

WILSON BALEOTTI JÚNIOR

**ESTUDO MOLECULAR DOS ALELOS DI A/DI B
E DA BANDA 3- MEMPHIS NA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, do aluno WILSON BALEOTTI JUNIOR.

22/07/2002.



*Profa.Dra. Lilian Maria de Castilho
Orientadora*

CAMPINAS

2002

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

WILSON BALEOTTI JÚNIOR

***ESTUDO MOLECULAR DOS ALELOS DI A/DI B
E DA BANDA 3- MEMPHIS NA POPULAÇÃO
BRASILEIRA***

*Tese 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.*

ORIENTADORA: PROF. DRA. LILLIAN MARIA DE CASTILHO

CAMPINAS

2002

INIDADE 80
1ª CHAMADA TI/UNICAMP
B195e
/ EX
FOMBO BCI 51464
PROC 16.837102
C DX
PREÇO R\$11,00
DATA 12/11/02
Nº CPD

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

CM00176418-5

BIB ID 266944

B195e Baleotti Júnior, Wilson
Estudo molecular dos alelos DI A/DI B e da banda 3-memphis na
população brasileira / Wilson Baleotti Júnior. Campinas, SP : [s.n.],
2002.

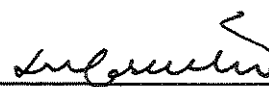
Orientador : Lílian Maria de Castilho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antígenos. 2. Genes. 3. Anticorpos. I. Lílian Maria de
Castilho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Aluno(a): WILSON BALEOTTI JUNIOR

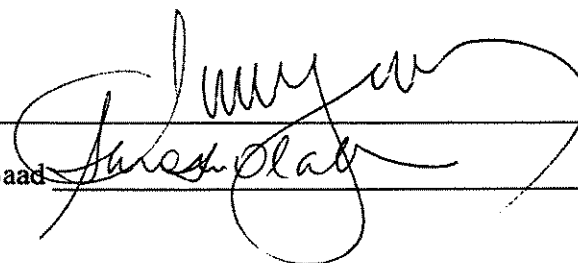
Orientador(a): Profa. Dra. LILIAN MARIA DE CASTILHO



Membros:

Professor Doutor Antonio Fabron Júnior

Professora Doutora Sara Teresinha Olalla Saad



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 22/07/2002

2025/163

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À Deus pelo seu imenso amor e luz constante em minha vida...

À minha querida e amada esposa

Luciana Ramos Baleotti

*pelo seu amor e carinho nos momentos difíceis e por proporcionar o momento mais feliz da
minha vida, o nascimento da*

Laura.

À minha filha

Laura Ramos Baleotti

por encher meu coração de alegria, coragem, felicidade e intenso amor.

Aos meus pais,

Wilson Baleotti (in memoriam) e Leda Polatti Baleotti,

pelo exemplo de amor a Deus e ao próximo, dedicação à família e respeito a profissão.

AGRADECIMENTOS

À **Profa Dra Lilian Maria de Castilho**, exemplo de dedicação e postura profissional. Obrigado por todos os ensinamentos em Imunohematologia, que foram fundamentais na minha formação profissional. Obrigado pela excelência de sua orientação, pela forma que me conduziu neste trabalho, ajudando a superar as dificuldades e celebrando as conquistas, proporcionando segurança, confiança e dando sentido as adversidades. Obrigado pela sincera amizade.

Ao **Prof. Dr. Jordão Pellegrino Junior**, pela grande e valiosa contribuição durante todo o decorrer do trabalho e principalmente na finalização.

A **Profa Dra Maria Rios** pela valiosa contribuição que possibilitou o desenvolvimento e conclusão do presente trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antonio Fabron Junior**, pela amizade, respeito, apoio, incentivo e confiança em mim depositada durante a realização deste trabalho.

A **Profa. Dra. Sara Saad**, pelo apoio e valiosas sugestões que contribuíram para concretização do presente trabalho.

Ao **Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão** e à **Profa. Dra. Márcia Aparecida Sperança**, pelas valiosas sugestões e apoio técnico.

Aos estatísticos **Ana Paula Bechelli** e **Carlos Henrique Pires** pela excelência na análise estatística de nossos resultados

À querida amiga **Prof. Dra. Eliana M. Rubio** por ter me ensinado os primeiros passos no laboratório de Imunohematologia

Aos meus queridos amigos **Laércio e Artemis** pela amizade e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP, **Maria Helena e Dilmara**, pelo apoio técnico.

Ao **Dr. Paulo R. M. Lima**, pelo incentivo e consideração.

À **Arlete**, pela simpatia, atenção e eficiência a mim dispensada.

À **Renata** pela gentileza, auxílio e atenção durante todo o decorrer do curso.

À **Diretoria da Faculdade de Medicina de Marília** pelo apoio e incentivo.

Aos amigos e funcionários do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília pelo apoio e incentivo.

À **Cecília** pelo eficiente auxílio e amizade durante todo o decorrer do curso.

Aos meus queridos amigos, **Sérgio e Mário** pelo constante incentivo.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro de Marília, **Marcelo, Marcia, Sueli, David e Marcel**, pelo apoio, consideração, estímulo e compreensão nos momentos difíceis e pela competente colaboração que tanto contribuíram para a minha formação e carreira profissional.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília, **Roger, Luciano, Ligia, Profa Dra Anete, Profa Dra Rosa, Rosi e Vanessa**, pelo carinho e respeito com que me receberam.

*Trabalho realizado no Centro de Hematologia
e Hemoterapia da Unicamp e no Hemocentro
da Faculdade de Medicina de Marília*

	<i>Pág</i>
RESUMO.....	<i>xviii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
A. Material.....	31
1. Amostras.....	31
2. Antisoros.....	31
3. Suspensão de hemácias.....	32
4. Solução de cloreto de amônio 0,144 M.....	32
5. Solução de bicarbonato de amônio.....	32
6. Tampão de lise.....	32
7. DNAzol.....	32
8. dNTP.....	33
9. Taq DNA polymerase.....	33
10. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X.....	33
11. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X.....	33

12. Gel de Agarose a 1,5%.....	33
13. Gel de Agarose a 3%.....	34
14. Gel de Agarose GTG® 5%.....	34
15. Marcadores moleculares.....	34
16. Enzimas de restrição.....	34
17. Azul de Commassie 0,25%.....	34
B. Métodos.....	35
1. Fenotipagem eritrocitária.....	35
3. Extração de DNA.....	36
4. Precipitação do DNA com etanol.....	36
5. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	37
6. Análise dos fragmentos de PCR após digestão com enzimas de restrição (RFLP).....	37
7. Genotipagem <i>DI A/DI B</i> (PCR-RFLP).....	38
8. Genotipagem Memphis (PCR-RFLP).....	39
9. Eletroforese de proteínas da membrana eritrocitária.....	40
10. Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	41
A. Resultados da genotipagem Diego.....	42
B. Resultados da genotipagem Memphis.....	44

C. Associação entre os genótipos Diego/Memphis.....	46
C.1. Amostras de DNA dos doadores voluntários de sangue.....	46
C.2. Amostras de DNA dos descendentes de africanos.....	47
C.3. Amostras de DNA dos descendentes de japoneses.....	47
C.4. Amostras de DNA dos Índios Parakanãs.....	48
D. Resultados da análise da proteína banda 3 por eletroforese.....	49
5. DISCUSSÃO.....	50
A. Frequência do antígeno Di ^a	51
B. Frequência dos alelos DI A e DI B	53
C. Frequência do alelo 166G.....	55
D. Associação entre os genótipos Diego e Memphis.....	58
6. CONCLUSÕES.....	61
7. SUMMARY	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
9. APÊNDICE.....	72

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DI A	Alelo DI A
DI B	Alelo DI B
166A	Alelo 166A
166G	Alelo 166G
DI A/DI B	Genótipo Diego (heterozigoto)
166A/G	Genótipo Memphis (heterozigoto)
166A>G	Mutação no gene SCL4A1
H ₂ DIDS	4,4'-diisotiocianato-1,2-difeniletano-2,2'-ácido dissulfônico
SCL4A1	Gene da banda 3
AE1	Gene Anion exchange 1
CHO	Carbohidrato
N-terminal	Amino-terminal
CH-terminal	Carboxi-terminal
Asn	Asparagina
Pro	Prolina
Leu	Leucina
Glu	Ácido Glutâmico
Lys	Lisina
Kb	Quilobases
kD	Quilodaltons
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio-Eletroforese em gel de poliacrilamida
Di ^a	Antígeno Diego a
Di ^b	Antígeno Diego b
Wr ^a	Antígeno Wrigth a

W ^r ^b	Antígeno Wrigth b
T	Timina
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfisms
PCR- RFLP	Técnica de PCR seguida por análise dos fragmentos com enzimas de restrição
EDTA	Ácido Etileno diamino tetracético
dNTP	2'-deoxinucleosídeo 5'-trifosfato
dATP	2'-deoxiadenina 5'-trifosfato
dGTP	2'-deoxiguanina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-deoxitimina 5'-trifosfato
μl	Microlítro
mM	Milimolar
TAE	Solução tampão tris-acetato-EDTA
μg	micrograma
rpm	Rotações por minuto
nm	Nanômetros
ng	Nanograma
pmol	Picomolar
nmol	Nanomolar
Di (a+b+)	Fenótipo Di (a+b+)
Di (a+b-)	Fenótipo Di (a+b-)
Di (a-b+)	Fenótipo Di (a-b+)
EXON	Região do gene que codifica aminoácido
INTRON	Região do gene que não codifica aminoácido

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1: Sequência dos primers utilizados nas genotipagens <i>DI A/DI B</i> e Memphis.....	40
TABELA 2: Resultados da genotipagem Diego.....	43
TABELA 3: Resultados da genotipagem Memphis.....	45
TABELA 4: Associação entre os genótipos Diego e Memphis em doadores de sangue.....	46
TABELA 5: Associação entre os genótipos Diego e Memphis em descendentes de africanos	47
TABELA 6: Associação entre os genótipos Diego e Memphis em descendentes de japoneses.....	47
TABELA 7: Associação entre os genótipos Diego e Memphis em Índios.....	48
TABELA 8: Frequências do antígeno Di^a encontradas em populações indígenas.....	51
TABELA 9: Frequências do antígeno Di^a encontradas em japoneses e descendentes.....	52
TABELA 10: Frequências do antígeno Di^a encontradas em caucasóides e descendentes de africanos.....	52
TABELA 11: Resultados da fenotipagem Di^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de doadores voluntários de sangue	73

TABELA 12:	Resultados da fenotipagem D_i^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de descendentes de africanos.....	76
TABELA 13:	Resultados da fenotipagem D_i^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de descendentes de japoneses.....	78
TABELA 14:	Resultados da fenotipagem D_i^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de índios Parakanãs.....	80
TABELA 15:	Intervalo de confiança para diferença das proporções –alelo $DI A..$	82
TABELA 16:	Intervalo de confiança para diferença das proporções –alelo $DI B..$	82
TABELA 17:	Intervalo de confiança para diferença das proporções – alelo 166 ^A	83
TABELA 18:	Intervalo de confiança para diferença das proporções –alelo 166G.	83

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1: Modelo estrutural da banda 3 humana.....	21
FIGURA 2: Eletroforese de membrana de eritrócitos humanos em SDS-PAGE, após digestão proteolítica com quimiotripsina.....	23
FIGURA 3: Banda 3: Representação esquemática da associação do antígeno D_i^a e polimorfismo Memphis (56Lys/Glu).....	25
FIGURA 4: Representação esquemática da localização dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo Diego.....	27
FIGURA 5: Padrões de leitura de hemaglutinação em tubo.....	35
FIGURA 6: Análise qualitativa de DNA em gel de agarose a 1%.....	37
FIGURA 7: PCR-RFLP para genotipagem <i>DI A/DI B</i>	38
FIGURA 8: PCR-RFLP para genotipagem Memphis.....	39
FIGURA 9: Eletroforese de proteínas.....	49
FIGURA 10: Ilustração da associação dos alelos Diego e banda 3-Memphis.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág</i>
GRÁFICO 1: Frequência gênica dos alelos <i>DI A/DI B</i>	43
GRÁFICO 2: Frequência gênica dos alelos. <i>166A</i> e <i>166G</i>	45
GRÁFICO 3: Intervalos de confiança para diferença das proporções – alelo <i>DI A</i>	54
GRÁFICO 4: Intervalos de confiança para diferença das proporções – alelo <i>DI B</i> ...	54
GRÁFICO 5: Intervalos de confiança para diferença das proporções – alelo <i>166A</i>	56
GRÁFICO 6: Intervalos de confiança para diferença das proporções – alelo <i>166G</i> ...	57

ANTÍGENOS DO SISTEMA DE GRUPO SANGÜÍNEO DIEGO

Símbolo do antígeno	Substituição do aminoácido	Posição do aminoácido
Di ^a	Pro→Leu	854
Di ^b	Pro	854
Wr ^a	Glu→Lys	658
Wr ^b	Ácido glutâmico	658
Wd ^a	Val→Met	557
Rb ^a	Pro→Leu	548
WARR	Thr→Ile	552
ELO	Arg→Trp	432
Wu	Gly→Ala	565
Bp ^a	Asn→Lys	569
Mo ^a	Arg→His	656
Hg ^a	Arg→Cys	656
Vg ^a	Tyr→His	555
Tr ^a	Lys→Asn	551
Sw ^a	Arg→Gln	646
BOW	Pro→Ser	561
NFLD	Glu→Asp / Pro→Ala	429 / 561
Jn ^a	Pro→Ser	566
KREP	Pro→Ala	566
Fr ^a	Glu→Lys	480
SW1	Arg→Trp	646



RESUMO

O sistema de grupo sanguíneo Diego é constituído por 21 antígenos localizados na glicoproteína banda 3 da membrana eritrocitária. Compreende 4 antígenos antitéticos Di^a/Di^b e Wr^a/Wr^b e 17 antígenos de baixa incidência populacional. O fenótipo Di^a resulta de uma mutação de ponto no nucleotídeo 2561 (T>C) que leva à substituição do aminoácido Prolina (Di^b) para Leucina (Di^a) na posição 854. O antígeno Di^b é um antígeno de alta incidência na população geral, enquanto que o antígeno Di^a é de baixa incidência em caucasianos, mas pode ser comum entre índios e japoneses.

A mutação 166A>G no gene *SLC4A1* (*AE 1*) que codifica a banda 3 dá origem a uma proteína variante, chamada banda 3-Memphis. Podem ser distinguidos dois tipos de banda 3 Memphis: variantes I e II. A banda 3 Memphis II está associada a presença do antígeno Di^a e apresenta maior afinidade de reação covalente com o H_2DIDS do que a Memphis I e a banda 3 normal.

De acordo com a literatura, o antígeno Di^a está sempre associado a presença da banda 3-Memphis, caracterizando a variante Memphis II. Entretanto, nenhum estudo de frequência dos alelos *DI A* e *166G* foi realizado até o momento.

Com a finalidade de determinar a frequência dos alelos *DI A/DI B* e da mutação 166A>G na população brasileira por métodos moleculares, estudamos 318 amostras de DNA de 4 diferentes populações (93 doadores voluntários de sangue, 71 descendentes de japoneses, 84 descendentes de africanos e 70 índios da tribo dos Parakanãs).

Nossos resultados demonstraram que existe forte associação entre os alelos *DI A* e 166G e que o alelo *DI A* pode também ocorrer sem o alelo 166G. Em nosso trabalho foram identificadas 4 formas alélicas da associação *DI / Memphis* na população brasileira: alelo *DI A*_{166A}, *DI A*_{166G}, *DI B*_{166A} e *DI B*_{166G}.

Os resultados da genotipagem *166A/G* demonstraram que a banda 3-Memphis é um polimorfismo comum entre as populações estudadas. Devido a alta frequência da mutação 166A>G encontrada, o alelo *166G* pode ser considerado como um bom marcador genético de populações não miscigenadas e que o alelo *166G* pode também ser considerado um protótipo do gene *SLC4A1*.

Além disso, considerando a importância clínica dos antígenos Di^a e Di^b , a possibilidade em determinar os genótipos *DI A/DI B*, poderá contribuir substancialmente na segurança transfusional e materno-fetal.



1. INTRODUÇÃO

A banda 3 é uma das mais importantes e numerosas glicoproteínas da membrana do eritrócito humano. Composta por 911 aminoácidos, possui um peso molecular de 95.000 daltons e compreende aproximadamente 1 milhão de cópias por membrana celular (FAIRBANKS, 1971).

Esta glicoproteína apresenta 2 domínios funcionalmente distintos: um domínio amino-terminal citoplasmático que desempenha papel crucial na manutenção da integridade celular por atuar como sítio de ligação com proteínas do citoesqueleto, enzimas glicolíticas e hemoglobina (LOW, 1986; JAY & CANTLEY, 1986, TANNER, 1997) ; e outro domínio carboxiterminal associado à membrana e que tem como principal função, direcionar o fluxo de anions bicarbonato (HCO_3^-) e cloro (Cl^-), através da membrana do eritrócito (TANNER, 1993; TANNER, 1997) (Figura 1).

