



## **PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PCR-SSP PARA OS ANTÍGENOS RHCE\*C/c EM PACIENTES DOS HEMOCENTROS VINCULADOS AO HEMEPAR- PR.**

Louise Fernanda Rosa Frühauf (Universidade Estadual de Maringá)  
Amanda de Amorim Fernandes Toledo Martins (Universidade Estadual de Maringá)  
Quirino Alves de Lima Neto (Universidade Estadual de Maringá)  
lourosa.lr@gmail.com

### **Resumo:**

A tipagem precisa dos antígenos eritrocitários é crucial para a compatibilidade transfusional e a prevenção de complicações como a aloimunização e a doença hemolítica do recém-nascido. Os antígenos *RHD* e *RHCE*, presentes dentro do grupo Rh são altamente significativos devido à imunogenicidade. Este estudo visou padronizar a metodologia PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers*) para a detecção dos antígenos *RHCE*\*C/c. Foi realizada a digitalização das informações presentes nas fichas de pacientes, em planilhas online para facilitar a organização e análise dos dados. Amostras de sangue foram processadas, e o DNA foi extraído a partir do sangue total utilizando o kit Biopur<sup>®</sup>. Para a otimização das reações de PCR-SSP utilizou-se a variação das concentrações de MgCl<sub>2</sub> e da temperatura de anelamento. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% para identificar os diferentes genótipos. Os resultados foram comparados com os dados digitalizados para avaliar precisão e reprodutibilidade, com controles positivos e negativos em todas as reações. A padronização da PCR-SSP demonstrou ser eficaz na genotipagem precisa dos antígenos *RHCE*, contribuindo para a segurança transfusional e a gestão de estoques de sangue dos hemocentros vinculados ao HemePar.

**Palavras-chave:** Reação em cadeia polimerase; RHCE; Genotipagem; Transfusão sanguínea; Aloimunização.

### **1. Introdução**

Os antígenos eritrocitários são proteínas presentes na superfície das hemácias, responsáveis pelas características imunológicas dos grupos sanguíneos. Entre os vários sistemas sanguíneos, o sistema Rh é um dos mais significativos, sendo o segundo mais importante após o sistema ABO (DANIELS, 2013). A correta tipagem desses antígenos é crucial para evitar aloimunização e reações transfusionais adversas, levando em conta que os



antígenos *RHD* e *RHCE*, principais componentes do sistema Rh, possuem alta imunogenicidade, especialmente o antígeno D, que é o mais imunogênico (FLEGEL, 2007).

O locus RH é composto por dois genes altamente homólogos, *RHD* que codifica o antígeno D e *RHCE* que codifica os antígenos C/c e E/e. Possuem 10 exons cada e estão localizados no cromossomo 1p36.13-p-34.3. As proteínas RhD e RhCE apresentam 93% de homologia, diferindo em 35/36 aminoácidos (8,4% de divergência), sugerindo uma duplicação de um gene ancestral comum. A genotipagem RHCc é desafiadora dada a semelhança entre *RHCE* e *RHD* (DANIELS, 2013).

A importância deste estudo está na necessidade de melhorar a precisão da tipagem sanguínea para aumentar a segurança transfusional. Complicações como a doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) evidenciam a relevância de métodos precisos de identificação de antígenos (DENOMME, 2006). Este trabalho visa padronizar a metodologia PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers*) para a detecção dos antígenos RHC. O estudo está vinculado à pesquisa e ao ensino, contribuindo para o desenvolvimento de novos protocolos laboratoriais e o treinamento de profissionais de saúde. A técnica PCR-SSP permite a genotipagem precisa dos antígenos RHC, oferecendo alta sensibilidade e especificidade (CHIU; LO, 2001).

## 2. Metodologia

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CAAE:0402.0.093.000-11). Utilizou-se amostras de sangue venoso de 8 pacientes e doadores de sangue do Hemocentro de Maringá, coletadas em tubos com EDTA e armazenadas a -20°C. Os dados foram digitalizados e armazenados em planilhas online.

A extração do DNA foi realizada utilizando o kit Biopur<sup>®</sup> (Biometrix Diagnostica), e a pureza e concentração do DNA determinadas com o espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop<sup>®</sup> (Thermo Fisher). A genotipagem foi feita por PCR-SSP, usando *primers* específicos para *RHCE*\*C e *RHCE*\*c, conforme as sequências:



**Quadro 1** - Quadro de *primers* utilizados para detecção do alelo *RHCE\*<sup>C</sup>* e *RHCE\*<sup>c</sup>*

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	<i>Amplicon</i>
<i>Forward / C for</i>	GCTCTGTTGCCAGTCTGAAGTG	~150 pb
<i>Reverse / C rev</i>	CCACTGGGAAGTGACAAAGGGC	
<i>Forward / c for</i>	CTTGGGCTTCCTCACCTCAA	
<i>Reverse / c rev</i>	GTGTGATGACCACCTTCCTGG	
<i>HGH Forward</i>	GCCTCCCAACCATTCCCTTA	439 pb
<i>HGH Reverse</i>	TCACGGATTCTGTTGTGTTT	

Cada reação de PCR foi configurada em um volume final de 10  $\mu$ L, contendo DNA genômico (100 ng/uL), *primers* específicos (2 ng/uL), dNTPs (0,2 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) tampão de reação (1X) e Taq DNA polimerase (0,4 U). A preparação do mix de reação incluiu o gene *HGH* como controle interno. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com o Buffer Green<sup>®</sup> (Thermo Fisher). A eletroforese foi realizada a 150 volts por 20 minutos e o resultado foi visualizado sob luz UV no fotodocumentador. Controles positivos e negativos foram incluídos para garantir a confiabilidade dos resultados.

