

RICARDO OMOTO

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE
DA GLICOFORINA B (*GYPB*) NA
POPULAÇÃO BRASILEIRA
DESCENDENTE DE AFRICANOS**

Campinas

2008

RICARDO OMOTO

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DA
GLICOFORINA B (*GYPB*) NA POPULAÇÃO
BRASILEIRA DESCENDENTE DE
AFRICANOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Maria de Castilho

**Campinas
2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Om6a Omoto, Ricardo
Análise molecular do gene da glicofina B (*GYPB*) na população brasileira descendente de africanos. / Ricardo Omoto. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Lilian Maria de Castilho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antígenos. 2. Gene. 3. Glicoforina. 4. Fenótipo. I. Castilho, Lillian.Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Molecular analyses of glycophorin B gene (GYPB) in African Brazilians

Keywords: . Antigen
. Gene
. Glycophorin
. Phenotype

Área de concentração : Clínica Médica

Titulação: Mestre em Clínica Médica

**Banca examinadora: Prof^a. Dr^a. Lílian Maria de Castilho
Prof^o. Dr^o. Wilson Baleotti Junior
Prof^a. Dr^a Simone Cristina Olenscki Gilli**

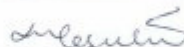
Data da defesa: 26 - 08 - 2008

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Ricardo Omoto

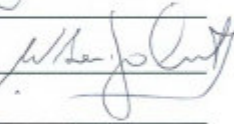
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Lilian Maria de Castilho

Membros:

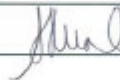
1. Prof^ª. Dr^ª. Lilian Maria de Castilho



2. Prof. Dr. Wilson Baleotti Júnior



3. Prof^ª. Dr^ª. Simone Cristina Olenscki Gilli



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/08/2008

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder a alegria, saúde e a determinação para alcançar as minhas conquistas pessoais e profissionais.

Aos **meus pais, Fumutoshi Omoto e Ida Satico Watanabe Omoto (in memorian)**, pelos esforços que dispuseram em suas vidas para proporcionar-me amor, educação e a formação do meu caráter.

À **minha madrasta, Kiyoko Maeda**, que esteve sempre presente ao meu lado, substituindo no papel de mãe, a precoce ausência de **minha querida mãe Ida Satico Watanabe Omoto**.

Ao amor da minha vida, **Carla Aprile Omoto**, que está sempre presente em todos os momentos da minha vida, sejam eles de alegria, tristeza ou angústia, para apoiar-me com suas palavras de amor e otimismo.

Aos meus queridos filhos, **Nivia Mayumi Omoto (“Nini”)**, **Ana Luiza Aprile Porto Ferreira (“Nana”)**, **Rafael Aprile Omoto (“Rafa”)** e **Paula Aprile Omoto (“Titi”)**, que são a minha razão de viver e fonte eterna de alegria na minha vida.

Ao meu irmão **Paulo Roberto Omoto** que apesar da distância que nos separa, estará sempre presente no meu coração.

Ao meu grande amigo **Fernando Luiz Vieira de Araujo**, por estar sempre presente, incentivando-me e apoiando-me em todos os momentos.

A minha querida amiga e madrinha **Mariza Aparecida Mota**, pela amizade, carinho, ajuda em diversos momentos críticos da minha vida e por ter me apresentado à **Profa. Dra. Lilian Maria de Castilho**.

À **Profa. Dra. Lilian Maria de Castilho**, por ter aceitado ser minha orientadora, pela amizade dedicada, pela compreensão nos momentos difíceis e pela disposição em orientar-me em todas as etapas da elaboração deste trabalho que contribuiu para o meu crescimento profissional e acadêmico.

Ao **Prof. Dr. Jordão Pellegrino Jr.**, pela amizade, apoio e grande colaboração na revisão deste trabalho.

À **Dra. Marion Reid** (New York Blood Center), pela atenção e disposição na análise e revisão do meu trabalho, sempre me incentivando em conjunto com a **Profa. Dra. Lilian Maria de Castilho**.

À diretoria do Hospital São Rafael, em especial à **Dra. Liliana Ronzoni (Diretora Médica)** e a **Sra. Laura Ziller (Vice-Presidente)**, pelo apoio e aceitar-me como membro da equipe dessa respeitosa Instituição que promove a saúde, a pesquisa e o bem-estar da população da cidade de Salvador.

Ao meu amigo **Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata**, Professor Titular da Disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela amizade, apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida acadêmica.

A todos os **membros da equipe do Centro de Hematologia, Hemoterapia e Análises Clínicas** que dispuseram seu precioso tempo a meu favor, contribuindo direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

A(o)s companheira(o)s de laboratório e pós-graduação: **Thaís, Fernanda, Débora, Clayton e Karina**, pela amizade e colaboração sempre presente durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores que participaram da Comissão Examinadora de Qualificação dessa dissertação: **Profa. Dra. Maria de Lourdes Borjas Castro** e **Prof. Dr. Vagner de Castro** pelas valiosas sugestões de melhorias na apresentação final da dissertação.

Trabalho realizado no **Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP** e no **Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital São Rafael.**

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	<i>xvi</i>
ABSTRACT	<i>xvii</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
A. Material	12
1. Amostras.....	12
2. Anti-soros.....	12
3. Cartões Gel (<i>ID-Micro Typing Cards</i>).....	12
4. Tampão LISS modificado (Diluyente 2).....	13
5. Suspensão de hemácias a 0,8%.....	13
6. Diluição dos anti-soros.....	13
7. <i>Easy DNA kit</i>	13
8. Taq DNA polimerase.....	13
9. dNTP 10 mM.....	13
10. Primers.....	14
11. Enzimas de restrição.....	14
12. Marcadores moleculares.....	14
13. Tampão Tris-Borato (TEB) 10x.....	14
14. Tampão Tris-Borato (TEB)	14

SUMÁRIO (cont.)

15. Gel de agarose (1%, 1,5% e 2%)	14
16. Gel de poliacrilamida 10%.....	15
B. MÉTODOS	15
1. Fenotipagem eritrocitária dos antígenos S/s/U.....	15
2. Extração do DNA.....	15
3. Seleção das Amostras para o estudo.....	16
4. PCR Alelo-específico S/s.....	16
5. Análise do exon 5 do gene <i>GYPB</i> – ensaio combinado AS/PCR-RFLP.....	17
4. RESULTADOS	19
Análises sorológicas.....	20
PCR Alelo-específico para <i>GYPB</i> *S/s.....	20
Ensaio combinado AS/PCR-RFLP para a determinação de alterações no exon 5 do gene <i>GYPB</i>	21
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
8. ANEXOS	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág
FIGURA 1: Família de genes <i>GYPA</i> no cromossomo 4	3
FIGURA 2: Estrutura esquemática da glicoforina A (GPA) e da glicoforina B (GPB) na membrana das hemácias humanas	4
FIGURA 3: Mecanismo de <i>Crossover</i> e Conversão Gênica no Sistema MNS gerando moléculas híbridas	6
FIGURA 4: PCR alelo específico para a genotipagem dos alelos <i>GYPB*<i>S</i></i> e <i>GYPB*s</i>	17
FIGURA 5: AS/PCR-RFLP para análise molecular do exon 5 do gene <i>GYPB</i>	18

LISTA DE TABELAS

	Pág
TABELA 1: Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas técnicas de AS-PCR e AS/PCR-RFLP	16
TABELA 2: Resultados do PCR Alelo-Específico para os alelos <i>GYPB</i> *S/s ...	20
TABELA 3: Resultados da análise molecular nas amostras de DNA que apresentaram fenótipo S-s-	21
TABELA 4: Resultados da análise molecular nas amostras de DNA que apresentaram fenótipo S-s+	22

LISTA DE ABREVIATURAS

Sigla	Descrição
A	Nucleotídeo adenina
Anti-He	Soro anti antígeno He
Anti-S	Soro anti antígeno S
Anti-s	Soro anti antígeno s
Anti-U	Soro anti antígeno U
AS/PCR-RFLP	Técnica de PCR combinada AS com digestão enzimática
AS-PCR	Técnica de PCR Alelo Específica
C	Nucleotídeo citosina
C-terminal	Região carboxila terminal da proteína
dATP	Desoxiadenosina trifosfatada
dCTP	Desoxicitosina trifosfatada
ddH₂O	Água destilada e deionizada
dGTP	Desoxiguanosina trifosfatada
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (fita de nucleotídeos)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
dTTP	Desoxitimidina trifosfatada
EcoRI	Enzima de restrição
EDTA	Anticoagulante Ácido Etilenodiamino tetra-acético
Fy(a-b-)	Fenótipo Duffy nulo
G	Nucleotídeo guanina
g	Força gravitacional
GP(A-B)	Glicoforina híbrida de GPA e GPB
GP(A-B-A)	Glicoforina híbrida de GPA e GPB, contendo duas partes de GPA
GP(B-A)	Glicoforina híbrida recíproca de GP(A-B)
GP(B-A-B)	Glicoforina híbrida de GPA e GPB, contendo duas partes de GPB

LISTA DE ABREVIATURAS (cont.)

Sigla	Descrição
GP(NY)	Glicoforina GP(NY)
GP(P2)	Glicoforina GP(P2)
GP.Cal	Glicoforina GP.Cal
GP.He(GL)	Glicoforina GP.He(GL)
GPA	Glicoforina A
GPB	Glicoforina B
GPB4/5	Primer
GPB5T	Primer
GPBIVS5	Primer
GYP(A-B)	Gene híbrido contendo nucleotídeos de <i>GYPA</i> e <i>GYPB</i>
GYP(A-B-A)	Gene híbrido resultante da inserção de nucleotídeos de <i>GYPB</i> em <i>GYPA</i>
GYP(B-A)	Gene híbrido recíproco de <i>GYP(A-B)</i>
GYP(B-A-B)	Gene híbrido resultante da inserção de nucleotídeos de <i>GYPA</i> em <i>GYPB</i>
GYP(P2)	Gene <i>GYP(P2)</i>
GYP.He	Gene da glicoforina B que expressa o antígeno He
GYPA	Gene <i>GYPA</i>
GYPB	Gene <i>GYPB</i>
GYPB(NY)	Gene <i>GYPB(NY)</i>
GYPB*S	Gene <i>GYPB*S</i>
GYPB*s	Gene <i>GYPB*s</i>
GYPE	Gene <i>GYPE</i>
GYPHe(NY)	Gene <i>GYPHe(NY)</i>
HCl	Ácido clorídrico
He	Antígeno Henshaw

LISTA DE ABREVIATURAS (cont.)

Sigla	Descrição
IAT	Teste Indireto da imunoglobulina
Kb	Mil pares de bases
KCl	Cloreto de potássio
LISS	Low ionic strength salt solution
MgCl₂	Cloreto de magnésio
ml	Milésima parte do litro
mM	Milésima parte do mol
MNS	Sistema de Grupo Sanguíneo MNS
MNS1	Antígeno M
MNS2	Antígeno N
MNS20	Antígeno Hil
MNS21	Antígeno M ^Y
MNS23	Antígeno s ^D
MNS24	Antígeno Mit
MNS3	Antígeno S
MNS30	Antígeno 'N'
MNS33	Antígeno TSEN
MNS4	Antígeno s
MNS5	Antígeno U
MNS6	Antígeno Henshaw
ng	Nanograma
N-terminal	Região amino terminal da proteína
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Técnica de PCR seguida por digestão enzimática
PEG	Polietileno glicol
POQ	Procedimento Operacional da Qualidade
Primer	Sequência de oligonucleotídeos sintéticos

LISTA DE ABREVIATURAS (cont.)

Sigla	Descrição
Pro	Prolina
RhAG	Proteína RhAG
<i>RHDΨ</i>	Pseudogene <i>RHD</i>
S	Antígeno S
s	Antígeno s
SCARF	Serum Cell and Rare Fluids
T	Nucleotídeo timina
Taq	DNA polimerase termo-estável
TEB	Tris EDTA Borato
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino
Thr	Treonina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Antígeno U
μl	Microlitro

RESUMO

Introdução: As bases moleculares responsáveis pelas variantes do gene *GYPB* ainda não estão estabelecidas para a população de Brasileiros descendentes de Africanos. O presente estudo foi realizado para analisar os mecanismos moleculares que originam o fenótipo S–s– e determinar a frequência do gene *GYPB**S silencioso no fenótipo S–s+, em uma população de doadores de sangue descendentes de Africanos. **Materiais e Métodos:** Foram selecionadas 165 amostras de sangue de Brasileiros descendentes de Africanos (Nordeste do Brasil) fenotipados como S–s– (n=17) e S–s+ (n=148) por hemaglutinação. Com a finalidade de identificar as formas variantes do gene *GYPB*, realizamos a genotipagem dessas amostras pelas técnicas de PCR Alelo-específico (AS-PCR) e PCR-RFLP. **Resultados:** Em 13 das 17 amostras S–s– (76,5%) ambos os alelos *GYPB**S e *GYPB**s estavam deletados. Em 137 das 148 amostras fenotipadas como S–s+ (92,6%), o resultado da genotipagem pela técnica AS-PCR foi consistente com o fenótipo S–s+. Em 4 das amostras S–s– (23,5%) e em 11 das amostras S–s+ (7,4%) foi identificada a presença do alelo *GYPB**S associado com o silenciamento do antígeno S. Das amostras de DNA de doadores com o fenótipo S–s– que demonstraram a presença do alelo *GYPB**S, 2 apresentaram a variante *GYP(P2)*, 1 a variante *GYP(NY)* e, em 1 amostra encontramos ambas as formas variantes de *GYPB*: *GYP(P2)* e *GYP(NY)*. Em 11 doadores com o fenótipo S–s+ houve heterozigidade para o alelo *GYP(P2)* (n=8) e heterozigidade para o alelo *GYP(NY)* (n=3). **Conclusão:** Esse estudo relata pela primeira vez os mecanismos moleculares responsáveis pelo fenótipo S–s– em uma população de Brasileiros descendentes de Africanos e promove o conhecimento de uma nova informação sobre a frequência (7,4%) e as bases moleculares do gene *GYPB**S silencioso nesta população.