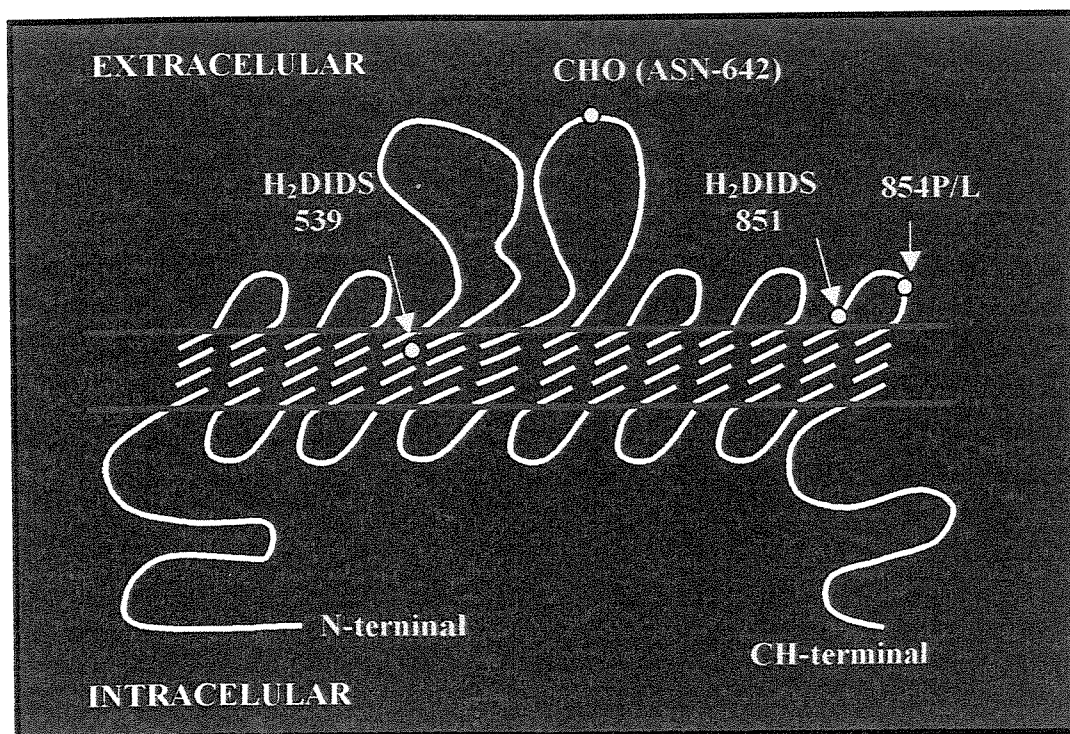


Figura 1. Modelo estrutural da banda 3 humana adaptado

Os estudos de função da banda 3 demonstraram que o canal de transporte de anions é formado por 2 resíduos de lysina (Lys539 e Lys851) que reagem covalentemente com a mesma molécula do inibidor de transporte de anions 4,4'-di-isotiocianato-1,2-difeniletano-2,2'-ácido dissulfonico (H₂DIDS) (OKUBO et al, 1994) (Figura 1).

O gene que codifica a glicoproteína banda 3 humana, chamado *SLC4A1* (*AE1*), está localizado no cromossomo 17q12-q21 e está organizado em 20 exons dentro de uma sequência genômica de 20 Kb (SHOWE et al, 1987; SOLOMON & LEDBETTER, 1990: Gen Bank - accession L35930).

O gene *SLC4A1* é altamente polimórfico e diversas formas variantes da banda 3 têm sido descritas na literatura (BRUCE et al, 1996). Estas variantes podem estar associadas: a alterações na sua atividade de transporte de anions, tais como a banda 3-Memphis (HSU & MORRISON, 1985) e a Banda 3 HT (High Transport) (BRUCE, 1993); a patologias tais como, Neuroacantocitose (HARDIE et al, 1991; KAY, 1991; KAY et al, 1991), Esferocitose hereditária (HS) (JAROLIM et al, 1992), Ovalocitose do sul da Ásia (SAO) (JAROLIM et al, 1991; MOHANDAS et al, 1992; SCHOFIELD et al, 1992; TANNER et al, 1997) bem como a expressão dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo Diego (DANIELS, 2001).

A variante da banda 3 mais comumente encontrada é a banda 3-Memphis que foi descrita pela primeira vez por MUELLER & MORRISON, 1977. Estes autores, verificaram através da digestão proteolítica de eritrócitos intactos e da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), a presença de uma variante da banda 3 com peso molecular aparentemente maior (63kD) que o da banda 3 normal (60kD) (figura 2). Os resultados de digestão com pronase sugeriram que o aumento do peso molecular da banda 3 Memphis poderia estar relacionado com a incorporação de um segmento adicional no domínio N-terminal citoplasmático da banda 3.

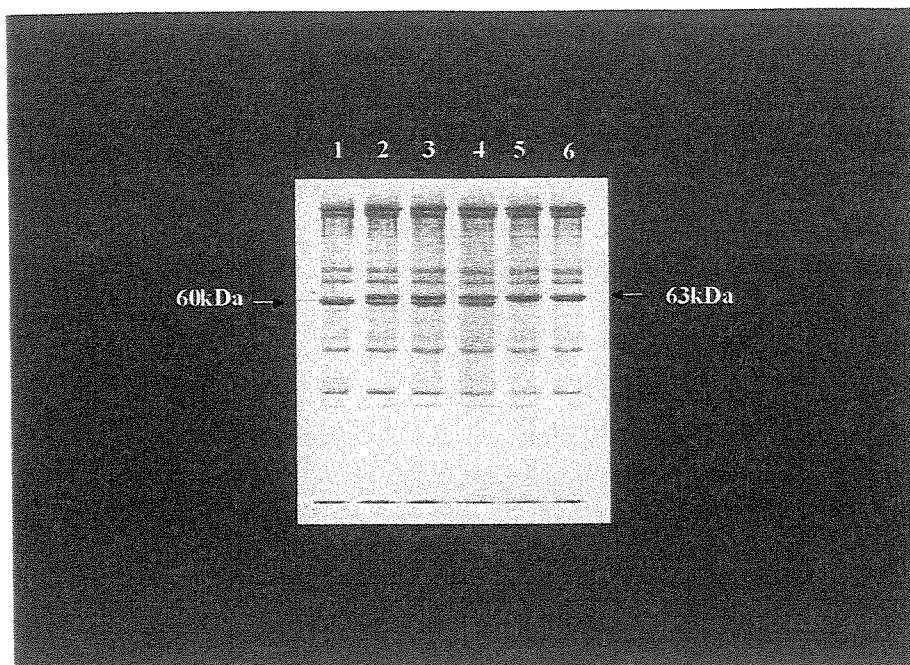


Figura 2: Eletroforese de membrana de eritrócitos humanos em SDS-PAGE, após digestão proteolítica com quimiotripsina.

Análises realizadas por **JAROLIM et al, 1992**, através do sequenciamento de cDNA de 12 indivíduos de diferentes grupos étnicos portadores da banda 3-Memphis, identificaram uma substituição no codon 56 da seqüência AAG para GAG (mutação 166A>G) responsável pela troca do resíduo de Lisina para ácido glutâmico (Lys56→Glu) na posição 56 da cadeia polipeptídica da banda 3. Estes mesmos autores demonstraram que a diferença de migração entre a banda 3 normal e banda 3-Memphis no SDS-PAGE era resultante apenas da troca Lys56→Glu e não pela incorporação de um segmento adicional como foi anteriormente descrito por **MUELLER & MORRISON, 1977**.

A banda 3-Memphis foi inicialmente detectada em 6-7% das amostras de sangue de doadores voluntários de sangue (**MUELLER & MORRISON, 1977**). Na população brasileira a Banda3-Memphis foi encontrada em 8% dos indivíduos de um grupo de caucasóides e 24% em negróides (**PALATNICK et al, 1990**). Em outras populações, as freqüências da banda 3-Memphis foram: 16,7% em afro-americanos, 18,5% em índios americanos, 29% em japoneses, 13% em chineses e 17,3% em filipinos (**RANNEY H. N., 1990; IDEGUCHI et al, 1992**).

Apesar da banda 3-Memphis ser uma forma variante assintomática da banda 3, ela também está relacionada com outras importantes mutações do gene *SLC4A1*: a banda 3 Tuscaloosa associada a Esferocitose hereditária (HS) (JAROLIM et al, 1992) e a deleção dos codons 400–408 associada a Ovalocitose do sul da Ásia (SAO) (JAROLIM et al, 1991).

Pela afinidade de reação com inibidores de transporte de anions, dois tipos de banda 3-Memphis, variante I e variante II, podem ser distinguidas. A proteína banda 3-Memphis variante II apresenta maior afinidade de reação covalente com o H₂DIDS do que a banda 3-Memphis variante I e banda 3 normal (HSU & MORRISON, 1985).

SPRING et al, 1992 observaram a associação da banda 3-Memphis variante II com a expressão do antígeno Di^a (antígeno de baixa incidência do sistema de grupo sanguíneo Diego), quando examinavam a afinidade da reação entre H₂DIDS em eritrócitos com diferentes fenótipos Diego: Di(a-b+), Di(a+b+) e Di(a+b-). Estes autores, afirmaram que os eritrócitos com o fenótipo Di(a+) estão sempre associados com a banda 3-Memphis, caracterizando a variante II, mas nem sempre a presença da banda 3-Memphis está associada ao fenótipo Di(a+) (Figura 3).

A associação entre o antígeno Di^a e a banda 3-Memphis variante II foi também observada por BRUCE et al, 1994, quando relacionaram o polimorfismo Di^a/Di^b com a troca dos aminoácidos Prolina854→Leucina na cadeia polipeptídica da banda 3 (figura 3) e os efeitos destas alterações sobre a reatividade com H₂DIDS.

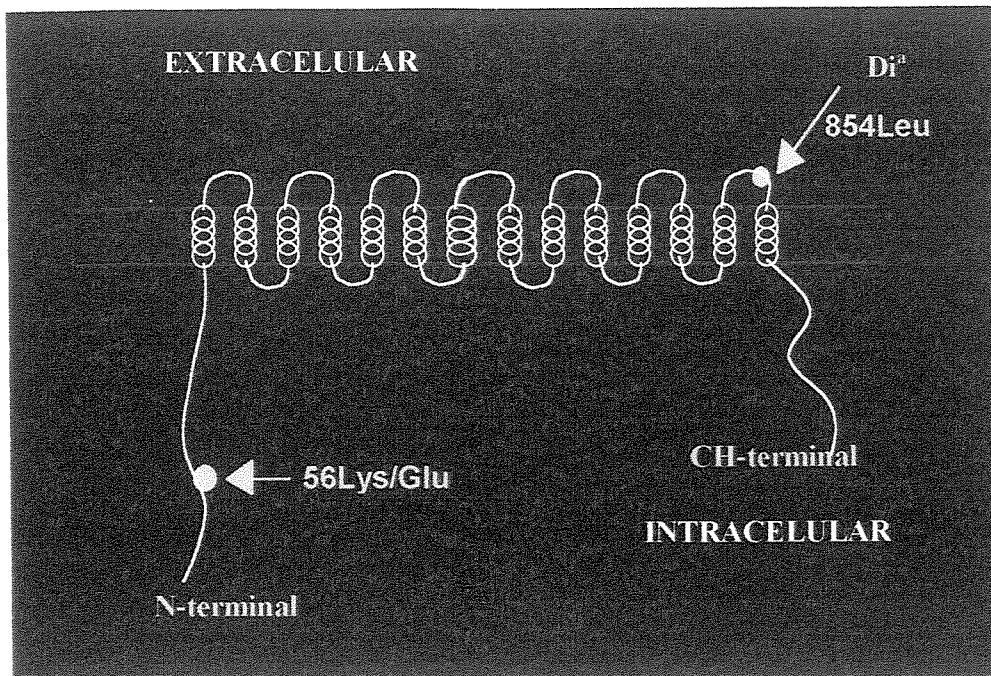


Figura 3. Banda 3: Representação esquemática da associação do antígeno Diª e polimorfismo Memphis (56Lys/Glu).

O antígeno Diª é considerado um importante marcador antropológico, por ser um antígeno comum em descendentes de Chineses, Japoneses e Índios e estar ausente em outras populações (LAYRISSE et al, 1955; LAYRISSE et al, 1956).

No Brasil, a frequência do antígeno Diª foi estudada em diversas tribos indígenas e os resultados encontrados variavam entre: 45,8% dos Índios Kaiagangues e 36,1% dos índios Carajás (JUNQUEIRA et al, 1956); 36,3% nos índios da tribo dos Xavantes (GERSHOWITZ et al, 1967). O antígeno Diª, seu par antitético, apresenta alta incidência em todas as populações analisadas (THOMPSON PR, 1967). O antígeno Diª, está mais freqüentemente envolvido em reações hemolíticas transfusionais e na doença hemolítica do recém nascido (LAYRISSE et al, 1955; ISSITT & ANSTEE, 1998).

O sistema de grupos sanguíneos Diego era constituído até 1993, por um único par de antígenos antitéticos (Diª e Diª). Após o sequenciamento do gene *SLC4A1* da Banda 3 (LUX, 1989; TANNER, 1988) e a descoberta da localização dos alelos *DI A* e *DI B*

(BRUCE et al, 1994), novos antígenos foram incorporados a este sistema. Atualmente, este sistema é composto por dois pares de antígenos antitéticos: Di^a/Di^b e Wr^a/Wr^b e mais 17 antígenos de baixa incidência populacional (JAROLIM et al, 1998; ZELINSKI et al, 1998; DANIELS, 2001) (figura 4).

O polimorfismo Di^a/Di^b resulta da substituição de um único aminoácido na 7ª alça extracelular, entre os segmentos intramembranários 13 e 14, da proteína banda 3 (troca do nucleotídeo 2561C>T no gene *SLC4A1*). A expressão do antígeno Di^a é determinada pela presença de Leucina na posição 854 (Figura 3), enquanto que a expressão do antígeno Di^b é caracterizada pela presença de Prolina na mesma posição da cadeia polipeptídica da banda 3 (BRUCE et al, 1994).

Tendo em vista, o envolvimento da banda 3-Memphis com diferentes patologias, a importância clínica e antropológica do antígeno Di^a , bem como a associação entre estes dois polimorfismos da banda 3, a realização de estudos que possam determinar a frequência e a associação destes polimorfismos em diferentes populações, pode ser importante na identificação de novos alelos, na associação com doenças e no processo de identificação de anticorpos do sistema Diego.

Apesar de existirem na literatura, estudos populacionais da frequência da banda 3-Memphis (MOURANT, 1976) estes estudos baseiam-se no fenótipo dos indivíduos, analisados pela técnica de SDS-PAGE. Até o presente momento, não encontramos estudos da frequência de associação desta variante com outros polimorfismos da banda 3. Da mesma forma, os estudos de frequência dos antígenos Di^a e Di^b foram realizados apenas por técnicas sorológicas que dependem da disponibilidade de antisoros raros, tornando na maioria das vezes inviável a detecção do seu par antitético, o antígeno Di^b .

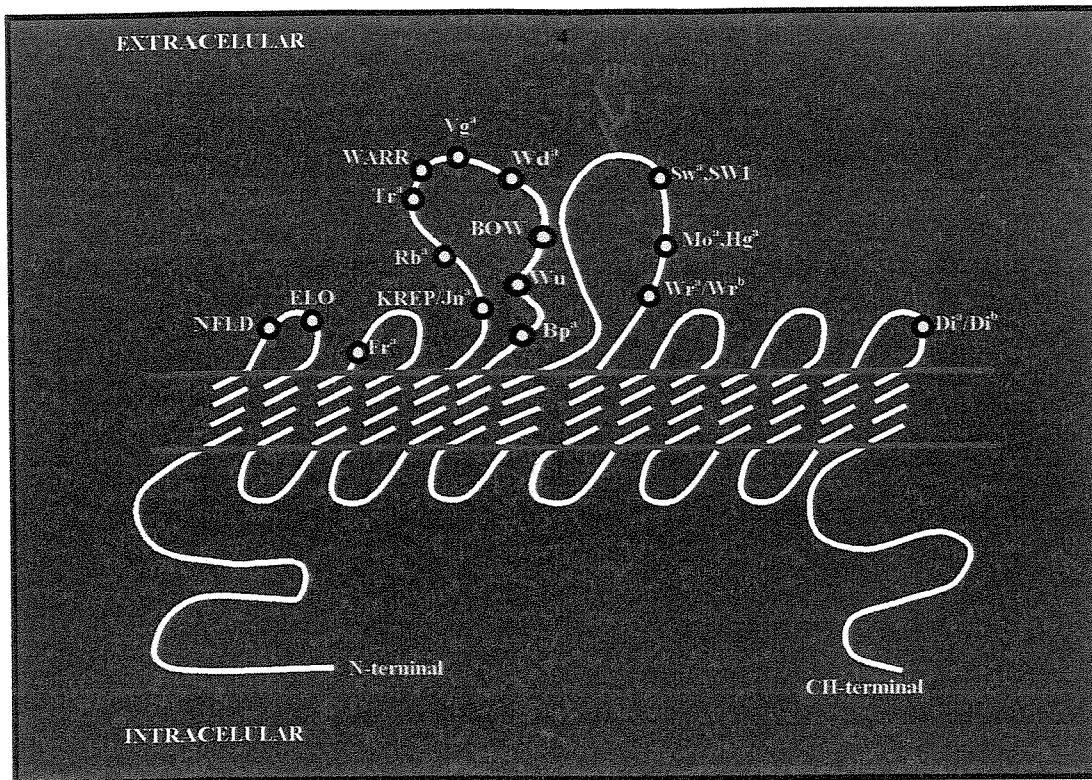


Figura 4. Representação esquemática da localização dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo Diego

Considerando que os procedimentos técnicos utilizados nos estudos de frequência da banda 3-Memphis e antígeno Di^a são complexos, dispendiosos e às vezes até mesmo inviáveis, o uso de técnicas de genotipagem molecular pode proporcionar maior segurança nos estudos de frequência destes polimorfismos.