Para a determinação da temperatura de anelamento e concentração de MgCl<sub>2</sub>, é necessário avaliar a temperatura ideal para a ligação dos primers ao DNA alvo, assegurando especificidade e evitando amplificações inespecíficas. Foram testadas cinco temperaturas de anelamento, sendo elas: 58, 60, 62, 64 e 65°C. As concentrações de 0,75, 1, 1,25 e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> foram testadas

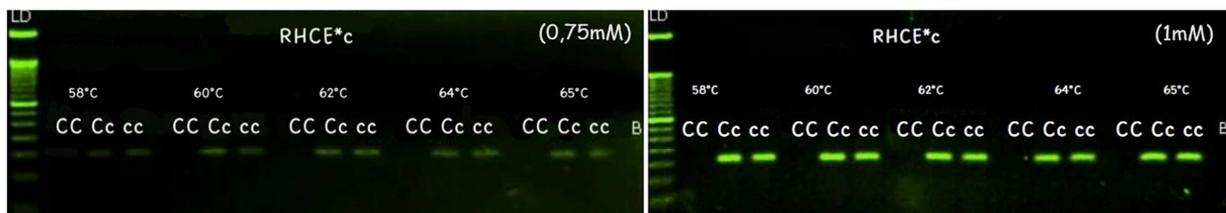
### 3. Resultados e Discussão

Inicialmente, reduziu-se a concentração do *primer* HGH de 0,2 uL para 0,1 uL, até sua completa remoção, visando reduzir a competição entre o *primer* controle e os *primers* específicos dos alelos *RHCE*, permitindo uma amplificação eficiente e específica dos alvos.

Uma das etapas críticas na repadronização é a determinação da temperatura de anelamento ideal, na qual os *primers* se ligam ao DNA alvo. Também foi realizada a alteração na concentração de MgCl<sub>2</sub>, pois o íon magnésio atua como um cofator para a enzima Taq Polymerase. Uma temperatura de anelamento muito baixa pode resultar em amplificação inespecífica, enquanto uma temperatura muito alta pode impedir a ligação eficaz dos *primers*. Por outro lado, aumentar a concentração de MgCl<sub>2</sub> pode otimizar a atividade da enzima Taq Polymerase, facilitando a reação.

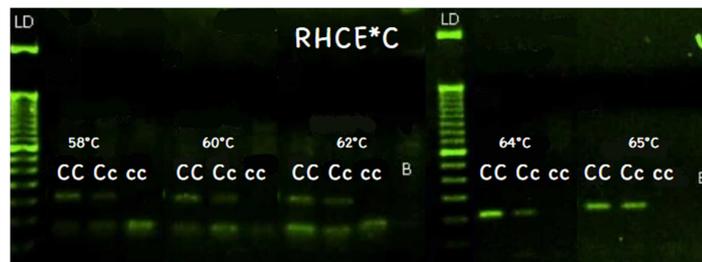
A revelação da PCR mostrou que, para o alelo *RHCE*\**c*, a concentração de MgCl<sub>2</sub> de 0,75 mM testada não foi suficiente para a otimização, independente da temperatura, como mostra a Figura 1. No entanto, todas as temperaturas foram adequadas para este alelo quando se usou concentrações de 1 e 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>. Assim, a temperatura de anelamento foi padronizada em 64°C à concentração de 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, de acordo com a Figura 2.

**Figura 1.** Resultados da revelação da eletroforese para o alelo *RHCE*\**c* com [MgCl<sub>2</sub>] de 0,75 e 1 mM.



Para o alelo *RHCE*\**C*, os melhores resultados foram com a concentração de 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub> a 65°C (Figura 3), embora outras combinações de concentração e temperatura não tenham sido satisfatórias. Concentrações inadequadas de MgCl<sub>2</sub> comprometem a eficiência da amplificação, uma otimização contínua é necessária para a especificidade e sensibilidade desejadas na genotipagem dos alelos *RHCE*\**c* e *RHCE*\**C*. Observou-se que os primers para o alelo *RHCE*\**C* precisam ser redesenhados para melhorar a especificidade e eficiência da amplificação.

Figura 3. Gel de agarose 2% para o alelo *RHCE\**C** com [MgCl<sub>2</sub>] de 1,25mM.



Esses ajustes garantem a precisão e confiabilidade dos resultados na genotipagem dos pacientes. Genotipagens inadequadas podem levar a erros clínicos, portanto, a otimização contínua das condições de reação é essencial para alcançar a especificidade e sensibilidade desejadas, assegurando diagnósticos precisos e tratamentos apropriados.

#### 4. Considerações

A padronização do PCR-SSP para a genotipagem dos alelos *RHCE\*c* e *RHCE\*C* é essencial para garantir resultados precisos e confiáveis. A otimização da concentração dos reagentes e da temperatura de anelamento foi crucial para melhorar a especificidade e sensibilidade das reações. Ainda é necessário testar concentrações mais altas de MgCl<sub>2</sub>, como 2 mM, e redesenhar os *primers* para o alelo *RHCE\*C*.

#### Referências

DANIELS, G. (2013). **Human Blood Groups**. Wiley-Blackwell.

FLEGEL, W. A. (2007). The genetics of the Rhesus blood group system. **Blood Transfusion**, 5(2), 50–57.

WAGNER, F. F., & Flegel, W. A. (2000). Review: RHD gene and its variants. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, 27(3), 126–136.



CHIU, R. W. K., & Lo, Y. M. D. (2001). Technical aspects of prenatal diagnosis by PCR-based methods. **Clinical Chemistry**, 47(8), 1187–1195.

DENOMME, G. A. (2006). Prospects for the provision of genotyped blood for transfusion. **British Journal of Haematology**, 134(1), 3–13.