ABSTRACT

Background: The molecular background of variant forms of *GYPB* is not well studied in Brazilians of African descent. The present study was carried out to determine the molecular bases of the S–s– phenotype and the frequency of *GYPB**S silent gene for the S–s+ phenotype in a blood donor population of African Brazilians. **Methods:** We selected 165 blood samples from African Brazilians (Northeastern Brazil) who phenotyped as S–s– (17) and S–s+ (148) by hemagglutination. AS-PCR and PCR-RFLP were used to identify the variant forms of *GYPB*. **Results:** In 13 of 17 S–s– samples (76.5%) both *GYPB* were deleted. In 137 of the 148 S–s+ samples (92.6%), the AS-PCR was consistent with the S–s+, phenotype. In 4 of the S–s– samples (23.5%) and 11 of the S–s+ samples (7.4%) showed the presence of the *GYPB**S allele associated with silencing of the S antigen. In the 4 donors with the S–s– phenotype there was homozygosity (or hemizyosity) for the *GYP(P2)* allele (n=2), homozygosity (or hemizyosity) for the *GYP(NY)* allele (n=1) and heterozygosity for the *GYP(P2)* and *GYP(NY)* alleles (n=1). In the 11 donors with the S–s+ phenotype there was heterozygosity for *GYP(P2)* allele (n=8) and heterozygosity for *GYP(NY)* allele (n=3). **Conclusion:** This study reports for the first time the molecular mechanisms responsible for the S–s– phenotype in a population of African Brazilians and provides a new information about the frequency and molecular bases of *GYPB**S silent gene (7.4%) in this population.

1. INTRODUÇÃO

O sistema MNS foi o segundo sistema de grupo sanguíneo a ser descoberto por **LANDSTEINER e LEVINE** em **1927**, através da imunização de coelhos com hemácias humanas. Os antígenos do sistema MNS estão completamente desenvolvidos no nascimento e são expressos na glicoforina A (GPA), glicoforina B (GPB) ou em estruturas híbridas de GPA e GPB na superfície das hemácias humanas. Atualmente, esse sistema de grupo sanguíneo possui descrito 46 antígenos distintos (Anexo 1) e perde em complexidade somente para o sistema Rh (**DANIELS et al, 2004**).

As glicoforinas são as principais sialoglicoproteínas (proteínas integrais de membrana do tipo I) e são responsáveis pela maior parte do conteúdo de carboidratos presentes na membrana das hemácias. A maioria desses carboidratos são estruturas de tetrassacarídeos contendo uma molécula de *N*-Acetilgalactosamina, uma molécula de galactose e duas moléculas de ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) (**ROLIH, 1989**). O elevado conteúdo de ácido siálico contribui para a carga negativa líquida e hidratação da membrana, evitando a aderência das hemácias às células endoteliais dos vasos sanguíneos, protegendo-as durante a circulação (**ANSTEE, 1990; BLANCHARD, 1990**). O glicocalix carregado negativamente também protege as hemácias da invasão por bactérias e outros patógenos. As hemácias deficientes da GPA são mais resistentes à invasão pelos merozoítos do *Plasmodium falciparum* devido à redução do conteúdo de ácido siálico nas hemácias, que parece ser essencial para a adesão do parasita (**CARTRON et al, 1983; PASVOL et al, 1989; ORLANDI et al, 1992**). Além disso, o ácido siálico ligado a GPA e GPB tem sido relatado como sendo o receptor para o vírus influenza (**LUBLIN, 1995**).

As glicoforinas A e B são codificadas por uma família de genes composta por três membros comuns: *GYP A*, *GYP B* e *GYP E*. Esses genes são adjacentes entre si e estão localizados no cromossomo 4q28.2-q31.1. As seqüências de nucleotídeos desses genes compartilham mais de 90% de homologia nas regiões codificantes e não-codificantes (Figura 1). Entretanto, a seqüência de aminoácidos codificada em

ambas glicoforinas difere nos domínios extracelulares próximo à porção hidrofóbica da membrana e no curto domínio citoplasmático da glicoforina B (RAHUEL et al, 1994).

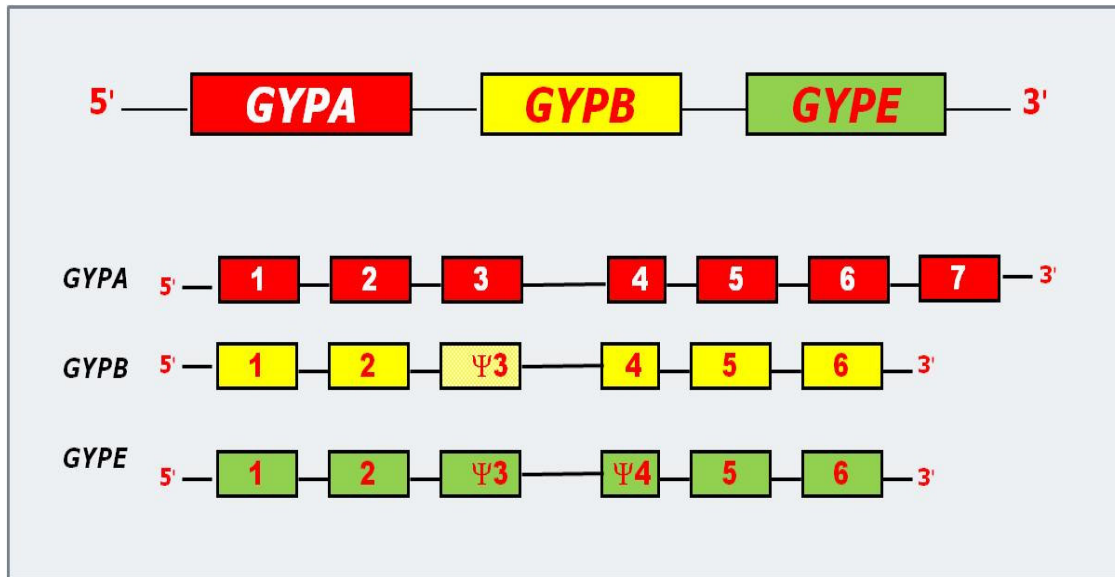


Figura 1: Família de genes *GYPA* no cromossomo 4

O gene *GYPA* codifica a glicoforina A e o gene *GYPB* codifica a glicoforina B. A GPA tem duas formas alélicas M (MNS1) ou N (MNS2) na região *N*-terminal. A GPB é idêntica a GPA^N nos primeiros 26 aminoácidos e, portanto, expressa o antígeno “N” (MNS30) na região *N*-terminal. A GPB também ocorre em duas formas alélicas expressando os antígenos S (MNS3) ou s (MNS4) que são definidos pela mudança de um aminoácido na posição 29 (metionina/treonina) (KUDO et al, 1989). O gene *GYPE* é ativamente transcrito, mas não produz nenhum produto detectável nas hemácias (Figura 2), participando somente nos rearranjos dos genes que originam os alelos variantes (KUDO et al, 1990). A análise da seqüência de nucleotídeos sugere que os genes *GYPB* e *GYPE* surgiram a partir da duplicação seqüencial do gene *GYPA* (VIGNAL et al, 1990; TATE et al, 1989; REARDEN et al, 1993).

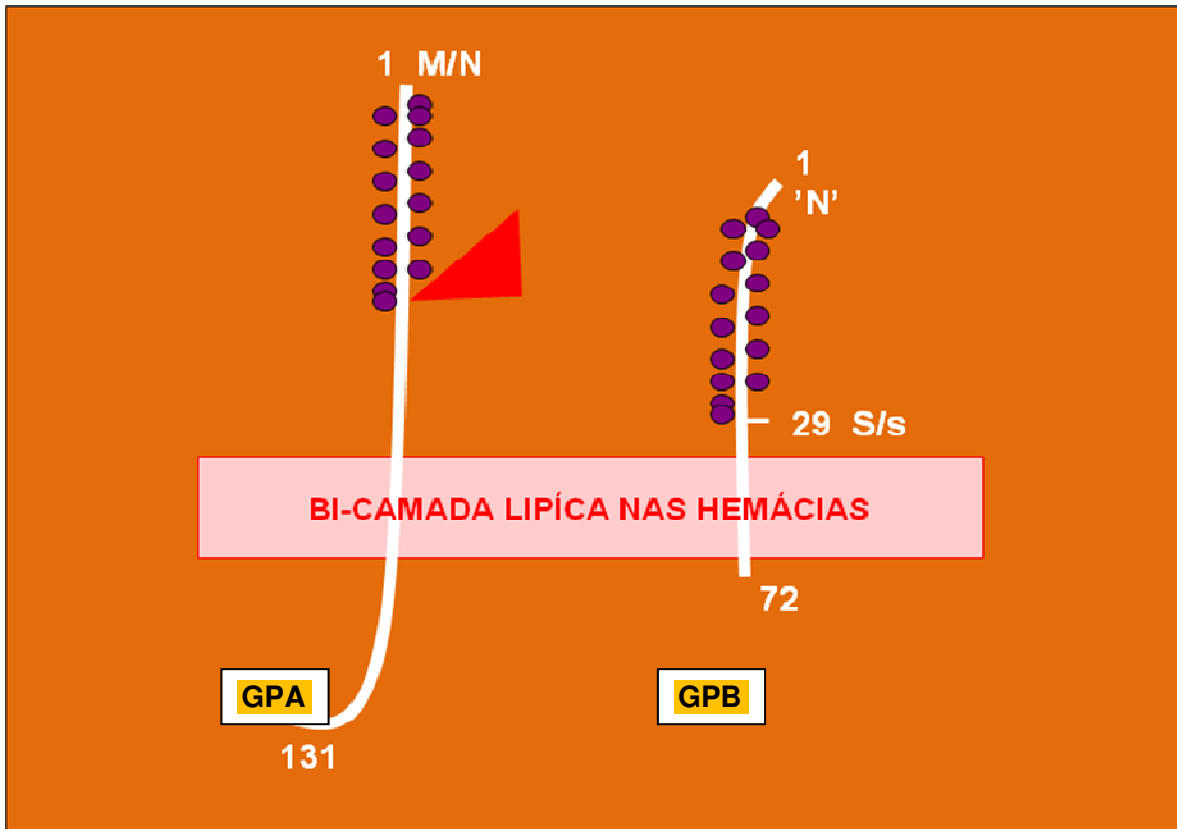


Figura 2: Estrutura esquemática da glicoforina A (GPA) e da glicoforina B (GPB) na membrana das hemácias humanas.

Apesar da similaridade entre *GYP A* e *GYP B*, há uma alteração de nucleotídeo (g>t) no gene *GYP B* na posição 5' do sítio de *splice* no intron 3, de tal forma que o exon 3, que é um pseudoexon, é removido e, conseqüentemente, o exon 2 une-se ao exon 4. A proximidade e homologia dos genes *GYP A* e *GYP B* permitem trocas recíprocas e não-recíprocas de ácidos nucléicos, resultando em moléculas híbridas que frequentemente expressam um ou mais antígenos novos, como por exemplo, GP(A-B) e GP(B-A-B), que expressam os antígenos Hil (MNS20) ou TSEN (MNS33), respectivamente. Além de codificar novos antígenos, a expressão dos antígenos mais comuns do sistema MNS, tais como, S ou s, pode ser afetada se a seqüência codificada estiver próxima ao sítio do *crossover*. Esses fatos são

frequentemente observados através de resultados inesperados de reação com anti-soros específicos (HUANG et al, 1995).

Estudos de variação genética dos genes das glicoforinas têm mostrado que os genes variantes frequentemente são híbridos, resultantes de rearranjos dos genes parentais por recombinações gênicas através dos mecanismos de *crossover* ou conversão gênica. O mecanismo de *crossover* é uma troca mútua de nucleotídeos entre os genes homólogos desalinhados durante a meiose. Esse mecanismo ocorre entre regiões de homologia com geração de dois arranjos recombinantes recíprocos. Um cromossomo carregando o híbrido *GYP(A-B)* não possui os genes *GYP(A)* e *GYP(B)* (tipo Lepore). Ao contrário, o cromossomo carregando o híbrido *GYP(B-A)* apresenta os genes *GYP(A)* e *GYP(B)* (tipo anti-Lepore). O mecanismo da conversão gênica pode ocorrer durante o processo de reparo do DNA entre genes homólogos durante a meiose. A conversão gênica é a transferência de nucleotídeos de um gene para o outro gene e não resulta em um produto recíproco. Esse mecanismo pode causar a inserção de nucleotídeos do gene *GYP(A)* em *GYP(B)* ou vice-versa. Como resultado, o cromossomo carregando um gene *GYP(B-A-B)* também carrega um gene *GYP(A)* mas não *GYP(B)*, enquanto que o cromossomo carregando um gene *GYP(A-B-A)* também carrega um gene *GYP(B)*, mas não o gene *GYP(A)*. Baseado nos mecanismos citados, os genes híbridos podem se agrupar em pelo menos quatro configurações básicas de acordo com o rearranjo dos genes: *GYP(A-B)*, *GYP(B-A)*, *GYP(A-B-A)* e *GYP(B-A-B)*, os quais são os resultados da homologia da seqüência de nucleotídeos nos genes parentais. A análise de todas as recombinações gênicas mostra que os eventos ocorrem no locus *MN* dentro de uma região genômica de aproximadamente 4 Kb. Em 18 de 20 variantes, as trocas genéticas estão confinadas a uma região de 2 Kb abrangendo os exons 2, 3 e 4. Esses genes híbridos determinam a expressão de novos fenótipos variantes, cujos determinantes antigênicos residem nas glicoforinas híbridas, do sistema de grupos sanguíneos MNS (VIGNAL et al, 1990; HUANG et al, 1995) (Figura 3).

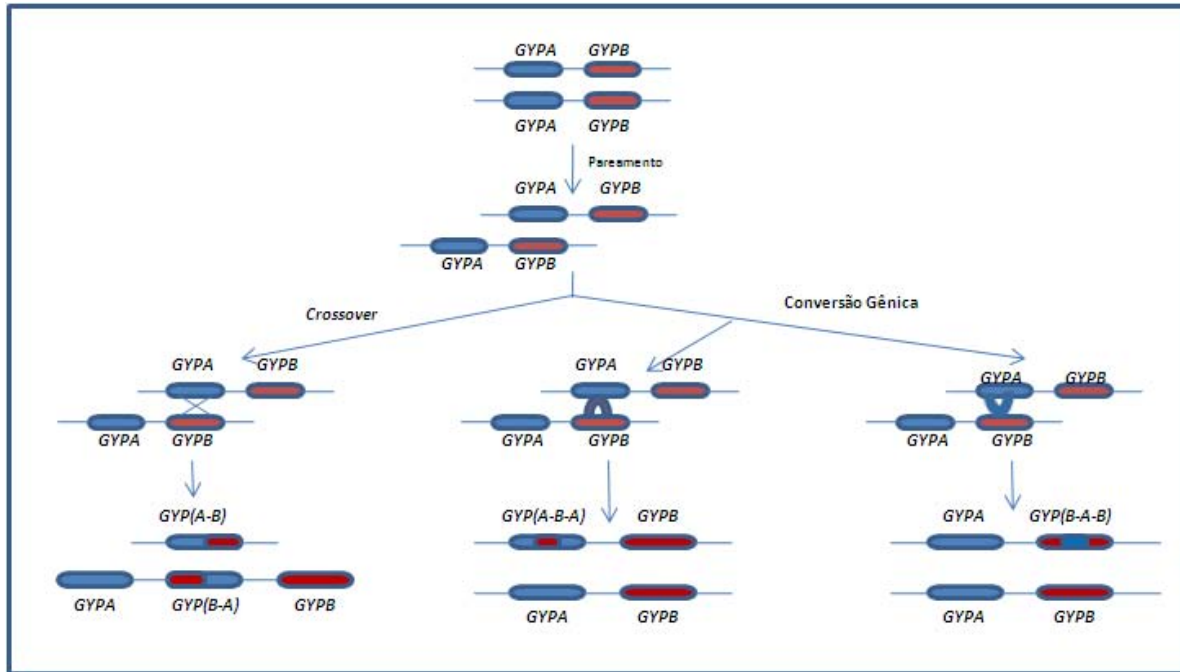


Figura 3: Mecanismo de *Crossover* e Conversão Gênica no Sistema MNS gerando moléculas híbridas.

