



PADRONIZAÇÃO DE REAÇÕES PCR-SSP COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO PARA AUXILIAR OS HEMOCENTROS AFILIADOS AO HEMEPAR NA GENOTIPAGEM DOS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DO GRUPO SANGUÍNEO DIEGO

Isadora Oliveira Fernandes (UEM)
Amanda de Amorim Fernandes Toledo Martins (UEM)
Quirino Alves de Lima Neto (UEM)
ra118875@uem.br

Resumo:

O antígeno do grupo sanguíneo Diego é um dos muitos sistemas de grupos sanguíneos menores, mas clinicamente significativos. Os principais antígenos neste sistema são *DI*01* e *DI*02*. A presença ou ausência desses antígenos é determinada por variações genéticas específicas no gene *SLC4A1* (*Solute Carrier Family 4 Member 1*), que codifica a proteína Banda 3. A genotipagem dos sistemas de grupos sanguíneos dos pacientes do Hemocentro e Hemepar, são essenciais para prevenir reações transfusionais imediatas e tardias, que podem levar a complicações fatais, evitar incompatibilidade em transplantes e auxiliar durante o gerenciamento da gravidez. Portanto, a precisão na identificação dos tipos sanguíneos e antígenos é crucial para a segurança do paciente. O objetivo deste trabalho foi digitalizar os dados cadastrais destes pacientes atendidos no Hemocentro Regional de Maringá no período entre 2015 até 2024 e realizar a otimização da reação de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction - Sequence-Specific Primers*) para o grupo sanguíneo Diego. A extração de DNA se deu por meio do kit Biopur, as reações de PCR-SSP foram otimizadas para a detecção do alelo *DI*01*, a PCR-SSP ocorreu em termociclador e o resultado foi revelado em eletroforese com gel de agarose 2%, posteriormente reveladas em fotodocumentador com o uso do software VisionCapt. O resultado da PCR-SSP foi significativamente superior quando utilizamos a temperatura de anelamento de 64°C. Este resultado foi crucial para genotipagens de pacientes para o alelo *DI*01*, aumentando a eficiência e a precisão da PCR-SSP. A implementação dessas melhorias não só potencializou a qualidade das análises, como também garantirá maior segurança e eficácia no tratamento transfusional dos pacientes.

Palavras-chave: GENOTIPAGEM; Diego, transfusões; alelo; padronização.



1. Introdução

O grupo Sanguíneo Diego é um dentre os 45 sistemas de grupos sanguíneos existentes e já detectados pela biologia molecular e sua detecção e evidência é de grande importância para evitar reações transfusionais imediatas e tardias como a hemólise aguda e reação febril não hemolítica assim como a Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN), respectivamente. (MINISTERIO DA SAUDE, 2022).

O sistema Diego foi descoberto em 1955 por Layrissa ao ser detectado a presença do anticorpo anti-Di em um indivíduo do sexo feminino na Venezuela, cujo recém-nascido apresentou doença hemolítica perinatal. O alelo *DI*01* do grupo sanguíneo Diego possui maior incidência entre índios americanos (36%) e em populações asiáticas, como chineses (5%), japoneses (12%) e coreanos (6,4-14,5%). Por outro lado, o alelo *DI*02* apresenta uma frequência populacional elevada (>99%), independentemente da origem étnica e geográfica (MINISTERIO DA SAUDE, 2022).

O intuito deste trabalho foi realizar a padronização das reações de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction - Sequence-Specific Primers*) para garantir a genotipagem do antígeno eritrocitário *DI*01* nas amostras recebidas do Hemocentro e Hemepar no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (LIG-UEM).

2. Metodologia

Inicialmente, no projeto cujo o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAE) possui registro formal: 0402.0.093.000-11, foi realizada a gestão das fichas de pacientes do Hemocentro de Maringá-PR e do Hemepar, cujas amostras correspondentes entre 2015 e 2024, foram analisadas no LIG. Para isso, foram digitalizados os dados cadastrais, laudos e termos de consentimento para garantir acessibilidade, preservação e segurança das informações.

