



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da**  
**Saúde**

---

**MARCOS PAULO MIOLA**

**Resolução de Discrepâncias do Sistema**  
**Histo-Sanguíneo ABO**

**São José do Rio Preto**  
**2017**

Marcos Paulo Miola

## Resolução de Discrepâncias do Sistema Histo-Sanguíneo ABO

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para a obtenção do título de Mestre no curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Eixo temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto  
2017

Miola, Marcos Paulo

Resolução de Discrepâncias do Sistema Histo-Sanguíneo ABO  
São José do Rio Preto, 2017

136 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do  
Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

1. Sistema de Grupo Sanguíneo ABO; 2. Testes Sorológicos; 3.  
Tipagem Molecular; 4. Glicosiltransferases; 5. Grupo Sanguíneo  
Secretor Alfa-2-fucosiltransferase.

Marcos Paulo Miola

Resolução de Discrepâncias do Sistema de  
Histo-Sanguíneo ABO

BANCA EXAMINADORA  
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE

Presidente e Orientador: Luiz Carlos de Mattos

2º Examinador: Haroldo Wilson Moreira

3º Examinador: Roberta Maria Fachini

Suplentes: Claudia Regina Bonini Domingos

Marcus Alexandre Mendes Luz

São José do Rio Preto, 13 / 03 / 2017.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas e Quadros.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Histórico.....	2
1.2 Fenótipos.....	8
1.3 Gene <i>ABO</i> .....	11
1.4 Terminologia e nomenclatura.....	19
1.5 Subgrupos <i>ABO</i> .....	22
1.5.1 Alelos comuns.....	22
1.5.2 Alelos com fraca expressão ou raros.....	27
1.6 Discrepâncias <i>ABO</i> .....	36
1.6.1 Competição entre <i>GTA</i> e <i>GTB</i> pelo antígeno <i>H</i> .....	39
1.6.2 Anticorpos anti- <i>A</i> e anti- <i>B</i> : origem e importância na fenotipagem <i>ABO</i> .....	41

1.6.3 Quimerismo.....	43
1.7 Resolução de Discrepâncias ABO.....	46
1.7.1 Estratégias sorológicas deste estudo.....	49
1.7.2 Estratégias moleculares deste estudo.....	51
1.8 Objetivo geral.....	56
1.8.1 Objetivos específicos.....	56
<b>2. Manuscritos.....</b>	<b>57</b>
Manuscrito 1. Use of serological and molecular methods to resolve ABO discrepancies.....	59
Manuscrito 2. Quimerismo entre gêmeos dizigóticos com campo misto na fenotipagem eritrocitária ABO.....	78
<b>3. Conclusões.....</b>	<b>95</b>
<b>4. Referências.....</b>	<b>97</b>
<b>5. Apêndices.....</b>	<b>119</b>
Apêndice 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	120
Apêndice 2. Ficha de dados clínicos e familiar.....	122
Apêndice 3. Protocolos de coleta, armazenamento e transporte de amostra de sangue periférico.....	123
Apêndice 4. Protocolos de coleta, armazenamento e transporte de amostras de saliva e <i>swab</i> .....	124

Apêndice 5.	Resumo apresentado na forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2014, 6-9 de novembro de 2014, Florianópolis, SC, Brasil.....	125
Apêndice 6.	Resumo apresentado na forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2015, 19-22 de novembro de 2015, São Paulo, SP, Brasil.....	126
Apêndice 7.	Resumo apresentado na forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2015, 19-22 de novembro de 2015, São Paulo, SP, Brasil.....	127
Apêndice 8.	Participação como palestrante no First Latin American Transfusion Science Course, 18-20 de abril de 2016, Lagoa Santa, MG, Brasil.....	128
Apêndice 9.	Resumo apresentado na forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2016, 10-13 de novembro de 2016, Florianópolis, SC, Brasil.....	129
Apêndice 10.	Resumo apresentado na forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2016, 10-13 de novembro de 2016, Florianópolis, SC, Brasil.....	130
<b>6. Anexos.....</b>		<b>131</b>
Anexo 1.	Tabela com os resultados sorológicos e moleculares dos casos analisados.....	132

Anexo 2.	Resultados identificados com sequenciamento direto a partir da sequência referência do sistema ABO.....	133
Anexo 3.	Quadro com os resultados do momento da resolução ABO diante dos protocolos utilizado neste estudo.....	134
Anexo 4.	Resultados identificados no caso M13 com sequenciamento direto a partir da sequência referência do gene <i>FUT2</i> .....	135
Anexo 5.	Eletroferograma com as variações de intensidade promovidas pela quimera dupla em gêmeos dizigóticos envolvendo quatro alelos.....	136

**DEDICATÓRIA:**

Dedico este trabalho à minha mãe Izaura,  
pela formação de meu caráter, com dificuldade, simplicidade, amor e carinho.

À minha esposa Sabrina,  
pelo companheirismo, pela ajuda se desdobrando entre seu ofício e os  
cuidados com nosso lar e filho, enquanto eu estudava.

E ao meu filho Artur,  
por me fazer experimentar sentimentos tão sublimes, por aprender a digitar  
enquanto eu tentava, por querer ajudar no meu trabalho “importante”, em  
desculpas pelo tempo que deixamos de ficar juntos, mas saiba que sempre  
estive com você e que foi um dos maiores e melhores estímulos para a  
conclusão deste trabalho.

Obrigado!

**AGRADECIMENTOS:**

Desejo expressar meus sinceros agradecimentos:

Ao meu mestre e orientador Professor Luiz Carlos de Mattos, pela confiança, incentivo, apoio, paciência, pelos ensinamentos e amizade.

À Professora Doutora Cínara de Cássia Brandão de Mattos, pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e seus Coordenadores.

Ao Professor Dr. Octávio Ricci Junior, Diretor do Hemocentro de São José do Rio Preto, pela oportunidade de crescimento profissional e confiança, assim como, a parceria neste trabalho.

À Professora Dra. Roberta Maria Fachini, pela parceria e oportunidade de aprender com o desafio de gerir a Agência Transfusional Hospital de Base, pelos ensinamentos, consultoria e amizade.

Ao Dr. Carlos Eduardo Miguel, pelo incentivo e ajuda na indicação do orientador.

Aos Colegas de trabalho, em especial, à equipe da Agência Transfusional Hospital de Base.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Imunogenética, em especial, aos que contribuíram com o meu trabalho, direta ou indiretamente.

Ao grupo de estudo do laboratório do professor Dr. Maurício, em especial, à Tatiane Colombo e ao Professor Aripuanã.

Ao Prof. Dr. João Pessoa de Araújo Júnior, responsável pelo Laboratório de Diagnóstico Molecular e Sequenciamento – IBTec / UNESP de Botucatu, e sua equipe, pela parceria com o sequenciamento.