O antígeno Henshaw (He ou MNS6) é uma variante do sistema MNS particularmente prevalente em Afro-descendentes de regiões endêmicas de malária, ocorrendo com uma prevalência de 1 a 7%. O antígeno He é definido pela substituição de três aminoácidos na seqüência *N*-terminal e é o produto de uma conversão gênica [*GYP(B-A-B)*]. A expressão do antígeno He varia entre as hemácias de vários indivíduos (HUANG et al, 1997).

Estudos moleculares têm demonstrado diferentes mecanismos moleculares envolvendo o antígeno He. Em um deles, o fenótipo S-s-He⁺, ocorre pela presença de um gene híbrido *GYP(B-A-B)* que codifica o antígeno He na porção 5' e que apresenta duas alterações de nucleotídeos adicionais em sítios de *splice* (HUANG et al, 1994). Em outra amostra variante He⁺, com o fenótipo S+s+ [GP.He(GL)], a omissão parcial ou completa do exon 4 levou a uma alteração do quadro de leitura, a um *stop códon* prematuro e a codificação de uma proteína truncada de apenas 59 aminoácidos e que pode ser detectada por imunoblot com anti-He (HUANG et al, 1997). No terceiro exemplo de um alelo He variante, uma glicoforina He⁺, St(a+) (MNS15) estava presente na superfície das hemácias

(GP.Cal) como resultado de eventos de recombinação e formação do gene híbrido *GYP(B-A-B-A)*(**HUANG et al, 1995**). Esses três exemplos mostram evidências da ocorrência de várias alterações de ponto e recombinações entre *GYP A* e *GYP B*, conforme mencionado previamente.

Além das moléculas híbridas nas quais a expressão dos antígenos S ou s está geralmente alterada, também foi observado a fraca expressão desses antígenos nas hemácias que apresentam os antígenos de baixa frequência M^V (MNS21), s^D (MNS23) ou Mit (MNS24) (**STORRY et al, 2001**). Esses antígenos de baixa frequência do sistema MNS são codificados por substituições de um único nucleotídeo no gene *GYP B*. Esse efeito na expressão dos antígenos S ou s pode ser devido às alterações na conformação da proteína resultante da troca de um único aminoácido, afetando o reconhecimento do antígeno por alguns tipos de anti-soros. **STORRY et al em 2001**, confirmaram que Arg35 é importante para a expressão completa do antígeno S e que Pro39 e Thr3 são igualmente importantes para a expressão completa do antígeno s .

A ausência da GPB nas hemácias é caracterizada pelo fenótipo S-s-, o qual é encontrado principalmente em indivíduos de descendência africana. As hemácias de aproximadamente 1% dos Afro-americanos, e de até 37% da população do Oeste da África, apresentam o fenótipo S-s-. Esse fenótipo é associado com a ausência do antígeno U (MNS5) de alta prevalência ou com a fraca expressão de U, também conhecida como U variante (U^{var}). A expressão do antígeno U nas hemácias U^{var} difere de um indivíduo para outro e é também dependente do anti-soro utilizado na fenotipagem. O fenótipo S-s-U- ocorre pela deleção do gene *GYP B*, enquanto que o fenótipo S-s-U^{var} tem sido associado com uma proteína GPB variante [*GYP(B-A-B)*] que expressa o antígeno He (**ISSIT et al, 1990; STORRY et al, 1996**).

STORRY et al, relataram em **2003**, através de um amplo estudo com 101 amostras de DNA de doadores e pacientes com fenótipo S-s-, as alterações moleculares e sua distribuição na população Afro-americana. Nesse estudo, foi confirmado que o DNA das amostras cujas hemácias não reagiram com um

potente anti-U/GPB também não foi amplificado por *primers* alelo-específico ou gene-específico designados a detectar o *GYPB*. Entretanto, as hemácias que apresentaram reatividade com o soro anti-U/GPB, demonstraram a presença das formas variantes de *GYP.He* (maioria das amostras) ou de *GYPB* nos ensaios alelo-específico. Todas as amostras demonstraram a presença do alelo *GYPB*S* silencioso. A ausência do antígeno S na superfície das hemácias foi devido a uma alteração nos nucleotídeos 208 (G>T) e 230 (C>T) do exon 5 [chamada de variante *GYPB(NY)* ou *GYPHe(NY)*] ou uma alteração g>t no nucleotídeo +5 do intron 5 [chamada variante *GYP(P2)*], que acarreta uma omissão parcial ou completa do exon, respectivamente. As análises de sequenciamento e PCR-RFLP mostraram que o alelo *GYP(P2)* foi o principal mecanismo molecular responsável pelo fenótipo S-s-U+^{var} nos doadores e pacientes estudados. A porção N-terminal das glicoforinas que apresentam GP(P2) ou GP(NY) podem expressar os antígenos 'N' ou He.

Alguns fenótipos raros do sistema MNS são encontrados mais frequentemente na população de descendentes de africanos. Muitos desses antígenos são resultantes de formas híbridas dos genes *GYP A* e *GYP B*, com a participação do *GYP E* na geração de alelos variantes. O efeito desse polimorfismo na população brasileira, que apresenta uma elevada miscigenação, é especialmente importante quando é necessário um suporte transfusional de longo prazo, como por exemplo, no tratamento da anemia falciforme, que expõe esses pacientes a um elevado risco de aloimunização para os antígenos de grupos sanguíneos devido às diferenças nos fenótipos eritrocitários entre os doadores de sangue que são descendentes de africanos e os não-descendentes. Por exemplo, indivíduos com fenótipo S-s- podem produzir anti-U, um anticorpo clinicamente importante e que requer unidades de sangue compatível S-s-U-.

Estes achados ressaltam a necessidade de incorporar métodos de genotipagem na rotina laboratorial para identificar novas e já conhecidas variantes genéticas na nossa população, com o objetivo de melhor atender as necessidades dos pacientes dependentes de transfusões regulares e de elaborar protocolos de genotipagem seguros para identificação dos alelos S e s.

2. OBJETIVOS

Considerando a importância clínica do sistema MNS e, em especial dos antígenos S, s e U e o fato de não existir na população brasileira estudos de identificação das formas variantes do gene *GYPB*, foram nossos objetivos:

- Analisar as bases moleculares do fenótipo S-s- na população brasileira descendente de africanos, residente na região metropolitana de Salvador;
- Determinar a frequência do gene *GYPB**S silencioso em indivíduos brasileiros descendentes de Africanos com o fenótipo S-s+.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A. MATERIAL

1. Amostras de Sangue

As amostras de sangue anticoaguladas com EDTA foram obtidas de doadores de sangue descendentes de africanos no Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital São Rafael. As amostras foram coletadas de acordo com os procedimentos operacionais da qualidade (POQs) da Instituição, após os candidatos serem considerados aptos à doação de sangue pelo processo de Triagem Clínica. Todos os doadores de sangue assinaram o Termo de Consentimento Livre e Informado para a doação de sangue aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

2. Anti-soros

Os anti-soros empregados na determinação dos antígenos S/s/U foram:

- Anti-S policlonal (Immucor, Norcross, GA);
- Anti-s policlonal (Immucor, Norcross, GA);
- Anti-U policlonal de origem humana (Serum Cell and Rare Fluids, SCARF).

3. Cartões Gel (*ID-MicroTyping Cards*)

Os cartões ID-LISS/Coombs foram utilizados na realização da fenotipagem eritrocitária e foram obtidos junto à DiaMed AG, Morat, Switzerland. Cada cartão ID-LISS/Coombs, contém 6 microtubos e, em cada um deles, uma mistura de gel e soro antiglobulina humana poliespecífica.

4. Tampão LISS modificado (Diluyente 2)

Tampão de baixa força iônica, utilizado na diluição dos anti-soros e das hemácias, para a realização da fenotipagem (DiaMed AG, Morat, Switzerland).

5. Suspensão de hemácias a 0,8%

Foram preparadas suspensões de hemácias a 0,8% em LISS modificado (Diluyente 2). Após lavar 3 vezes as hemácias em solução fisiológica, usando centrifugação a 100g durante 1 minuto, a cada vez, 2 µl do concentrado de hemácias obtido foi ressuspenso em 0,5 ml de LISS modificado.

6. Diluição dos Anti-soros

As diluições dos anti-soros foram realizadas em tampão LISS modificado (Diluyente 2) na razão 2 contra hemácias específicas. A diluição de trabalho foi definida na última diluição que apresentou reação de aglutinação de 4+ do anti-soro com o antígeno correspondente.

7. Easy DNA Kit

O *Easy DNA Kit*, utilizado na extração de DNA de amostras de sangue periférico, foi obtido da Invitrogen, Carlsbad, CA.

8. Taq DNA Polimerase

As enzimas Taq DNA polimerase, utilizadas nas reações de PCR, foram obtidas da Invitrogen, Carlsbad, CA. O kit contendo 5 unidades/µl desta enzima, incluía 1 ml de tampão 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4) e 500 mM de KCl e 1ml de MgCl₂, 50 mM.

9. dNTP 10 mM

As dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) foram obtidas da empresa Invitrogen, Carlsbad, CA. Para as reações de amplificação foram utilizados dNTPs na concentração de 10 mM (diluição de 20µl de cada nucleotídeo em 120 µl de água deionizada).

10. Primers

Os primers utilizados neste trabalho foram obtidos da empresa Invitrogen, Carlsbad, CA e estão descritos na Tabela 1.

11. Enzimas de restrição

A enzima *EcoRI* (MBI Fermentas, Amherst, NY) foi utilizada para a digestão dos produtos de PCR do ensaio combinado AS/PCR-RFLP (*GYPB* Exon 5).

12. Marcadores moleculares

Marcadores de 100 pb e 1kb (Invitrogen, Carlsbad, CA e MBI Fermentas, Amherst, NY), utilizados na análise do tamanho dos fragmentos de DNA.

13. Tampão Tris-Borato (TEB) 10x

Este tampão foi preparado, dissolvendo-se 108g de TRIS (Sigma Chemical Co), 55g de ácido bórico (Sigma Chemical Co) e 40 ml de EDTA 0,5 M pH 8.0 (Sigma Chemical Co), em 1000 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

14. Tampão Tris-Borato (TEB) 1x

O tampão TEB 1x foi preparado diluindo-se 100 ml de TEB 10x em 900 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

15. Gel de agarose (1%, 1,5% e 2%)

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 1,5 g de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA) em 100 ml de TEB 1x. Essa solução foi aquecida em forno microondas durante 1 minuto e, após o resfriamento, adicionava-se 50 µg de brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA).

16. Gel de poliacrilamida 10%

A solução de poliacrilamida foi preparada misturando-se, em um *becker*, 23,3 ml de acrilamida 40% (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 8.8 ml de TEB 10x, 55 ml de ddH₂O, 363 µl de persulfato de amônio 10% (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) e 66 µl de TEMED (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Esta solução era colocada entre duas placas de vidro, previamente preparada, até que ocorresse a polimerização.

B. MÉTODOS

1. Fenotipagem eritrocitária dos antígenos S/s/U

Os testes de fenotipagem dos antígenos S, s e U foram realizados pelo teste de hemaglutinação em gel, utilizando-se os cartões ID-LISS/Coombs. Após identificação dos cartões, 50µl das hemácias em teste a 0,8% em Diluente 2, foram adicionadas aos microtubos contendo gel e soro antiglobulina humana. Após, 25 µl do anti-soro diluído, contendo anticorpos específicos ao antígeno a ser estudado, eram adicionados ao mesmo tubo. Após incubação a 37°C durante 15 minutos, os cartões foram centrifugados a 70 *g* por 10 minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação do gel teste.

2. Extração do DNA

O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico utilizando-se o Easy DNA Kit, de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA foram analisadas somente quando não foi possível realizar a amplificação do DNA através dos métodos convencionais. Quando necessário, a qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a sua concentração determinada pela medida da densidade ótica em espectrofotômetro a 260 nm.

3. Seleção das Amostras para o Estudo

Foi selecionado para o estudo, um total de 165 amostras de sangue total de doadores voluntários de sangue, descendentes de Africanos e que apresentaram os seguintes fenótipos: S-s+ (n=148) e S-s- (n=17). As amostras S-s- foram adicionalmente fenotipadas com soros anti-U policlonais de origem humana obtido junto ao SCARF (*Serum, Cells and Rare Fluids*) para o estudo de caracterização dos fenótipos S-s-U- e S-s-U+^(var).

4. PCR alelo-específico para genotipagem dos alelos *GYPB**S e *GYPB**s

Uma técnica de PCR alelo-específico (AS-PCR) foi utilizada para a identificação dos alelos *GYPB**S/s em todas as amostras S-s+ (n=148) e S-s- (n=17).

A seqüência dos *primers* e do controle interno (hormônio de crescimento de origem humana) são mostrados na Tabela 1.

