

Análise molecular do gene *GYPB* para inferência dos fenótipos S, s e U em uma população miscigenada de Minas Gerais – Brasil

Marina Alves Faria
Marina Lobato Martins
Luciana Cayres Schmidt
Maria Clara Fernandes da Silva Malta

Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais - HEMOMINAS, Belo Horizonte, MG, Brasil

Objetivo: Este estudo teve como objetivos: 1) implementar a genotipagem para os antígenos S, s e U do sistema de grupo sanguíneo MNS na Fundação Hemominas e 2) avaliar pela primeira vez em uma população miscigenada de Minas Gerais, Brasil a ocorrência de polimorfismos do gene *GYPB* relacionados aos fenótipos U- e U+var, assim como a deleção de *GYPB*. Os antígenos S, s e U podem ocasionar reações transfusionais e doença hemolítica perinatal. A genotipagem é uma ferramenta útil na imuno-hematologia, principalmente quando a fenotipagem não pode ser realizada.

Métodos: 96 amostras de doadores de sangue e pacientes com doença falciforme previamente fenotipadas para os antígenos S, s e U foram selecionadas. As técnicas AS/PCR e ensaio combinado AS/PCR - RFLP foram empregadas para identificar os alelos *GYPB**S, *GYPB**s e as variantes *GYPB*(P2) e *GYPB*(NY), bem como a deleção do gene *GYPB*.

Resultados: Os resultados da genotipagem alelo-específica *GYPB**S e *GYPB**s foram 100% concordantes em relação aos fenótipos S+ (n = 56), s+ (n = 60) e s- (n = 35). Entretanto, o alelo *GYPB**S, em associação com a variante *GYPB*(P2), foi detectado em 17,5% das amostras S- (n = 40), o que revela a importância da avaliação desta variante em nossa população. Entre as amostras S-s- avaliadas (n = 10), 60% apresentaram deleção do gene *GYPB*, e 40% apresentaram *GYPB* (P2) em homo ou hemizigose.

Conclusão: A genotipagem é uma estratégia eficaz na inferência dos fenótipos S, s e U na população miscigenada de Minas Gerais, podendo contribuir para a segurança transfusional.

Descritores: Sistema do grupo sanguíneo MNS; Biologia molecular; Grupo com ancestrais do continente Africano; Brasil

Introdução

O sistema de grupo sanguíneo MNS é complexo, apresentando 46 antígenos conhecidos⁽¹⁾. Os principais antígenos desse sistema são M e N, presentes na proteína glicoforina A (GPA); S, s e U, presentes na glicoforina B (GPB). Os genes *GYPB* e *GYPB*, que codificam para as proteínas GPA e GPB, respectivamente, representam dois *loci* estreitamente ligados, localizados no cromossomo 4 (4p28-q31)⁽²⁾. Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) são responsáveis pelas variantes alélicas S/s e M/N. Indivíduos que apresentam deleção do gene *GYPB* são negativos para os antígenos S, s e U. Já o fenótipo S-s-U+var, caracterizado pela expressão enfraquecida do antígeno U e ausência dos antígenos S e s na superfície dos eritrócitos, está associado a alterações do éxon 5 do gene *GYPB* [variante *GYPB*(NY)] ou do íntron 5 deste mesmo gene [variantes *GYPB*(P2)]. Estas alterações são encontradas em populações africanas ou afro-descendentes e acarretam, respectivamente, a omissão parcial ou completa da expressão do éxon 5 do gene *GYPB*⁽³⁾.