Aos meus Irmãos, Jair, Heder, Edna, Ricardo e Kassia, por toda convivência juntos, contribuindo com meu caráter e minha formação pessoal.

À Alessandra Pulier da Silva, do Serviço de Hemoterapia do Hospital Naval Marcílio Dias do Rio de Janeiro, pelo caso de quimerismo que nos enviou.

À Ana Lúcia Girello, por confiar e indicar nosso trabalho.

Aos doadores e pacientes que autorizaram a pesquisa e fizeram parte deste estudo, possibilitando as descobertas e contribuindo com minha formação.

**EPÍGRAFE**

*“ A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ”*

*Arthur Schopenhauer*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	a) Dr. Karl Landsteiner (≈1920): Descobridor do sistema de grupo sanguíneo ABO. b) Publicação original de 1901: “fenômenos de aglutinação de sangue humano normal”.....	3
<b>Figura 2.</b>	Representação dos componentes da membrana das hemácias que expressam os antígenos (b) em comparação a um “jardim” (a).....	7
<b>Figura 3.</b>	Fenótipos, antígenos e anticorpos do sistema histossanguíneo ABO.....	10
<b>Figura 4.</b>	Organização do gene <i>ABO</i> .....	12
<b>Figura 5.</b>	Estruturas bioquímicas necessárias para formação do antígeno H.....	13
<b>Figura 6.</b>	Representação das variações espaciais das estruturas moleculares (isoformas) de um antígeno em um formato tridimensional.....	15
<b>Figura 7.</b>	Estrutura da glicosiltransferase no complexo de golgi.....	16
<b>Figura 8.</b>	Representação da biossíntese dos antígenos do grupo sanguíneo ABO a partir de estruturas precursoras tipo 2 (H), na hemácia.....	18
<b>Figura 9.</b>	Representação contendo a localização das principais mutações entre os alelos comuns do Sistema ABO.....	27
<b>Figura 10.</b>	Padrão eletroforético da reação de PCR-RFLP e corte enzimático com enzima <i>Kpn I</i> .....	53

---

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Genótipos, fenótipos e anticorpos do sistema de grupo sanguíneo ABO postulado por Bernstein em 1924.....	6
<b>Tabela 1.</b>	Frequência fenotípica em porcentagem entre diferentes grupos étnicos de algumas populações.....	11
<b>Quadro 2.</b>	Precursor ABH, estrutura bioquímica e distribuição nos tecidos.....	14
<b>Quadro 3.</b>	Diferentes nomenclaturas utilizadas na identificação de fenótipos, antígenos e alelos do sistema ABO.....	21
<b>Quadro 4.</b>	Padrões sorológicos dos principais subgrupos do sistema ABO.....	28
<b>Quadro 5.</b>	Principais causas de discrepâncias do sistema ABO.....	37
<b>Quadro 6.</b>	Fatores que influenciam ou causam discrepância ABO.....	48
<b>Quadro 7.</b>	Estratégias sorológicas para resolução de discrepâncias ABO.....	49
<b>Quadro 8.</b>	Estratégias moleculares para resolução de discrepâncias ABO.....	52
<b>Quadro 9.</b>	Relação dos <i>primers</i> , localização no cromossomo, tamanho do fragmento e gene, utilizados neste trabalho.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

>	Maior que
<	Menor que
≤	Menor ou igual que
=	Igual
≈	Aproximadamente igual
%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
β1-3	Ligação química tipo beta entre carbonos 1 e 3
β1-4	Ligação química tipo beta entre carbonos 1 e 4
aa(s)	Aminoácido(s)
AABB	Associação Americana de Banco de Sangue
<i>ABO</i>	Gene que determina os alelos dos grupos A, B e O.
ABH	Antígenos A, B e H
ag	Antígeno
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
Asn	Asparagina
<i>Ava II</i>	Enzima de restrição
BGMUT	Banco de dados para mutações dos genes e antígenos de grupos sanguíneos
CD5+	Conjunto de moléculas de Diferenciação 5 positivo

---

CD5-	Conjunto de moléculas de Diferenciação 5 negativo
cel	Célula
CM	Campo misto
CRG	Consórcio de Referência Genômica
dbRBC	Banco de dados de glóbulos vermelhos humanos
del	Deleção
delG	Deleção de uma base de nucleotídeo guanina
DTT	Ditiotreitol
Fen	Fenilalanina
Fuc	Fucose
Fuc-1	Fucosiltransferase do tipo 1, atuante em cadeias precursoras do tipo 2 na hemácia
Fuc-2	Fucosiltransferase do tipo 2, atuante em cadeias precursoras do tipo 1 de secreções e plasma
Fuc- $\alpha$ (1,2)	Fucose em ligação alfa nos carbonos 1 ou 2.
Fuc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2	Fucose em ligação alfa nos carbonos 1 e 2.
<i>FUT1</i>	Gene que determina o antígeno H
FUT1	Enzima Fucosiltransferase-1
<i>FUT2</i>	Gene que determina a condição secretora
FUT2	Enzima Fucosiltransferase-2
Gal	Galactose
Gal- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3	Galactose em ligação alfa entre os carbonos 1 e 3.
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GDP	guanosina difosfato

GDP-Fuc	guanosina difosfato – fucose
Glc	Glucose
GlcNac	N-Acetilglucosamina
Gli	Glicina
GT(s)	Glicosiltransferase(s)
GTA	Glicosiltransferase A (3- $\alpha$ -N-Acetilgalactosaminiltransferase encontrada em indivíduos que carregam o gene A)
GTB	Glicosiltransferase B ( $\alpha$ -3-D-Galactosiltransferase encontrada em indivíduos que carregam o gene B)
His	Histidina
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgM	Imunoglobulina de classe M
IgG	Imunoglobulina de classe G
Ile	Isoleucina
ISBT	Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea
kb	kilo bases
Km	Constante de molaridade
Kpn I	Enzima de restrição
kDa	Kilo Dalton
NCBI	Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
nt(s)	Nucleotídeo(s)
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
pH	Potencial Hidrogeniônico
R	Radical formado de Glicoproteína ou Glicolípido
RE	Retículo endoplasmático
SNP(s)	Substituição(ões) de aminoácido(s) por alteração de único nucleotídeo
Trp	Triptofano
UDP	Uracíla Difosfato
UDP-Gal	Uracíla Difosfato doador de Galactose
UDP-GalNAc	Uracíla Difosfato doador de N-Acetilgalactosamina

