



GENOTIPAGEM DOS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DE PACIENTES ATENDIDOS POR HEMOCENTROS AFILIADOS AO HEMEPAR: PADRONIZAÇÃO DE PCR-SSP PARA GENOTIPAGEM DO ANTÍGENO ERITROCITÁRIO KELL

Talita Morales (UEM)

Amanda de Amorim Fernandes Toledo Martins (UEM)

Quirino Alves de Lima Neto (UEM)

ra117849@uem.br

Resumo:

Os antígenos eritrocitários apresentam grande significância clínica no contexto da medicina transfusional pois estão diretamente envolvidos nos processos de aloimunização. Este trabalho teve como objetivo realizar a padronização das reações de PCR-SSP para o antígeno eritrocitário Kell, assim como efetuar a digitalização dos laudos de pacientes atendidos pelo Laboratório de Imunogenética (LIG) da UEM. Os laudos físicos dos pacientes atendidos pelo laboratório foram transcritos para uma planilha, com intuito de preservar e organizar as informações para pesquisas futuras. O DNA foi extraído por kit Biopur®, concentração e absorbância foram avaliadas em Nanodrop. Posteriormente, foi realizada a reação de PCR-SSP do antígeno eritrocitário Kell e o resultado foi revelado em eletroforese em gel de agarose 2%. As extrações de DNA das amostras foram bem sucedidas, porém os resultados experimentais da padronização foram considerados insatisfatórios. Isso se deve ao fato de que amostras com genótipo homozigoto conhecido para *KEL*02* apareceram como heterozigotas(*KEL*01/KEL*02*), sendo considerados falsos positivos. Pode-se sugerir que a divergência de resultados possivelmente ocorreu pela qualidade dos primers utilizados, tendo em vista que os iniciadores específicos diferem para cada alelo pela troca de uma base nitrogenada. O presente projeto teve sucesso com a digitalização das informações clínicas e sociodemográficas dos pacientes atendidos pelo LIG, no entanto a padronização do antígeno Kell não ocorreu como esperada o que consequentemente reforça a necessidade de uma análise reforçada dos novos primers e dos protocolos adotados pelo laboratório.

Palavras-chave: Antígenos eritrocitários, Biologia Molecular, Kell, PCR

1. Introdução

Os antígenos eritrocitários compreendem um grande e variável grupo de moléculas



expressas na superfície dos eritrócitos, os quais estão diretamente envolvidos com a aloimunização no contexto da medicina transfusional (DANIELS,2013). A aloimunização é um processo pelo qual o paciente entra em contato com antígenos estranhos e passa a desenvolver anticorpos contra os mesmos, sendo a transfusão sanguínea e a gestação uma das principais causas desse acontecimento (MOLINA-AGUILAR,2019). Cada grupo sanguíneo é composto por um ou mais antígenos, que são determinados por um único *locus* do gene ou por genes homólogos relacionados entre si (DANIELS,2013). Existem 46 sistemas de grupos sanguíneos reconhecidos até o momento, dentre os quais o ABO e Rh são ditos os mais imunogênicos, porém outros antígenos como Kell, Duffy, Kidd e MNS também apresentam grande significância na prática clínica.

O sistema Kell é o terceiro mais imunogênico dos grupos, ou seja, ele é o terceiro antígeno eritrocitário que ativa o sistema imunológico com mais intensidade sen capaz de causar reações transfusionais e até a Doença Hemolítica do Recém Nascido (DHRN), está presente em hemácias, órgãos do sistema linfóide, músculo esquelético e cardíaco e também no sistema nervoso. O gene *KEL* encontra-se no cromossomo 7, 7q33 e é altamente polimórfico, possui 36 antígenos e codifica a proteína Kell por meio de dois alelos codominantes principais, *KEL*01(K)* e *KEL*02(k)*. A única diferença entre eles é um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP-*Single Nucleotide Polymorphism*) (698C→T), ou seja estes antígenos se diferenciam pela troca de um único aminoácido na posição 698 (DEAN,2005). O grupo sanguíneo Kell é caracterizado como uma glicoproteína de membrana tipo 2, a qual atua como uma enzima conversora de endotelina-3 que por sua vez participa de uma cascata de reações influenciando na regulação do tônus vascular (JI,2014).

