Uma mutação pontual no éxon 14 do gene da proteína Janus Kinase 2 (JAK2), correspondente à substituição de valina por fenilalanina no códon 617, foi verificada por diversos grupos de pesquisa em praticamente todos os pacientes acometidos por PV, e em metade daqueles acometidos por TE ou MFP (GONG et al, 2013). A presença da mutação V617F foi estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como critério de diagnóstico para essas três neoplasias, devido à sua evidente correlação clínica. Para TE e MFP, a presença de uma mutação encontrada no éxon 10 gene MPL (receptor de trombopoietina) também é necessária no diagnóstico definitivo (GONG et al, 2013).

De acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (2023), os 45 grupos de sistemas sanguíneos existentes englobam 362 antígenos eritrocitários, determinados por 50 diferentes genes altamente polimórficos. O gene *Duffy* (locus 1q21 - q22) codifica a glicoproteína transmembrana DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*), que atua como receptora de citocinas e quimiocinas nos eritrócitos, participando também na metástase e angiogênese de alguns tipos de câncer (ERDEMIR; ERDEM; SINCAN, 2023). Os alelos *FY*01* e *FY*02* do gene diferem entre si por um SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) de substituição, que codifica glicina para o alelo *FY*01* e aspartato para o alelo *FY*02* (DANIELS, 2013). O gene *KEL* (locus 7q33), do grupo sanguíneo Kell, produz uma proteína de função enzimática. Os dois alelos codominantes expressos, *KEL*01* (*K*) e *KEL*02* (*k*), resultam de um polimorfismo C578T no éxon 6, que causa a substituição de um aminoácido na glicoproteína Kell: metionina para *KEL*01* e treonina para *KEL*02* (DANIELS, 2013).

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-SSP) é um método que permite a detecção e amplificação de fragmentos de DNA de interesse. Esse processo se dá através da ação da enzima DNA-polimerase, que produz novos fragmentos de DNA a partir de *primers* específicos (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2011). A técnica de PCR em tempo real (qPCR), que ocorre através de *primers* marcados por sondas fluorescentes, possibilita o monitoramento da reação em tempo real, bem como a tradução da informação biológica em dados quantitativos (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2011).



2. Metodologia

O projeto está registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE: 0402.0.093.000-11). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O processo de digitalização das fichas dos pacientes do Hospital do Câncer (HC) foi realizado manualmente através do programa Planilhas Google.

Os pacientes do HC foram genotipados por qPCR, através de sondas fluorescentes TaqMan específicas para o polimorfismo V617F do gene *JAK2*. Para a amplificação das amostras, foram utilizados 5µL de volume total de reagentes, sendo 2 µL de DNA e 3µL do Mix da reação. Para avaliar a fluorescência, foi utilizado o termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o resultado da amplificação foi analisado no *software* StepOne v2.3 (Applied Biosystems, 2012).

A genotipagem de antígenos eritrocitários para os genes *KEL* e *Duffy* foi realizada em 51 pacientes *JAK2* positivos. Como controle para esta análise, foram realizados testes para a presença da mutação V617F em 28 pacientes com espondilite anquilosante por qPCR. As sequências dos *primers* para a genotipagem de *Kell* e *Duffy* se encontram na Tabela 1. No gene *KEL*, foram avaliados os alelos *KEL*01* e *KEL*02*. Para o gene *DUFFY*, foram analisados os alelos *FY*01* e *FY*02*.

Tabela 1. Primers utilizados para a genotipagem de cada alelo.

Gene	Alelo	Primer	Sequência
<i>KEL</i>	<i>KEL*01</i>	<i>Forward</i>	TGGACTTCCTTAAACTTTAACCGTAT
		<i>Reverse</i>	GTGTCTTCGCCAGTGCATC
	<i>KEL*02</i>	<i>Forward</i>	TGGACTTCCTTAAACTTTAACCGTAC
		<i>Reverse</i>	GTGTCTTCGCCAGTGCATC
<i>Duffy</i>	<i>FY*01</i>	<i>Forward</i>	CAGGAGACTCTTCCGGTGTAAC
		<i>Reverse</i>	CAGCTGCTTCCAGGTTGCCAC
	<i>FY*02</i>	<i>Forward</i>	CAGGAGACTCTTCCGGTGTAAC

		Reverse	CAGCTGCTTCCAGGTTGCCAT
--	--	---------	-----------------------

Foram utilizados os seguintes reagentes na PCR-SSP, com as suas concentrações: Tampão (1X), MgCl₂ (1,5 mM para o gene *KEL* e 1,0 mM para o gene *Duffy*), dNTPs (0,2 mM), *primers* (2,0 ng/uL), *primers HGH* (1,0 ng/uL), Taq Polimerase (0,4U). As amostras de DNA possuíam concentração entre 30 a 50 ng/uL. As reações ocorreram no termociclador, e análise por eletroforese em gel de agarose 2% e revelação em transiluminador.