Os avanços tecnológicos no diagnóstico molecular e a clonagem e sequenciamento do gene *SLC4A1* que codifica a banda 3, permitem identificar com segurança a mutação 166A>G responsável pelo polimorfismo Memphis e os genes alelos *DI A/DI B* utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida da análise de fragmento de restrição (RFLP) (SAMBROOCK, 1989).



2. OBJETIVOS

Considerando a importância clínica e antropológica do antígeno Di^a e sua associação com a banda 3-Memphis e o fato de não existir na literatura estudos de frequência dos alelos $DI A/DI B$, 166G e da associação $DI A/166G$ foram nossos objetivos:

1. Determinar a frequência dos alelos $DI A/DI B$ e da mutação 166A>G (banda 3-Memphis) em doadores voluntários de sangue, Índios, descendentes de Japoneses e descendentes de Africanos
2. Verificar a ocorrência da associação entre os alelos $DI A/166G$ nestas 4 populações brasileiras.



3. MATERIAL E MÉTODOS

A . MATERIAL

1. AMOSTRAS

a) Amostras de sangue de doadores voluntários de sangue

Após consentimento informado, foram coletadas 93 amostras de sangue, anticoaguladas com EDTA, de doadores voluntários de sangue de Marília e região atendidos no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília, nos meses de janeiro a fevereiro de 2000. Estas amostras foram previamente fenotipadas para o antígeno Di^a.

b) Amostras de sangue de descendentes de Japoneses

Após consentimento informado, foram coletadas 71 amostras de sangue, anticoaguladas com EDTA, de descendentes de Japoneses de Marília e região que foram convidados a participar deste estudo. Estas amostras foram previamente fenotipadas para o antígeno Di^a.

c) Amostras de sangue de descendentes de Africanos

Após consentimento informado, foram coletadas 84 amostras de sangue, anticoaguladas com EDTA, de pacientes portadores de anemia falciforme atendidos no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília e no Hemocentro da UNICAMP. Estas amostras foram previamente fenotipadas para o antígeno Di^a.

d) Amostras de sangue de Índios

Foram coletadas 70 amostras de sangue, anticoaguladas com EDTA, de índios pertencentes à tribo Parakanã, localizada no estado do Pará, em abril de 1995. Estas amostras foram fenotipadas para o antígeno Di^a por testes de hemaglutinação em tubo e o DNA extraído de leucócitos de sangue periférico foi armazenado à -20⁰C.

2. ANTI-SOROS

Os anti-soros empregados na determinação do antígeno Di^a foram:

- anti-Di^a (lotes DIA24A e DIA27A, Gamma Biologicals Inc.®, Houston, TX)
- antiglobulina humana monoespecífica (lotes 714810 e 104910, Diamed AG, Morat, Switzerland)

3. SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS A 3%

Foram preparadas suspensões de hemácias a 3% em solução fisiológica. Após lavar 3 vezes as hemácias em solução fisiológica, usando centrifugação a 3400 rpm durante 30 segundos, a cada vez, 90µl do concentrado de hemácias obtido foi resuspenso em 3 ml de solução fisiológica.

4. SOLUÇÃO DE CLORETO DE AMÔNIO 0,144 M

A Solução de Cloreto de Amônio 0,144 M foi preparada dissolvendo-se 7,704g de NH_4Cl em 1000 ml de H_2O destilada.

5. SOLUÇÃO DE BICARBONATO DE AMÔNIO 0,01 M.

A Solução de Bicarbonato de Amônio 0,01 M foi preparada dissolvendo-se 0,79g de NH_4HCO_3 em 100 ml de H_2O destilada.

6. TAMPÃO DE LISE

O tampão de lise para extração de DNA foi preparado a partir da diluição de 40 ml da solução de NH_4HCO_3 em 400 ml da solução de NH_4Cl .

7. DNAzol

Solução utilizada na extração de DNA de leucócitos de sangue periférico (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD).

8. dNTP 10 mM

Os nucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP foram obtidos da Promega®, Madison, WI e Gibco BRL®, Gaithersburg, MD. A concentração de dNTP 10 mM utilizadas nas reações de PCR foi obtida diluindo-se 20 µl de cada nucleotídeo em 120 µl de água deionizada e destilada (ddH₂O).

9. TAQ DNA POLYMERASE

As enzimas Taq DNA polymerase, utilizadas nas reações de PCR, foram obtidas da Promega®, Madison, WI e Gibco BRL®, Gaithersburg, MD. 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 1 ml de MgCl₂ 50 mM.

10. TAMPÃO TRIS-ACETATO-EDTA (TAE) 50X

Este tampão foi preparado, dissolvendo-se 242 g de Tris (Sigma Chemical CO® St Louis), 57,1 g de ácido acético glacial (Sigma Chemical CO® St Louis) e 100 ml de EDTA 0,5 M, pH 8.0 (Sigma Chemical CO® St Louis), em 1000 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

11. TAMPÃO TRIS-ACETATO-EDTA (TAE) 1X

O tampão TAE 1X foi preparado diluindo-se 20 ml de TAE 50X em 980 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

12. GEL DE AGAROSE A 1,5%

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 1,5 g de agarose (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD) em 100 ml de TAE 1X. Esta solução era aquecida em forno de microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, adicionava-se 50 µg de brometo de etídio (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD).

13. GEL DE AGAROSE A 3%

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 3 g de agarose (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD) em 100 ml de TAE 1X. Esta solução era aquecida em forno de microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, adicionava-se 50 µg de brometo de etídio (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD).

14. GEL DE AGAROSE GTG® A 5%

A solução de agarose a 5% foi preparada dissolvendo-se 5 g de agarose GTG Nufieve® em 100 ml de TAE 1X. Esta solução era aquecida em forno de microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, adicionava-se 50 µg de brometo de etídio (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD).

15. MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares de 25 pb, 50 pb e 100 pb, foram obtidos da Gibco BRL®, Gaithersburg, MD.

16. ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As enzimas *Mnl* I, *Msp* I foram obtidas da New England Biolab®, MBI Fermentas®, Amherst, NY.

17. AZUL DE COMMASSIE 0,25%

Este tampão foi preparado, dissolvendo-se 25 g (Sigma Chemical CO® St Louis) em 1000 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

B. MÉTODOS

1. FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA

A fenotipagem eritrocitária foi realizada pelo teste de hemaglutinação em tubos de vidro, utilizando-se os anti-soros comerciais anti-Di^a e antiglobulina humana poliespecífica. Após a identificação dos tubos, foram dispensados 50 µl de hemácias em teste a 3% em solução fisiológica em cada tubo identificado com o número correspondente ao da amostra. A seguir, 25 µl do anti-soro anti-Di^a foi adicionado a cada tubo. Após a incubação de 30 minutos a 37°C em banho maria, a reação de cada tubo foi lavada por 3 vezes e só então, após a terceira lavagem, foi adicionada a antiglobulina humana e os tubos submetidos a centrifugação a 3400 rpm por 15 segundos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação das hemácias (Figura 5)

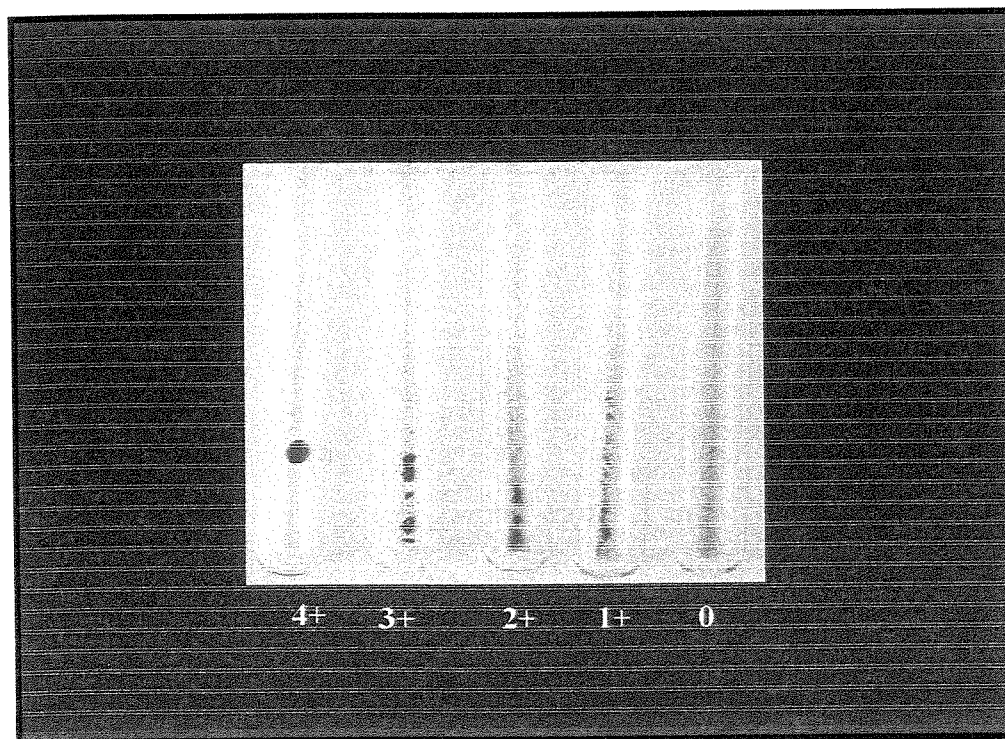


Figura 5: Padrões de leitura de hemaglutinação em tubo

3. EXTRAÇÃO DE DNA

As extrações de DNA foram realizadas utilizando-se um tubo cônico de plástico (Falcon) com volume de 15 ml, onde uma alíquota de 1 ml de cada amostra de sangue coletado em EDTA, era centrifugada a 3400 rpm, por 20 minutos. Após a centrifugação o plasma sobrenadante era retirado. Ao tubo Falcon adicionava-se tampão de lise até a marca de 13 ml e homogeneizava-se a mistura por inversão, para ocorrência da lise dos leucócitos e hemácias. Após a lise celular, nova centrifugação a 3400 rpm por 20 minutos era realizada para retirada do sobrenadante. Este processo de adição do tampão de lise e centrifugação era repetido até que o sobrenadante estivesse livre de hemólise, deixando no fundo do tubo apenas o pellet de DNA. Após a lise, adicionava-se 1 ml de DNAzol (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD) ao pellet incubando-se a mistura por 12 horas a temperatura ambiente.

4. PRECIPITAÇÃO DO DNA COM ETANOL.

Para precipitação do DNA, adicionava-se ao tubo Falcon, sem retirar o DNAzol (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD), etanol absoluto até a marca de 13 ml e aguardava-se 20 minutos a precipitação do DNA. Após a precipitação, o DNA era transferido para um tubo de 1,5 ml e então era adicionado a este tubo, 1 ml de etanol a 70% . Homogeneizava-se a reação e então centrifugava-se a 3400 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação o etanol sobrenadante era desprezado por inversão do tubo, deixando escorrer o excesso de sobrenadante sobre um papel limpo e absorvente. Após o processo de precipitação, o DNA era suspenso em 100 µl de H₂O esteril. A concentração e a qualidade de todos os DNAs preparados foram analisadas. A quantidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose (**Figura 6**) e a concentração de DNA foi determinada pela medida da densidade ótica em espectrofotômetro a 260 nm.

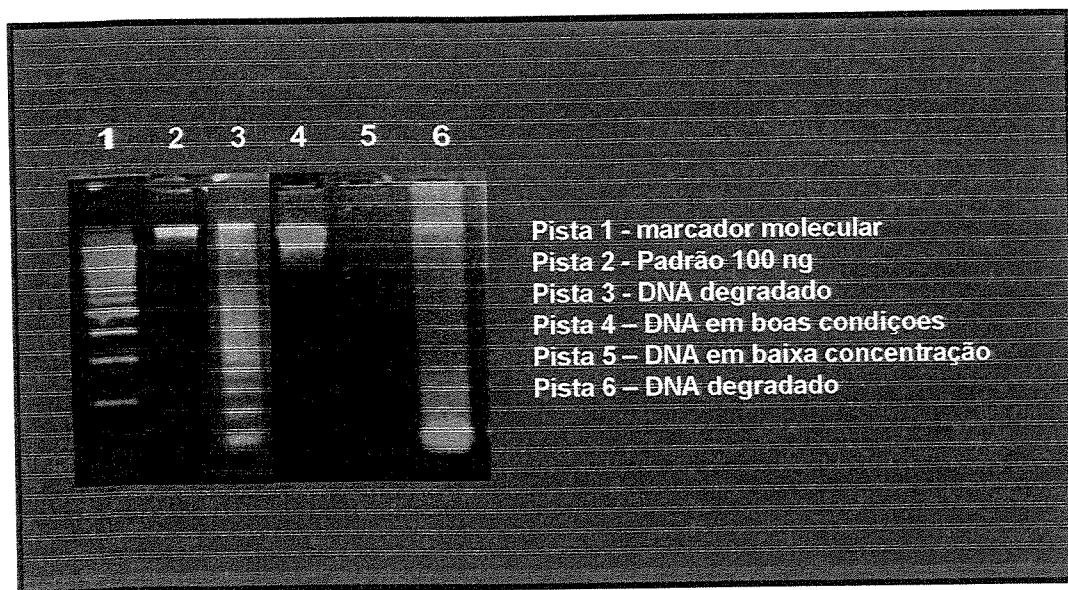


Figura 6. Análise qualitativa de DNA em gel de agarose a 1%

5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da Polimerase (PCR), utiliza 20 a 200 ng de DNA, 50 pmol de cada *primer*, 2 nmol de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase e tampão em um volume final de 50 µl.

Os ciclos de amplificação foram realizados em um termo ciclador Perkin Elmer 9700 (Foster City, CA). O mesmo protocolo foi utilizado para todos os ensaios: desnaturação a 95 °C por 15 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94 °C; 20 segundos a 62 °C; 20 segundos a 72 °C e uma extensão de 10 minutos a 72 °C.

6. ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DE PCR APÓS DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Os produtos de PCR amplificados foram digeridos *overnight* com as enzimas de restrição *Msp* I e *Mnl* I (New England Biolab®, MBI Fermentas®, Amherst, NY) em um volume final de 20 µl, utilizando 10 µl do produto do PCR e, 10 µl da mistura de enzima/tampão, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A análise do tamanho dos fragmentos obtidos com digestão enzimática foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 3% ou gel de agarose GTG® a 5%.

7. GENOTIPAGEM *DI A* (PCR-RFLP)

A genotipagem *DI A/DI B* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se *primers* compostos por 20 pb cada um, cujo produto amplificado era um fragmento com 149 pb do exon 18 do gene *AEI*. O produto obtido por PCR, foi submetido a (clivagem) ação da enzima de restrição *Msp* I que reconhecia como sítio de restrição a sequência 5'...C↓CGG...3' do codon 854, que é a base molecular do alelo *DI B*. Como resultado da ação da enzima *Msp* I eram produzidos dois fragmentos de restrição, um fragmento com 79 pb e outro fragmento com 70 pb, que demonstravam diferentes padrões de migração quando submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% ou gel de agarose GTG® a 5% (Figura 7). As seqüências dos primers utilizados encontram-se na tabela 1.

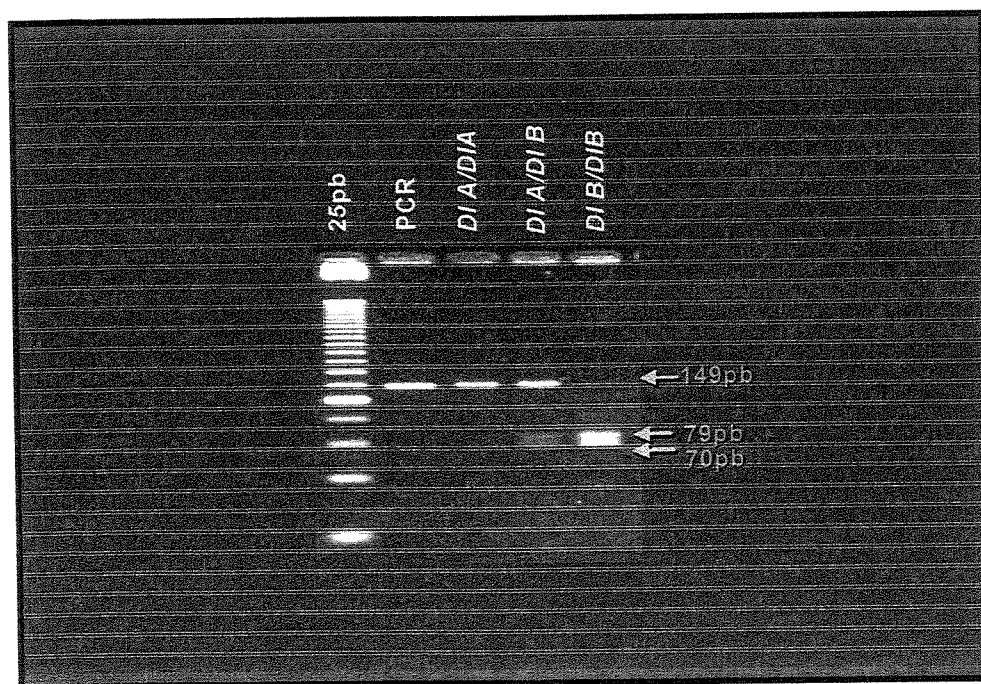


Figura 7: PCR-RFLP para genotipagem *DI A/DI B*

8. GENOTIPAGEM *MEMPHIS* (PCR-RFLP)

Para a genotipagem *MEMPHIS* (166A>G) foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers que amplificavam um fragmento de 84 pb do exon 3 do gene *AEI* (ANEXO 1). O produto obtido por PCR, foi submetido a (clivagem) ação da enzima de restrição *Mnl* I que reconhece como sítio de restrição a sequência 5'...CCTC(N)₇↓...3', complementar ao codon 56GAG (*MEMPHIS*). Como resultado da ação da enzima *Mnl* I, são produzidos dois fragmentos de restrição, um fragmento com 57 pb e outro fragmento menor com 27 pb, que demonstram diferentes padrões de migração quando submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% ou gel de agarose GTG® a 5% (Figura 8). As seqüências dos primers utilizados encontram-se na tabela 1.