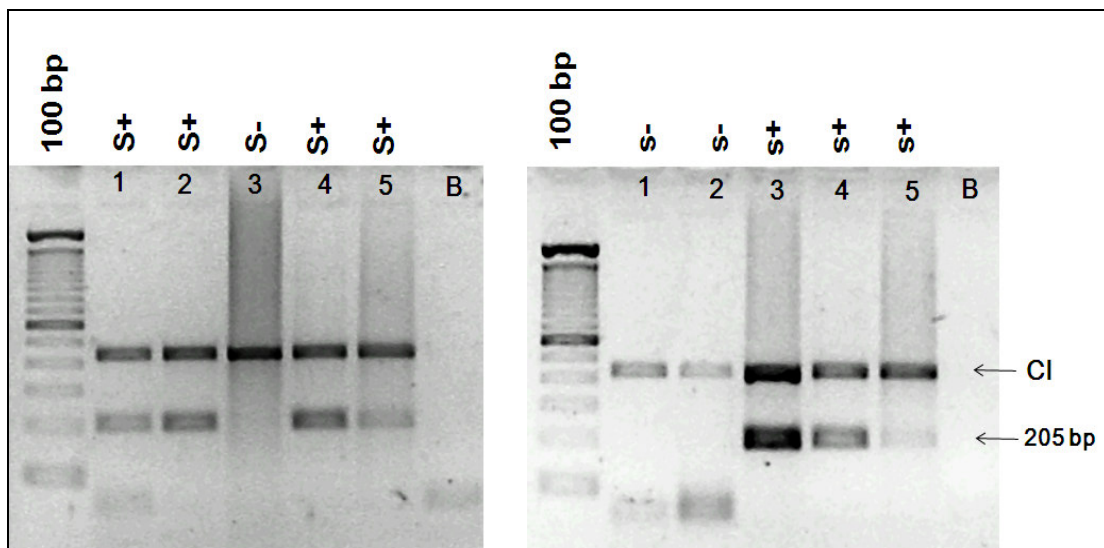
Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados nas técnicas de AS-PCR e AS/PCR-RFLP.

Primer	Direção	Seqüência (5' para 3')	Produto
GPB 1640	sense	GGTAAGACTGACACATTACCTCAC	
GPB S	antisense	AGTGAAACGATGGACAAGTTCTCCCA	207 pb
GPB s	antisense	AGTGAAACGATGGACAAGTTCTCCCG	
HGH	sense	TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA	
HGH	antisense	CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC	434 pb
GPB 4/5	sense	CTGTCTTATTTTTCTATTGCTATG	
GPB IVS5	antisense	CTGTTTCTCTTTTGAGTTTAACTG	260 pb
GPB 5T	antisense	ACTGTAAGAAATTAAGAGGCTCA	

A técnica AS-PCR foi realizada nas seguintes condições: 1 x PCR buffer, 1,5 mmol/L MgCl₂, 0,2 mmol/L dNTP, 100 ng dos *primers* (*sense* e *antisense*), 100

ng do controle do *primer*, 2,5 U da Taq DNA polimerase. A quantidade de DNA genômico variou de 2 a 5 µl (200ng) para um volume final de reação de 50 µl. A amplificação foi realizada utilizando um protocolo padrão de 35 ciclos, com uma temperatura de anelamento de 62°C. Os produtos do PCR foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (**Figura 4**).

Figura 4: PCR alelo específico para a genotipagem dos alelos GYPB*S e GYPB*s



B – água – controle branco CI – controle interno

5. Análise do exon 5 do gene *GYPB* – ensaio combinado AS/PCR-RFLP

As amostras de DNA genômico com os fenótipos S-s+ (n=11) e S-s- (n=4) e que apresentaram produto amplificado para o alelo *GYPB**S foram submetidas a um ensaio combinado AS/PCR-RFLP para a análise do exon 5 do gene *GYPB*. As seqüências dos primers utilizados neste PCR (GPB 4/5, GPB5T e GPB IVS5) encontram-se na tabela 1. Após amplificação do DNA, 20 µl do produto foi digerido com 20 U da enzima *EcoRI* durante um período de 12 horas

(*overnight*) à 37°C. Os produtos da digestão foram analisados após a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (Figura 5).

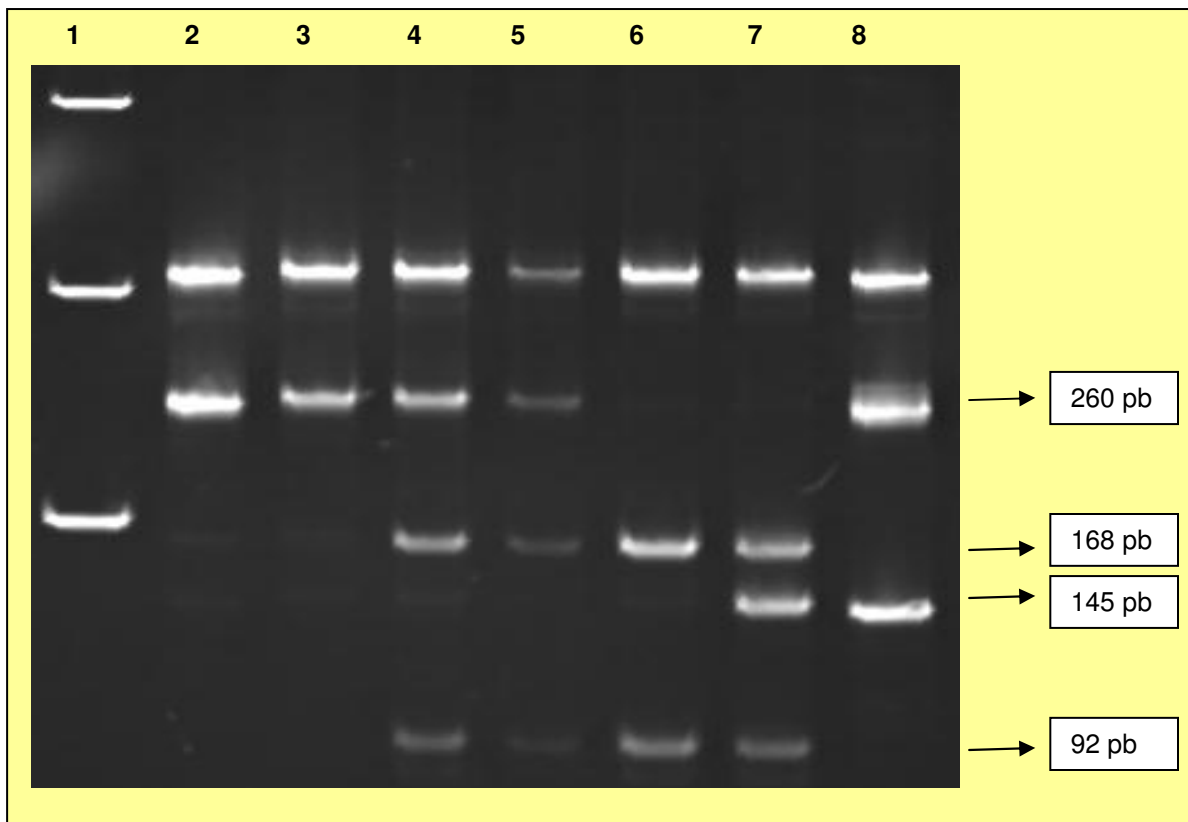


Figura 5: AS/PCR-RFLP para análise molecular do exon 5 do gene *GYPB*.

Linha 1: Marcador molecular de 100pb. Linha 2: Produto de PCR antes da digestão com a enzima *EcoRI*; Linha 3: Padrão de digestão da forma variante *GYP(P2)* homocigoto ou hemizigoto (eliminação do sítio de ação da enzima *EcoRI*); Linhas 4 e 5: Padrão de digestão de uma forma variante *GYP(P2)* heterocigoto; Linha 6: Padrão de digestão do *GYPB* normal. Linha 7: Padrão de digestão com a banda alelo específica *GYP(NY)* de 145 bp; . Linha 8: Produto de PCR da variante *GYP(NY)* antes da digestão enzimática.

4. RESULTADOS

Análises Sorológicas

As amostras de hemácias dos 165 doadores foram inicialmente fenotipadas com anti-soros anti-S e anti-s através da técnica de hemaglutinação em cartões ID-LISS/Coombs para determinar o perfil dos antígenos S/s. Destas, 17 amostras foram fenotipadas como S-s- e as restantes 148 foram fenotipadas como S-s+. Todas as amostras fenotipadas como S-s- não apresentaram reação de hemaglutinação com o soro policlonal anti-U de origem humana (n=17) e foram classificadas sorologicamente como S-s-U-.

PCR Alelo Específico para *GYPBS/s**

O DNA genômico de cada uma das 165 amostras foi analisado pelo ensaio AS-PCR para a determinação dos alelos *GYPB**S/s. O par de primers específico para o alelo *GYPB**S apresentou produto de amplificação em 4 das 17 amostras S-s- e em 11 das 148 amostras S-s+ (Tabela 2). Nenhum produto de amplificação foi obtido nas restantes 13 amostras S-s-, indicando que ambos *GYPB**S e *GYPB**s estavam deletados nessas amostras. As 137 amostras S-s+ restantes somente apresentaram produtos de amplificação para o alelo *GYPB**s.

Tabela 2: Resultados do PCR Alelo-Específico para os alelos *GYPBS/s.**

Fenótipos	nº de amostras	Produto amplificado (<i>GYPB</i>*S)	Produto sem amplificação (<i>GYPB</i>*S)
S-s-U-	17	4	13*
S-s+	148	11	137

*sem amplificação para os alelos *GYPB**S e *GYPB**s

Ensaio combinado AS/PCR-RFLP para a determinação de alterações no Exon 5 do gene *GYPB*

O DNA genômico de cada uma das 4 amostras S-s- e das 11 amostras S-s+ que apresentaram produtos de amplificação para o alelo *GYPB**S foi analisado por um ensaio combinado AS/PCR-RFLP para a determinação de alterações no exon 5 do gene *GYPB* e os resultados são mostrados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Esse ensaio combinado foi validado por **STORRY et al, 2003** para determinar a presença ou ausência do gene *GYPB* e, se *GYPB* está amplificado, determinar se a forma variante é *GP(P2)* ou *GP(NY)* (Figura 6).

Tabela 3: Resultados da análise molecular nas amostras de DNA que apresentaram fenótipo S-s- .

nº de amostras	Gene	Tipo de alteração de nucleotídeo
2	<i>GYP(P2)</i>	+5 intron 5 (g>t)
1	<i>GYP(NY)</i>	nt208 e nt230
1	<i>GYP(NY)/ GYP(P2)</i>	nt208 e nt230/ +5 intron 5 (g>t)
13	<i>Deleção GYPB</i>	-

Os produtos de digestão das quatro amostras S-s- apresentaram os seguintes perfis: duas amostras foram homozigotas (ou hemizigotas) para a alteração no nucleotídeo +5 (g>t) do intron 5, consistente com a variante *GYP(P2)*, uma amostra foi homozigota (ou hemizigota) para as alterações nos nucleotídeos 208 (G>T) e 230 (C>T), consistente com a variante *GYP(NY)*, e a última amostra apresentou uma forma variante heterozigota para ambos os alelos *GYP(NY)/GYP(P2)*.

Tabela 4: Resultados da análise molecular nas amostras de DNA que apresentaram fenótipo S–s+ .

nº de amostras	Gene	Tipo de alteração de nucleotídeo
8	<i>GYP(P2)</i>	+5 intron 5 (g>t)
3	<i>GYP(NY)</i>	nt208 e nt230
137	<i>GYPB*s</i>	–

Nas 11 amostras fenotipadas como S–s+, encontramos os seguintes perfis de eletroforese nos produtos da digestão enzimática: 8 amostras apresentaram alterações no nucleotídeo +5 (g>t) do intron 5, consistente com a variante *GYP(P2)* e 3 amostras apresentaram alterações nos nucleotídeos 208 e 230, consistente com a forma variante *GYP(NY)*. As amostras dos brasileiros descendentes de africanos fenotipados como S–s+ foram incluídas neste estudo para uma melhor caracterização molecular das variantes do gene *GYPB*. Entretanto, os resultados evidenciaram uma alta prevalência do alelo *GYPB*s* “silencioso” (7.4%) nesta população.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, as bases moleculares das formas variantes do gene *GYPB* em doadores voluntários de sangue brasileiros de descendência Africana foram determinadas pela primeira vez através das análises dos fenótipos S–s– e S–s+. A possibilidade de se detectar essas formas variantes em uma população de pacientes portadores de anemia falciforme ou em outras hemoglobinopatias e, em doadores de descendência africana, é de fundamental importância para assegurar uma melhor compatibilidade e segurança transfusional. Além disso, a utilização do ensaio combinado AS/PCR-RFLP para análise do exon 5 do gene *GYPB* é muito útil para identificar e classificar os doadores que apresentam genes *GYPB* variantes. Isso é relevante para os pacientes, cujo anticorpo somente é compatível com hemácias que apresentam deleção do gene *GYPB* e, também permite a identificação do alelo S silencioso para solucionar as discrepâncias entre os testes de hemaglutinação e os ensaios de DNA. Como já anteriormente demonstrado por **STORRY et al (2003)**, este estudo é de grande importância clínica e representa para os pacientes S–s–U– ou para aqueles que são S–s–U^{var}, que podem produzir anticorpos anti-U quando expostos a hemácias antígeno-positivo, a única possibilidade de se encontrar sangue compatível. Essa premissa é consistente com outros relatos da literatura que discutem a importância destes anticorpos nas reações transfusionais hemolíticas em pacientes portadores de anemia falciforme (**ROSSE et al, 1990**) e também em casos graves de doença hemolítica do feto e do recém-nascido (**DHANDSA et al, 1981; GOTTSCHALL et al, 1981; SMITH et al, 1998**). As transfusões para pacientes aloimunizados que necessitam de hemácias S–s–U– ainda representam um desafio para qualquer serviço transfusional devido à falta de reagentes sorológicos bem caracterizados e de boa qualidade. A utilização de PEG-IAT e Gel centrifugação e a utilização de um anticorpo anti-U/GPB com alta reatividade é o método de escolha para se detectar o fenótipo S–s–U^{var} (**REID et al, 1997**). Entretanto, mesmo com o emprego destas técnicas sensíveis e com a utilização de potentes anticorpos anti-U, ainda podem ocorrer falhas na detecção do antígeno U variante. É extremamente difícil conseguir

anticorpos anti-U de boa reatividade e com volume suficiente para permitir a fenotipagem dos pacientes e possíveis doadores.

Desta forma, o conhecimento atual das bases moleculares associadas com a expressão dos antígenos variantes, transforma os testes moleculares em importantes ferramentas para a fenotipagem dos antígenos S, s e U de pacientes e de potenciais doadores, possibilitando a identificação dos fenótipos S–s–U– e S–s–U+^{var}.