3. Resultados e Discussão

Os resultados das reações de qPCR para a mutação V617F do gene *JAK2* dos 28 controles foram todos negativos. Para as análises dos genótipos *KEL* e *Duffy* dos pacientes *JAK2* positivos para a mutação V617F, foram utilizadas ao todo 51 amostras de DNA, selecionadas dentre os pacientes do HC. Para o gene *KEL*, os resultados encontrados para os genótipos *KEL**01/*KEL**01, *KEL**01/*KEL**02 e *KEL**02/**KEL**02 foram, respectivamente: 0 (0%), 8 (15,68%) e 43 (84,32%). Para o gene *Duffy*, os resultados encontrados para cada um dos genótipos foram: 8 (15,68%) para *FY**01/*FY**01, 16 (31,38%) para *FY**01/*FY**02 e 27 (52,94%) para *FY**02/*FY**02. Abaixo, resultados de uma reação PCR para os alelos *KEL**01 e *KEL**02 do gene *KEL* (Figura 1) e para os alelos *FY**01 e *FY**02 do gene *Duffy* (Figura 2).

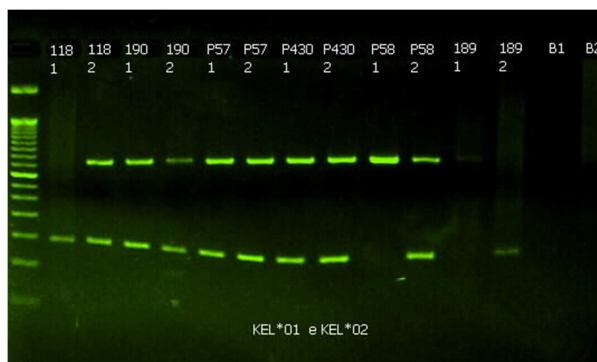


Figura 1. Resultado de reação para o gene *KEL*.

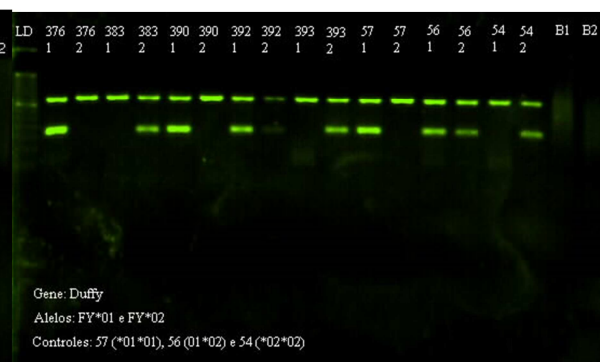


Figura 2. Resultado de reação para o gene *Duffy*.

Um estudo publicado em 2023 por Erdemir, Erdem e Sincan, relacionou positivamente a frequência dos fenótipos K-k⁺ do grupo Kell e Fy (a-b-) (fenótipo nulo) do grupo Duffy à ocorrência de neoplasias hematológicas. Além disso, também relacionou negativamente a



positividade dos antígenos Kpa e Kpb (expressos pelos alelos *KEL*03/KEL*04*) à ocorrência dessas doenças. A elevada frequência do genótipo *KEL*02/*KEL*02* verificada entre os pacientes do HC concorda com os resultados obtidos por Erdemir, Erdem e Sincan (2023). No ano de 2016, Costa e colaboradores publicaram um estudo acerca da frequência de diferentes polimorfismos para alguns grupos sanguíneos no estado de Santa Catarina. Os resultados obtidos neste estudo para os genótipos do grupo *Kell* são proporcionalmente semelhantes aos obtidos por Costa (2016). Para o sistema Duffy, no entanto, não há semelhança entre as proporções verificadas.

4. Considerações

A análise de *JAK2* oferecida pelo projeto na Universidade em parceria com o Hospital do Câncer representa um recurso de grande valor para a precisão do diagnóstico e qualidade de vida dos pacientes. Para a associação entre os grupos sanguíneos Kell e Duffy e a mutação V617F, se faz necessária a realização de mais experimentos e estudos no futuro.

Referências

BENCH, Anthony J. *et al.* Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of *JAK2* V617F and other relevant mutations. **British Journal of Hematology**, v. 160, p. 23-34, janeiro de 2013.

GONG, Jerald Z. *et al.* Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting *JAK2* and *MPL* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms: A Report of the Association for Molecular Pathology. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 15, p. 733-744, novembro de 2013.

DANIELS, Geoff. **Human Blood Groups**. Reino Unido: Wiley-Blackwell, 2013.

COX, Michael M., DOUDNA, Jennifer A., O'DONNELL, Michael. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. Estados Unidos: W.H. Freeman and Company, 2011.

International Society of Blood Transfusion. **Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology**. 2023. Disponível em: <<https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>>. Acesso em: 22 de julho de 2023.

ERDEMIR, Mete; ERDEM, Fuat; SINCAN, Gülden. The Distribution and Phenotypes of Blood Groups in Hematologic Malignancies. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 55, p. 20-24, fevereiro de 2023.



COSTA, Daiane Cobianchi *et al.* Frequencies of polymorphisms of the Rh, Kell, Kidd, Duffy and Diego systems of Santa Catarina, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, p. 199-205, 2016.