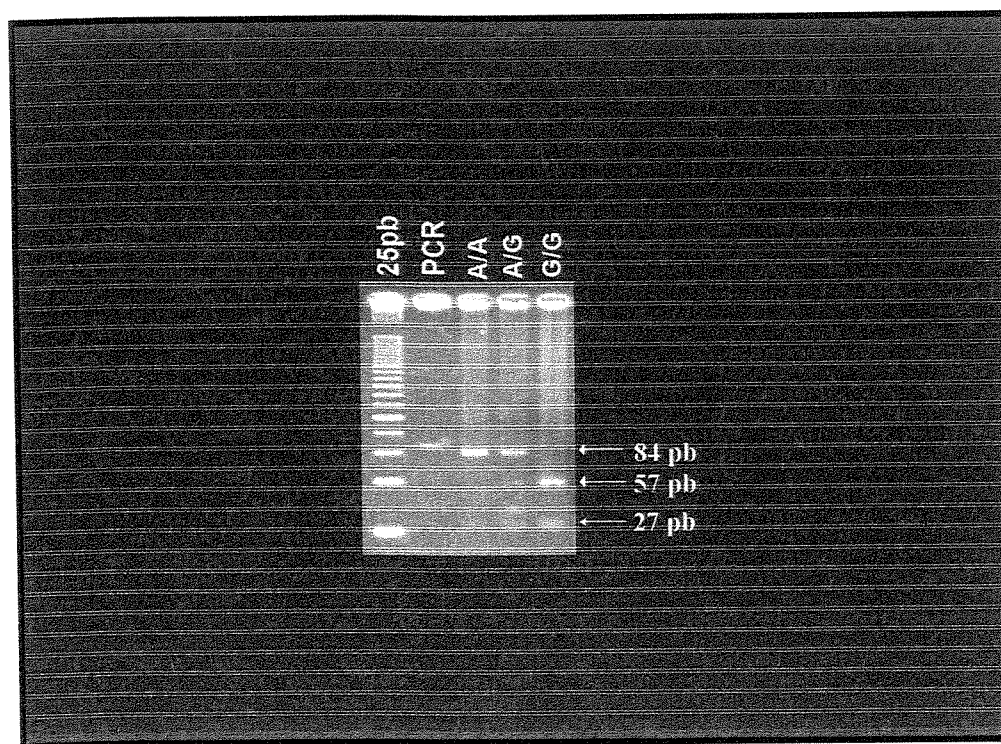


Figura 8: PCR-RFLP para genotipagem Memphis

9. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA

A eletroforese de proteínas foi realizada pelo sistema de Fairbanks (FAIRBANKS et al, 1971): 30µg de proteínas de membrana solubilizadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida utilizando-se um gradiente de 3.5% a 17%. As proteínas foram visualizadas após coloração do gel com azul de Commassie 0,25%.

10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com a finalidade de avaliar se existe diferença significativa entre as frequências encontradas, calcularam-se os intervalos de confiança de 95% para a diferença entre as proporções de cada um dos grupos. Dizemos que as diferenças são estatisticamente significativas se o intervalo de confiança não contém o valor nulo (zero). Caso contrário, não podemos afirmar que as proporções sejam significativamente diferentes. Neste caso, calculamos os intervalos de confiança para os níveis de significância 1% e 5% (BHATTACHARYYA & JOHNSON 1977)

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados nas genotipagens *DI A/DI B* e Memphis.

Primers	Sequências	Mutação
EX18S	5'-TGG CGC ATG CAC TTA TTC AC-3'	2561 C>T
EX18R	5'-TTC CTG AAG ATG AGC GGC AG-3'	
EX3S	5'-TTC AGC TCA CGA CAC CGA GG-3'	166 A>G
EX3R	5'-GAG GCT GGG GTC CTC ACC T-3'	



4. RESULTADOS

A. RESULTADOS DA GENOTIPAGEM DIEGO

Com o objetivo inicial de padronizar as técnicas moleculares da genotipagem Diego, comparamos os resultados obtidos na genotipagem do alelo *DI A* com os resultados da fenotipagem do antígeno Di^a . A fenotipagem do antígeno Di^b é difícil de ser realizada, devido a indisponibilidade de antisoro anti- Di^b . Para a validação das técnicas, empregamos 318 amostras de sangue e DNA de quatro populações brasileiras, com antecedentes étnicos distintos: 93 doadores voluntários de sangue, 84 descendentes de africanos, 71 amostras de descendentes de japoneses e 70 amostras de índios da tribo Parakanã.

Houve 100% de concordância entre os resultados da fenotipagem e da genotipagem nestas amostras, demonstrando que o nosso protocolo de genotipagem Diego poder ser aplicado nas populações estudadas.

Os resultados da genotipagem dos alelos *DI A* e *DI B* nas 318 amostras de DNA estudadas estão apresentados na **tabela 2**. Das 93 amostras dos doadores de sangue, 90 (96,8%) apresentaram o genótipo homozigoto *DI B/DI B* e 3 (3,2%), apresentaram o genótipo *DI A/DI B*. Das 84 amostras dos descendentes de africanos, 83 (98,8%) apresentaram o genótipo *DI B/DI B* e 1 (1,19%) o genótipo *DI A/DI B*. Entre as 71 amostras de DNA dos descendentes de japoneses, 62 (87,3%) apresentaram o genótipo *DI B/DI B*, 8 (11,3%) eram *DI A/DI B* e 1 (1,4%) era *DI A/DI A*. Das 70 amostras de DNA de índios, 17 (24,3%) apresentaram o genótipo homozigoto *DI B/DI B*, 26 (37,1%) apresentaram o genótipo *DI A/DI B* e 27 (38,6%) eram *DI A/DI A*.

Os resultados da frequência dos alelos *DI A* e *DI B* estão apresentados na **tabela 2**. A frequência do alelo *DI A* (0,571) encontrada na população indígena foi superior à frequência encontrada nos doadores de sangue (0,016), descendentes de africanos (0,006) e descendentes de japoneses (0,07). A frequência do alelo *DI B*, encontrada em doadores de sangue (0,984), descendentes de africanos (0,994) e descendentes de japoneses (0,929) foi mais alta que a encontrada entre os índios (0,428) (**Gráfico 1**).

Tabela 2: Resultados da genotipagem Diego

População estudada	Genótipo Diego				Frequência gênica	
	DI A/DI A	DI A/DI B	DI B/DI B	Total	DI A	DI B
Doadores de sangue	0	3	90	93	0,016	0,984
Descendentes Africanos	0	1	83	84	0,006	0,994
Descendentes Japoneses	1	8	62	71	0,070	0,929
Índios Parakanãs	27	26	17	70	0,571	0,428

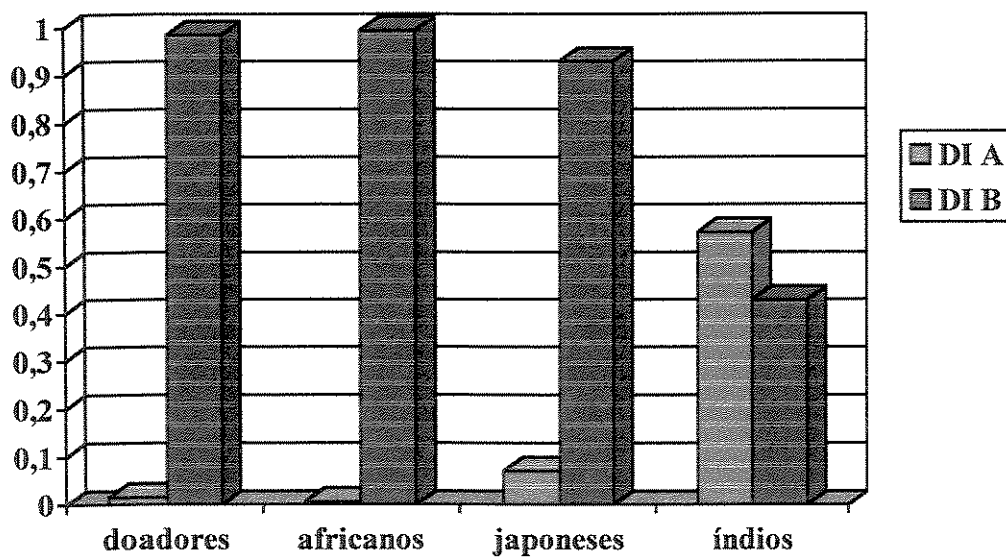


Gráfico 1: Frequência gênica dos alelos *DI A/DI B*

De acordo com a análise estatística comparativa da frequência dos alelos *DI A/DI B* entre as populações estudadas, existe diferença significativa entre as populações, doadores x índios, descendentes de africanos x índios, descendentes de japoneses x índios. A análise estatística demonstra também que não existe diferença significativa da frequência destes alelos entre as populações de doadores x descendentes de japoneses, doadores x descendentes de africanos e descendentes de africanos x descendentes de japoneses (tabelas 15 e 16-apêndice).

B. RESULTADOS DA GENOTIPAGEM MEMPHIS

A genotipagem Memphis foi realizada nas 318 amostras de DNA obtidas das populações estudadas. Os resultados encontram-se na **tabela 3**. Das 93 amostras de doadores, 6 (6,4%) apresentaram a mutação 166A>G em heterozigose e 1 (1,1%) em homozigose. Das 84 amostras de DNA dos descendentes de africanos, 11 (13,09%) eram heterozigotas (166A/G) e 2 (2,5%) homozigotas (166G/G). Entre as 71 amostras de DNA dos descendentes de japoneses, 21 (29,6%) apresentaram a mutação 166 A>G em heterozigose e 3 (4,2%) em homozigose. Trinta (42,9%) das 70 amostras de DNA dos índios Parakanãs, foram heterozigotas (166A/G) e 23 (32,8%) homozigotas (166G/G).

Tabela 3: Resultados da genotipagem Memphis

População Estudada	Genótipo Memphis				Frequência gênica	
	166 A/A	166 A/G	166 G/G	Total	166A	166G
Doadores de sangue	86	6	1	93	0,957	0,043
Descendentes Africanos	71	11	2	84	0,910	0,089
Descendentes Japoneses	47	21	3	71	0,810	0,190
Índios Parakanãs	17	30	23	70	0,457	0,543

A frequência do alelo *166G* variou consideravelmente entre as populações estudadas. A maior frequência deste alelo (0,543) foi encontrada entre os índios da tribo Parakanã, correspondendo a 12 vezes a frequência observada em caucasianos (0,043), 5 vezes a frequência observada entre os descendentes de africanos (0,094) e, 3 vezes à frequência encontrada entre os descendentes de japoneses (0,190) (Gráfico 2).

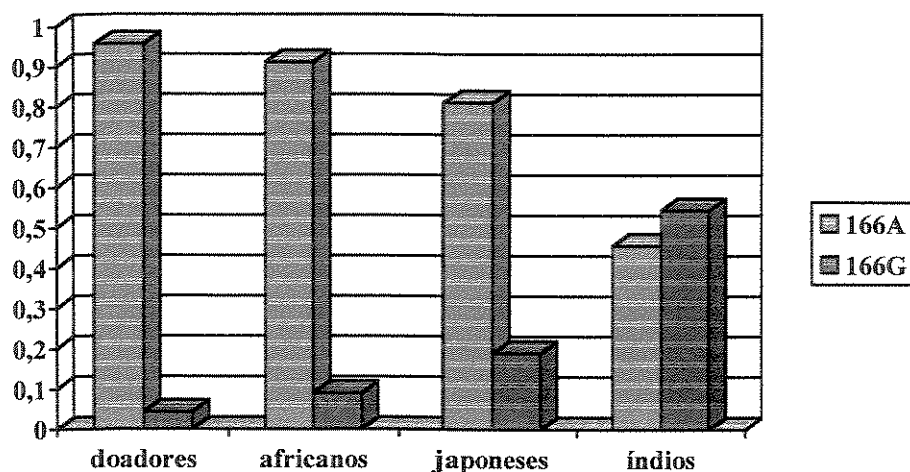


Gráfico 2: Frequência gênica dos alelos *166A* e *166G*

De acordo com a análise estatística comparativa da frequência dos alelos *166A* e *166G* entre as populações estudadas, existe diferença significativa entre as populações de doadores x descendentes de japoneses, doadores x índios, descendentes de africanos x índios, descendentes de japoneses x índios. A análise estatística demonstra também que não existe diferença significativa entre a frequência destes alelos nas populações de doadores x descendentes de africanos e descendentes de africanos x descendentes de japoneses (tabelas 17 e 18 -apêndice).

C. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DIEGO/MEMPHIS

Com o objetivo de verificar a associação entre os alelos *166G* e *DI A* nas populações estudadas foram analisados os resultados obtidos nas genotipagens Memphis e Diego.

C.1. AMOSTRAS DE DNA OBTIDAS DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE

Os resultados da associação Diego/Memphis nas amostras de DNA obtidas de doadores voluntários de sangue encontram-se na **Tabela 4**. A análise dos resultados demonstrou que 3 doadores apresentam a associação *DI A / 166G*. O alelo *166G* foi também encontrado em 4 doadores genotipados como *DI B/DI B*.

Tabela 4: Associação entre os genótipos Diego e Memphis em doadores de sangue

Genótipo Diego	Genótipo Memphis			Total
	166 A/A	166 A/G	166 G/G	
DI A/DI A	0	0	0	0
DI A/DI B	0	2	1	3
DI B/ DI B	86	4	0	90
Total	86	6	1	93

C.2. AMOSTRAS DE DNA OBTIDAS DE DESCENDENTES DE AFRICANOS

Os resultados da associação Diego/Memphis nas amostras de DNA obtidas de descendentes de africanos estão representados na **tabela 5**. A associação foi observada em uma amostra genotipada como *DI A/DI B*. O alelo 166 G foi também encontrado em 12 amostras genotipados como *DI B/DI B*.

Tabela 5: Associação entre os genótipos Diego e Memphis em descendentes de africanos

Genótipo Diego	Genótipo Memphis			Total
	166 A/A	166 A/G	166 G/G	
DI A/DI A	0	0	0	0
DI A/DI B	0	1	0	1
DI B/ DI B	71	10	2	83
Total	71	11	2	84

C.3. AMOSTRAS DE DNA OBTIDAS DE DESCENDENTES DE JAPONESES

Os resultados da associação Diego/Memphis nas amostras dos descendentes de japoneses encontram-se na **tabela 6**. A associação foi observada em uma amostra genotipada como *DI A/DI A* e em 8 amostras genotipadas como *DI A/DI B*. O alelo 166 G foi observado em 15 amostras genotipadas como *DI B/DI B*.

Tabela 6: Associação entre os genótipos Diego e Memphis em descendentes de japoneses

Genótipo Diego	Genótipo Memphis			Total
	166 A/A	166 A/G	166 G/G	
DI A/DI A	0	0	1	1
DI A/DI B	0	7	1	8
DI B/ DI B	47	14	1	62
Total	47	21	3	71

C.4. AMOSTRAS DE DNA OBTIDAS DE ÍNDIOS PARAKANÃS

Os resultados da associação Diego/Memphis nas amostras de DNA obtidas de índios estão representados na **tabela 7**. A associação foi observada em 27 amostras genotipadas como *DI A/DI A* e 26 amostras genotipadas como *DI A/DI B*. Em 17 amostras genotipadas como *DI B/DI B*, não foi encontrado o alelo 166 G. É importante salientar que entre as 27 amostras *DI A/DI A*, 4 (5,7%) apresentaram o genótipo Memphis em heterozigose (*166A/G*), ou seja o alelo *DI A* não associado ao alelo 166G.

Tabela 7: Associação entre os genótipos Diego e Memphis em Índios

Genótipo Diego	Genótipo Memphis			Total
	166 A/A	166 A/G	166 G/G	
DI A/DI A	0	4	23	27
DI A/DI B	0	26	0	26
DI B/ DI B	17	0	0	17
Total	17	30	23	70

D. RESULTADOS DA ANÁLISE DA PROTEÍNA BANDA 3 POR ELETROFORESE

Com o objetivo de verificar a influência do alelo *166G* associado ou não ao alelo *DI A* na mobilidade eletroforética da proteína banda 3, foram analisadas amostras com diferentes genótipos Diego e Memphis: *DI A/DI B* e *166 A/G*, *DI A/DI B* e *166 G/G*, *DI B/DI B* e *166 A/G*, *DI B/DI B* e *166 A/A* e *DI B/DI B* e *166 G/G*. Foi observado um padrão difuso na migração eletroforética da proteína banda 3 quando o alelo *DI A* está presente, independentemente do genótipo Memphis. Estes resultados demonstram que somente a presença do alelo *166G* não interfere na migração da proteína banda 3 (Figura 9).