## RESUMO

**Introdução.** O sistema histo-sanguíneo ABO é o de maior importância transfusional e a identificação de seus fenótipos é frequentemente realizada por meios das tipagens direta e reversa as quais sempre devem apresentar resultados concordantes. Entretanto, alguns fatores genéticos como quimerismos naturais e mutações pontuais no gene *ABO*, podem afetar a expressão dos antígenos e anticorpos deste sistema, contribuindo com a discrepância nas fenotipagens, requerendo investigações para se definir o correto fenótipo de receptores e doadores de sangue. **Objetivos.** O objetivo geral deste estudo foi investigar as variações na expressão dos antígenos do sistema histo-sanguíneo ABO. Seus objetivos específicos compreenderam: **1.** Seleção de receptores e doadores de sangue que apresentaram discrepâncias entre os resultados das fenotipagens direta e reversa do sistema histo-sanguíneo ABO; **2.** Investigação, com o uso de métodos sorológicos e moleculares, das causas das alterações fenotípicas e discrepâncias entre os resultados das fenotipagens direta e reversa no sistema histo-sanguíneo ABO nos receptores e doadores de sangue. **Material e Método.** Foram selecionadas amostras de receptores (n=2) e doadores (n=7) de sangue com discrepâncias entre as fenotipagens direta e reversa. As fenotipagens foram realizadas com o uso dos métodos de hemaglutinação convencional e modificada, em tubos e colunas de gel, com antissoros comerciais e lectinas. As investigações moleculares foram realizadas com o uso dos métodos PCR-RFLP e sequenciamento dos exons 6 e 7 do gene *ABO* e do exon 2 do gene *FUT2*. **Resultados:** Quatro casos com fraca expressão do antígeno A e ausência do

anticorpo esperado, observados na hemaglutinação, foram identificados como A<sub>2</sub>B, A<sub>el</sub> e A<sub>w</sub>. Quatro casos sem alteração antigênica, mas com presença de anticorpo irregular ou ausência do anticorpo esperado, foram caracterizados como AB, A<sub>1</sub> e O e apresentaram alelos comuns. Um caso de gêmeos não dizigóticos, fenotipados como AB e com dupla população de hemácias foi caracterizado como quimera hematopoiética, após extensa análise familiar. O DNA extraído de swab bucal revelou os genótipos ABO (*A101/B101*) e FUT2 (*SE\*25.01.01/SE\*25.01.01*) no gêmeo masculino e os genótipos ABO (*O01/O02*) e FUT2 (*SE\*01.04.01/SE\*01.06.03*) no gêmeo feminino. As sequências de dois novos alelos dos genes ABO (*ABO\*Aw.38*; KT906366.1) e FUT2 (*SE\*01.06.03*; KX550421) foram depositadas no *GenBank*. **Conclusões:** Nossos resultados demonstram que o uso de análises sorológicas eritrocitárias e salivares combinadas a métodos moleculares são fundamentais na resolução de discrepâncias entre as fenotipagens direta e reversa do sistema histossanguíneo ABO bem como no esclarecimento de casos de quimerismo gemelar em humanos, contendo dupla população de hemácias. Além disso, contribuem para a identificação de novos alelos dos genes ABO e FUT2.

**Palavras-chave:** Sistema do Grupo Sanguíneo ABO; Testes Sorológicos; Tipagem Molecular; Glicosiltransferases; Grupo Sanguíneo Secretor Alfa-2-fucosiltransferase.

## ABSTRACT

**Introduction.** ABO histo-blood group system is the most important transfusional system and the identification of its phenotypes is often performed by means of direct and reverse typing, which must always present concordant results. However, some genetic factors such as natural chimerisms and point mutations in the *ABO* gene may affect the expression of the antigens and antibodies of this system, contributing to the discrepancy in the phenotyping, requiring investigations to define the correct phenotype of receptors and blood donors. **Objectives.** The main objective of this study was to investigate the variations in the expression of the antigens of the ABO histo-blood group system. Its specific objectives were: **1.** Selection of recipients and blood donors that presented discrepancies between the results of the direct and reverse phenotyping of the ABO histo-blood group system; **2.** Investigation, using serological and molecular methods, of the causes of phenotypic changes and discrepancies between the results of direct and reverse phenotypes in the ABO histo-blood group system in the recipients and donors of blood. **Material and Methods.** Samples of recipients ( $n = 2$ ) and blood donors ( $n = 7$ ) presenting discrepancies between the direct and reverse phenotyping were selected. Phenotyping were performed using conventional and modified hemagglutination methods in tubes and gel columns with commercial antisera and lectins. Molecular investigations were performed using PCR-RFLP method and sequencing of exons 6 and 7 of the *ABO* gene and exon 2 of the *FUT2* gene. **Results.** Four cases with poor expression of antigen A and absence of expected antibody, observed in hemagglutination, were identified as  $A_2B$ ,  $A_{el}$

and  $A_w$ . Four cases without antigenic alteration but carrying an irregular antibody anti- $A_1$  or absence of expected antibody were characterized as AB,  $A_1$  and O and presented common ABO alleles. A case of non-dizygotic twins, phenotyped as AB and with double red blood cell population was characterized as hematopoietic chimera after extensive family analysis. The DNA extracted from buccal swab revealed the ABO ( $A101/B101$ ) and FUT2 ( $SE^*25.01.01/SE^*25.01.01$ ) genotypes in the male twin and the ABO ( $O01/O02$ ) and FUT2 ( $SE^*01.04.01/SE^*01.06.03$ ) genotypes in the female twin. Sequences of two new ABO ( $ABO^*Aw.38$ ; KT906366.1) and FUT2 ( $SE^*01.06.03$ ; KX550421) allele sequences were deposited on GenBank. **Conclusions.** Our results demonstrate that the use of serum and salivary serological assays combined with molecular methods are good tools to solving discrepancies between the direct and reverse phenotyping of the ABO histo-blood group system as well as elucidate cases of twin chimerism in humans, with a double population of red blood cells. In addition, they contribute to the identification of new alleles of the *ABO* and *FUT2* genes.

**Key-words:** ABO Blood-Group System; Serologic Tests; Molecular Typing; Glycosyltransferases; Secretor Blood Group Alpha-2-fucosyltransferase.