Em **1987**, **HUANG et al** reportaram dois indivíduos não-aparentados que possuíam o fenótipo S–s–U– com a não detecção da GPB e que a ausência dessa proteína correlacionou com a deleção do gene *GYPB*. A deleção de genes é um mecanismo comum para algumas doenças genéticas humanas, mais notavelmente as talassemias (**KAN et al, 1986**). Certos tipos de talassemias ocorrem em grupos de indivíduos geograficamente definidos, para os quais têm sido presumido que a ausência do gene α ou β globina pode representar uma vantagem seletiva. Este mecanismo seletivo, provavelmente possa ter ocorrido entre os Africanos que apresentam uma maior incidência do fenótipo S–s–U– (1 a 35%) quando comparado com a incidência de <0,001% na população caucasiana. Atualmente, vários estudos (**HUANG et al, 1997; HUANG et al, 1994; REID et al, 1996**) têm associado o fenótipo S–s– não somente com a ausência do antígeno de alta prevalência U, mas também com a fraca expressão de U (também conhecido como fenótipo U variante [U+^{var}]). O fenótipo S–s–U– é devido a uma deleção do gene *GYPB*, enquanto que o fenótipo S–s–U+^{var} está associado a uma proteína GPB variante que geralmente expressa o antígeno He (**STORRY et al, 2003**).

STORRY et al, relataram em **2003**, que 49% das amostras de doadores e pacientes S–s– foram identificadas como sendo S–s–U+^{var} pela hemaglutinação. A análise de sequenciamento demonstrou que 82,9% das amostras S–s–U+^{var} apresentaram a alteração de nucleotídeo +5 (g>t) do intron 5, no sítio doador de *splice*, e que resulta na omissão completa do exon 5, demonstrado

experimentalmente pela eliminação do sítio de ação da enzima *EcoRI* [variante conhecida como *GYPB(P2)* ou *GYPHe(P2)*]. Em 9,8% das amostras, foram identificadas alterações nos nucleotídeos 208 (G>T) e 230 (C>T) que favorecem o uso de um novo sítio acceptor de *splice*, o qual resulta em uma omissão parcial do exon 5 [variante conhecida como *GYPB(NY)* ou *GYPHe(NY)*]. Nas 7,3% das amostras remanescentes, foram identificadas uma heterozigotidade para ambos os alelos descritos anteriormente, ou seja, *GYP(P2)* e *GYP(NY)*.

Os resultados obtidos no presente estudo, avaliando uma população de Brasileiros descendentes de Africanos, foram discretamente diferentes do estudo anteriormente citado quando se compara a frequência dos mecanismos moleculares responsáveis pelas formas variantes do gene *GYPB*. Demonstramos que 23,5% dos Brasileiros descendentes de Africanos fenotipados como S-s- apresentam uma forma variante do *GYPB* e que a alteração do nucleotídeo +5 (g>t) do intron 5 [variante *GYPB(P2)* ou *GYPHe(P2)*] é o mecanismo mais freqüente que determina o fenótipo S-s-U^{var}, (50% das amostras analisadas). Alterações nos nucleotídeos 208 e 230 do exon 5 que determinam as variantes *GYPB(NY)* ou *GYPHe(NY)* foram encontradas em 25% das amostras e a associação das variantes *GYP(NY)* e *GYP(P2)* foram encontradas nas restantes 25% das amostras. As diferenças de frequência observadas entre os dois estudos podem ser explicadas pelo intenso processo de miscigenação que ocorreu no Brasil, com ênfase à região do Nordeste Brasileiro, desde o período de sua colonização, onde o grande fluxo gênico de indivíduos Africanos e Europeus gerou um antecedente étnico único na região. Dessa forma, as frequências fenotípicas e genotípicas dos diversos sistemas de grupos sanguíneos podem diferir entre populações como consequência da miscigenação entre os indivíduos de diferentes grupos raciais (**BEIGUELMAN, 2003**).

Neste estudo, não fomos capazes de definir a zigosidade da variante *GYPB* nos doadores com o fenótipo S-s-U^{var} devido a uma aparente incapacidade do ensaio AS/PCR-RFLP em detectar a deleção do gene *GYPB* quando as variantes *GYP(P2)* ou *GYP(NY)* estão presentes em aparente homozigose.

Dessa forma, diante do exposto acima, propomos a existência de 3 formas alélicas de *GYPB* na população brasileira estudada: *GYP(P2)* homocigoto ou hemizigoto, *GYP(NY)* homocigoto ou hemizigoto e a forma heterocigota *GYP(NY)/GYP(P2)*.

Um achado interessante foi que as amostras dos doadores fenotipadas como S–s– não reagiram com o soro anti-U policlonal humano. Esta ausência de reatividade de nossas amostras S–s–U+^{var} com o soro anti-U policlonal humano utilizado em nosso laboratório, levantou várias questões sobre a natureza do antígeno U presente nas hemácias normais e com as variantes fenotípicas. A base molecular do antígeno U não foi identificada até o presente momento. Entretanto, existem evidências que sugerem uma possível interação da GPB com a proteína RhAG (**HABIBI et al, 1978; DAHR et al, 1987**), que poderia acarretar alterações conformacionais da variante GPB na superfície das hemácias. Essa teoria é baseada na observação de que alguns soros com especificidade anti-U são compatíveis com todas as hemácias S–s–, incluindo os fenótipos S–s–U+^{var}.

A inclusão das amostras de sangue dos doadores descendentes de Africanos fenotipados como S–s+ neste estudo, com o objetivo inicial de complementar e confirmar os mecanismos moleculares responsáveis pelo fenótipo S–s–, evidenciou uma alta prevalência do raro gene *GYPB*S* “silencioso” nesta população (7,4% das amostras S-s+), mostrando formas heterocigotas das variantes *GYP(P2)* (73% das amostras) seguido por *GYP(NY)* (27% das amostras). A implicação dessa característica molecular na prática transfusional ainda é desconhecida e permanece como um desafio para futuros estudos de identificação de formas variantes. No entanto, fica claro a importância da análise das variantes atualmente conhecidas quando se utiliza métodos moleculares nos estudos de genotipagem. A relevância dos genes silenciosos nas diferentes populações é bem exemplificada nos estudos do sistema de grupos sanguíneos Duffy, onde o fenótipo Fy(a–b–) em Africanos resulta de um alelo silencioso associado com uma mutação (-33 T>C) no promotor GATA que silencia a transcrição do alelo *FY*B* nas hemácias, mas não em outros tecidos

(TOURNAMILLE et al, 1995; SANGER et al, 1955; MOULDS et al, 1998). Em caucasianos, o fenótipo Fy(a-b-) é resultado da presença dos alelos *FY*AO* e *FY*BO* gerados por quatro diferentes mecanismos moleculares associados com um *stop codon* (MALLINSON et al, 1995; RIOS et al, 2000). Outro exemplo relevante é o pseudogene *RHD* (*RHD Ψ*), predominante na população descendente de Africanos responsável por aproximadamente 25% dos casos dos fenótipos RhD-negativo (SINGLETON et al, 2000). Tendo como base estes achados é importante enfatizar que quando as decisões para a prática transfusional forem norteadas nas análises moleculares, ainda que em raras situações, o genótipo pode não se correlacionar com a expressão antigênica nas hemácias. Nesse caso, um paciente que possui um gene aparentemente normal que não é expresso, pode produzir um anticorpo após a transfusão de um sangue antígeno-positivo. Por isso, é apropriado utilizar ensaios que possam detectar as alterações nos genes que impedem a expressão dos antígenos nas hemácias, como por exemplo, a análise do exon 5 do gene *GYPB* para a genotipagem do alelo *GYPB*S*.

A genotipagem de grupos sanguíneos tem sido cada vez mais utilizada na prática transfusional para suprir as limitações da hemaglutinação. No entanto, fica cada vez mais evidente e, pudemos demonstrar claramente neste estudo, a importância da análise dos genes de grupos sanguíneos em diferentes populações para que possamos estabelecer protocolos seguros de genotipagem que garantam maior segurança transfusional levando a uma redução nas reações transfusionais hemolíticas, principalmente em pacientes que freqüentemente recebem transfusões.

6. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos do presente trabalho, podemos concluir que:

1. Neste estudo foi possível descrever pela primeira vez os mecanismos moleculares responsáveis pelo fenótipo S-s- na população Brasileira descendente de Africanos;
2. A forma variante *GYP(P2)* foi a mais comumente encontrada nas amostras S-s- e S-s+, seguida da forma variante *GYP(NY)*, que apresentaram o alelo *GYPB*S* associado com a não expressão do antígeno S;
3. O ensaio combinado AS/PCR-RFLP para analisar as alterações de nucleotídeos no exon 5 do gene *GYPB* utilizado neste estudo, mostrou limitações para detectar a zigosidade das formas variantes do gene *GYPB* nas amostras de doadores S-s-U+^{var}.
4. A alta prevalência (7,4%) do alelo *GYPB*S* “silencioso” nas amostras dos descendentes de Africanos fenotipados como S-s+ foi um achado surpreendente e importante neste estudo.
5. A genotipagem do gene *GYPB* deve ser recomendada para os pacientes portadores de anemia falciforme ou outras hemoglobinopatias fenotipados como S-s- para identificar a presença das formas variantes que enfraquecem a expressão do antígeno U.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSTEE DJ.** The nature and abundance of human red cell surface glycoproteins. *J. Immunogenet* 1990;17:219-225.
- BEIGUELMAN, B.** O Sistema Rh. In: Beiguelman, B. Os sistemas sanguíneos eritrocitários, 3 ed, Ribeirão Preto: Funpec Editora, 2003.p. 107-49.
- BLANCHARD D.** Human red cell glycophorins: biochemical and antigenic properties. *Transf Med Rev* 1990;4:170-186.
- CARTRON JP, PROU O, LUILIER M, SOULIER JP.** Susceptibility to invasion by *Plasmodium falciparum* of some human erythrocytes carrying rare blood group antigens. *Br J Haematol* 1983;55:639-647.
- DAHR W, MOULDS JJ.** High-frequency antigens of human erythrocyte membrane sialoglycoproteins, IV. Molecular properties of the U antigen. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1987; 368:659-667.
- DANIELS GL, FLETCHER A, GARRATY G, ET AL.** Blood group terminology 2004. *Vox Sang* 2004; 87:316.
- DHANDSA N, WILLIAMS M, JOSS V, PATTEN J, JAMES D, SINCLAIR L.** Haemolytic disease of the newborn caused by anti-U. *Lancet* 1981; 2:1232.
- GOTTSCHALL, JL.** Hemolytic disease of the newborn with anti-U. *Transfusion* 1981; 21:230-232.

HABIBI B, FOUILLADE MT, DUEDARI N, ET AL. The antigen Duclos. A new high frequency red cell antigen to Rh and U. *Vox Sang* 1978; 34:302-309.

HUANG CH, BLUMENFELD OO, REID ME, CHEN Y, DANIELS GL, SMART E. Alternative splicing of a novel glycoporphin allele GPHe(GL) generates two protein isoforms in the human erythrocyte membrane. *Blood* 1997; 90:391-397.

HUANG CH, BLUMENFELD OO. MNSs blood groups and major glycoporphins: molecular basis for allelic variation. In: Cartron JP, Rouger P, eds. *Molecular basis of major human blood group antigens*. New York: Plenum Press, 1995:153-183.

HUANG CH, JOHE K, MOULDS JJ, SIEBERT PD, FUKUDA M, BLUMENFELD OO. δ Glycoporphin (Glycoporphin B) gene deletion in two individuals homozygous for the S-s-U- blood group phenotype. *Blood* 1987; 70:1830-1835.

HUANG CH, REID ME, BLUMENFELD OO. Remodeling of the transmembrane segment in human glycoporphin by aberrant RNA splicing. *J Biol Chem* 1994; 269:10804-10812.

ISSITT PD. Heterogeneity of anti-U. *Vox Sang* 1990; 58-70-71.

KAN YW: The William Allan Memorial Award Address: Thalassemia: Molecular Mechanism and Detection. *Am J Hum Genet* 1986; 38:4.

KUDO S, FUKUDA M. Identification of a novel human glycoprotein, glycoprotein E, by isolation of genomic clones and complementary DNA clones utilizing polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 1990;265:1102-1110.

KUDO S, FUKUDA M. Structural organization of glycoprotein A and B genes: glycoprotein B gene evolved by homologous recombination at Alu repeat sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:4619-4623.

LANDSTEINER K, LEVINE P. Further observations on individual differences of human blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1927; 24:941.

LOWE RF, MOORES P: S-s-U- red cell factor in Africans of Rhodesia, Malawi, Mozambique and Natal. *Hum Hered* 1972; 22:344.

LUBLIN DM. Functional roles of blood group antigens. In: molecular and functional aspects of blood group antigens. Silberstein LE (ed). Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1995;163-192.

MALLINSON G, SOO KS, SCHALL TJ, PISACKA M, ANSTEE DJ. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fy^a/Fy^b antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the $Fy(a-b)$ phenotype. *Br J Haematol* 1995;90:823-839.

MOULDS JM, HAYES S, WELLS TD. DNA analysis of Duffy genes in American blacks. *Vox Sang* 1998;74:248-52.

ORLANDI PA, KLOTZ FW, HAYNES JD. A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2- 3)Gal-sequences of glycophorin A. J Cell Biol 1992;116:901-909.

PASVOL G, CHASIS JA, MOHANDAS N, et al. Inhibition of malarial parasite invasion by monoclonal antibodies against glycophorin A correlates with reduction in red cell membrane deformability. Blood 1989;74:1836-1843.

RAHUEL C, ELOUET J-F, CARTRON J-F. Post-transcriptional regulation of the cell surface expression of glycophorins A, B and E. J Biol Chem 1994; 269:32752-32758.

REARDEN A, MAGNET A, KUDO S, FUKUDA M. Glycophorin B and glycophorin E genes arose from glycophorin A ancestral gene via two duplications during primate evolution. J Biol Chem 1993; 268:2260-2267.

REID ME, STORRY JR, MAURER J, NANCE ST. Practical method for determination of the U status of S-s- erythrocytes. Immunohematology 1997; 13:111-114.

REID ME, STORRY JR, RALPH H, ET AL. Expression and quantitative variation of the low incidence blood group antigen He on some S-s-RBCs. Transfusion 1996; 36:719-724.

RIOS M, CHAUDHURI A, MALLINSON G, ET AL. New genotypes in Fy(a-b) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either *FYA* or *FYB*. Br J Haematol 2000;108:448-454.

ROLIH, S. Biochemistry of MN Antigens. In Unger, PJ and Laird-Fryer, B (eds): Blood Group Systems: MN and Gerbich. American Association of Blood Banks, Arlington, VA, 1989.

ROSSE WF, GALLAGHER D, KINNEY TR, ET AL. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The cooperative study of sickle cell disease. Blood 1990; 76:1431-1437.