Os antígenos do sistema MNS são importantes na prática clínica por serem capazes de provocar reações transfusionais e doença hemolítica perinatal⁽⁴⁾. Pacientes com transfusão recente ou anemia hemolítica autoimune nem sempre podem ser fenotipados, e nesses casos a genotipagem vem sendo empregada com sucesso⁽⁵⁾. Indivíduos S-s-U- ou S-s-U+var, quando expostos a hemácias U+, podem produzir aloanticorpo anti-U, o qual pode ocasionar reações transfusionais severas. Como doadores com o fenótipo U- são raros em várias populações, e soros anti-U de boa qualidade são escassos, a compatibilização deste antígeno muitas vezes pode se tornar um desafio na prática transfusional. Nesse contexto, a utilização das ferramentas de biologia molecular, aliada ao atual conhecimento das bases genéticas associadas à expressão de antígenos variantes, tem sido muito importante na rotina laboratorial da Imuno-hematologia^(6,7).

O Estado de Minas Gerais possui grande extensão territorial e população altamente miscigenada⁽⁸⁾, tendo recebido indivíduos de várias regiões da África no período colonial, em decorrência do tráfico de escravos⁽⁹⁾. Desta forma, é plausível que na população de Minas Gerais sejam observadas as variantes relacionadas ao gene *GYPB* previamente descritas em africanos e afro-

Conflito de interesse:
Os autores declaram não haver conflito de interesse

Submissão: 10/1/2012
Aceito: 26/3/2012

Autor correspondente:
Maria Clara Fernandes da Silva Malta
Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, HEMOMINAS
Alameda Ezequiel Dias, 321, Bairro Santa Efigênia
30.130-110 Belo Horizonte, MG, Brasil
maria.malta@hemominas.mg.gov.br

www.rbhh.org or www.scielo.br/rbhh

DOI: 10.5581/1516-8484.20120052

descendentes. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivos 1) implementar a genotipagem para os antígenos S, s e U do sistema de grupo sanguíneo MNS na Fundação Hemominas e 2) avaliar pela primeira vez na população mineira a ocorrência de mutações do íntron 5 e éxon 5 do gene *GYPB* relacionados aos fenótipos U- e U^{var}.

Para isso, foi empregada a técnica de AS/PCR (*allele-specific primers polymerase chain reaction*) para a genotipagem dos antígenos S e s e o ensaio combinado AS/PCR-RFLP (*allele-specific primers polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*) para a identificação dos polimorfismos genéticos responsáveis pelos fenótipos U negativo e U^{var(3)}.

Métodos

Amostras empregadas

Visando à implementação e validação da técnica de genotipagem para os antígenos S, s e U, foram analisadas 96 amostras previamente fenotipadas de doadores de sangue e pacientes portadores de doença falciforme da Fundação Hemominas, com os seguintes fenótipos: S+s+ (n = 30), S-s+ (n = 30), S+s- (n = 26) e S-s- (n = 10).

Testes sorológicos

Todas as amostras de sangue foram previamente submetidas à fenotipagem dos antígenos S e s, empregando a técnica de aglutinação em coluna e utilizando gel de centrifugação ID-LISS/Coombs (contendo antiglobulina humana poliespecífica) e anticorpos humanos policlonais anti-S e anti-s (DiaMed AG - Suíça).

As amostras S-s- foram fenotipadas para o antígeno U pela técnica de aglutinação em coluna, utilizando gel de centrifugação ID-LISS/Coombs, empregando soro de pacientes aloimunizados, contendo o anticorpo anti-U previamente identificado.

Estes testes foram realizados no Laboratório de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas em amostras de sangue total colhido em EDTA.

Extração do DNA genômico

A purificação de DNA genômico foi realizada a partir do sangue total utilizando o *kit* comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante.

Genotipagem *GYPB**S e *GYPB**s – Ensaio de PCR alelo-específica

Todas as 96 amostras avaliadas no presente estudo foram submetidas às técnicas de PCR alelo-específicas para a genotipagem dos alelos *GYPB**S e *GYPB**s. Os testes foram realizados utilizando-se 100 ng de DNA genômico em uma reação de 20 µl contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 2,0 mM de MgCl₂ para *GYPB**S e 2,5 mM para *GYPB**s, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 0,8 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, USA) e 2 pmol de cada iniciador GPB 1640 e GPBS ou GPBs (Tabela 1). A PCR foi feita em termociclador (modelo

TC-412, Techne, Reino Unido), nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, uma fase de anelamento de 60 °C para *GYPB**S e 63 °C para *GYPB**s por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e uma fase final de extensão de 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo.