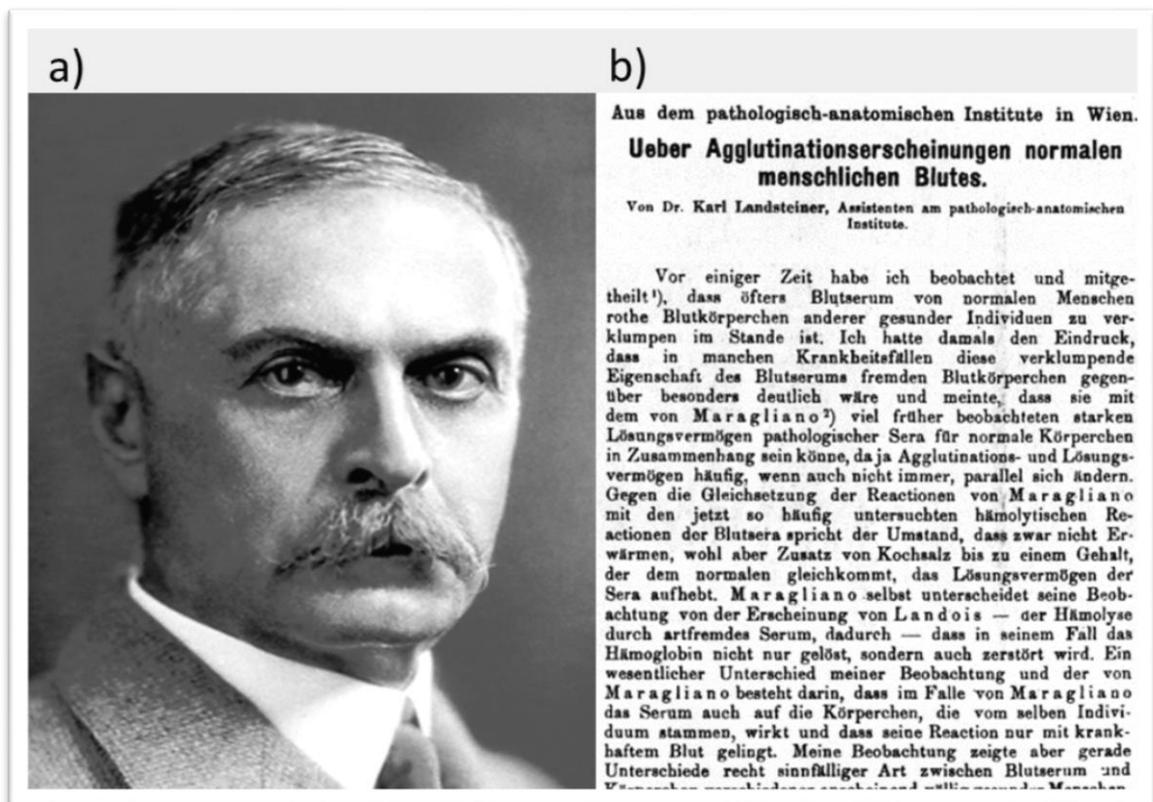
## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Histórico

Os sistemas de grupos sanguíneos humanos surgiram em 1900, em Viena, quando Karl Landsteiner (figura 1.a), um cientista Austríaco de 32 anos descobriu o primeiro sistema de grupo sanguíneo da história após realizar experimentos com amostras de cinco colegas de laboratório e a sua própria, misturando hemácias e soro.<sup>(1, 2)</sup> Esta descoberta mudou a forma de pensar da época demonstrando que o sangue não era o mesmo em todas as pessoas.<sup>(3-5)</sup> A constatação foi relatada em uma breve nota em 1900, esta nota afirmou que o soro de seres humanos saudáveis não só tem um efeito aglutinador de sangue animal, mas também de humanos de diferentes indivíduos.<sup>(6)</sup> Ele relatou acreditar que este fenômeno era devido a diferenças individuais originais ou por uma influência de lesões como possível infecção bacteriana.<sup>(1)</sup> Os experimentos definitivos mostraram que as infecções não alteravam as reações e que era possível classificar a população em três grupos com base nas reações das hemácias e soros de indivíduos saudáveis, sendo publicado no ano seguinte, em 1901 (figura 1.b).<sup>(2, 6, 7)</sup>

Landsteiner explicou suas descobertas propondo a existência de três grupos, que chamou de A, B e C, onde A e B aglutinavam com padrões diferentes e C não aglutinava, sendo este último posteriormente substituído pela letra O.<sup>(1)</sup> Um ano depois seus colegas de laboratório Decastello & Sturli, identificou o grupo AB, onde as hemácias aglutinavam com quase todos os plasmas testados, mas o plasma destes indivíduos não aglutinava outras hemácias.<sup>(4, 6, 8)</sup>



**Figura 1.** a) Dr. Karl Landsteiner (≈1920): Descobridor do sistema ABO. b) Publicação original de 1901: “fenômenos de aglutinação de sangue humano normal”. (2, 6, 9)

A descoberta do sistema ABO possibilitou entender que a presença de anticorpos regulares era o que faltava para uma prática segura de transfusão de sangue. O significado de sua descoberta e observações sobre as consequências resultantes de transfusões de sangue a fins terapêuticos, se tornou evidente e comum somente após a Primeira Guerra Mundial (1914-1918).<sup>(10, 11)</sup> Landsteiner recebeu um Prêmio Nobel de medicina por sua descoberta em 1930.<sup>(5)</sup>

Em 1952, Dodd e colaboradores<sup>(4)</sup> através de seus estudos identificaram um anticorpo que só foi encontrado em indivíduos do grupo O. Este anticorpo foi chamado de anti-A,B por reconhecer epítomos comuns dos antígenos A e B, sendo identificado somente por adsorção e eluição.<sup>(12)</sup> Com o

conhecimento dos quatro tipos diferentes de grupos ABO, classificados por dois antígenos (A e B) e basicamente por dois anticorpos (anti-A e anti-B), foi postulado na época que: quando o antígeno identificado por uma letra (A ou B) estiver presente nas hemácias, o anticorpo identificado pela letra contrária (anti-B ou anti-A, respectivamente) deverá estar presente no plasma. Esta proposição ficou conhecida como “Lei de Landsteiner” e permanece válida até os dias atuais.<sup>(13)</sup>

O interesse científico nos grupos ABO foi aumentando consideravelmente e não demorou para descobrir que antígenos A e B deveriam ser herdados. Landsteiner havia considerado que os grupos sanguíneos foram definidos pelos anticorpos presentes no soro, mas o fato de que os antígenos celulares foram os fatores responsáveis pela formação destes anticorpos foi reconhecido por von Dungern e Hirsfeld em 1910.<sup>(2, 14, 15)</sup> Estes autores mostraram que as especificidades antigênicas A e B são herdadas de forma codominantes e dominantes sobre o O. Propuseram que A e B foram herdados independentemente um do outro e que a sua herança dependia de dois pares de genes com os alelos *A* e *a*, *B* e *b*. Embora essa ideia tenha sido contestada por mais de uma década, somente em 1924 os estudos de Bernstein<sup>(16, 17)</sup> concluíram que a teoria dos dois pares de genes independentes era insustentável. Ele propôs o modelo de três alelos de acordo com o qual *A*, *B* e *O* são formas alternativas de um único locus genético. Assim, uma criança pode receber um dos três alelos de cada um dos pais dando origem aos seis genótipos, AA, AO, BB, BO, AB e OO, e os quatro

fenótipos, A, B, AB e O, que são detectáveis com reagentes de referência anti-A e anti-B (quadro 1).<sup>(17)</sup>