SANGER R, RACE RR, JACK J. The Duffy blood groups of New York negroes: the phenotype Fy(a-b-). Br J Haematol 1955;1:370-374.

SINGLETON BK, GREEN CA, AVENT ND, ET AL. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. Blood 2000;95:12-18.

SMITH G, KNOTT P, RISSIK J, WIN N. Anti-U and haemolytic disease of the fetus and newborn. BJOG 1998; 105:1318-1321.

STORRY JR, REID ME, FETICS S, HUANG CH. Mutations in GYPB exon 5 drive the S-s-U+^{var} phenotype in persons of African descent: implications for transfusion. Transfusion 2003; 43:1738-1747.

STORRY JR, REID ME, MACLENNAN S, LUBENKO A, NORTMAN P. The low incidence MNS antigens M^v, s^D and Mit arise from single amino acid substitutions on GPB. Transfusion 2001; 41:269-275.

STORRY JR, REID ME. Characterization of antibodies produced by S-s- individuals. Transfusion 1996; 36:512-516.

TATE CG, TANNER MJ, JUDSON PA, ANSTEE DJ. Studies on human red cell membrane glycoprotein A and glycoprotein B genes in glycoprotein-deficient individuals. *Biochem J* 1989; 263:993-996.

TOURNAMILLE C, COLIN Y, CARTRON JP, LE VAN KIM C. Disruption of a GATA motif in the *Duffy* gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 1995;10:224-228.

VIGNAL A, LONDON J, RAHUEL C, CARTRON J-P. Promoter sequence and chromosomal organization of the genes encoding glycoprotein A, B and E. *Gene* 1990; 95:289-293.

VIGNAL A, RAHUEL C, LONDON J, ET AL. A novel gene member of the human glycoprotein A and B family. Molecular cloning and expression. *Eur J Biochem* 1990; 191:619-625.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Antígenos do Sistema de Grupos Sanguíneos MNS

Antígeno	Nome Histórico	Número ISBT
M		MNS1
N		MNS2
S		MNS3
s		MNS4
U		MNS5
He	Henshaw	MNS6
Mi ^a	Miltenberger	MNS7
M ^c		MNS8
Vw	Gr, Verweyst	MNS9
Mur	Murrell	MNS10
M ^e	Gilfeather	MNS11
Vr	Verdegaal	MNS12
M ^e		MNS13
Mt ^a	Martin	MNS14
St ^a	Stones	MNS15
Ri ^a	Ridley	MNS16
Cl ^a	Caldwell	MNS17
Ny ^a	Nyberg	MNS18
Hut	Hutchinson	MNS19
Hil	Hill	MNS20
M ^v	Armstrong	MNS21
Far	Kam	MNS22
s ^D	Dreyer	MNS23
Mit	Mitchell	MNS24
Dantu		MNS25
Hop	Hopper	MNS26
Nob	Noble	MNS27
En ^a		MNS28
ENKT	En ^a KT	MNS29
‘N’		MNS30
Or	Orriss	MNS31
DANE		MNS32
TSEN		MNS33
MINY		MNS34
MUT		MNS35
SAT		MNS36
ERIK		MNS37
Os ^a		MNS38
ENEP		MNS39
ENEH		MNS40
HAG		MNS41
ENAV	AVIS	MNS42
MARS		MNS43
ENDA	Alta - GPA-B-A	MNS44
ENEV	Alta - V62G	MNS45
MNTD	Baixa - T17R	MNS46

ANEXO 2: Resumo apresentado no Congresso da Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB), Anaheim, Califórnia, EUA, em 2.007.

SP356

Molecular Characterization of GYPB in Brazilian Blood Donors of African Descent with the Rare S-s-U- Phenotype

R Omoto¹ (ricardo.omoto@uol.com.br), M Reid², D C Credidio³, K R Ribeiro³, L Castilho³.
¹Hospital São Rafael, Salvador, Brazil; ²New York Blood Center, New York, NY; ³Hemocentro de Campinas, Unicamp, Campinas, Brazil.

Background: Transfusion of alloimmunized patients requesting U- RBC units is still a challenge for any transfusion service due to the lack of well-characterized serologic screening reagents. Knowledge of the molecular bases associated with expression of variant antigens makes DNA testing an important new tool for both screening donors and typing patients. Thus, it is now feasible to genotype donors to identify U- phenotypes. We employed DNA based assays to identify or confirm U+var and U- phenotypes, and to characterize the molecular mechanisms responsible for the S-s phenotype in a population of African Brazilians. **Methods:** We selected 16 samples from Brazilian blood donors of African descent who phenotyped as S-s-U- by hemagglutination using commercially available polyclonal antibodies (anti-S and anti-s) and single source plasma or serum samples from donors or patients (anti-U). Genomic DNA from the 16 S-s-U- samples were amplified with the GPB4/5, GPBIVS5 and GPB5T primers, using a combination AS/PCR-RFLP assay (Storry et al, Transfusion 2003) to determine whether *GYPB* is present or absent and to distinguish the variant *GYPB* genes in nondeletion type S-s- donors. The PCR products were digested with *EcoRI* during an overnight incubation at 37°C. The uncut and digested products were analyzed on a 10% polyacrylamide gel. **Results:** In 13 of the 16 samples, a complete *GYPB* deletion was observed, which is consistent with the S-s-U- phenotypes. Three samples showed a product amplification revealing molecular changes in and around exon 5 compatible with U+var. The digested products from these 3 samples showed interesting patterns: 1 of them was homozygous for a point mutation at +5 (g>t) of intron 5, consistent with variant *GYPB(P2)*; 1 was homozygous for mutations at nt208 (G>T) and nt230, consistent with variant *GYPB(NY)*, and the other sample was heterozygous for both alleles *GYP(NY)/GYP(P2)*. **Conclusions:** This molecular analysis revealed that 3 of 16 (18.7%) donors had a variant *GYPB* and report for the first time the molecular mechanisms responsible for the S-s- phenotype in a population of African Brazilians. This study highlights the value of using PCR based analyses to discriminate S-s-U- donors from U+var donors who may be misidentified as U- when searching for U- units for *GYPB*-deleted patients with anti-U.

Disclosure of Conflict of Interest

Ricardo Omoto, Marion Reid, Debora C Credidio, Karina R Ribeiro, Lilian Castilho: Nothing to Disclose

ANEXO 3: Trabalho intitulado “Molecular Analyses of *GYPB* in African Brazilians”, enviado para a revista *immunohematology – Journal of Blood Group Serology and Education*.

IMMUNOHEMATOLOGY
Journal of Blood Group Serology and Education

July 15, 2008

Dear Mr. Omoto

Your manuscript entitled:

Molecular analyses of *GYPB* in African Brazilians

has been received and will be reviewed by members of the editorial staff and by peer reviewers.

After these reviews, you will be notified of our decision concerning your manuscript. This may take up to twelve weeks. Please sign and return the enclosed copyright form.

Thank you for your support.

Sincerely,

Cindy Flickinger
Managing Editor, *Immunohematology*
700 Spring Garden Street
Philadelphia, PA 19123
Phone: 215-451-4909
Fax: 215-451-2538

Molecular analyses of *GYPB* in African Brazilians

R. OMOTO¹, M. E. REID², L. CASTILHO³

¹Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brazil; ²New York Blood Center, NY, USA;

³Hemocentro, Unicamp, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: Ricardo Omoto

Hospital São Rafael

Avenida Sao Rafael, 2152

CEP: 41.253-900

Telephone: +55-71-2109-2912

Fax: +55-71-2109-2909

e-mail: ricardo.omoto@uol.com.br

Running Title: [*GYPB* variants in African Brazilians]

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant n^o 06/ 02573-4 (LC)

Key Words: African Brazilians, S–s–phenotype, *GYPB(P2)*, *GYPB(NY)*, MNS blood group system, *GYPB*S* silent gene, blood group genotyping.

ABSTRACT:

Background: The molecular background of variant forms of *GYPB* is not well studied in Brazilians of African descent. The present study was carried out to determine the molecular bases of the S–s– phenotype and the frequency of *GYPB**S silent gene for the S–s+ phenotype in a blood donor population of African Brazilians. **Methods:** We selected 165 blood samples from African Brazilians (Northeastern Brazil) who phenotyped as S–s– (17) and S–s+ (148) by hemagglutination. AS-PCR and PCR-RFLP were used to identify the variant forms of *GYPB*. **Results:** In 13 of 17 S–s– samples (76.5%) both *GYPB* were deleted. In 137 of the 148 S–s+ samples (92.6%), the AS-PCR was consistent with the S–s+, phenotype. In 4 of the S–s– samples (23.5%) and 11 of the S–s+ samples (7.4%) showed the presence of a *GYPB**S allele associated with silencing of the S antigen. In the 4 donors with the S–s– phenotype there was homozygosity (or hemizygosity) for the *GYP(P2)* allele (n=2), homozygosity (or hemizygosity) for the *GYP(NY)* allele (n=1), and heterozygosity for the *GYP(P2)* and *GYP(NY)* alleles (n=1). In the 11 donors with the S–s+ phenotype there was heterozygosity for *GYP(P2)* allele (n=8) and heterozygosity for *GYP(NY)* allele (n=3). **Conclusion:** This study reports for the first time the molecular mechanisms responsible for the S–s– phenotype in a population of African Brazilians and provides a new information about the frequency and molecular bases of *GYPB**S silent gene (7.4%) in this population.

INTRODUCTION

The MNS blood group system is a highly complex system that consists of more than 40 distinct antigens¹. These antigens are carried on glycoprotein A (GPA), glycoprotein B (GPB) or hybrid proteins that arise from unequal crossover, nucleotide substitution, or gene conversion events between the glycoprotein genes².

The genes encoding GPA (*GYPA*) and GPB (*GYPB*) are located on chromosome 4 together with a third gene of this glycoprotein family, *GYPE*. In addition to sequence homology and proximity between the glycoprotein genes, recombination hot spots have been identified and demonstrated to generate many different hybrid *GYP* gene products at the RBC surface, as a result of reciprocal and nonreciprocal exchange of nucleic acids³. These hybrid molecules often carry one or more novel antigens of the MNS blood group system. Furthermore, the expression of more common MNS system antigens, such as, S or s, may be affected if the encoding sequence is close to the crossover site, manifested by unexpected results with some antisera⁴. In addition, Storry et al⁵, studying the molecular bases of the weakened expression of S and/or s associated with the low-incidence antigens M^y, s^D and Mit, showed that Arg35 is important for full expression of S and Pro39 and Thr3 were also important for full expression of s.

The absence of GPB on the RBCs as a result of a *GYPB* gene deletion is characterized by the S–s– phenotype⁶, which is found in persons of African descent. RBCs of approximately 1% of African Americans, and up to 37% of

West Africans, type as S–s–. The S–s– phenotype is associated either with the absence of the high-prevalence antigen, U, or with weakened expression of U (U^{+var}). The U antigen is commonly found in all populations. The S–s–U– phenotype is found among Black ethnic groups and appears to correlate with the geographic prevalence of malaria infection due to the deletion of *GYPB*, whereas the S-s-U^{+var} phenotype has been associated with two variant GPB proteins⁷⁻⁹.

Storry et al⁴ reported in 2003 a large cohort study of S–s– donors to determine the molecular alterations of the S–s– phenotype and their distribution in the African American population. In this study, it was confirmed that DNA from donors whose RBCs failed to react with a potent anti-U/GPB was not amplified by allele-specific or gene-specific primers designed to detect *GYPB*. In contrast, donors whose RBCs that were reactive with anti-U/GPB demonstrated the presence of variant forms of *GYP.He* (in the majority of samples) or of *GYPB* by allele-specific assays. All samples demonstrated the presence of the silenced *GYPB*S* allele. The absence of S antigen at the RBC surface was demonstrated to be due to a change at nucleotide 208 (G>T) and 230 (C>T) of exon 5 [named variant *GYPB(NY)*, or *GYPHe(NY)*], or a g>t change at +5 of intron 5 [named variant *GYPB(P2)*, or *GYPHe(P2)*], which lead to partial or complete exon skipping. Sequencing and PCR-RFLP analyses showed that the *GYP(P2)* allele was the most common mechanism in donors and patients with the S–s–U^{+var} phenotype. The N-terminus of glycoporphins carrying either GP(P2) or GP(NY) can express ‘N’ or He antigens.⁴

In this study, we employed DNA-based assays to identify variant forms of *GYPB* in Brazilian blood donors of African descent with the S–s– and S–s+ phenotypes. We have identified that *GYP(P2)* and *GYP(NY)* alleles are the mechanisms for the S–s–U+^{var} and have also explained the presence of the *GYPB*S* allele with silencing of S in S–s+ phenotypes in this donor population.

MATERIAL AND METHODS

Blood Samples

EDTA blood samples were obtained from healthy volunteer blood donors, who self-identified their ethnicity as African Brazilians, at the Sao Rafael Hospital Blood Bank. Institutional Review Board-approved informed consent was obtained from each blood donor.

Serologic analysis

The S/s/U antigen status of donor's RBCs was determined by IAT-hemagglutination in gel cards (DiaMed AG, Morat, Switzerland) using commercially available polyclonal anti-S and anti-s (Immucor, Norcross, GA) and single-source plasma or serum samples from donors or patients (human polyclonal anti-U). After the determination of the antigen profile, aliquots of 200 μ l of 17 S-s-U- and 148 S-s+ samples were subjected to DNA analysis.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was isolated by a whole blood DNA extraction kit (Easy DNA, Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The DNA solutions were analyzed for quality by agarose gel electrophoresis. Quantification tests were not performed after extraction by this procedure; however the expected yield was 3 to 12 μ g of DNA.

Allele-specific PCR

Allele-specific PCR (AS-PCR) for the *S/s* alleles were performed in all 17 *S-s-U-* and 148 *S-s+* samples to characterize the alleles present. The sequences of primer combinations and control primers that amplified an unrelated gene (human growth hormone gene) were previously published⁴. AS-PCR was carried out under the following conditions: 1 x PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0,2 mmol/L dNTP mix, 100 ng of sense and antisense primers, 100 ng of control primers, 2.5 U *Taq* DNA polymerase. Two microliters of genomic DNA was used per 50µl assay. Amplification was performed using a standard 35-cycle protocol, with an annealing temperature of 62°C.