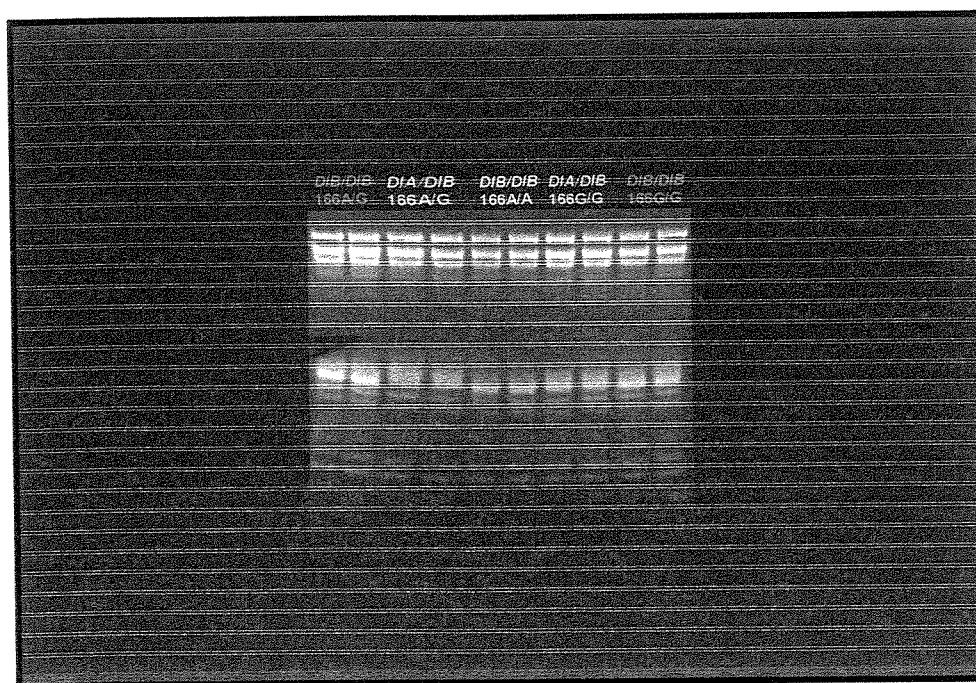


Figura 9: Eletroforese de proteínas



5. DISCUSSÃO

A. FREQUÊNCIA DO ANTÍGENO Di^a

Desde as primeiras publicações sobre o sistema de grupos sanguíneos Diego, o antígeno Di^a já era apontado como um importante marcador antropológico de populações indígenas (LAYRISSE et al, 1955) e asiáticas (LAYRISSE, 1956). O nosso estudo também demonstra uma estreita relação do fenótipo Di (a+) com as populações indígenas e asiáticas. Ao analisarmos os dados da literatura, verificamos que a frequência do antígeno Di^a (75,7%) por nós encontrada nos Índios Parakanãs foi superior a maior frequência já publicada (45,8%) que foi a observada na tribo dos índios Kaingangues por JUNQUEIRA et al, 1965 (Tabela 8).

Tabela 8: Frequências do antígeno Di^a encontradas em populações indígenas

Autores	Populações estudadas	N ^o amostras	Di(a+)	
			N	Frequência
Levine et al, 1956	Carib (Venezuela)	121	43	0,355
Levine et al, 1956	Arauwaco (Venezuela)	152	8	0,052
Junqueira et al, 1956	Kaingangues (Brasil)	48	22	0,458
Lewis et al, 1956	Chippewa (USA)	148	16	0,108
Allen et al, 1960	Penobscots (USA)	249	20	0,080
Neal et al, 1964	Xavantes (Brasil)	78	24	0,270
Cann et al, 1968	Mayan (Guatemala)	255	57	0,223
Presente Trabalho	Parakanãs (Brasil)	70	53	0,757

Nos descendentes de japoneses, a frequência do antígeno Di^a (12,7%) foi duas vezes maior que a frequência encontrada por CERQUEIRA et al, 1968 em japoneses do Brasil, próxima a frequência (12,3%) encontrada por LAYRISSE et al, 1956 em descendentes de japoneses da Venezuela e, superior (7,5%) a observada por YOKOYAMA et al, 1960 e TSUCHIYA et al, 1964 em japoneses do Japão (Tabela 9).

Tabela 9: Freqüências do antígeno Di^a encontradas em japoneses e descendentes

Autores	Populações	N ^o	Di(a+)	
	estudadas	amostras	N	Frequência
Layrisse et al, 1956	Caracas (Venezuela)	65	8	0,123
Yokoyama et al, 1960	Tokyo (Japão)	146	6	0,041
Yojoyama et al, 1960	Kumamoto (Japão)	227	17	0,075
Tsuchiya et al, 1964	Hiroshima (Japão)	309	25	0,081
Cerqueira et al, 1968	Rio de Janeiro (Brasil)	207	13	0,067
Presente Trabalho	Marília (Brasil)	71	9	0,127

Estudos sorológicos demonstraram que o antígeno Di^a está ausente na população caucasóide americana (LEVINE et al, 1956) e é extremamente raro em africanos (MOURANT et al, 1976) e europeus (LEVINE et al, 1954). Em nosso estudo, encontramos o antígeno Di^a em 3,2% dos doadores de sangue estudados e em 1,2% dos descendentes de africanos. Como o antígeno Di^a é considerado marcador genético de populações indígenas e asiáticas, nossos resultados demonstram claramente a miscigenação ocorrida entre a nossa população e as populações indígenas e japonesas (Tabela 10).

Tabela 10: Freqüências do antígeno Di^a encontradas em caucasóides e descendentes de africanos

Autores	Populações	N ^o	Di(a+)	
	estudadas	amostras	N	Frequência
Levine et al, 1954	Europeus	4462	1	0,0002
Levine et al, 1956	Caucasianos (USA)	1000	0	0
Mourant et al, 1976	Africanos (USA)	827	1	0,0012
Presente Trabalho	Doadores de sangue	93	3	0,032
Presente Trabalho	Descendentes de africanos	84	1	0,012

B. FREQUÊNCIA DOS ALELOS *DI A* E *DI B*

Até o presente momento, este trabalho foi o único que estudou a frequência dos alelos *DI A*/*DI B* por técnicas moleculares. Assim, foi possível calcular diretamente as frequências gênicas de cada um dos alelos nas populações estudadas.

A frequência gênica do alelo *DI A* (0,571) na população indígena foi alta, quando comparada a frequência nos descendentes de japoneses (0,07), doadores de sangue (0,016) e descendentes de africanos (0,006).

Ao analisarmos os dados da literatura, observamos que não existem estudos de frequência gênica do alelo *DI A* em diferentes populações. Acreditamos que a alta frequência do alelo *DI A* por nós encontrada em índios deve-se ao fato de termos estudado uma população fechada e que não sofreu qualquer processo de miscigenação.

Embora várias publicações sobre o sistema de grupos sanguíneos Diego, indiquem o antígeno Di^a como um importante marcador antropológico de populações asiáticas (ARENDS & LAYRISSE, 1956) e a frequência do antígeno Di^a ser 4 vezes mais alta que a verificada nos doadores de sangue e 10 vezes mais alta que nos descendentes de africanos, a análise estatística não demonstrou diferença significativa na frequência dos alelos *DI A* e *DI B* entre doadores x japoneses e africanos x japoneses. Estes resultados demonstram a miscigenação ocorrida em nossa região e indicam que os alelos *DI A* e *DI B* podem atingir uma frequência uniforme na população brasileira (Gráficos 3 e 4).

As frequências dos alelos *DI A* e *DI B* encontradas em Índios Parakanãs diferem significativamente das encontradas nas outras populações estudadas. Este resultado está de acordo com a literatura e confirma que o alelo *DI A* pode ser considerado um importante marcador genético de populações indígenas.

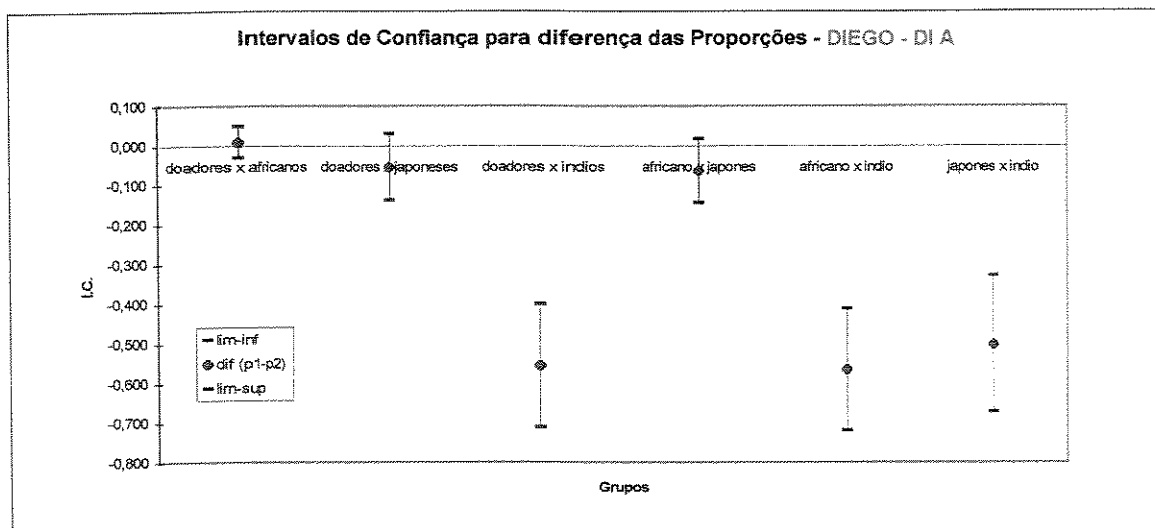


Gráfico 3: Intervalos de confiança para diferença das proporções – alelo *DI A*

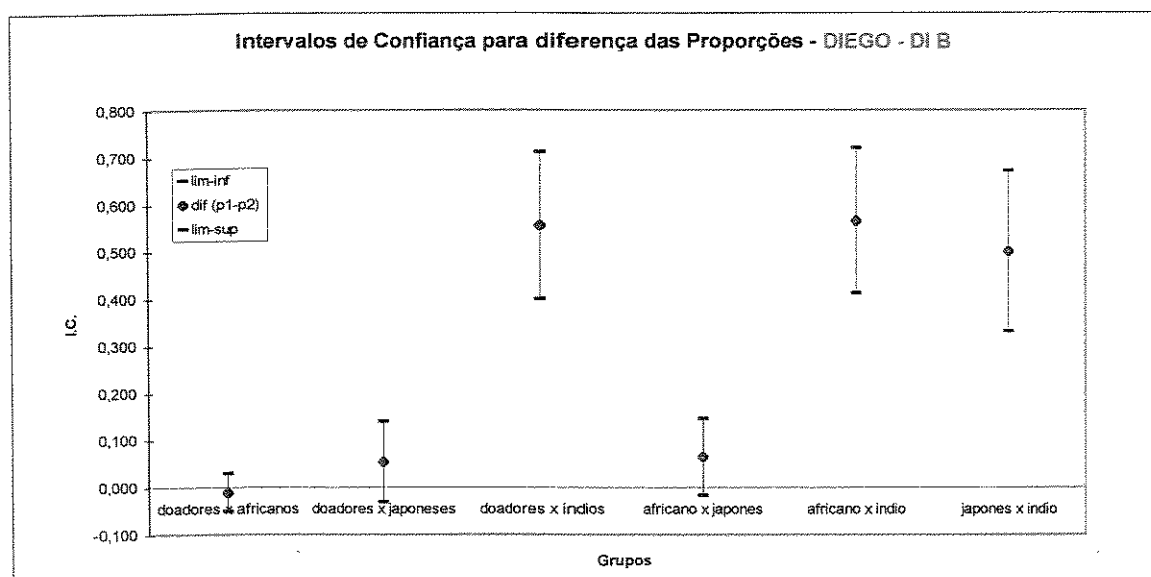


Gráfico 4: Intervalos de confiança para diferença das proporções – alelo *DI B*

C. FREQUÊNCIA DO ALELO 166G (BANDA 3-MEMPHIS)

A banda 3-Memphis é considerada um polimorfismo comum da banda 3, pelo fato de ter sido encontrada em diversas populações. Em nosso estudo, verificamos que a frequência do alelo 166G variou entre as populações estudadas.

A maior frequência do alelo 166G foi observada entre os índios Parakanãs (0,543), quando comparados aos descendentes de japoneses (0,190), descendentes de africanos (0,089) e os doadores voluntários de sangue (0,043). Quando comparamos nossos resultados com as frequências encontradas na literatura, verificamos que a maior frequência da banda 3-Memphis foi observada entre japoneses (IZUHARA et al, 1995; IDEGUCHI et al, 1992). No entanto poucos autores determinaram a presença da banda 3-Memphis em índios (RANNEY et al, 1990) e não encontramos nenhum estudo de frequência desta mutação em índios brasileiros.

A alta frequência do alelo 166G encontrada nos índios da tribo Parakanã pode ser explicada pelo fato destes índios viverem em uma comunidade isolada e portanto representarem uma população que mantém pouco contacto com a nossa sociedade. Além disto, favorecem o casamento entre os membros da própria comunidade, restringindo assim os efeitos da miscigenação (BLACK et al, 1980).

Entre os brasileiros descendentes de japoneses a frequência do alelo 166G (0,190) encontrada foi muito próxima a frequência da banda 3-Memphis (0,156) descrita por IDEGUCHI et al, 1992 na população japonesa, porém estes valores são bem menores do que a frequência (0,293) descrita por IZUHARA et al, 1995 quando estudou os habitantes de uma comunidade isolada na ilha Himeshima no Japão.

Em descendentes de africanos, a frequência (0,089) do alelo 166G foi similar a frequência (0,091) da banda 3-Memphis encontrada por RANNEY et al, 1990 em afro-americanos mas, inferior a descrita por PALATNIK et al, 1990 (0,125) em africanos do Brasil. A diferença encontrada entre as duas populações de descendentes de africanos brasileiros pode ser explicada pelo maior processo de miscigenação ocorrido em nossa região.

A menor frequência do alelo *166G* (0,043) observada em nosso estudo foi entre os doadores de sangue. Esta frequência está próxima da frequência (0,041) da banda 3-Memphis encontrada por PALATNIK et al, 1990 em caucasianos brasileiros, porém é duas vezes maior que a frequência (0,028) observada por RANNEY et al, 1990, em uma população de doadores de sangue caucasianos americanos. Nossos resultados confirmam a hipótese de PALATNIK et al, 1990 que atribuíram esta maior frequência da banda 3-Memphis entre os caucasianos brasileiros ao processo de miscigenação que ocorreu no Brasil entre caucasianos e descendentes de africanos.

A análise estatística de nossos resultados confirma os efeitos da miscigenação entre as populações de doadores e descendentes de africanos, quando demonstra não haver diferença significativa da frequência dos alelos *166A* (Gráfico 5) e *166G* (Gráfico 6) entre estas duas populações. Estes achados diferem dos resultados encontrados por PALATNIK et al, 1990, onde a diferença da frequência da banda 3-Memphis entre caucasóides e descendentes de africanos foi significativa.