A primeira alteração fenotípica por enfraquecimento foi observada em 1911 por von Dungern e Hirszfeld<sup>(18)</sup> em indivíduos do grupo A, revelando a existência de subgrupos. Contudo, seus padrões de alteração fenotípica só foram definidos por Thomsen e colaboradores em 1930.<sup>(19)</sup> Eles descreveram os dois subgrupos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> que também podem ser explicados com base no modelo Bernstein. Subsequentemente, numerosos subgrupos com fenótipos fracos de A e B foram descritos e mesmo sem o conhecimento molecular, o modelo de Bernstein de múltiplos alelos é reconhecido atualmente como um grande acerto.<sup>(20, 21)</sup>

Em 1989 foi proposto pela primeira vez, renomear o sistema ABO como um sistema histo-sanguíneo, devido descoberta dos antígenos ABO em outras células e fluidos do corpo humano além das hemácias. Esta descoberta ampliou a complexidade do sistema ABO por demonstrar sua importância em transplantes de órgãos sólidos.<sup>(22)</sup>

Antígenos do sistema ABO foram os únicos marcadores genéticos utilizados em estudos forenses e antropológicos até a identificação de antígenos de outros grupos sanguíneos que foram descobertos, em sua maioria nos anos imediatamente após a Segunda Guerra Mundial.<sup>(5)</sup> Contudo, somente 90 anos após a descoberta do sistema ABO, em 1990 a base molecular foi elucidada por Yamamoto com a clonagem do *locus* ABO, sendo considerado o segundo momento mais importante da história deste sistema, onde os aminoácidos diferenciais dos alelos comuns foram identificados e em

1992 e 93 as mutações dos alelos raros também.<sup>(16, 23)</sup> O Quadro 1 apresenta os genótipos, fenótipos, anticorpos e os produtos do gene ABO.

**Quadro 1.** Genótipos, fenótipos e anticorpos do sistema de grupo sanguíneo ABO postulado por Bernstein em 1924.

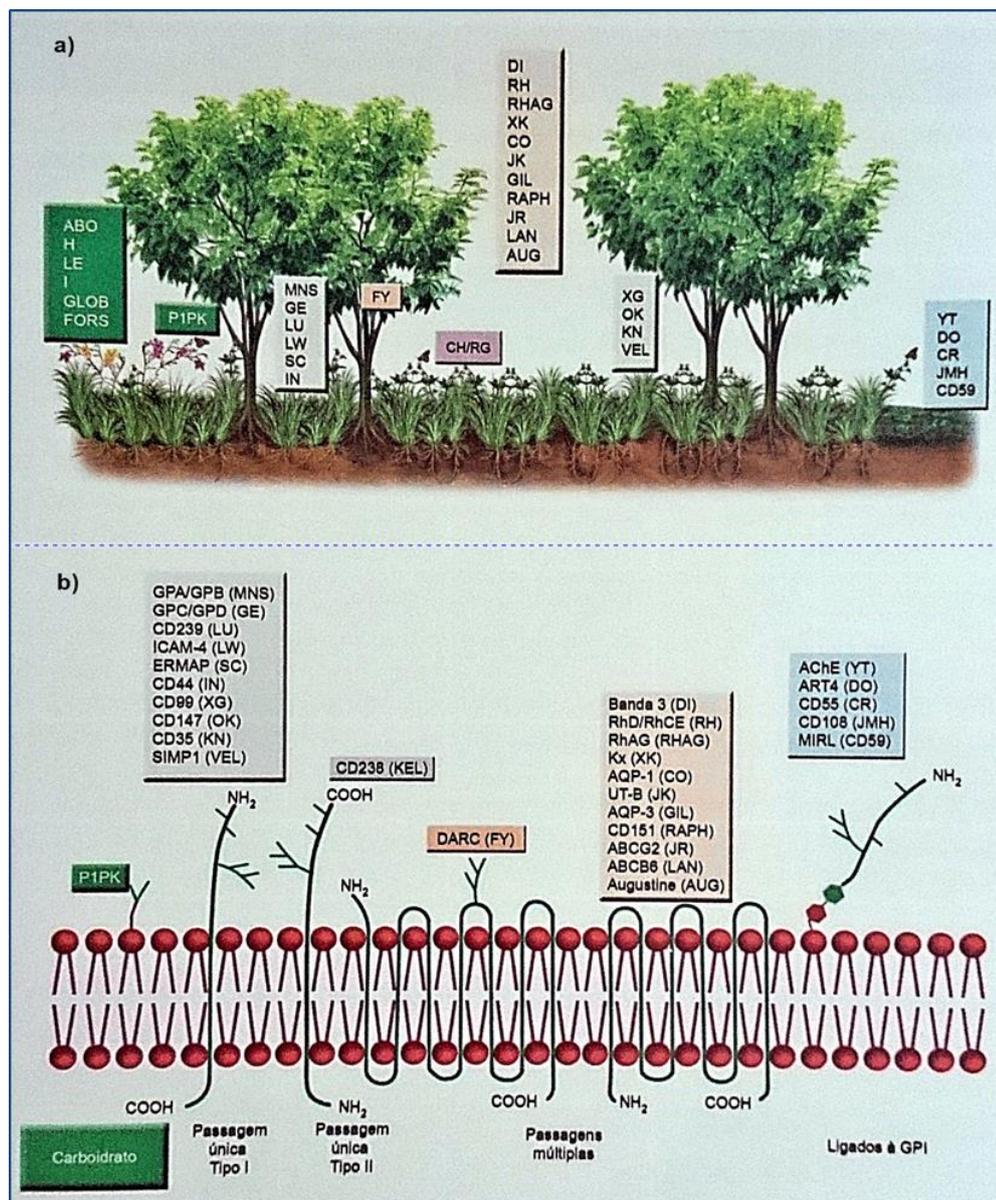
Hemácias		Soro/plasma	
Genótipos	Fenótipos	Anticorpos	Enzimas
<b>AA, AO</b>	A	anti-B	$\alpha$ -3-N-acetilgalactosaminiltransferase
<b>BB, BO</b>	B	anti-A	$\alpha$ -3-galactosiltransferase
<b>AB</b>	AB	-	$\alpha$ -3-N-acetilgalactosaminiltransferase e $\alpha$ -3-galactosiltransferase
<b>OO</b>	O	anti-A, anti-B, anti-A,B	$\alpha$ -3-galactosiltransferase