***GYPB* Exon 5 combination AS/PCR-RFLP assay**

Genomic DNA samples from the 4 non-deletion type *S-s-U-* samples and 11 *S-s+* samples were amplified with the GPB4/5, GPBIVS5 and GPB5T primers, using a combination AS/PCR-RFLP assay⁴ to determine whether *GYPB* is present or absent and to distinguish the variant *GYPB* genes products in non-deletion type *S-s-* and *S-s+* (*GYPB***S* silent gene) donors. The PCR products were digested with *EcoRI* during an overnight incubation at 37°C. The uncut and digested products were analyzed on a 10% polyacrylamide gel.

RESULTS

Serologic analysis

RBCs from 165 blood samples were initially tested with polyclonal anti-S and anti-s by IAT-hemagglutination in gel test cards to determine the S/s antigen profile. Of these, 17 samples were phenotyped as S-s- and 148 were S-s+. None of the S-s- samples reacted with our human polyclonal anti-U (n=17) and were serologically classified as S-s-U-.

Allele-specific PCR

Genomic DNA from the 165 samples was analyzed by AS-PCR assay for *GYPB**S/s. The *GYPB**S-specific primer pair amplified products in four of the 17 S-s- and 11 of the 148 S-s+ samples (Table 1). No amplification was obtained in the other 13 S-s- samples, indicating that *GYPB* was deleted in these samples. The remaining 137 S-s+ samples only gave amplified products with the *GYPB**s-specific primer, suggesting homozygosity or hemizyosity for *GYPB* (Figure 1).

***GYPB* Exon 5 combination AS/PCR-RFLP assay**

Genomic DNA from the 4 S-s- and 11 S-s+ samples that gave amplified products for *GYPB**S-specific primer were analyzed by the *GYPB* exon 5 combination AS/PCR-RFLP assay and the results are summarized in Table 2 and 3, respectively. This combination assay was validated by Storry et al⁴ to

determine whether *GYPB* is present or absent and if *GYPB* is amplified, whether it is the GP(P2) or the GP(NY) form (Figure 2).

The digested products from the four S-s- samples showed the following patterns: two were homozygous (or hemizygous) for the nucleotide change at +5 (g>t) of intron 5, consistent with variant *GYP(P2)*, one was homozygous (or hemizygous) for nucleotide changes at nt208 (G>T) and nt230, consistent with variant *GYP(NY)*, and one was a heterozygous variant form for both *GYP(NY)/GYP(P2)* alleles.

In the 11 samples that phenotyped as S-s+, we found the following electrophoresis profile in the digested products: 8 had a nucleotide change at +5 (g>t) of intron 5, consistent with variant *GYP(P2)* and 3 presented with changes at nt208 and nt230, consistent with variant *GYP(NY)*. The African Brazilians samples phenotyped as S-s+ were included in this study to extend the molecular characterization of variant *GYPB*. They provided evidence of a high prevalence (7.4%) of *GYPB*s* silent gene in this population. In samples that were apparently homozygous for the *GYPB*s* allele, it is not possible to determine if the partner chromosome has a deleted *GYPB* gene.

DISCUSSION

In the present study, the molecular background of variant forms of *GYPB* in Brazilian blood donors of African descent was determined for the first time through analyses of S–s– and S–s+ phenotypes. This is particularly important due to the ability to detect these variant forms within a population of sickle cell disease (SCD) patients or other hemoglobinopathies and black donors, to ensure the best match and transfusion safety. Moreover, the *GYPB* exon 5 combination assay is useful to readily identify *GYPB*-deleted donors for those patients whose antibody is compatible only with *GYPB*-deleted RBCs and also permits the identification of silent S allele to resolve the discrepancies between hemagglutination and DNA-based assays. Clinical issues must be addressed for S–s–U– patients or for those who are S–s–U^{+var}, as shown by Storry et al⁴, they can produce anti-U, when exposed to antigen-positive RBCs. This premise is consistent with other reports of clinically significant transfusion reactions in SCD patients¹⁰ and several cases of hemolytic disease of the fetus and newborn¹¹⁻¹³ caused by anti-U. Transfusion of alloimmunized patients requiring S–s–U– RBC components is a challenge for any transfusion service due to the lack of well-characterized serologic screening reagents. PEG-IAT and MTS-gel with broadly reactive anti-U/GPB are the methods of choice to detect S–s–U^{+var}¹⁴. However, with current knowledge of the molecular bases associated with expression of variant antigens makes DNA testing an important tool for both screening donors and typing patients. Therefore, it is now feasible to genotype donors to identify S–s–U– phenotypes.

In 1987, Huang et al⁶ reported two unrelated individuals who exhibited the S–s–U– phenotype lacking GPB and that the absence of this protein correlated with deletion of the *GYPB* gene. Gene deletion is a common mechanism for some human genetic disorders, most notably thalassemias¹⁵. Certain thalassemias occur in geographically defined groups of individuals, for which it has been presumed that the absence of α or β globin gene may have represented a selective advantage. It is therefore of interest that the S–s–U– phenotype is prevalent among selected populations, in particular among Blacks from certain regions in Africa where the incidence of this phenotype ranges between 1% to 35%¹⁶ as compared with an incidence of <0.001% in the white population. However, several studies⁷⁻⁹ have associated the S–s– phenotype with not only the absence of the high-prevalence antigen, U, but also with weakened expression of U (the so-called U variant [U^{var}] phenotype). The S–s–U– phenotype is due to the deletion of *GYPB*, whereas the S–s– U^{var} phenotype is associated with a variant GPB protein that often expresses He antigen⁴.

Our findings were slightly different from previously reported data when comparing the molecular events implicated in the nature of *GYPB* variant forms found in our African Brazilian population. We report that 23.5% of African Brazilians phenotyped as S-s- presented a variant *GYPB* and that the +5 nucleotide change in intron 5 was the most common (50% of samples) mechanism for generating the S–s– U^{var} phenotype, followed by a change at nucleotide 208 and 230 (25% of samples with a variant *GYPB*) of exon 5 and a heterozygous change at nt208 and nt230 of exon5 and +5 of intron 5 (25% of samples with a variant *GYPB*). However, in this study, we have not been able to

define the zygosity status of the variant *GYPB* in the donors with S-s-U+^{var} phenotype due to the apparent inability of AS/RFLP-PCR assay to detect the deleted *GYPB* gene when *GYP(P2)* or *GYP(NY)* are present as apparent homozygotes.

All samples from S-s- donors failed to react with human polyclonal anti-U. The absence of reactivity of our S-s-U+^{var} samples with human polyclonal anti-U used in our laboratory raised questions about the nature of the U antigen on RBCs of normal and variant phenotypes. The molecular basis of the U antigen has not been identified so far; however, there is evidence to suggest a possible interaction of GPB with Rh-associated glycoprotein, RhAG^{17,18}, which could lead to conformational changes of variant GPB on the RBC surface. This is supported by the observation that some anti-U are compatible with all S-s- RBCs, even S-s-U+^{var}. Apparently rare in an electronic literature search, the inclusion of African Brazilian blood samples phenotyped as S-s+ in this study, to complement and confirm the molecular mechanisms responsible for the S-s- phenotype, provided the knowledge of a high-prevalence of *GYPB*S* silent gene in this population (7.4% of S-s+ samples), not described in the literature, showing heterozygous variant forms of *GYP(P2)* (73% of samples) followed by *GYP(NY)* (27% of samples). The implication of this molecular characteristic on blood transfusion practice is unknown and remains a challenge for future identification studies of variant forms, however, it is important that molecular methods incorporate the analysis of known *GYPB* variants especially in a specific population.

ACKNOWLEDGMENTS:

We thank Karina Ribeiro (Hemocentro de Campinas, Unicamp), Debora Castilho Credidio (Hemocentro de Campinas, Unicamp) and Fernando Luiz Vieira de Araujo (Hospital Sao Rafael, Salvador) for their contribution to this work.

REFERENCES:

1. Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, ET AL. Blood group terminology 2004. Vox Sang 2004; 87:316.
2. Reid ME, Lomas-Francis C. Blood group antigen facts book. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2004.
3. Blumenfeld OO, Huang C-H. Molecular genetics of the glycophorin gene family. The antigens for MNSs blood groups; multiple gene rearrangements and modulation of splice site usage result in extensive diversification. Hum Mutation 1995; 6:199-209.
4. Storry JR, Reid ME, Fetics S, Huang C-H. Mutations in *GYPB* exon 5 drive the S-s-U^{+var} phenotype in persons of African descent: implications for transfusion. Transfusion 2003; 43:1738-1747.
5. Storry JR, Reid ME, MacLennan S, Lubenko A, Nortman P. The low-incidence MNS antigens M^y, s^D, and Mit arise from single amino acid substitutions on GPB. Transfusion 2001; 41:269-275.
6. Huang C-H, Johe K, Moulds JJ, Siebert PD, Fukuda M, Blumenfeld OO. δ Glycophorin (Glycophorin B) gene deletion in two individuals homozygous for the S-s-U- blood group phenotype. Blood 1987; 70:1830-1835.
7. Huang C-H, Reid ME, Blumenfeld OO. Remodeling of the transmembrane segment in human glycophorin by aberrant RNA splicing. J. Biol. Chem 1994; 269:10804-12
8. Huang C-H, Blumenfeld OO, Reid ME, et al. Alternative splicing of a novel glycophorin allele GPHe(GL) generates two protein isoforms in the human erythrocyte membrane. Blood 1997; 90:391-7.

9. Reid ME, Storry JR, Ralph H, et al. Expression and quantitative variation of the low incidence blood group antigen He on some S-s- RBCs. *Transfusion* 1996; 36:719-24.
10. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The cooperative study of sickle cell disease. *Blood* 1990; 76:1431-7.
11. Dhandra N, Williams M, Joss V, Patten J, James D, Sinclair L. Haemolytic disease of the newborn caused by anti-U. *Lancet* 1981; 2:1232.
12. Gottschall JL. Hemolytic disease of the newborn with anti-U. *Transfusion* 1981; 21:230-2.
13. Smith G, Knott P, Rissik J, Win N. Anti-U and haemolytic disease of the fetus and newborn. *BJOG* 1998; 105:1318-21.
14. Reid ME, Storry JR, Maurer J, Nance ST. Practical method for determination of the U status of S-s- erythrocytes. *Immunohematology* 1997; 13:111-14.
15. Kan YW: The William Allan Memorial Award Address: Thalassemia: Molecular Mechanism and Detection. *Am J Hum Genet* 1986; 38:4.
16. Lowe RF, Moores P: S-s-U- red cell factor in Africans of Rhodesia, Malawi, Mozambique and Natal. *Hum Hered* 1972; 22:344.
17. Habibi B, Fouillade MT, Duedari N, et al. The antigen Duclos. A new high frequency red cell antigen to Rh and U. *Vox Sang* 1978; 34:302-9.

18. Dahr W, Moulds JJ. High-frequency antigens of human erythrocyte membrane sialoglycoproteins, IV. Molecular properties of the U antigen. Biol Chem Hoppe-Seyler 1987; 368:659-67.

Tables

TABLE 1. Results of AS-PCR for *GYPB S/s*

Serologic results	n	<i>GYPB</i> *S amplified product	No <i>GYPB</i> *S amplified product
S-s-U-	17	4	13*
S-s+	148	11	137

* No *GYPB**S or *GYPB**s amplified products

Table 2. Results of testing 17 S-s- DNA samples by AS/PCR-RFLP assay

n	Variant Gene	Type of Nucleotide Change
2	<i>GYP(P2)</i>	+5 intron 5(g>t)
1	<i>GYP(NY)</i>	nt208 and nt230
1	<i>GYP(NY)/GYP(P2)</i>	nt208 and nt230/+5 intron 5 (g>t)
13	<i>GYPB</i> deletion	-

Table 3. Results of testing 148 S-s+ DNA samples by AS/PCR-RFLP assay

n	Variant Gene	Type of Nucleotide Change
8	<i>GYP(P2)</i>	+5 intron 5(g>t)
3	<i>GYP(NY)</i>	nt208 and nt230
137	<i>GYPB*s</i>	-

Figures

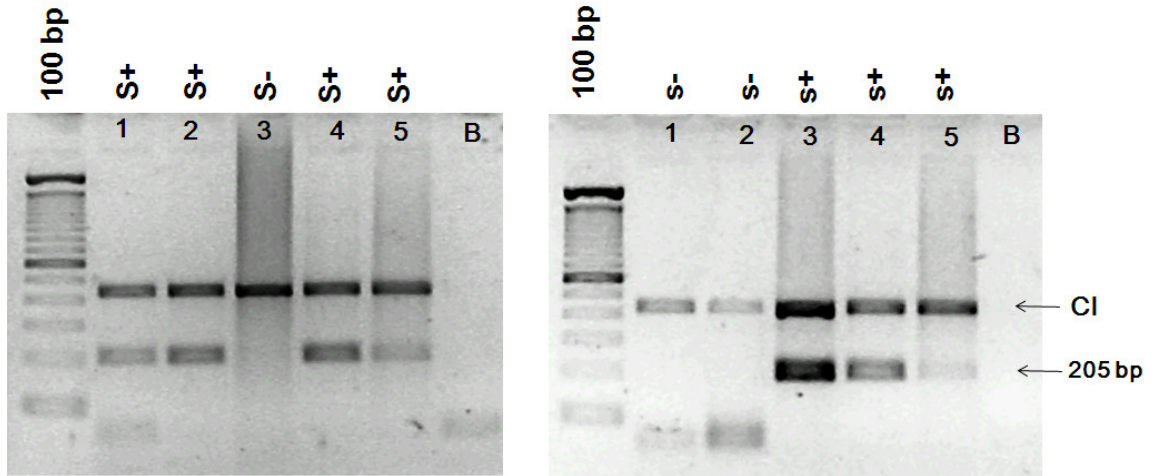


Figure 1. AS-PCR for *GYPBS/s. Electrophoresis profile in agarose gel.**

B = water blank control

CI = internal control

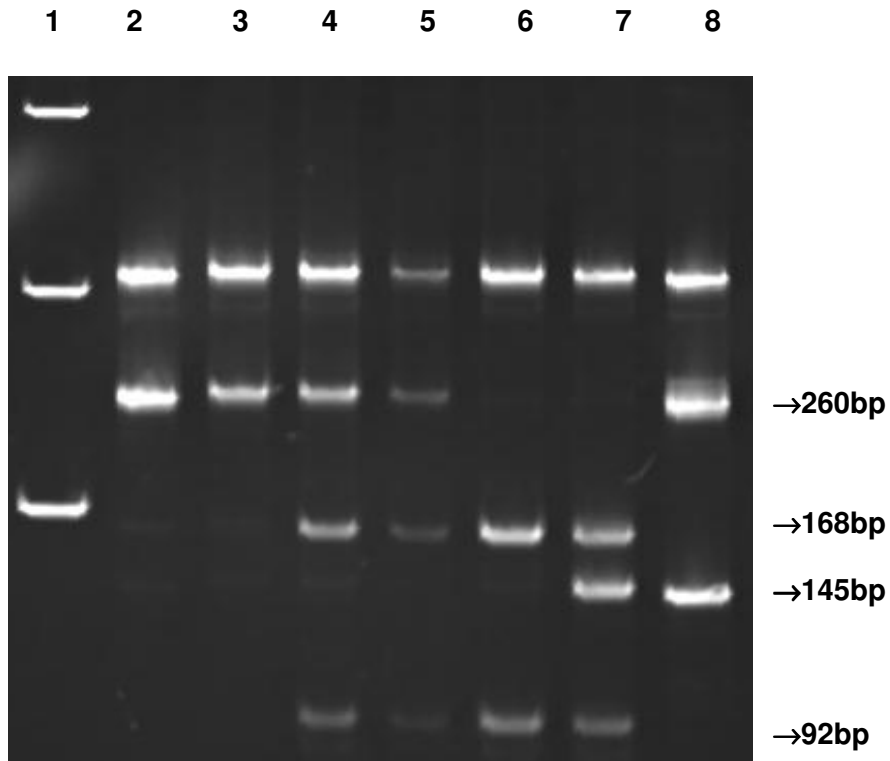


Figure 2. Analysis of *GYPB* exon 5 combination AS/RFLP-PCR assay after digestion with *EcoRI*. A 10% polyacrylamide gel electrophoresis demonstrating the band patterns for interpretation of variant forms of *GYPB* in African Brazilian phenotyped as S–s– or S–s+. Lane 1 is the 100bp ladder; Lane 2 is the uncut PCR product; Lane 3 is digestion pattern of a M/M (no *EcoR* I site present), a GYP(P2); Lanes 4, 5 digestion pattern of a M/W; Lane 6 is the digestion pattern of a W/W; GYPB; Lane 7 is the digestion pattern with the allele-specific band; GYP(NY); Lane 8 is the uncut PCR product of the GYP(NY) showing the allele-specific band.