A extração do material genético foi realizada com o kit Biopur, e a concentração final ficou entre 15 ng/μL e 150 ng/μL e pureza aceitável entre 1,90 e 2,10.

Para a otimização da PCR-SSP do alelo *DI*01*, foram utilizados os *primers* presentes na tabela 01. Usou-se o hormônio *HGH* (*Hormônio do Crescimento Humano*) nos primeiros experimentos como controle interno de reação. Já na tabela 2, estão os reagentes utilizados na amplificação com suas respectivas concentrações.



Tabela 1. Sequência de primers para o gene *DI*01* e *DI*02*.

Gene	Alelo	Primer/Nome	Sequência
<i>DI</i>	<i>DI*01</i>	Forward/ <i>DI01</i> for Reverse/ <i>DI01</i> rev	GTGCTGGGGTGTGATAGGC CAGGGCCAAGGGAGGCCA
	<i>DI*02</i>	Forward/ <i>DI02</i> for Reverse/ <i>DI02</i> rev	GGTGGTGAAGTCCACGCC CCAGGCAGCCACTCACAC
<i>HGH</i>		Forward	CAGTGCCTTCCCAACCAT
		Reverse	CACTCCTGAAGAAGAT

Tabela 2. Reagentes utilizados para a PCR-SSP do gene *DI*01* e *DI*02*.

Reagentes	Concentração
Água	q.s.p
Tampão PCR Buffer (10X)	1 X
dNTP (10mM)	0,2 mM
MgCl ₂ (50mM)	Determinado experimentalmente
Primer Diego Forward (100 mM)	2,0 ng/μL
Primer Diego Reverse (100 mM)	2,0 ng/μL
Taq Polymerase (5U/μL)	0,4 U
DNA	100 ng/μL

Utilizou-se 2 amostras controles para a PCR-SSP, GALS e MGQ, seus genótipos são respectivamente, *DI*02/02* e *DI*01/02*. Para otimizar a PCR-SSP, foram testadas diferentes concentrações de MgCl₂: 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM e 1,50 mM. As temperaturas de anelamento utilizadas foram 62°C e 64°C. As configurações do termociclador foram: 94°C por 2 minutos (1 ciclo), 94°C por 30 segundos (30 ciclos), 62°C ou 64°C por 1 minuto (30 ciclos), na temperatura de extensão 72°C por 30 segundos (30 ciclos), 72°C por 5 minutos (1 ciclo), e 4°C até desligar o equipamento.

A revelação foi feita por eletroforese com gel de agarose L.E 2% e TBE 1X com a configuração da fonte em 300 W, 150 mA e 300 V por 20 minutos. O resultado foi revelado em transiluminador com luz UV, fotodocumentador VisionCapt.

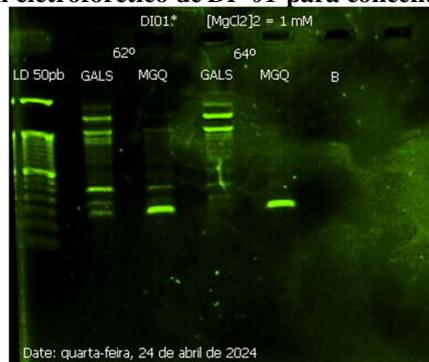
3. Resultado e Discussão

Durante as reações PCR-SSP para o alelo *DI*01*, a primeira concentração de MgCl₂ (0,75 mM), no experimento 1, revelou arraste e bandas inespecíficas, mas as bandas de *DI*01* foram visíveis na amostra MGQ, mesmo sem controle interno *HGH*, este reagente foi abolido inicialmente por gerar possíveis interferências com outros componentes da PCR-SSP. Na

segunda concentração de $MgCl_2$ (1 mM), no experimento 2, também foram observadas bandas inespecíficas, mas as bandas de *DI*01* foram detectadas na amostra MGQ e o melhor desempenho foi em 64°C.