Adaptado de Bernstein (1924).<sup>(17)</sup>

O sistema ABO possui mais de 380 alelos, com cerca de 900 polimorfismos.<sup>(24)</sup> A maioria destes alelos resulta de polimorfismos de substituições de aminoácidos por alteração de único nucleotídeo (SNPs) que codificam glicosiltransferases (GTs) que adicionam os monossacarídeos que formam os antígenos de membrana das hemácias, demonstrando a grande variabilidade do sistema ABO.<sup>(25)</sup> Esta variabilidade se estende desde o gene que controla a expressão de seus antígenos através da atividade das enzimas codificadas, até a quantidade de antígenos presentes na membrana da hemácia e em outros tecidos.<sup>(7, 26)</sup>

Os sistemas de grupos sanguíneos constituem bons exemplos de eventos programados pela natureza que ainda despertam atenção da ciência e estão alinhados com a biologia moderna e a medicina transfusional.<sup>(27)</sup> Neste contexto, a investigação e a compreensão dos efeitos moduladores e dos

fatores que influenciam a variabilidade e a expressão dos antígenos de grupos sanguíneos na medicina transfusional, na saúde, na suscetibilidade e na resistência a doenças são caminhos a serem explorados pela ciência.<sup>(4, 28, 29)</sup> A representação das estruturas que formam os antígenos na membrana da hemácia e sua variabilidade pode ser observada na comparação da membrana celular com um jardim, conforme figura 2.



**Figura 2.** Representação dos componentes da membrana das hemácias que expressam os antígenos (b) em comparação a um “jardim” (a).<sup>(3)</sup>

## 1.2 Fenótipos

Os fenótipos do sistema ABO são caracterizados por reações sorológicas que se baseiam na pesquisa do antígeno, conhecida como prova direta e pela pesquisa dos anticorpos, chamada de prova reversa. A concordância entre ambas as provas associada a reatividades fortes, levam à caracterização segura dos fenótipos mais comuns, porém fenótipos com fraca expressão podem ter um comportamento sorológico de difícil interpretação ou até ser falho.<sup>(30-32)</sup>

Os seis fenótipos ABO principais são O, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, A<sub>1</sub>B e A<sub>2</sub>B. A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> são fenótipos que demonstram reatividade com anti-A, onde A<sub>1</sub> reage fortemente e A<sub>2</sub> pode apresentar reatividade mais fraca. Esta diferença sugere que o anticorpo anti-A apresenta especificidade contra regiões antigênicas comuns entre A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, presentes em menor quantidade em A<sub>2</sub>. A necessidade de diferenciação ocorre comumente quando os resultados sorológicos indicam discrepância entre as provas direta e reversa, devido à presença do anticorpo irregular anti-A<sub>1</sub>, relativamente comum em indivíduos A<sub>2</sub>.<sup>(7)</sup>

Considerando o princípio da lei de Landsteiner, o sistema imunológico produz anticorpos contra quaisquer antígenos de grupo sanguíneo ABO que não são encontrados nas hemácias autólogas. Assim, um indivíduo do grupo A terá anticorpos anti-B e alguns subgrupos diferentes de A<sub>1</sub> também podem apresentar anti-A<sub>1</sub>. Indivíduos do grupo B terão anticorpos anti-A. Os indivíduos que possuem o comum fenótipo O, devem ter os anticorpos anti-A, anti-B e anti-A,B no seu plasma. Seguindo esse raciocínio, indivíduos do grupo AB não devem ter os anticorpos anti-A, anti-B e anti-A,B no seu plasma.

Alguns raros indivíduos apresentam características sorológicas do grupo O em prova direta, porém, no seu soro encontram-se anticorpos anti-H. Estes indivíduos são chamados de Bombaim e só não podem apresentar antígenos A ou B de forma normal devido mutações no gene *FUT1* que inativam a enzima responsável pela síntese do antígeno H, precursor dos antígenos ABO.<sup>(33, 34)</sup>

Mutações no gene *ABO* podem levar a modificações fenotípicas. A sequência de nucleotídeos do fenótipo A<sub>1</sub> é considerada a referência. Este fenótipo pode apresentar até 10<sup>6</sup> antígenos por célula que reagem com anti-A<sub>1</sub> e compõem cerca de 80% dos indivíduos do grupo A, enquanto hemácias com o fenótipo A<sub>2</sub>, apresentam cerca de 5 vezes menos antígenos e não reagem com anti-A<sub>1</sub>, correspondendo a cerca de 20% dos indivíduos do grupo A. Existe muitos outros subgrupos de A que podem expressar um antígeno A fraco, enquanto que as variantes com antígeno B fraco são muito mais raras, possivelmente devido à menor frequência populacional do fenótipo B.<sup>(30, 35)</sup>

A Figura 3 ilustra os quatro principais fenótipos eritrocitários do sistema histo-sanguíneo ABO com seus antígenos e anticorpos regulares. Além disso demonstra alguns dos fatores necessários para determinação dos grupos ABO, características dos anticorpos presentes em cada grupo bem como do tipo Bombaim que se comporta sorologicamente como o grupo O.

<b>Antígeno</b> (hemácia)	<b>Antígeno A</b> ( $10^6$ ag./cel.)  ( $A_1 > A_2 > A_3 > \dots > A_{ei}$ )	<b>Antígeno B</b> ( $7.5 \times 10^5$ ag./cel.)  ( $B > B_3 > \dots > B_{ei}$ )	<b>Antígeno A + B</b> ( $8.5 \times 10^5$ ag./cel.)  [ <i>cis</i> -AB; B(A)]	<b>A/B ausente</b> ( $10^6$ ag.H/cel.)  ( $O_1 = O_2 > O_3$ )	<b>H ausente</b> (mutação não ABO)  (Fenótipo O)
<b>Anticorpo</b> (Soro ou plasma)	<b>Anti-B</b> 	<b>Anti-A</b> 	<b>Ausentes</b>	<b>Anti-A, -B e -A,B</b> 	<b>Anti-A; -B; -A,B e -H</b> 
<b>Grupo ABO</b> (Característica)	<b>Grupo A</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Subgrupos podem produzir anti-A1 (<math>A_2 \approx 1\%</math>; <math>A_2B \approx 25\%</math>);</li> <li>Anti-B e anti-A1: IgG, IgM e IgA;</li> <li>Pode ativar complemento e causar hemólise intravascular</li> </ul>	<b>Grupo B</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Anti-A: com títulos maiores, sendo considerado mais potente que anti-B</li> <li>IgG, IgM e IgA;</li> <li>Pode ativar complemento e causar hemólise intravascular</li> </ul>	<b>Grupo AB</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Não possui anticorpos ABH</li> <li>Ideal para produção de imunoglobulina intravenosa</li> <li>Secretores devem possuir antígenos solúveis A e B</li> </ul>	<b>Grupo O</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Anti-A e anti-B semelhante aos grupos A e B;</li> <li>Anti-AB: quase sempre IgG, ativa complemento, reconhece antígenos semelhantes mas diferentes de A ou B</li> </ul>	<b>Bombaim</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Anti-A, anti-B e anti-A,B similar ao Grupo O</li> <li>Anti-H: IgG e IgM de elevada importância clínica</li> <li>H deficientes não secretores</li> </ul>