Nas reações de genotipagem *GYPB**S e *GYPB**s, a detecção do produto de 207 pb indica a presença dos alelos correspondentes aos antígenos S e s, respectivamente.

Análise molecular para avaliação de polimorfismos do éxon 5 e íntron 5 do gene *GYPB* ou de sua deleção

As amostras com fenótipos S-s- previamente conhecidos (n = 10) e as amostras fenotipadas como S-s+ e que amplificaram para *GYPB**S (n = 3) foram submetidas a um ensaio combinado AS/PCR-RFLP. Este ensaio permite avaliar a ocorrência da deleção de *GYPB* bem como detectar polimorfismos do éxon 5 e íntron 5 deste gene, relacionados ao impedimento da expressão do antígeno S e enfraquecimento de expressão do antígeno U nos eritrócitos [variantes *GYPB*(P2) e *GYPB*(NY)].

Para o ensaio combinado AS/PCR - RFLP, primeiramente foi realizada uma PCR na qual 100 ng de DNA genômico foram utilizados em reação com volume final de 20 µL, contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 2,0 mM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 4 pmol dos iniciadores GPB 4/5 e GPB IVS5, 6 pmol do iniciador GPB 5T (Tabela 1) e 0,8 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, USA). Nesta mesma reação também foi utilizado 1 pmol dos iniciadores HGH *sense* e *antisense* (que amplificam uma sequência codificadora do hormônio de crescimento humano), como um controle positivo interno da reação de amplificação (Tabela 1). A reação de PCR foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente para *GYPB**S, porém com uma fase de anelamento a 55 °C. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo.

A ausência de amplificação do produto de 260 pb específico para esta reação, em amostras fenotipadas como S-s-, na presença de amplificação do produto de 434 pb relacionado ao gene controle HGH, permite a inferência do fenótipo S-s-U- relacionado à deleção do gene *GYPB*.

Nesta mesma reação, a presença de um produto alelo-específico de 145 pb indica a ocorrência da mutação 230 C>T no éxon 5, relacionada à variante *GYPB*(NY).

Já a presença do produto de 260 pb indica que o gene *GYPB* está presente. Nestes casos, é necessário investigar a ocorrência da alteração +5g>t do íntron 5 do gene, relacionado à variante *GYPB*(P2), por meio de RFLP visando a melhor caracterização das amostras.

Nesta reação de RFLP, a digestão do produto de PCR de 260 pb pela enzima EcoRI (Promega, USA), gerando fragmentos de 92 pb e 168 pb, indica a ocorrência do gene *GYPB* selvagem, enquanto a ausência de digestão (perda do sítio de restrição) indica a presença da mutação +5 g>t no íntron 5 relacionada à variante *GYPB*(P2).

Tabela 1 - Iniciadores utilizados nas PCR para genotipagem dos antígenos S, s e U e para o ensaio combinado AS/PCR - RFLP, com seus respectivos produtos⁽³⁾. Em destaque estão os nucleotídeos que foram trocados (*mismatches*), visando a proporcionar maior especificidade

Nome do iniciador	Direção	Alelos	Sequência (5' a 3')	Produto
GPB 1640	Sense	<i>GYPB</i> *S <i>GYPB</i> *s	GGTAAGACTGACACATTACCTCAC	
GPB S	Antisense	<i>GYPB</i> *S	AGTGAACGATGGACAAGTTCTCCCA	207 pb
GPB s	Antisense	<i>GYPB</i> *s	AGTGAACATGGACAAGTTCTCCCG	
GPB 4/5	Sense	<i>GYPB</i>	CTGCTTATTTTTCTATTGCTATG	260 pb*
GPB IVS5	Antisense	<i>GYPB</i>	CTGTTTCTCTTTTGAGTTAACTG	
GPB 5T	Antisense	<i>GYPB</i> (NY)	ACTGTAAGAAATTAAGAGGCTCA	145 pb
HGH	Sense	HGH	TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA	434 pb
HGH	Antisense	HGH	CCACTCACGGATTCTGTGTGTTTC	

*Este produto indica a presença do gene *GYPB*. Uma reação de RFLP com enzima *EcoRI* é necessária para a diferenciação entre *GYPB* selvagem e *GYPB*(P2).