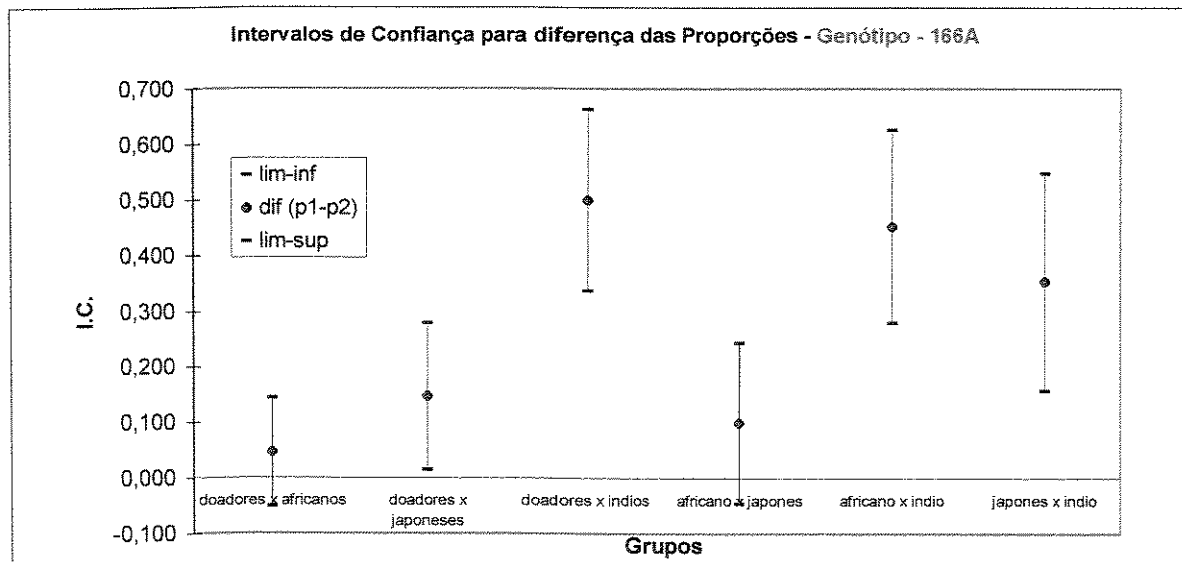


Gráfico 5: Intervalos de confiança para diferença das proporções – alelo 166A

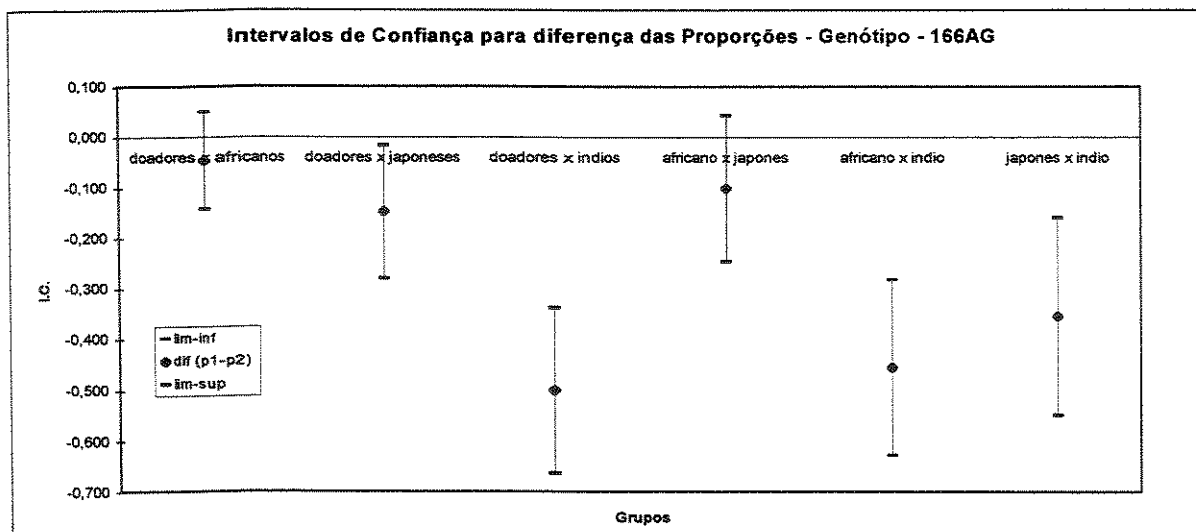


Gráfico 6: Intervalos de confiança para diferença das proporções – alelo 166G.

A análise estatística demonstra ainda não haver diferença significativa na frequência dos alelos 166G e 166A entre descendentes de japoneses x descendentes de africanos. Estes resultados indicam que existe uma tendência da frequência do alelo 166G se tornar uniforme na população brasileira.

Apesar da análise estatística demonstrar diferença significativa nas frequências dos alelos 166G e 166A entre doadores de sangue x descendentes de japoneses e, este resultado ser concordante com o encontrado por IDEGUCHI et al, 1990, ao observarmos os gráficos 5 e 6, verificamos que esta diferença está próxima a linha limítrofe de similaridade.

Em nossos resultados, foi observado que existe diferença significativa na frequência dos alelos 166G e 166A encontrada nos Índios Parakanãs com a observada nas outras populações estudadas. Este resultado reforça a afirmação de IZUHARA et al, 1995 de que a banda 3-Memphis, ou seja a presença do alelo 166G, pode ser um bom marcador genético de populações não miscigenadas.

D. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DIEGO E MEMPHIS

Dois tipos de banda 3-Memphis (variante I e variante II) podem ser distinguidos pela afinidade de reação com inibidores de transporte de anions. A banda 3-Memphis variante II apresenta maior afinidade de reação covalente com o H₂DIDS, do que a banda 3-Memphis variante I e a banda 3 normal (HSU & MORRISON, 1985).

A banda 3- Memphis variante II é caracterizada pela presença simultânea do resíduo de ácido glutâmico na posição 56 (variante I) e a expressão do antígeno Di^a (Leu854) na cadeia polipeptídica da banda 3. Apesar disto, a maior afinidade de reação entre a variante II e o H₂DIDS é atribuída apenas a expressão do antígeno Di^a. Estes estudos foram realizados utilizando eritrócitos com fenótipo Di (a+) associados à presença de 56Glu pelo fato do antígeno Di^a estar sempre associado à banda 3-Memphis (SPRING et al, 1992; BRUCE et al, 1994).

Os resultados da fenotipagem Di^a obtidos em nossas amostras estão de acordo com a literatura, ou seja, não encontramos nenhuma amostra com o fenótipo Di(a+) sem o alelo 166G mas, encontramos o alelo 166G em amostras com o fenótipo Di (a-).

Nossos resultados da genotipagem confirmam os dados da literatura (SPRING et al, 1992; BRUCE et al, 1994) e demonstram que existe associação entre o alelo *DIA* e o alelo 166G nas 4 populações estudadas. No entanto, um novo alelo foi encontrado na população indígena estudada, ou seja, a ocorrência do alelo *DIA* sem o alelo 166G. Quatro índios com genótipo *DIA/DIA* apresentam o genótipo Memphis na forma heterozigota (166 A/G). Este resultado é inédito pelo fato de que até o presente momento esta associação era feita pelo fenótipo e não pelo genótipo, ou seja, se relacionava a presença do fenótipo Di (a+) com a banda 3-Memphis e não a associação dos alelos *DIA* e 166G.

Estes dados, associados a alta freqüência do alelo 166G em comunidades isoladas como os Índios Parakanãs e os habitantes da ilha de Himeshima no Japão (IZUHARA et al, 1995) e, o fato da banda 3-Memphis estar sempre associada a outros polimorfismos da banda 3 que causam alterações morfológicas importantes no eritrócito, reforçam a hipótese proposta por PALATNIK et al, 1990 quando encontraram a banda

3-Memphis na membrana eritrocitária do macaco Rhesus, que o alelo *166G* é o protótipo e não a mutação do gene *SLC4A1* e por seleção natural está sendo substituído pelo alelo *166A*.

Em nosso estudo, encontramos também, a presença do alelo *166G* em indivíduos genotipados como *DI B/DI B*. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por SPRING et al, 1992 e BRUCE et al, 1994 que demonstraram que a banda 3-Memphis pode ocorrer sem a presença do antígeno Di^a .

Quando realizamos a técnica de SDS-PAGE com a finalidade de verificarmos o padrão de migração eletroforética na presença do alelo *166G* associado ou não ao alelo *DI A* (Figura 3), observamos um padrão difuso na migração eletroforética da proteína banda 3 somente quando o alelo *DI A* está presente, independentemente do genótipo Memphis. Estes resultados indicam que a presença da substituição Lys56→Glu não interfere na migração da proteína banda 3.

Assim, diante do acima exposto, propomos a existência de 4 formas alélicas de associação Diego/Memphis na população brasileira: alelo *DI A_{166A}*, *DI A_{166G}*, *DI B_{166A}* e *DI B_{166G}* (Figura 10).

Desta forma e de acordo com os resultados por nós encontrados na população brasileira, única em seu antecedente étnico, demonstram a importância de analisar diferentes populações para melhor entendimento das bases genéticas do sistema de grupos sanguíneos Diego.

Além disto, como já mencionado anteriormente, o fato de não se conseguir realizar a fenotipagem para o antígeno Di^b , devido à indisponibilidade de anti-soro anti- Di^b , a genotipagem para os alelos *DI A/DI B* pode contribuir, substancialmente na seleção de doadores $\text{Di}(b-)$ aumentando assim, a segurança transfusional de pacientes aloimunizados pelo antígeno Di^b .

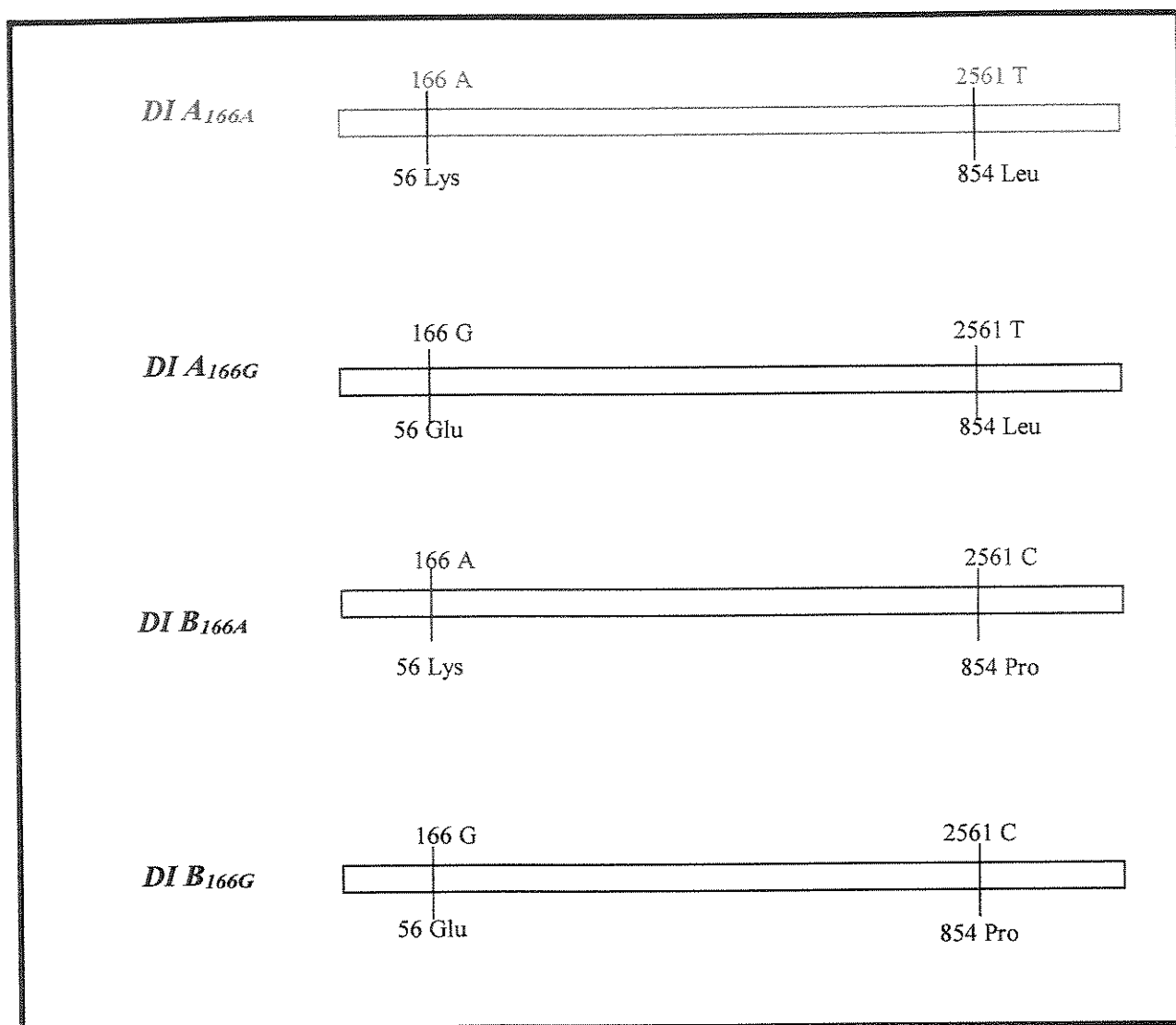


Figura 10 : Ilustração da associação dos alelos Diego e banda 3-Memphis



6. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos do presente trabalho, as condições em que foi realizado o estudo molecular dos alelos *DI A*/*DI B* e da banda 3-Memphis na população brasileira, podemos concluir que:

1. Existe um alto grau de associação entre os alelos *DI A* e *166G* na população brasileira;
2. Indivíduos homozigotos para ao alelo *DI B* podem apresentar o alelo *166G*;
3. Este estudo demonstra pela primeira vez a presença do alelo *DI A* sem o alelo *166G* que define a banda 3-Memphis;
4. O alelo *166G* (Memphis) é um polimorfismo comum do gene *SCL4A1* da banda 3;
5. O alelo *166G* pode ser considerado o protótipo do gene *SLC4A1* e um bom marcador genético de miscigenação;
6. O fato de não haver diferença significativa da frequência dos alelos *166G* e *166A* entre doadores x africanos e descendentes de japoneses x descendentes de africanos, indica que a frequência do alelo *166G* tende a se tornar uniforme na população brasileira;
7. A alta frequência do antígeno D_i^a encontrada nos Índios estudados indica que este antígeno é um importante marcador antropológico de populações indígenas;
8. Os estudos de frequência do antígeno D_i^a realizado nas amostras dos doadores de sangue, descendentes de africanos e descendentes de japoneses demonstram a miscigenação ocorrida entre essas populações, na nossa região;
9. A frequência do alelo *DI B* é muito superior a frequência do alelo *DI A* em todas as populações estudadas, com exceção da população indígena onde a frequência do alelo *DI A* é superior a frequência do *DI B*;

10. Apesar dos dados da literatura indicarem o antígeno Di^a como um importante marcador antropológico de populações asiáticas, a análise estatística deste estudo não demonstrou diferença significativa na frequência dos alelos *DI A* e *DI B* em doadores x japoneses e africanos x japoneses;
11. De acordo com os resultados encontrados neste estudo, estamos propondo 4 formas alélicas do gene *SLC4A1* relacionado a associação do genótipo Diego e banda 3-Memphis, na população brasileira: alelo *DI A_{166A}*, alelo *DI A_{166G}*, alelo *DI B_{166A}* e alelo *DI B_{166G}*.
12. A genotipagem dos alelos *DI A/DI B* pode contribuir, substancialmente, na qualidade da transfusão de sangue em pacientes politransfundidos aloimunizados para os antígenos Di^a e Di^b pois permite uma seleção mais adequada do sangue a ser transfundido.



7. SUMMARY

The Diego blood group system consists of 21 antigens located on band 3 of the red blood cell membrane. It includes the 4 antithetical antigens Di^a / Di^b and Wr^a / Wr^b , and 17 low incidence antigens. The Di^a phenotype results from a point mutation at nucleotide 2561 (T>C) leading to a single amino acid substitution from Leu (Di^a) to Pro (Di^b) in position 854. Di^b is a high incidence antigen while Di^a has low incidence among Caucasians but is particularly common among American Indians and Japanese.

The Memphis variants of band 3 result from a point mutation 166 A>G in *SLC4A1* leading to an amino acid substitution (56 Lys>Glu). There appears to be a strong association of Memphis (56Glu) with Di^a (854Leu) among Native Americans.

The initial aim of this study was to determine the frequency of Diego (*DI A/DI B*) and Memphis (166A>G) mutations in the Brazilian population.

We studied samples from 70 Amazonian Indians, 71 individuals of Japanese descent, 93 regular blood donors and 84 Sickle Cell Disease patients by PCR-RFLP. PCR assays were designed to amplify a sequence of 149 bp from exon 18 (*DI A/DI B* alleles), and of 84 bp from exon 3 *SLC4A1* gene that determine band 3-Memphis. Alleles were identified by digestion of amplified products with the restriction enzymes *Msp* I to discriminate *DI A* from *DI B* in exon 18, and *Mnl* I to identify band 3-Memphis in exon 3.

Both the *DI A* allele and band 3-Memphis had high gene frequency among Amazonian Indians (0.571 and 0.543, respectively). Unexpectedly, four Amazonian Indians had the *DI A* allele without the band-3 Memphis mutation.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANNER MJ, BRUCE L, MARTIN PG, REARDEN DM, JONES GL. Melanesian hereditary ovalocytes have a deletion in red cell band 3. Blood, 78:2785-6, 1991.
- BHATTACHARYYA, GOURI K. & JOHNSON, RICHARD A. Statistical Concepts and Methods. John Wiley & Sons; pp. 308-309, 1977.
- BLACK FL, SALZANO FM, LAYRISSE Z, FRANCO MHLF, HARRIS N, WEINER TA. Restriction and persistence of polymorphism of HLA and other blood genetic traits in the Parakanã Indians of Brazil. Am J Phys Anthr, 52:119-132, 1980.
- BRUCE LJ, ANSTEE DJ, SPRING FA, TANNER MJ. Band 3 Memphis variant II. Altered stilbene disulfonate binding and the Diego (Di^a) blood group antigen are associated with the human erythrocyte band 3 mutation Pro854→Leu. J Biol Chem, 269:16155-8, 1994.
- BRUCE LJ, KAY MM, LAWRENCE C, TANNER MJ. Band 3 HT, a human red-cell variant associated with acanthocytosis and increased anion transport, carries the mutation Pro868→Leu in the membrane domain of band 3. Biochem J, 293:317-20, 1993.
- BRUCE LJ, TANNER MJ. Structure-function relationships of band 3 variants. Cell Mol Biol 42:953-73, 1996.
- CERQUEIRA AJB, JUNQUEIRA PC TSUM T. Grupos sangüíneos dos sistemas ABO, Rh e Diego em Japoneses. A Folha Médic, 57: 105-109, 1968.
- DANIELS GL, ANSTEE DJ, CARTRON JP, DAHR W, FLETCHER A, GARRATTY G, HENRY S, JORGENSEN J, JUDD WJ, KORNSTAD L, LEVENE C, LIN M, LOMAS-FRANCIS C, LUBENKO A, MOULDS JJ, MOULDS JM, MOULDS M, OVERBEEKE M, REID ME, ROUGER P, SCOTT M, SISTONEN P, SMART E, TANI Y, WENDEL S, ZELINSKI T. International Society of Blood Transfusion Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens. Vox Sang, 80:193-7, 2001.