**Figura 3.** Fenótipos, antígenos e anticorpos do sistema histo-sanguíneo ABO. Adaptado de Donald R. Branch.<sup>(6)</sup>

A subdivisão dos fenótipos A ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_x$ ,  $A_{ei}$ , etc) se deu com base nas características sorológicas de reatividade com antissoros policlonais humanos. Foram considerados os seguintes fatores: a intensidade da reação, a presença de aglutinação em campo misto, a presença de anticorpos anti- $A_1$ , ausência ou variação de reatividade com anti- $A_1$ , ausência ou variação na reatividade com anti-H e presença de antígenos ABH na saliva de indivíduos secretores. Estas subdivisões também ocorrem no fenótipo B, mas são tipicamente mais difíceis de serem sorologicamente definidas em categorias específicas. Alguns subgrupos de B (por exemplo,  $B_{ei}$ ) são análogos sorologicamente aos seus homólogos de A (por exemplo,  $A_{ei}$ ). A frequência dos fenótipos ABO comuns ( $A_1$ ,  $A_2$ , B,  $A_1B$ ,  $A_2B$ , e O) varia muito entre diferentes populações, conforme mostrado na tabela 1.<sup>(30, 36)</sup>

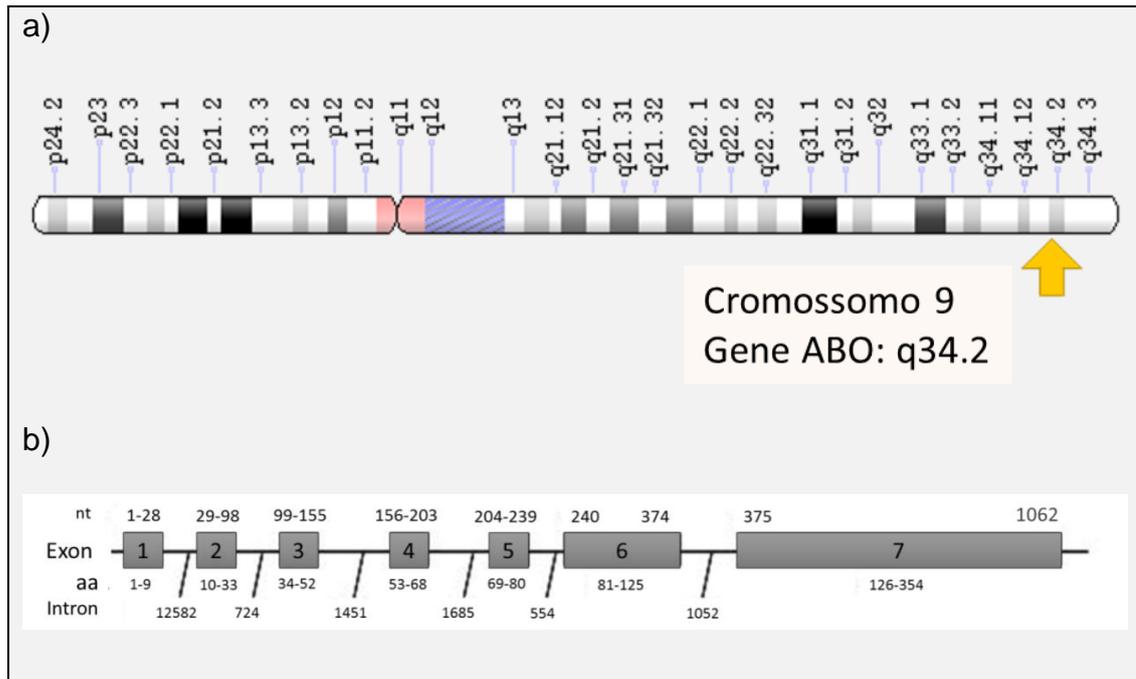
**Tabela 1.** Frequência fenotípica em porcentagem entre diferentes grupos étnicos de algumas populações.

Fenótipo	Branços*	Negros*	Mexicanos*	Asiáticos *	Ameríndios**	Europeus***
<b>O</b>	45	49	56	43	99,9	43
<b>A<sub>1</sub></b>	33	19	22	27	0	35
<b>A<sub>2</sub></b>	8	8	6	Raro	0	10
<b>B</b>	10	19	13	25	0	9
<b>A<sub>1</sub>B</b>	3	3	4	5	0	3
<b>A<sub>2</sub>B</b>	1	1	Raro	Raro	0	1

Fonte: \*Harmeng (2006);<sup>(37)</sup> \*\*Daniels (2013);<sup>(7)</sup> \*\*\*Reid (2012).<sup>(35)</sup>

### 1.3 Gene *ABO*

O gene do sistema de grupo histo-sanguíneo ABO está localizado no braço longo do cromossomo 9q34.2 (figura 4a). É composto por sete exons e seis introns, abrangendo uma região com cerca de 19,5 kb, sendo que 1062 pares de bases (pb) codificam uma sequência de 354 aminoácidos (aas), correspondente à sequência de tradução de uma proteína de 41-kDa com função enzimática, denominada glicosiltransferase (GT). Os exons 6 e 7 são os dois mais longos, contendo 77% de toda a extensão de leitura da GT, correspondendo a aproximadamente 90% do sítio ativo catalítico e a 274 aas dos 354 que constituem as glicosiltransferases do grupo A (GTA) e Glicosiltransferases do grupo B (GTB). A Figura 4b demonstra a distribuição dos nucleotídeos (nts) e aas entre os exons do gene *ABO*.<sup>(38)</sup>

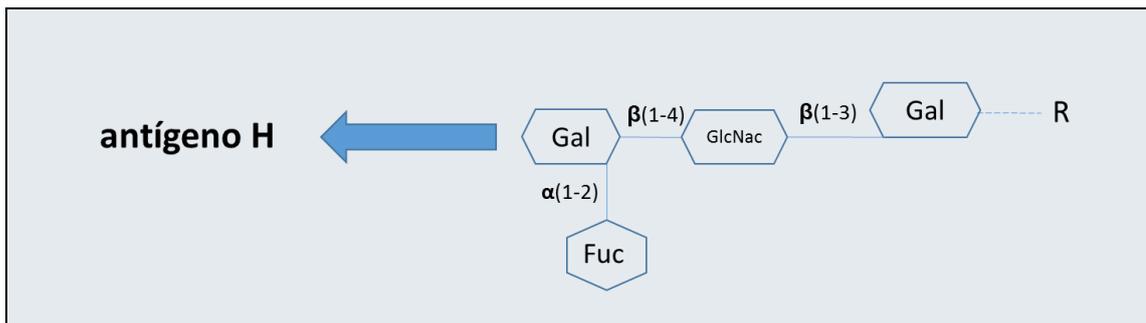


**Figura 4.** Organização do gene *ABO*. a) localização do gene no cromossomo; b) nucleotídeos (nts), aminoácido (aa), exons e introns do gene *ABO*. Fonte: Consórcio de Referência Genômica (CRG), hospedado na página da internet do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI).<sup>(39)</sup>