ANEXO 4: Resultados da Fenotipagem para os antígenos S e s e da Genotipagem *GYPB* em amostra de sangue e DNA de 146 doadores voluntários de sangue.

SEQ	AMOSTRA	FENOTIPAGEM		FENÓTIPO DEDUZIDO S/s	GENE VARIANTE	PF
		S	s			
1	b3008050 22413-06	0	+	S+s+	<i>GYP(P2)</i>	103945
2	b3008050 22426-40	0	+	S-s+	-	125609
3	b3008050 22427-41	0	+	S+s+	<i>GYP(P2)</i>	116501
4	b3008050 22436-07	0	+	S+s+	<i>GYP(P2)</i>	125612
5	b3008050 22438-07	0	+	S+s+	<i>GYP(P2)</i>	125613
6	b3008050 22439-42	0	+	S-s+	-	125614
7	b3008050 22440-06	0	+	S-s+	-	125615
8	b3008050 22411-40	0	+	S-s+	-	125624
9	b3008050 22428-40	0	+	S-s+	-	125640
10	b3008050 22446-40	0	+	S-s+	-	125634
11	b3008050 22451-07	0	+	S-s+	-	125637
12	b3008050 22453-43	0	+	S-s+	-	125639
13	b3008050 22454-41	0	+	S-s+	-	125636
14	b3008050 22464-06	0	+	S-s+	-	105749
15	b3008050 22409-06	0	+	S-s+	-	116639
16	b3008050 22416-07	0	+	S-s+	-	125656
17	b3008050 22419-06	0	+	S+s+	<i>GYP(P2)</i>	125655
18	b3008050 22447-06	0	+	S-s+	-	125650
19	b3008050 22460-42	0	+	S-s+	-	125666
20	b3008050 22461-42	0	+	S-s+	-	125682
21	b3008050 22467-07	0	+	S-s+	-	125668
22	b3008050 22472-06	0	+	S-s+	-	125663
23	b3008050 22474-41	0	+	S-s+	-	122261
24	b3008050 22476-42	0	+	S-s+	-	121520
25	b3008050 22478-40	0	+	S-s+	-	125680
26	b3008050 22480-07	0	+	S-s+	-	125669
27	b3008050 22481-06	0	+	S-s+	-	125679
28	b3008050 22483-40	0	+	S-s+	-	122222
29	b3008050 22485-40	0	+	S-s+	-	125674
30	b3008050 22486-43	0	+	S-s+	-	125675

ANEXO 4: Resultados da Fenotipagem para os antígenos S e s e da Genotipagem *GYPB* em amostra de sangue e DNA de 146 doadores voluntários de sangue (cont.).

SEQ	AMOSTRA	FENOTIPAGEM		FENÓTIPO DEDUZIDO S/s	GENE VARIANTE	PF
		S	s			
31	b3008050 22488-07	0	+	S-s+	-	100966
32	b3008050 22489-06	0	+	S-s+	-	125690
33	b3008050 22492-07	0	+	S-s+	-	121503
34	b3008050 22518-41	0	+	S-s+	-	110729
35	b3008050 22501-07	0	+	S-s+	-	125693
36	b3008050 22495-41	0	+	S-s+	-	125704
37	b3008050 22500-40	0	+	S-s+	-	110911
38	b3008050 22505-41	0	+	S-s+	-	125698
39	b3008050 22528-06	0	+	S-s+	-	120861
40	b3008050 22540-42	0	+	S-s+	-	114273
41	b3008050 22523-42	0	+	S-s+	-	125751
42	b3008050 22525-40	0	+	S-s+	-	125758
43	b3008050 22527-42	0	+	S-s+	-	125738
44	b3008050 22532-07	0	+	S-s+	-	125740
45	b3008050 22537-42	0	+	S-s+	-	125743
46	b3008050 22544-06	0	+	S-s+	-	125756
47	b3008050 22561-40	0	+	S-s+	-	111380
48	b3008050 22567-06	0	+	S-s+	-	125763
49	b3008050 22570-42	0	+	S-s+	-	125761
50	b3008050 22563-43	0	+	S-s+	-	125767
51	b3008050 22564-42	0	+	S-s+	-	125773
52	b3008050 22565-41	0	+	S-s+	-	125770
53	b3008050 22566-42	0	+	S-s+	-	125772
54	b3008050 22587-07	0	+	S-s+	-	122614
55	b3008050 22598-06	0	+	S-s+	-	110783
56	b3008050 22643-07	0	+	S-s+	-	107174
57	b3008050 22546-44	0	+	S-s+	-	103515
58	b3008050 22547-41	0	+	S-s+	-	125654
59	b3008050 22550-42	0	+	S-s+	-	125803
60	b3008050 22582-42	0	+	S-s+	-	125812

ANEXO 4: Resultados da Fenotipagem para os antígenos S e s e da Genotipagem *GYPB* em amostra de sangue e DNA de 146 doadores voluntários de sangue (cont.).

SEQ	AMOSTRA	FENOTIPAGEM		FENÓTIPO DEDUZIDO S/s	GENE VARIANTE	PF
		S	s			
61	b3008050 22604-06	0	+	S-s+	-	125820
62	b3008050 22615-42	0	+	S-s+	-	125824
63	b3008050 22638-07	0	+	S-s+	-	125822
64	b3008050 22606-07	0	+	S-s+	-	122678
65	b3008050 22618-06	0	+	S-s+	-	125844
66	b3008050 22624-41	0	+	S-s+	-	125835
67	b3008050 22626-43	0	+	S-s+	-	125847
68	b3008050 22633-41	0	+	S-s+	-	125834
69	b3008050 22634-07	0	+	S-s+	-	125837
70	b3008050 22613-07	0	+	S-s+	-	125852
71	b3008050 22621-42	0	+	S-s+	-	125865
72	b3008050 22609-42	0	+	S-s+	-	125876
73	b3008050 22642-42	0	+	S-s+	-	125877
74	b3008050 22647-06	0	+	S-s+	-	124966
75	b3008050 22664-40	0	+	S-s+	-	125871
76	b3008050 22668-07	0	+	S+s+	<i>GYP(NY)</i>	125873
77	b3008050 22670-43	0	+	S-s+	-	125870
78	b3008050 22764-06	0	+	S-s+	-	125878
79	b3008050 22765-40	0	+	S-s+	-	125881
80	b3008050 22766-40	0	+	S-s+	-	125879
81	b300805024079-41	0	+	S-s+	-	127373
82	b300805024081-44	0	+	S-s+	-	127374
83	b300805024083-44	0	+	S-s+	-	118362
84	b300805023895-07	0	+	S-s+	-	127413
85	b300805023966-05	0	+	S-s+	-	127414
86	b300805023977-42	0	+	S-s+	-	127390
87	b300805023978-40	0	+	S-s+	-	127389
88	b300805023980-41	0	+	S-s+	-	120169
89	b300805023993-42	0	+	S-s+	-	127442
90	b300805023996-06	0	+	S-s+	-	127412

ANEXO 4: Resultados da Fenotipagem para os antígenos S e s e da Genotipagem *GYPB* em amostra de sangue e DNA de 146 doadores voluntários de sangue (cont.).

SEQ	AMOSTRA	FENOTIPAGEM		FENÓTIPO DEDUZIDO S/s	GENE VARIANTE	PF
		S	s			
91	b300805024000-42	0	+	S+s+	<i>GYP(P2)</i>	127424
92	b300805024029-41	0	+	S-s+	-	127402
93	b300805024030-07	0	+	S-s+	-	127403
94	b300805024040-07	0	+	S-s+	-	127394
95	b300805024042-44	0	+	S-s+	-	127397
96	b300805024043-44	0	+	S-s+	-	127393
97	b300805024044-41	0	+	S-s+	-	127396
98	b300805024067-43	0	+	S-s+	-	127419
99	b300805024068-07	0	+	S-s+	-	127415
100	b300805024087-44	0	+	S-s+	-	127404
101	b300805024106-41	0	+	S-s+	-	127410
102	b300805024107-42	0	+	S-s+	-	101271
103	b300805024108-40	0	+	S-s+	-	125339
104	b300805024151-06	0	+	S-s+	-	127423
105	b300805023968-41	0	+	S+s+	<i>GYP(NY)</i>	120026
106	b300805023994-41	0	+	S-s+	-	120615
107	b300805024162-07	0	+	S-s+	-	127463
108	b300805024089-44	0	+	S-s+	-	127480
109	b300805024091-44	0	+	S-s+	-	127479
110	b300805024092-44	0	+	S-s+	-	127476
111	b300805024093-44	0	+	S-s+	-	127465
112	b300805024094-44	0	+	S-s+	-	127477
113	b300805024095-43	0	+	S+s+	<i>GYP(P2)</i>	127466
114	b300805024100-44	0	+	S-s+	-	127469
115	b300805024102-44	0	+	S-s+	-	127482
116	b300805024112-44	0	+	S-s+	-	127475
117	b300805024111-44	0	+	S-s+	-	127488
118	b300805024113-44	0	+	S-s+	-	127487
119	b300805024161-06	0	+	S-s+	-	109709
120	b300805024208-07	0	+	S-s+	-	125038

ANEXO 4: Resultados da Fenotipagem para os antígenos S e s e da Genotipagem *GYPB* em amostra de sangue e DNA de 146 doadores voluntários de sangue (cont.).

SEQ	AMOSTRA	FENOTIPAGEM		FENÓTIPO DEDUZIDO S/s	GENE VARIANTE	PF
		S	s			
121	B300805024101-42	0	+	S-s+	-	110769
122	B300805024120-07	0	+	S-s+	-	127510
123	B300805024126-07	0	+	S-s+	-	127523
124	B300805024133-41	0	+	S-s+	-	127519
125	B300805024135-41	0	+	S-s+	-	127524
126	B300805024152-07	0	+	S-s+	-	127490
127	B300805024123-43	0	+	S+s+	<i>GYP(P2)</i>	127532
128	B300805024128-40	0	+	S-s+	-	127533
129	B300805024138-40	0	+	S-s+	-	127527
130	B300805024163-40	0	+	S-s+	-	127530
131	B300805024170-07	0	+	S-s+	-	109149
132	B300805024167-06	0	+	S-s+	-	112260
133	B300805024169-07	0	+	S-s+	-	103869
134	B300805024050-44	0	+	S-s+	-	122097
135	B300805024171-40	0	+	S-s+	-	101386
136	B300805024173-42	0	+	S-s+	-	105456
137	B300805024175-07	0	+	S-s+	-	127536
138	B300805024176-43	0	+	S-s+	-	109173
139	B300805024178-07	0	+	S-s+	-	121740
140	B300805024180-40	0	+	S+s+	<i>GYP(NY)</i>	127538
141	B300805024361-40	0	+	S-s+	-	116011
142	B300805024016-07	0	+	S-s+	-	127565
143	B300805024274-40	0	+	S-s+	-	127643
144	B300805024275-07	0	+	S-s+	-	103132
145	B300805024320-07	0	+	S-s+	-	103953
146	B300805024280-07	0	+	S-s+	-	127649
147	B300805024309-07	0	+	S-s+	-	127670
148	B300805024310-06	0	+	S-s+	-	127679

ANEXO 5: Resultados da Fenotipagem para os antígenos S e s e da Genotipagem *GYPB* em amostra de sangue e DNA de 17 doadores voluntários de sangue.

SEQ	AMOSTRA	FENOTIPAGEM		FENÓTIPO DEDUZIDO S/s	GENE	PF
		S	s		VARIANTE	
1	b300805032089	-	-	S-s-U-	-	142189
2	b300806035413	-	-	S-s-U-	-	145223
3	b300806560261	-	-	S-s-U-	-	145101
4	b300806035577	-	-	S-s-U-	-	145339
5	b300106034448	-	-	S-s-U+var	<i>GYP(P2)</i>	
6	b300805024267	-	-	S-s-U+var	<i>GYP(NY)</i>	127634
7	b300805024373	-	-	S-s-U+var	<i>GYP(P2)/GYP(NY)</i>	104175
8	b300805030271	-	-	S-s-U-	-	119039
9	b300805030326	-	-	S-s-U-	-	140402
10	b300805031406	-	-	S-s-U-	-	111436
11	b300805033092	-	-	S-s-U-	-	143173
12	b300805031319	-	-	S-s-U-	-	116880
13	b300805031617	-	-	S-s-U-	-	141717
14	b300807045857	-	-	S-s-U+var	<i>GYP(P2)</i>	155349
15	b300807046436	-	-	S-s-U-	-	155884
16	b300807048499	-	-	S-s-U-	-	157866
17	b300807052297	-	-	S-s-U-	-	161755