- FAIRBANKS G, STECK TL, WALLACH DF. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, 10:2606-17, 1971.
- GERSHOWITZ H, JUNQUEIRA PC, SALZANO FM, NEEL JV. Further studies on the Xavante Indians. 3. Blood groups and ABH-Lea secretor types in the Simoes Lopes and Sao Marcos Xavantes. Am J Hum Genet, 19:502-13, 1967.
- HARDIE RJ, PULLON HW, HARDING AE, OWEN JS, PIRES M, DANIELS GL, IMAI Y, MISRA VP, KING RH, JACOBS JM, ET AL. Neuroacanthocytosis. A clinical, haematological and pathological study of 19 cases. Brain, 114:13-49, 1991.
- HSU L, MORRISON M. A new variant of the anion transport protein in human erythrocytes. Biochemistry, 24:3086-90, 1985.
- IDEGUCHI H, OKUBO K, ISHIKAWA A, FUTATA Y, HAMASAKI N. Band 3-Memphis is associated with a lower transport rate of phosphoenolpyruvate. Br J Haematol, 82:122-5, 1992.
- ISSITT PD, ANSTEE DJ. Applied Blood Group Serology. Montgomery Scientific publications; pp 581-607, 1998.
- IZUHARA K, IDEGUCHI H, OTSUKA T, OKUBO K, OGO T, HAMASAKI N, NIHO Y. High incidence of a polymorphic variant of erythrocyte membrane protein, Band 3-Memphis, on a western Japanese island. Jpn J Hum Genet, 40:265-70, 1995.
- JAROLIM P, PALEK J, AMATO D, HASSAN K, SAPAK P, NURSE GT, RUBIN HL, ZHAI S, SAHR KE, LIU SC. Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 88:11022-6, 1991.
- JAROLIM P, PALEK J, RUBIN HL, PRCHAL JT, KORSGREN C, COHEN CM. Band 3 Tuscaloosa: Pro327----Arg327 substitution in the cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 protein associated with spherocytic hemolytic anemia and partial deficiency of protein 4.2. Blood, 80:523-9, 1992.

- JAROLIM P, RUBIN HL, ZHAI S, SAHR KE, LIU SC, MUELLER TJ, PALEK J. Band 3 Memphis: a widespread polymorphism with abnormal electrophoretic mobility of erythrocyte band 3 protein caused by substitution AAG----GAG (Lys----Glu) in codon 56. Blood, 80:1592-8, 1992.
- JAROLIM P, RUBIN HL, ZAKOVA D, STORRY J, REID ME. Characterization of seven low incidence blood group antigens carried by erythrocyte band 3 protein. Blood, 92:4836-43, 1998.
- JAY D, CANTLEY L. Structural aspects of the red cell anion exchange protein. Annu Rev Biochem, 55:511-38, 1986.
- JUNQUEIRA PC, WISHART PJ, OTTENSORSSER F, PASQUALIN R, LORENZO FERNANDEZ P, KALMUS H. The Diego blood factor In Brazilian Indians. Nature, 177:41, 1956.
- KAY MM, HUGHES J, ZAGON I, LIN FB. Brain membrane protein band 3 performs the same functions as erythrocyte band 3. Proc Natl Acad Sci U S A, 88:2778-82, 1991.
- KAY MM. Band 3 in aging and neurological disease. NAnn N Y Acad Sci, 621:179-204, 1991.
- LAYRISSE M, ARENDS T, DOMINGUES SISICO R. Nuevo grupo sanguíneo encontrado en descendientes de Índios. Acta Med Venezuelana, 3:132-138, 1955.
- LAYRISSE M, ARENDS T. The Diego blood factor in Chinese and Japanese. Nature, 177:1083-1084, 1956.
- LEVINE P, KOCH EA, McGEE RT. Rare human isoagglutinins and their identification. Am. J. Clin. Path., 24: 292-304, 1954.
- LEVINE P, ROBINSON E A, LAYRISSE M, ARENDS T, DOMINGUEZ SISICO R. The Diego blood factor in Brazilian Indians. Nature, 177:40-41, 1956.

- LOW PS. Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. Biochim Biophys Acta, 864:145-67, 1986.
- LUX SE, JOHN KM, KOPITO RR, LODISH HF. Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1). Proc Natl Acad Sci U S A, 86:9089-93, 1989.
- MOHANDAS N, WINARDI R, KNOWLES D, LEUNG A, PARRA M, GEORGE E, CONBOY J, CHASIS J. Molecular basis for membrane rigidity of hereditary ovalocytosis. A novel mechanism involving the cytoplasmic domain of band 3. J Clin Invest, 89:686-92, 1992.
- MOURANT AE, KOPEC AC, DOMANIEWSKA-SOBCZAK K. The distribution of the human and other polymorphisms, 2nd ed, pp 20-24, Oxford University Press, London, 1976.
- MUELLER TJ, MORRISON M. Detection of a variant of protein 3, the major transmembrane protein of the human erythrocyte. J Biol Chem, 252:6573-6, 1977.
- OKUBO K, KANG D, HAMASAKI N, JENNINGS ML. Red blood cell band 3. Lysine 539 and lysine 851 react with the same H2DIDS (4,4'-diisothiocyanodihydrostilbene-2,2'-disulfonic acid) molecule. J Biol Chem, 269:1918-26, 1994.
- PALATNIK M, SIMOES ML, ALVES ZM, LARANJEIRA NS. The 60 and 63 kDa proteolytic peptides of the red cell membrane band-3 protein: their prevalence in human and non-human primates. Hum Genet, 86:126-30, 1990.
- RANNEY HM, ROSENBERG GH, MORRISON M, MUELLER TJ. Frequencies of Band 3 variants of human red cell membranes in some different populations. Br J Haematol, 75:262-7, 1990.
- SAMBROOCK J, FRITSCH EF AND MANIATIS. Molecular Cloning: *A Laboratory Manual* Vol 2. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed, 1989.
- SCHOFIELD AE, TANNER MJ, PINDER JC, CLOUGH B, BAYLEY PM, NASH GB, DLUZEWSKI AR, REARDON DM, COX TM, WILSON RJ, ET AL. Basis of unique red cell membrane properties in hereditary ovalocytosis. J Mol Biol, 223:949-58, 1992.

- SHOWE LC, BALLANTINE M, HUEBNER K. Localization of the gene for the erythroid anion exchange protein, band 3(EMPB3), to human chromosome 17. Genomics, 1:71-6, 1987.
- SOLOMON E, LEDBETTER DH. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 17. Cytogenet Cell Genet, 55:198-215, 1990.
- SPRING FA, BRUCE LJ, ANSTEE DJ, TANNER MJ. A red cell band 3 variant with altered stilbene disulphonate binding is associated with the Diego (Dia) blood group antigen. Biochem J, 288:713-6, 1992.
- TANNER MJ, MARTIN PG, HIGH S. The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. Biochem J, 256:703-12, 1988.
- TANNER MJ. Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE1). Semin Hematol, 30:34-57, 1993.
- TANNER MJ. The structure and function of band 3 (AE1): recent developments. Mol Membr Biol, 14:155-65, 1997.
- THOMPSON PR, CHILDERS DM, HATCHER DE. Anti-Di b -first and second examples. Vox Sang, 13:314-8, 1967.
- TSUCHIYA T, KURATA M, FUKUMA A, ONISHI T, YOKOYAMA M, KOBAYASHI H, TOMITA K. Anthropological observation of blood groups in Hiroshima. Nature, 204:87-&, 1964.
- YANNOUKAKOS D, VASSEUR C, DRIANCOURT C, BLOUQUIT Y, DELAUNAY J, WAJCMAN H, BURSAUX E. Human erythrocyte band 3 polymorphism (band 3 Memphis): characterization of the structural modification (Lys56----Glu) by protein chemistry methods. Blood, 78:1117-20, 1991.
- YOKOYAMA M, MURAKATA M, UENO N. The Diego factor in Japanese. Nature, 188:591, 1960
- ZELINSKI T. Erythrocyte band 3 antigens and the Diego Blood Group System. Transfusion Medicine Review, 12:36-45, 1998.



9. APÊNDICES

Tabela 11: Resultados da fenotipagem Di^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de doadores voluntários de sangue

Nº	Identificação	Raça	Fenótipo Di ^a	Genótipo Memphis	Genótipo Diego
1	23641-2	C	neg	166A	DI B/DI B
2	22924-6	DA	neg	166A	DI B/DI B
3	22707-3	C	neg	166A	DI B/DI B
4	23618-8	C	neg	166A	DI B/DI B
5	23615-3	C	neg	166A	DI B/DI B
6	23624-2	DJ	neg	166A	DI B/DI B
7	23828-8	C	neg	166A	DI B/DI B
8	23885-7	C	neg	166A	DI B/DI B
9	22881-9	C	neg	166A	DI B/DI B
10	23764-8	C	neg	166A	DI B/DI B
11	23633-1	C	neg	166A	DI B/DI B
12	23602-1	C	neg	166A	DI B/DI B
13	23597-1	M	pos	166G	DI A/DI B
14	23887-3	C	neg	166A	DI B/DI B
15	23561-0	C	neg	166A	DI B/DI B
16	23594-7	M	neg	166A	DI B/DI B
17	23635-8	C	neg	166A	DI B/DI B
18	23572-6	C	neg	166A	DI B/DI B
19	23886-5	C	neg	166A	DI B/DI B
20	23795-8	C	neg	166A	DI B/DI B
21	23763-0	C	neg	166A/G	DI B/DI B
22	23558-0	C	neg	166A	DI B/DI B
23	23753-2	DJ	neg	166A	DI B/DI B
24	23600-5	C	neg	166A	DI B/DI B
25	23604-8	C	neg	166A	DI B/DI B
26	23603-0	C	neg	166A	DI B/DI B
27	23349-9	C	neg	166A	DI B/DI B
28	22899-1	C	neg	166A	DI B/DI B
29	23711-7	C	neg	166A	DI B/DI B
30	22872-0	C	pos	166A/G	DI A/DI B

Tabela 11: Resultados da fenotipagem Di^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de doadores voluntários de sangue (cont.)

Nº	Identificação	Raça	Fenótipo Di ^a	Genótipo Memphis	Genótipo Diego
31	22875-4	C	neg	166A	DI B/DI B
32	23702-8	C	neg	166A	DI B/DI B
33	23657-9	C	neg	166A	DI B/DI B
34	23637-4	C	neg	166A	DI B/DI B
35	23719-2	M	neg	166A	DI B/DI B
36	23812-1	C	neg	166A	DI B/DI B
37	23799-0	C	neg	166A	DI B/DI B
38	23814-8	C	neg	166A	DI B/DI B
39	23980-2	C	neg	166A	DI B/DI B
40	23626-9	C	neg	166A	DI B/DI B
41	23933-0	C	neg	166A	DI B/DI B
42	23965-9	DA	neg	166A	DI B/DI B
43	23920-9	C	neg	166A	DI B/DI B
44	23927-6	C	pos	166A/G	DI A/DI B
45	23978-0	C	neg	166A	DI B/DI B
46	23629-3	C	neg	166A	DI B/DI B
47	23646-3	C	neg	166A	DI B/DI B
48	23746-0	C	neg	166A	DI B/DI B
49	23749-4	DA	neg	166A	DI B/DI B
50	23968-3	C	neg	166A	DI B/DI B
51	23964-0	C	neg	166A	DI B/DI B
52	23907-1	C	neg	166A	DI B/DI B
53	23963-2	M	neg	166A	DI B/DI B
54	23744-3	C	neg	166A	DI B/DI B
55	23969-1	C	neg	166A	DI B/DI B
56	23960-8	C	neg	166A	DI B/DI B
57	23910-1	C	neg	166A	DI B/DI B
58	22776-6	C	neg	166A	DI B/DI B
59	23899-7	C	neg	166A	DI B/DI B
60	23977-2	C	neg	166A	DI B/DI B

Tabela 11: Resultados da fenotipagem Di^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de doadores voluntários de sangue (cont.)

Nº	Identificação	Raça	Fenótipo Di ^a	Genótipo Memphis	Genótipo Diego
61	23872-5	C	neg	166A/G	DI B/DI B
62	23905-5	C	neg	166A	DI B/DI B
63	23902-0	C	neg	166A	DI B/DI B
64	24140-8	C	neg	166A	DI B/DI B
65	23976-4	DJ	neg	166A	DI B/DI B
66	23958-6	C	neg	166A	DI B/DI B
67	23728-1	C	neg	166A	DI B/DI B
68	22888-6	C	neg	166A	DI B/DI B
69	23721-4	M	neg	166A	DI B/DI B
70	23705-2	C	neg	166A	DI B/DI B
71	23722-2	C	neg	166A	DI B/DI B
72	22889-4	C	neg	166A	DI B/DI B
73	23745-1	C	neg	166A	DI B/DI B
74	24086-0	C	neg	166A	DI B/DI B
75	22787-1	C	neg	166A	DI B/DI B
76	23713-3	C	neg	166A	DI B/DI B
77	24071-1	C	neg	166A/G	DI B/DI B
78	23704-4	C	neg	166A	DI B/DI B
79	24022-3	C	neg	166A	DI B/DI B
80	23698-6	C	neg	166A	DI B/DI B
81	24019-3	M	neg	166A	DI B/DI B
82	23996-9	C	neg	166A	DI B/DI B
83	24234-0	C	neg	166A	DI B/DI B
84	24048-7	C	neg	166A/G	DI B/DI B
85	23595-5	C	neg	166A	DI B/DI B
86	23621-8	C	neg	166A	DI B/DI B
87	23639-0	C	neg	166A	DI B/DI B
88	23849-0	C	neg	166A	DI B/DI B
89	23622-6	C	neg	166A	DI B/DI B
90	23944-6	M	neg	166A	DI B/DI B
91	23578-5	C	neg	166A	DI B/DI B
92	23935-7	C	neg	166A	DI B/DI B
93	23967-5	M	neg	166A	DI B/DI B

Tabela 12: Resultados da fenotipagem Di^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de descendentes de africanos.

Nº	Identificação	Iniciais	Fenótipo Di ^a	Genótipo Memphis	Genótipo Diego
1	F1	C.R.C.	neg	166A	DI B/DI B
2	F5	A.G.A	neg	166A	DI B/DI B
3	F6	M.G.P.N.	neg	166A	DI B/DI B
4	F9	S.G.	neg	166A	DI B/DI B
5	F11	E.A.	neg	166A	DI B/DI B
6	F12	M.F.P.	neg	166A	DI B/DI B
7	F16	M.F.	neg	166A	DI B/DI B
8	F17	M.S.J.	neg	166A	DI B/DI B
9	F22	J.M.S.C.	neg	166A	DI B/DI B
10	F25	R.A.O.	neg	166A	DI B/DI B
11	F30	H.D.S.	neg	166A	DI B/DI B
12	F32	E.A.	neg	166A	DI B/DI B
13	F34	L.A.P.	neg	166A	DI B/DI B
14	F42	G.C.S.	neg	166A	DI B/DI B
15	F47	C.R.N.	neg	166A	DI B/DI B
16	F48	L.L.S.	neg	166A	DI B/DI B
17	F49	J.A.B.	neg	166A	DI B/DI B
18	F50	E.A.P.	neg	166A	DI B/DI B
19	F54	J.M.T.	neg	166A	DI B/DI B
20	F59	V.A.F.	neg	166A	DI B/DI B
21	5A	D.C.	neg	166A	DI B/DI B
22	9A	S.A.P.F.	neg	166A	DI B/DI B
23	10A	S.M.J.	neg	166A	DI B/DI B
24	14A	S.S.E.	neg	166A	DI B/DI B
25	16A	M.F.F.S.	neg	166A	DI B/DI B
26	17A	L.M.S.	neg	166A	DI B/DI B
27	18A	F.S.A.	neg	166A	DI B/DI B
28	19A	A.A.N.	neg	166A/G	DI B/DI B
29	21A	T.D.S.	neg	166A	DI B/DI B
30	22A	J.E.C.	neg	166A/G	DI B/DI B
31	24A	D.A.L.	neg	166A	DI B/DI B
32	25A	M.C.A.	neg	166A	DI B/DI B
33	26A	Z.B.S.S.	neg	166A	DI B/DI B
34	27A	M.S.A.G.	neg	166G	DI B/DI B
35	29A	M.C.C.B.	neg	166A	DI B/DI B
36	30A	M.F.D.	neg	166A	DI B/DI B
37	31A	M.J.R.	neg	166A	DI B/DI B
38	32A	C.B.S.	neg	166A	DI B/DI B
39	33A	C.S.P.	neg	166A	DI B/DI B
40	35A	R.C.L.	neg	166A/G	DI B/DI B
41	36A	M.I.S.A.	neg	166A	DI B/DI B
42	37A	R.S.	neg	166A	DI B/DI B
43	38A	E.J.S.	neg	166A/G	DI B/DI B

Tabela 12: Resultados da fenotipagem Di^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de descendentes de africanos(cont.)