Resultados

PCR alelo-específica *GYPB**S e *GYPB**s

Todas as amostras estudadas foram submetidas às técnicas de PCR alelo-específicas *GYPB**S e *GYPB**s. Para as 56 amostras fenotipadas como S+ (30 amostras S+s+ e 26 amostras S+s-), foi observada a presença do produto de amplificação esperado de 207 pb que identifica o alelo que codifica para o antígeno S (Tabela 2). Em relação às 40 amostras fenotipadas como S- (30 amostras S-s+ e 10 amostras S-s-), sete (17,5%) mostraram a presença do alelo *GYPB**S (Tabela 2). Dentre estas sete amostras, três haviam sido fenotipadas como S-s+ e quatro como S-s- (Tabela 2).

As sete amostras fenotipadas como S- que amplificaram na PCR alelo-específica *GYPB**S foram analisadas por meio do ensaio combinado AS/PCR-RFLP⁽³⁾ com o intuito de determinar a presença de alterações no éxon 5 e no íntron 5 do gene *GYPB* que impedem a expressão do antígeno S na superfície dos eritrócitos (ver abaixo).

Já as amostras genotipadas para o alelo *GYPB**s apresentaram total concordância com a fenotipagem, ou seja, as 60 amostras s+ avaliadas (30 amostras S-s+ e 30 amostras S+s+) apresentaram produto de amplificação esperado de 207 pb, enquanto as 35 amostras fenotipadas como s- (25 amostras S+s- e 10 amostras S-s-) foram negativas na PCR *GYPB**s (Figura 1).

Análise molecular para avaliação de polimorfismos do éxon 5 e íntron 5 do gene *GYPB* ou de sua deleção (Ensaio combinado AS/PCR – RFLP)

As dez amostras fenotipadas como S-s- foram investigadas quanto à deleção do gene *GYPB* por meio do ensaio combinado AS/PCR - RFLP. Quatro dessas amostras apresentaram, nesta reação, o produto de 260 pb, indicando a presença do gene. As outras seis amostras não apresentaram este produto de amplificação, podendo, portanto, ser consideradas S-s-U- em decorrência da deleção do gene *GYPB*.

As três amostras fenotipadas como S-s+ que apresentaram produto de amplificação na PCR alelo-específica *GYPB**S e as quatro amostras fenotipadas como S-s- que apresentaram ausência de deleção do gene *GYPB* foram investigadas quanto a alterações no éxon 5 e íntron 5 do gene (Figura 2).