As técnicas de biologia molecular são um recurso importante para a identificação e seleção de bolsas de sangue nos hemocentros. Pacientes com patologias que necessitam de diversas transfusões ao longo da vida acabam sendo aloimunizados e consequentemente, as politransfusões levam ao maior risco de reações hemolíticas tardias. Sabendo disso, estes pacientes são os principais beneficiados com o uso da ferramenta. O trabalho buscou padronizar as reações em cadeia da polimerase com sequências específicas de primers (PCR-SSP) e realizar a genotipagem dos antígenos eritrocitários de pacientes atendidos nos hemocentros afiliados ao HEMEPAR, a fim de auxiliar na seleção de bolsas mais compatíveis.



2. Metodologia

O trabalho faz parte do projeto “Aplicação de técnicas de biologia molecular como ferramenta de diagnóstico para auxiliar os Hemocentros afiliados ao Hemepar na genotipagem dos antígenos eritrocitários e o Hospital do Câncer de Maringá na detecção da mutação JAK2 em neoplasias mieloproliferativas” e foi aprovado pelo Comitê de Ética sob o registro CAAE:0402.0.093.000-11.

Inicialmente, foi realizada a digitalização das informações presentes nas fichas dos pacientes que foram genotipados pelo Laboratório de Imunogenética (LIG) da Universidade Estadual de Maringá entre 2016 e 2024.

A padronização do antígeno eritrocitário Kell foi realizada utilizando gradiente de temperaturas e de concentração de cloreto de magnésio. As temperaturas estabelecidas para a padronização foram de 58°C, 60°C, 62°C e 64°C, enquanto que as concentrações de cloreto de magnésio variaram entre 0,75 mM, 1,00 mM, 1,25 mM e 1,50 mM. Para essas reações foram utilizados controles anteriormente genotipados pelo LIG e *primers* específicos para a detecção dos alelos *KEL**01 (K) e *KEL**02 (k).

Os *primers* e reagentes utilizados para as reações estão descritos na tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1- Sequência de *primers* para o gene *KEL*

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
<i>Primer KEL*01 Forward</i>	TGGACTTCCTAAAACTTTAACCGAAT
<i>Primer KEL Reverse</i>	TGGACTTCCTTAAACTTTAACCGAAC
<i>Primer KEL *02 Forward</i>	GTGTCTTCGCCAGTGCATC

Fonte: Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá.

Tabela 2- Reagentes utilizados para a PCR-SSP do gene



Reagentes	Concentração
Água	q.s.p 10 µL
Tampão PCR Buffer (10x)	1 µL
dNTP (10mM)	0,2 µL
MgCl ₂ (50 mM)	x
<i>Primer Kel Forward</i>	0,2 µL
<i>Primer Kel Reverse</i>	0,2 µL
Taq Polymerase (5U/µL)	0,08 µL
DNA	1,5 µL

Fonte: Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá.

3. Resultados e Discussão

A digitalização dos laudos emitidos junto às informações clínicas e sociodemográficas dos pacientes atendidos pelo LIG foi bem sucedida, resultando na conservação dos documentos originais e na otimização da gestão de informações para o laboratório.

Os resultados experimentais da padronização do antígeno eritrocitário Kell não foram satisfatórios pois foi observado o aparecimento de resultados falsos positivos. Inicialmente foi cogitado a possibilidade de contaminação cruzada entre amostras porém com a repetição das reações e aumento do cuidado com a manipulação, os resultados continuaram os mesmos. Esses resultados expõem a possibilidade de que os novos primers adotados para o laboratório sejam o motivo para esse desfecho, dado que os iniciadores diferem entre si por apenas uma base nitrogenada.

4. Considerações

O presente trabalho possibilitou que os participantes adquirissem conhecimentos teóricos e práticos a respeito da biologia molecular, sendo possível explorar sobre um assunto de grande importância para a sociedade. Além disso, foi estimulado a independência dos alunos dentro do laboratório permitindo que os participantes desenvolvessem as habilidades



técnicas de forma autônoma e colaborativa.

Apesar dos resultados fugirem do esperado, a identificação desse problema durante o projeto de extensão reforça a necessidade da revisão dos novos primers adquiridos, assim como os protocolos experimentais do laboratório, sendo extremamente importante para o controle de qualidade e otimização de trabalhos futuros.

Referências

MOLINA-AGUILAR, R. et al. **Pathophysiology of Alloimmunization**. p. 152 – 159, 08 2019.

DEAN, L. The Kell blood group. In: DEAN, L. (Ed.). **Blood Groups and Red Cell Antigens**. National Center for Biotechnology Information (US), 2005. cap. 8.

BONIFACIO, S. L. et al. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. Rev. Bras. **Hematol. Hemoter.** v. 31, n. 2, p. 104-111, 2009

JI, Y. et al. Novel alleles at the Kell blood group locus that lead to Kell variant phenotype in the Dutch population. **Transfusion**. v. , p. , 2014