Nº	Identificação	Iniciais	Fenótipo Di ^a	Genótipo Memphis	Genótipo Diego
44	40A	E.S.A.	neg	166A	DI B/DI B
45	41A	J.D.J.	neg	166A	DI B/DI B
46	42A	M.L.S.	neg	166A	DI B/DI B
47	43A		neg	166A	DI B/DI B
48	44A	J.R.P.	neg	166A	DI B/DI B
49	45A	J.C.C.	neg	166A	DI B/DI B
50	47A	E.R.G.	neg	166A	DI B/DI B
51	50A	M.H.V.S.	neg	166A	DI B/DI B
52	51A	M.L.S.	neg	166A	DI B/DI B
53	52A	R.R.V.	neg	166A	DI B/DI B
54	53A	F.J.L.P.	neg	166A	DI B/DI B
55	54A	I.M.S.	neg	166A	DI B/DI B
56	56A	A.M.L.O.	neg	166G	DI B/DI B
57	57A	A.V.S.	neg	166A/G	DI B/DI B
58	58A	R.R.S.	neg	166A/G	DI B/DI B
59	59A	J.P.A.	neg	166A	DI B/DI B
60	61A	J.P.S.	neg	166A	DI B/DI B
61	65A	M.A.O.	neg	166A	DI B/DI B
62	67A	M.C.G.	neg	166A	DI B/DI B
63	68A	M.N.J.	neg	166A	DI B/DI B
64	69A	S.M.B.C.	neg	166A/G	DI B/DI B
65	73A	R.S.L.	neg	166A	DI B/DI B
66	75A	M.A.M.	neg	166A/G	DI B/DI B
67	76A	A.M.J.A.	neg	166A	DI B/DI B
68	77A	R.C.C.	neg	166A	DI B/DI B
69	78A	I.S.J.	neg	166A	DI B/DI B
70	79A	M.S.C.	neg	166A	DI B/DI B
71	80A	M.J.S.	neg	166A	DI B/DI B
72	81A	C.B.S.	neg	166A	DI B/DI B
73	83A	D.S.	neg	166A	DI B/DI B
74	84A	M.S.	neg	166A/G	DI B/DI B
75	86A	E.B.M.	neg	166A/G	DI B/DI B
76	88A	A.A.A.	neg	166A	DI B/DI B
77	89A	C.L.S.	neg	166A	DI B/DI B
78	90A	V.L.S.O.	pos	166A/G	DI A/DI B
79	92A	G.N.B.S.	neg	166A	DI B/DI B
80	93A	M.A.M.	neg	166A	DI B/DI B
81	95A	M.I.N.M.	neg	166A	DI B/DI B
82	96A	F.S.B.	neg	166A	DI B/DI B
83	99A	J.F.S.	neg	166A	DI B/DI B
84	126A	V.A.M.N.	neg	166A	DI B/DI B

Tabela 13: Resultados da fenotipagem Di^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de descendentes de japoneses

Nº	Identificação	Iniciais	Fenótipo Di ^a	Genótipo Memphis	Genótipo Diego
1	1J	M.K.U.F.	neg	166A	DI B/DI B
2	2J	M.Y.	neg	166A	DI B/DI B
3	3J	M.I.	neg	166A/G	DI B/DI B
4	4J	E.T.O.	neg	166A	DI B/DI B
5	5J	A.I.	neg	166A	DI B/DI B
6	6J	M.S.	neg	166A	DI B/DI B
7	7J	R.S.	neg	166A	DI B/DI B
8	8J	N.I.K.C.	neg	166A	DI B/DI B
9	9J	K.N.	neg	166A	DI B/DI B
10	10J	L.M.	neg	166A/G	DI B/DI B
11	11J	E.I.	neg	166A	DI B/DI B
12	12J	I.I.T.	neg	166A	DI B/DI B
13	13J	I.H.H.	pos	166A/G	DI A/DI B
14	14J	R.S.T.	neg	166A	DI B/DI B
15	15J	M.M.H.	neg	166A	DI B/DI B
16	16J	M.M.H.	neg	166A	DI B/DI B
17	17J	G.Y.T.	neg	166A	DI B/DI B
18	18J	N.C.Y.	neg	166A	DI B/DI B
19	19J	R.T.K.	neg	166A	DI B/DI B
20	20J	A.M.O.K.	neg	166A	DI B/DI B
21	21J	L.N.	neg	166A/G	DI B/DI B
22	22J	N.H.	neg	166A	DI B/DI B
23	23J	E.T.K.J.	pos	166A/G	DI A/DI B
24	24J	T.O.	neg	166A	DI B/DI B
25	25J	E.A.A.	neg	166A	DI B/DI B
26	26J	G.Q.I.	neg	166A	DI B/DI B
27	27J	S.A.H.	neg	166A/G	DI B/DI B
28	28J	N.S.	neg	166A	DI B/DI B
29	29J	K.T.	neg	166A	DI B/DI B
30	30J	F.N.	neg	166A	DI B/DI B
31	31J	N.S.K.	neg	166A	DI B/DI B
32	32J	R.M.	neg	166A	DI B/DI B
33	33J	C.S.I.	neg	166A	DI B/DI B
34	34J	C.K.	neg	166A	DI B/DI B
35	35J	S.S.N.	neg	166A/G	DI B/DI B

Tabela 13: Resultados da fenotipagem Di^a e da genotipagem Diego/Memphis nas mostras de sangue e DNA de descendentes de japoneses (cont.)

Nº	Identificação	Iniciais	Fenótipo Di ^a	Genótipo Memphis	Genótipo Diego
36	36J	T.K.	neg	166A	DI B/DI B
37	37J	T.I.	neg	166A	DI B/DI B
38	38J	E.M.M.	neg	166A	DI B/DI B
39	39J	F.K.	neg	166A/G	DI B/DI B
40	40J	K.S.T.	pos	166A/G	DI A/DI B
41	41J	M.M.S.	neg	166A	DI B/DI B
42	42J	O.M.	pos	166A/G	DI A/DI B
43	43J	F.K.	neg	166A/G	DI B/DI B
44	44J	C.T.	pos	166A/G	DI A/DI B
45	45J	L.S.	neg	166A/G	DI B/DI B
46	46J	E.M.	neg	166A/G	DI B/DI B
47	47J	C.Y.M.	neg	166A/G	DI B/DI B
48	48J	M.Y.	neg	166A	DI B/DI B
49	49J	M.C.Y.	neg	166A/G	DI B/DI B
50	50J	J.Y.	neg	166A	DI B/DI B
51	51J	M.H.S.	pos	166G	DI A/DI B
52	52J	M.H.	neg	166A	DI B/DI B
53	53J	E.A.M.	neg	166A/G	DI B/DI B
54	54J	G.M.	neg	166A/G	DI B/DI B
55	55J	D.Y.	neg	166A	DI B/DI B
56	56J	D.H.S.	pos	166A/G	DI A/DI B
57	57J	J.A.S.	pos	166A/G	DI A/DI B
58	58J	L.N.	neg	166A	DI B/DI B
59	59J	M.H.M.	neg	166G	DI B/DI B
60	60J	J.T.H.	neg	166A	DI B/DI B
61	61J	L.N.S.	neg	166A	DI B/DI B
62	62J	W.O.K.	neg	166A/G	DI B/DI B
63	63J	C.T.M.	neg	166A	DI B/DI B
64	64J	F.M.E.	neg	166A	DI B/DI B
65	65J	J.T.M.	neg	166A	DI B/DI B
66	66J	V.M.A.	neg	166A	DI B/DI B
67	67J	M.T.	neg	166A	DI B/DI B
68	68J	O.M.I.	neg	166A	DI B/DI B
69	69J	M.L.N.	neg	166A	DI B/DI B
70	70J	T.T.S.	neg	166A	DI B/DI B
71	71J	R.	pos	166G	DI A/DI A

Tabela 14: Resultados da fenotipagem Di^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de índios Parakanãs

Nº	Identificação	Fenótipo Di^a	Genótipo Memphis	Genótipo Diego
1	IPR 1	Pos	166A/G	DI A/DI B
2	IPR 2	neg	166A	DI B/DI B
3	IPR 3	neg	166A	DI B/DI B
4	IPR 4	pos	166A/G	DI A/DI A
5	IPR 5	pos	166A/G	DI A/DI B
6	IPR 6	neg	166A	DI B/DI B
7	IPR 7	pos	166A/G	DI A/DI B
8	IPR 10	pos	166A/G	DI A/DI B
9	IPR 12	pos	166G	DI A/DI A
10	IPR 13	pos	166A/G	DI A/DI B
11	IPR 14	neg	166A	DI B/DI B
12	IPR 16	pos	166A/G	DI A/DI B
13	IPR 17	pos	166G	DI A/DI A
14	IPR 18	neg	166A	DI B/DI B
15	IPR 19	neg	166A	DI B/DI B
16	IPR 21	neg	166A	DI B/DI B
17	IPR 23	pos	166A/G	DI A/DI B
18	IPR 24	pos	166G	DI A/DI A
19	IPR 25	neg	166A	DI B/DI B
20	IPR 26	neg	166A	DI B/DI B
21	IPR 28	neg	166A	DI B/DI B
22	IPR 29	pos	166G	DI A/DI A
23	IPR 30	pos	166A/G	DI A/DI B
24	IPR 31	pos	166A/G	DI A/DI B
25	IPR 32	neg	166A	DI B/DI B
26	IPR 33	pos	166G	DI A/DI A
27	IPR 34	neg	166A	DI B/DI B
28	IPR 35	pos	166A/G	DI A/DI B
29	IPR 36	pos	166A/G	DI A/DI B
30	IPR 37	pos	166A/G	DI A/DI B
31	IPR 38	pos	166A/G	DI A/DI B
32	IPR 39	pos	166G	DI A/DI A
33	IPR 40	neg	166A	DI B/DI B
34	IPR 41	neg	166A	DI B/DI B
35	IPR 43	pos	166A/G	DI A/DI B

Tabela 14: Resultados da fenotipagem Di^a e da genotipagem Diego/Memphis nas amostras de sangue e DNA de índios Parakanãs (cont.)

Nº	Identificação	Fenótipo Di ^a	Genótipo Memphis	Genótipo Diego
36	IPR 44	pos	166G	DI A/DI A
37	IPR 45	pos	166A/G	DI A/DI A
38	IPR 46	pos	166G	DI A/DI A
39	IPR 48	pos	166G	DI A/DI A
40	IPR 49	pos	166G	DI A/DI A
41	IPR 51	pos	166G	DI A/DI A
42	IPR 52	neg	166A	DI B/DI B
43	IPR 53	pos	166G	DI A/DI A
44	IPR 54	pos	166G	DI A/DI A
45	IPR 55	pos	166A/G	DI A/DI B
46	IPR 56	pos	166G	DI A/DI A
47	IPR 57	pos	166A/G	DI A/DI B
48	IPR 58	pos	166G	DI A/DI A
49	IPR 59	pos	166A/G	DI A/DI B
50	IPR 60	pos	166A/G	DI A/DI B
51	IPR 61	pos	166A/G	DI A/DI B
52	IPR 62	pos	166A/G	DI A/DI B
53	IPR 63	pos	166G	DI A/DI A
54	IPR 64	pos	166A/G	DI A/DI B
55	IPR 65	pos	166G	DI A/DI A
56	IPR 66	pos	166A/G	DI A/DI B
57	IPR 67	pos	166G	DI A/DI A
58	IPR 68	pos	166A/G	DI A/DI B
59	IPR 69	neg	166A	DI B/DI B
60	IPR 70	pos	166A/G	DI A/DI B
61	IPR 71	pos	166G	DI A/DI A
62	IPR 72	pos	166G	DI A/DI A
63	IPR 73	pos	166G	DI A/DI A
64	IPR 75	neg	166A	DI B/DI B
65	IPR 77	pos	166A/G	DI A/DI A
66	IPR 78	pos	166G	DI A/DI A
67	IPR 79	pos	166A/G	DI A/DI A
68	IPR 81	pos	166G	DI A/DI A
69	IPR 85	pos	166A/G	DI A/DI B
70	IPR 87	pos	166A/G	DI A/DI B

Tabela 15: Intervalo de confiança para diferença das proporções –alelo *DI A*

Comparação <i>DI A</i>	p1	p2	n1	n2	lim-inf	Dif (p1-p2)	Lim sup	z	alfa	alfa/2
doadores x africanos	0,016	0,006	93	85	-0,020	0,010	0,040	1,96	5%	0,025
	0,016	0,006	93	85	-0,030	0,010	0,050	2,575	1%	0,005
doadores x japoneses	0,016	0,070	93	71	-0,119	-0,054	0,011	1,96	5%	0,025
	0,016	0,070	93	71	-0,139	-0,054	0,031	2,575	1%	0,005
doadores x índios	0,016	0,571	93	70	-0,674	-0,555	-0,436	1,96	5%	0,025
	0,016	0,571	93	70	-0,711	-0,555	-0,399	2,575	1%	0,005
africanos x japoneses	0,006	0,070	85	71	-0,126	-0,064	-0,002	1,96	5%	0,025
	0,006	0,070	85	71	-0,145	-0,064	0,017	2,575	1%	0,005
africanos x índios	0,006	0,571	85	70	-0,682	-0,565	-0,448	1,96	5%	0,025
	0,006	0,571	85	70	-0,719	-0,565	-0,411	2,575	1%	0,005
japoneses x índios	0,070	0,571	71	70	-0,631	-0,501	-0,371	1,96	5%	0,025
	0,070	0,571	71	70	-0,672	-0,501	-0,330	2,575	1%	0,005

Tabela 16: Intervalo de confiança para diferença das proporções –alelo *DI B*

Comparação <i>DI B</i>	p1	p2	n1	n2	Lim inf	Dif (p1-p2)	Lim sup	z	alfa	alfa/2
doadores x africanos	0,984	0,994	93	85	-0,040	-0,010	0,020	1,96	5%	0,025
	0,984	0,994	93	85	-0,050	-0,010	0,030	2,575	1%	0,005
doadores x japoneses	0,984	0,929	93	71	-0,010	0,055	0,120	1,96	5%	0,025
	0,984	0,929	93	71	-0,030	0,055	0,140	2,575	1%	0,005
doadores x índios	0,984	0,428	93	70	0,437	0,556	0,675	1,96	5%	0,025
	0,984	0,428	93	70	0,400	0,556	0,712	2,575	1%	0,005
africano x japoneses	0,994	0,929	85	71	0,003	0,065	0,127	1,96	5%	0,025
	0,994	0,929	85	71	-0,016	0,065	0,146	2,575	1%	0,005
africano x índios	0,994	0,428	85	70	0,449	0,566	0,685	1,96	5%	0,025
	0,994	0,428	85	70	0,412	0,566	0,720	2,575	1%	0,005
japoneses x índios	0,929	0,428	71	70	0,371	0,501	0,631	1,96	5%	0,025
	0,929	0,428	71	71	0,331	0,501	0,671	2,575	1%	0,005

Tabela 17: Intervalo de confiança para diferença das proporções –alelo 166A

Comparação 166A	p1	p2	n1	n2	Lim inf	Dif (p1-p2)	Lim sup	z	alfa	alfa/2
doadores x africanos	0,957	0,910	93	84	-0,027	0,047	0,121	1,96	5%	2,5%
	0,957	0,910	93	84	-0,050	0,047	0,144	2,575	1%	0,5%
doadores x japoneses	0,957	0,810	93	71	0,047	0,147	0,247	1,96	5%	2,5%
	0,957	0,810	93	71	0,015	0,147	0,279	2,575	1%	0,5%
doadores x índios	0,957	0,457	93	70	0,376	0,500	0,624	1,96	5%	2,5%
	0,957	0,457	93	70	0,337	0,500	0,663	2,575	1%	0,5%
africanos x japoneses	0,910	0,810	84	71	-0,010	0,100	0,210	1,960	5%	2,5%
	0,910	0,810	84	71	-0,044	0,100	0,244	2,575	1%	0,5%
africanos x índios	0,910	0,457	84	70	0,321	0,453	0,585	1,960	5%	2,5%
	0,910	0,457	84	70	0,280	0,453	0,626	2,575	1%	0,5%
japoneses x índios	0,810	0,457	71	70	0,205	0,353	0,501	1,960	5%	2,5%
	0,810	0,457	71	70	0,158	0,353	0,548	2,575	1%	0,5%

Tabela 18: Intervalo de confiança para diferença das proporções –alelo 166G

Comparação 166AG	p1	p2	n1	n2	Lim inf	Dif (p1-p2)	Lim sup	z	alfa	alfa/2
doadores x africanos	0,043	0,089	93	84	-0,120	-0,046	0,028	1,96	5%	2,5%
	0,043	0,089	93	84	-0,143	-0,046	0,051	2,575	1%	0,5%
doadores x japoneses	0,043	0,190	93	71	-0,247	-0,147	-0,047	1,960	5%	2,5%
	0,043	0,190	93	71	-0,279	-0,147	-0,015	2,575	1%	0,5%
doadores x índios	0,043	0,543	93	70	-0,624	-0,500	-0,376	1,960	5%	2,5%
	0,043	0,543	93	70	-0,663	-0,500	-0,337	2,575	1%	0,5%
africanos x japoneses	0,089	0,190	84	71	-0,211	-0,101	0,009	1,960	5%	2,5%
	0,089	0,190	84	71	-0,245	-0,101	0,043	2,575	1%	0,5%
africanos x índios	0,089	0,543	84	70	-0,586	-0,454	-0,322	1,960	5%	2,5%
	0,089	0,543	84	70	-0,627	-0,454	-0,281	2,575	1%	0,5%
japoneses x índios	0,190	0,543	71	70	-0,501	-0,353	-0,205	1,960	5%	2,5%
	0,190	0,543	71	70	-0,548	-0,353	-0,158	2,575	1%	0,5%