Estas investigações revelaram que as quatro amostras fenotipa-

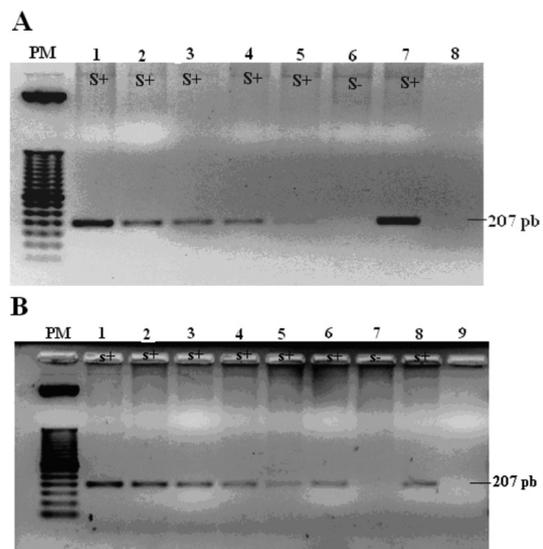


Figura 1 - Genotipagem *GYPB**S e *GYPB**s. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV. (A): Genotipagem para o alelo *GYPB**S. PM: padrão de peso molecular DNA ladder 50 pb. 1 a 5: amostras fenotipadas como S+. 6: controle negativo. 7: controle positivo. 8: água – “controle branco”. (B) Genotipagem para o alelo *GYPB**s. PM: padrão de peso molecular de 50 pb, 1 a 6: amostras fenotipadas como s+. 7: controle negativo. 8: controle positivo. 9: água – “controle branco”. – “blank control”

Tabela 2 - Resultados da PCR alelo-específica para a genotipagem dos antígenos S e s e avaliação da deleção do gene *GYPB*

Fenótipo	Nº de amostras genotipadas	Amplificação do alelo S	Amplificação do alelo s	Deteção do gene <i>GYPB</i>
S+s+	30	30	30	Não Realizado
S+s-	26	26	0	Não Realizado
S-s+	30	3	30	Não Realizado
S-s-	10	4	0	4

das como S-s- avaliadas foram homocigotas ou hemizigotas para a alteração no nucleotídeo +5 (g>t) do íntron 5 do gene *GYPB*, a qual está relacionada à variante *GYPB*(P2) (amostras 4 a 7, Tabela 3).

As três amostras fenotipadas como S-s+ e que apresentaram amplificação na PCR alelo-específica *GYPB**S apresentaram padrão compatível com heterocigose para um alelo correspondente

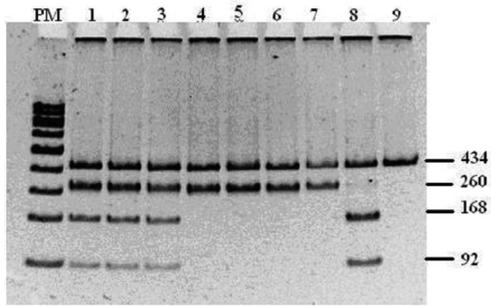


Figura 2 - Ensaio combinado AS/PCR - RFLP. Gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

PM: padrão de peso molecular DNA ladder 100 pb. 1 a 3: amostras S+s- genotipadas como heterozigotas para as variantes *GYPB*(P2) e *GYPB* selvagem. 4 a 7: amostras S-s- genotipadas como homozigotas ou hemizigotas para as variantes *GYPB*(P2). 8: controle positivo (amostra U+, homozigota para *GYPB* selvagem). 9: controle negativo (amostra S-s-U- em decorrência da deleção do gene *GYPB*).

Tabela 3 - Resultados da análise molecular do éxon 5 e íntron 5 do gene *GYPB* em amostras com fenótipo S-s+ e S-s- e amplificação do alelo *GYPB**S

Amostra	Fenotipagem	Análise do éxon 5 e íntron 5
1	S-s+	+5 íntron 5 (g>t) / <i>GYPB</i> selvagem
2	S-s+	+5 íntron 5 (g>t) / <i>GYPB</i> selvagem
3	S-s+	+5 íntron 5 (g>t) / <i>GYPB</i> selvagem
4	S-s-	+5 íntron 5 (g>t)
5	S-s-	+5 íntron 5 (g>t)
6	S-s-	+5 íntron 5 (g>t)
7	S-s-	+5 íntron 5 (g>t)

à variante *GYPB*(P2) e outro alelo selvagem, correspondente à *GYPB* (amostras 1 a 3, Tabela 3).

Discussão

Para avaliar a eficácia das técnicas de genotipagem empregadas, as PCR alelo-específicas *GYPB**S e *GYPB**s foram realizadas em 96 amostras correspondentes aos seguintes fenótipos: S+s+ (n = 30), S+s- (n = 26), S-s+ (n = 30) e S-s- (n = 10).