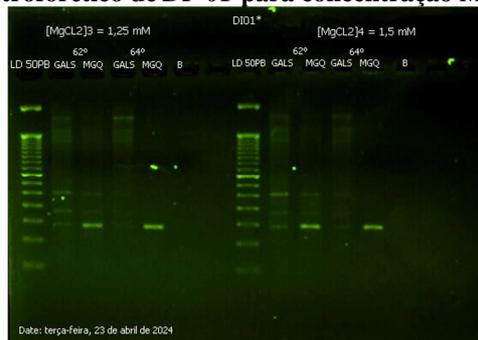
Quanto a amostras homozigota para *DI*02* (GALS), foi evidenciado a presença das bandas correspondentes ao alelo *DI*02*, mesmo sem controle interno HGH possuindo um desempenho melhor em 64°C como é possível constatar na figura abaixo (figura 1).

Figura 1. Perfil eletroforético de *DI*01* para concentração $MgCl_2$ 1 mM.



Ainda, no experimento 3, ao testar as concentrações de $MgCl_2$ a 1,25 mM e 1,5 mM, respectivamente, nota-se a presença de arraste e bandas inespecíficas com a amostra homozigota GALS, porém foi evidenciado a presença das bandas correspondentes de *DI*01* na amostra MGQ, mesmo sem controle interno *HGH* (Figura 2).

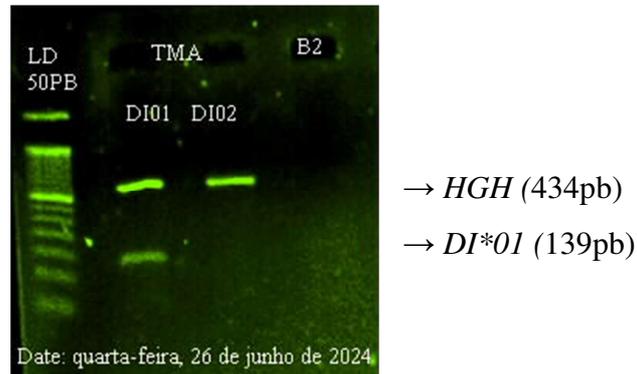
Figura 2. Perfil eletroforético de *DI*01* para concentração $MgCl_2$ 1,25 mM e 1,5mM.



Há algumas hipóteses para presença de bandas inespecíficas e arraste, como: contaminação durante a execução da PCR-SSP, fragmentação do DNA, sobrecarga de amostra ou formação de produtos inespecíficos. A amostra MGQ, que possui o genótipo *DI*01/DI*02* apresentou melhor desempenho na amplificação em concentrações de $MgCl_2$ maiores ou iguais a 1 mM e em temperaturas de anelamento de 64°C.

A execução desta técnica foi de extrema importância para que houvesse a testagem de outras amostras para a pesquisa do genótipo homozigoto para *DI*01*. Como por exemplo foi o caso do participante TMA, cujo genótipo homozigoto é apresentado na figura 3.

Figura 3. Perfil eletroforético *DI*01/DI*01*.



4. Considerações

É necessário continuar a otimização das reações, agora com o controle interno *HGH*, para aumentar a sensibilidade e reduzir os arrastes e amplificações inespecíficas. A pesquisa também possibilitou detectar um participante com genótipo homozigoto para o alelo *DI*01*, mas é interessante testar experimentalmente novas amostras para aumentar o banco de controles do Laboratório de Imunogenética. Por fim, a digitalização do banco de dados físicos garantiu a acessibilidade, preservação e segurança das informações, oferecendo uma gestão de conhecimento.

Referências

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia do Cadastro Nacional do Sangue Raro. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 1º ed., 2022.

BONIFÁCIO, Silvia L; NOVARETTI Marcia C. Z.. **Funções biológicas dos antígenos eritrocitários**. Revista Brasileira de hematologia e Hemoterapia, Rio de Janeiro, vol. 31 n.2 Fev, 2009.

GIRELLO, Ana L.; KUHN, Telma .I.B. **Fundamentos da Imunohematologia eritrocitária**. 2.ed. São Paulo: Editora Senac. 2007. 141p.