Os resultados da genotipagem *GYPB**S e *GYPB**s obtidos foram 100% concordantes com os testes de hemaglutinação quando foram utilizadas amostras fenotipadas como S+s- ou S+s+.

Entretanto, 10% das amostras fenotipadas como S-s+ (n = 30) amplificaram na PCR alelo-específica *GYPB**S. Este percentual é mais elevado do que o anteriormente descrito em brasileiros descendentes de africanos amostrados no Nordeste do país, onde em 7,4% das amostras S-s+ foi identificada a presença do alelo *GYPB**S⁽⁶⁾; e mais elevado do que os 5% de discrepância entre fenotipagem e genotipagem dos antígenos S e s, relatados entre brasileiros da região amazônica⁽¹⁰⁾.

A análise do íntron 5 e do éxon 5 de *GYPB* revelou que as três amostras que apresentaram amplificação do alelo *GYPB**S, embora tenham sido fenotipadas como S-s+, apresentaram a mutação silenciadora associada à variante *GYPB*(P2) em heterozigose com a *GYPB* selvagem. Nestes casos, o genótipo deduzido para os indivíduos seria *GYPB*(P2)*S/*GYPB**s.

Das dez amostras S-s- avaliadas, seis (60%) apresentaram deleção do gene *GYPB*. Estudos prévios realizados em brasileiros mostraram uma prevalência de 76,5% (13/17) desta deleção entre as amostras fenotipadas como S-s-⁽⁶⁾.

As quatro amostras fenotipadas como S-s- e para as quais foi detectado o gene *GYPB* também foram submetidas ao ensaio combinado AS/PCR-RFLP com o objetivo de analisar as variantes do éxon 5 e íntron 5 desse gene. Todas essas amostras foram homozigotas ou hemizigotas para a variante *GYPB*(P2).

Estudos anteriores já haviam relatado que a alteração +5 g>t do íntron 5, associada à variante *GYPB*(P2), é de fato o mecanismo mais frequentemente associado ao silenciamento do antígeno S e à ocorrência do fenótipo S-s-U+^{var}, tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos. Estes estudos mostraram que entre os afro-descendentes S-s- amostrados no Nordeste brasileiro (n = 17), quatro possuíam o gene *GYPB*, dos quais três apresentavam a mutação relacionada à variante *GYPB*(P2) em homo (n = 2) ou heterozigose (n = 1)⁽⁶⁾. Já entre afro-americanos esta variante foi relatada em 83% das amostras S-s-U+^{var}⁽³⁾.

Por outro lado, embora nenhuma variante *GYPB*(NY) tenha sido encontrada no presente trabalho, os estudos realizados em doadores de sangue brasileiros relataram que dois dos quatro indivíduos S-s-U+^{var} e três dos 11 indivíduos S-s+ que amplificaram para *GYPB**S avaliados eram positivos para o alelo *GYPB*(NY)⁽⁶⁾. Já entre os afro-americanos provenientes do programa de triagem de doadores com fenótipo raro do New York Blood Center (EUA), 7 dos 41 indivíduos S-s-U+^{var} apresentavam *GYPB*(NY) em homozigose (n = 4) ou heterozigose com *GYPB*(P2) (n = 3)⁽³⁾.

É importante lembrar que após cinco séculos de miscigenação, temos em Minas Gerais, assim como em outras regiões do país, uma população altamente miscigenada, na qual há grande variabilidade nos níveis de ancestralidade, mesmo dentro de categorias fenotípicas tradicionais como “branco”, “negro” ou “afro-descendente”⁽¹¹⁾. Por este motivo, consideramos que a seleção de amostras independente do perfil étnico retrata de forma mais adequada a população e evita a subjetividade própria do processo de autodenominação étnica nas populações miscigenadas.

A prevalência do fenótipo S-s- é de 2 a 8% na África, tendo sido descrito entre pigmeus (20%), africanos ocidentais (até 37%) e afro-americanos (1%)⁽¹²⁻¹⁵⁾. A existência de polimorfismos relacionados ao gene *GYPB* entre indivíduos de origem africana tem levado à especulação de que estas variantes possam ter sido selecionadas como um resultado da resistência relativa que elas conferem contra a malária *falciparum*⁽¹⁰⁾.

A miscigenação africana na população brasileira é expressiva, tendo sido estimada em 34,1% para doadores de sangue e 45,5% para pacientes com doença falciforme amostrados em Minas Gerais⁽⁸⁾. Desta forma, não apenas é esperado que os fenótipos S-s-U- e S-s-U+^{var} sejam encontrados no Brasil, mas também que suas frequências variem entre as regiões do país, já que níveis de miscigenação variam substancialmente no espaço geográfico^(8,16-21).

Considerando todas as 40 amostras S- estudadas (30 amostras S-s+ e 10 amostras S-s-), 17,5% apresentaram resultado positivo na PCR *GYPB**S e presença da variante silenciadora *GYPB*(P2). Estes números ressaltam a expressiva frequência desse polimorfismo na população mineira e são um exemplo claro da importância da análise das variantes atualmente conhecidas quando se utiliza a genotipagem para a inferência dos fenótipos dos antígenos S, s e U do sistema MNS. Além disso permanece como um desafio para futuros estudos, a identificação de outras formas variantes, além das atualmente conhecidas.

Embora as análises apresentadas tenham sido realizadas em amostras com fenótipos previamente conhecidos, a genotipagem S, s e U pode ser muito útil nos casos em que os testes sorológicos objeti-

vando a determinação dos antígenos não podem ser realizados. Nestes casos, a pesquisa dos polimorfismos conhecidos, associados a alterações da expressão de *GYPB*, deve ser obrigatoriamente realizada.

A implicação na prática transfusional da presença das alterações moleculares envolvidas no fenótipo U+^{var} ainda é desconhecida, embora saiba-se que indivíduos U+^{var} sejam capazes de produzir anti-U quando em contato com o antígeno.

As transfusões para pacientes aloimunizados que necessitam de hemácias S-s-U- ainda representam um desafio em qualquer serviço transfusional devido à falta de reagentes sorológicos bem caracterizados e de boa qualidade⁽²²⁾. É difícil obter anticorpos anti-U de boa reatividade e com volume suficiente para permitir a fenotipagem dos pacientes e possíveis doadores de sangue⁽⁶⁾. Tendo em vista estas dificuldades, os Laboratórios de Imuno-Hematologia, tanto do Brasil quanto de outras partes do mundo, eventualmente utilizam soro anti-U de pacientes aloimunizados para fenotipar hemácias de doadores e pacientes. Porém, em geral, esses anticorpos não são suficientemente bem caracterizados e podem não detectar o antígeno U variante, uma vez que ele é fracamente expresso na superfície dos eritrócitos, o que pode levar ao risco de resultados falso-negativos (indivíduo U+^{var} fenotipado como U-). Esta situação provavelmente ocorreu em quatro das dez amostras S-s- avaliadas no presente estudo (amostras 4 a 7, Tabela 3), as quais foram inicialmente fenotipadas como S-s-U- e, após a detecção da variante *GYPB(P2)* em homo ou hemizigose na genotipagem, foram reclassificadas como S-s-U+^{var}. A fenotipagem falso-negativa do antígeno U é especialmente crítica para os doadores, uma vez que suas hemácias poderão ser transfundidas em pacientes verdadeiramente U negativos.

Assim, a inserção de ferramentas de biologia molecular na determinação dos antígenos S/s e U em doadores de sangue e pacientes mostra-se fundamental para minimizar os problemas encontrados na prática imuno-hematológica, como a correta identificação dos indivíduos S-s-U- e S-s+U+^{var}. A genotipagem S/s e U poderá levar a uma redução do risco de reações transfusionais potencialmente severas envolvendo estes antígenos, principalmente em pacientes politransfundidos, como os portadores de anemia falciforme.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas pela disponibilização das amostras de sangue fenotipadas, à Dr^a. Lilian Castilho pelo fornecimento de amostras de DNA controle U+^{var}, à Fundação Hemominas e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Referências

- Daniels G, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, Lomas-Francis C, Moulds JM, Moulds JJ, Olsson ML, Overbeeke MA, Poole J, Reid ME, Rouger P, van der Schoot CE, Scott M, Sistonen P, Smart E, Storry JR, Tani Y, Yu LC, Wendel S, Westhoff CM, Zelinski T. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens: Cape Town report. *Vox Sang*. 2007;92(3):250-3.
- Kudo S, Fukuda M. Structural organization of glycophorin A and B genes: glycophorin B gene evolved by homologous recombination at ALU repeat sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(12):4619-23.
- Storry JR, Reid ME, Fetis S, Huang CH. Mutations in *GYPB* éxon 5 drive the S-s-U+^{var} phenotype in persons of Africans descent: implications for transfusion. *Transfusion*. 2003;43(12):1738-47.
- American Association of Blood Banks (AABB). Technical manual. 15th ed. Bethesda: AABB; 2005. 722p.
- Martins ML, Cruz KV, Silva MC, Vieira ZM. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(4):252-9.
- Omoto R, Reid ME, Castilho L. Molecular analyses of *GYPB* in African Brazilians. *Immunohematology*. 2008;24(4):148-53.
- Castilho L. Imuno-hematologia molecular: onde estamos e para onde vamos. *Rev Bras de Hematol e Hemoter*. 2009;31(4):216-7.
- da Silva MC, Zuccherato LW, Lucena FC, Soares-Souza GB, Vieira ZM, Pena SD et al. Extensive admixture in Brazilian sickle cell patients: implications for the mapping of genetic modifiers. *Blood*. 2011;118(16):4493-5; author reply 4495. Comment on: *Blood*. 2010;115(9):1815-22.
- Reis JJ. A presença negra: encontros e conflitos. In: IBGE, Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia Estatística – IBGE; 2000. p. 91.
- Tarazona-Santos E, Castilho L, Amaral DR, Costa DC, Furlani NG, Zuccherato LW, et al. Population genetics of *GYPB* and association study between *GYPB**S/s polymorphism and susceptibility to *P. falciparum* infection in the Brazilian Amazon. *Plos One*. 2011;6(1): 16123.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):177-82.
- Fraser GR, Giblett ER, Motulsky AG. Population genetic studies in the Congo. 3. Blood groups (ABO, MNSs, Rh, Jsa). *Am J Hum Genet*. 1996;18(6):546-52.
- Vos GH, Moores P, Lowe RF. A comparative study between the S-s-U- phenotype found in Central African Negroes and the S-s+U- phenotype in Rhnull individuals. *S Afr J Med Sci*. 1971;36(1):1-6.
- Lowe RF, Moores PP. S-s-U- red cell factor in Africans of Rhodesia, Malawi, Mozambique and Natal. *Hum Hered*. 1972;22(4):344-50.
- Issitt PD, Anstee DJ. Applied blood group serology. 4th ed. Durham: Montgomery Scientific Publications; 1998. 1208p.
- Bortolini MC, Da Silva Junior WA, De Guerra DC, Remonato G, Miranda R, Hutz MH, et al. African-derived South American populations: A history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. *Am J Hum Biol*. 1999;11(4):551-63.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2000;67(2):444-61.
- Salzano FM, Bortolini MC. The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 511p.
- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME et al. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol*. 2003;15(6):824-34.
- Marrero AR, Das Neves FP, De Almeida Carvalho B, Peres LM, Kommers TC, Da Cruz IM, et al. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as white in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol*. 2005;17(4):496-506.
- Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol*. 2010;22(2):187-92.
- Reid ME, Storry JR, Maurer J, Nance ST. Practical method for determination of the U status of S-s- erythrocytes. *Immunohematology*. 1997;13(4):111-4.