O gene *ABO* está sob o controle de muitos fatores de regulação. Alguns são específicos para regular expressão nos tecidos envolvendo outros genes, enquanto outros para aumentar ou diminuir o nível de produto do gene. Vários estudos têm sido realizados para esclarecer a regulação da expressão do gene *ABO*.<sup>(16)</sup>

Os antígenos do sistema *ABO* são sintetizados por glicosiltransferases. Estas enzimas são responsáveis pela adição de açúcares específicos a cadeias oligossacarídicas precursoras comuns contendo uma galactose terminal. Indivíduos que possuem um gene *H* localizado no cromossomo 19q13.33, codifica uma fucosiltransferase, que adiciona um açúcar (fucose) em ligação  $\alpha$ -1,2 a esta galactose terminal do oligossacarídeo precursor, formando o antígeno *H* (Figura 5).<sup>(23)</sup> Assim é produzido

oligossacarídeo necessário para síntese dos antígenos A e B. Se o gene que determina o antígeno H está ausente ou é defeituoso, o antígeno pode não ser formado e conseqüentemente, não será sintetizado os antígenos A e/ou B. Estes raros indivíduos são chamados de Bombaim.<sup>(6)</sup>



**Figura 5.** Estruturas bioquímicas necessárias para formação do antígeno H. R: radical formado de Glicoproteína ou Glicolípido; Gal: Galactose; GlcNac: N-Acetilglucosamina; Fuc: fucose;  $\beta(1-3)$ ,  $\beta(1-4)$  e  $\alpha(1-2)$ : tipos de ligações glicosídicas. Adaptado de Harmening (2006) e Daniels (2013).<sup>(7, 37)</sup>

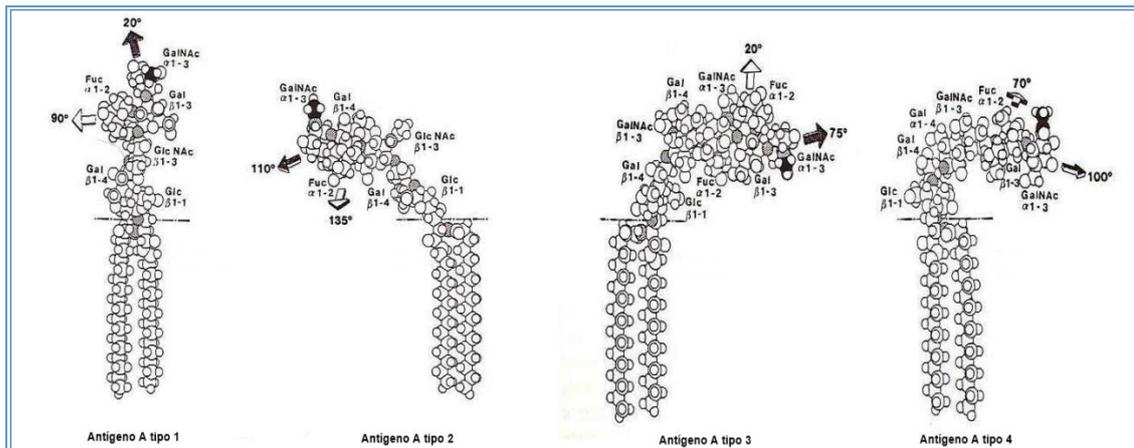
A síntese do antígeno H é regida por dois genes diferentes mas estreitamente ligados e homólogos, *FUT1* (H) e *FUT2* (secretor), independentemente do gene ABO. Os produtos destes genes são duas fucosiltransferases (Fuc-1 e Fuc-2, respectivamente) que agem em diferentes cadeias precursoras presentes em diferentes tecidos.<sup>(40)</sup> A Fuc-1 sintetiza principalmente antígeno H a partir de cadeias precursoras do tipo 2 na hemácia. O produto do gene secretor (Fuc-2), atua principalmente em cadeias precursoras do tipo 1 presente nas secreções e no plasma. Os antígenos formados a partir de cadeias do tipo 1, podem mais tarde ser adsorvidos e incorporados na membrana das hemácias. Ambas as enzimas também podem atuar nas cadeias dos tipo 3 e tipo 4. As cadeias dos tipos 1 a 4 são

consideradas os principais precursores para os antígenos ABH (Quadro 2).<sup>(22)</sup> A forma tipo 4 parece ser o substrato predominante para a síntese de antígeno A no rim, enquanto que as atividades das transferases  $A_2$  são restritas às isoformas dos tipo 1 e 2. Por outro lado, a transferase  $A_1$  pode interagir com todas as isoformas. Contudo a expressão renal do antígeno A é inferior em indivíduos  $A_2$  em comparação com indivíduos  $A_1$ . Simples alterações dos precursores modificam a conformação da estrutura antigênica formada, podendo conter diferentes sítios antigênicos, apesar da alta homologia entre as isoformas. O quadro 2 mostra a estrutura linear das cadeias precursoras dos antígenos ABO e a figura 6 mostra as diferentes conformações espaciais destas estruturas.

**Quadro 2.** Precursor ABH, estrutura bioquímica e distribuição nos tecidos. Adaptado de Clausen e Hakomori (1989).<sup>(22)</sup>

Tipo de precursor	Estrutura	Distribuição nos tecidos
<b>Tipo 1</b>	Gal $\beta$ 1-3GlcNac $\beta$ 1-R	Endoderma, secreções e plasma
<b>Tipo 2</b>	Gal $\beta$ 1-4GlcNac $\beta$ 1-R	Ectoderma e mesoderma
<b>Tipo 3</b>	Gal $\beta$ 1-3GlcNac $\alpha$ 1-R	Vários tecidos
<b>Tipo 4</b>	Gal $\beta$ 1-3GlcNac $\beta$ 1-R	Glicolípídeos nos Rins e hemácias

Gal: Galactose  
 $\beta$ 1-3,  $\beta$ 1-4,  $\alpha$ 1,  $\beta$ : Tipos de ligações química entre carbonos  
GlcNac: N-Acetilglucosamina  
R: Radical formado de Glicoproteína ou Glicolípídeo



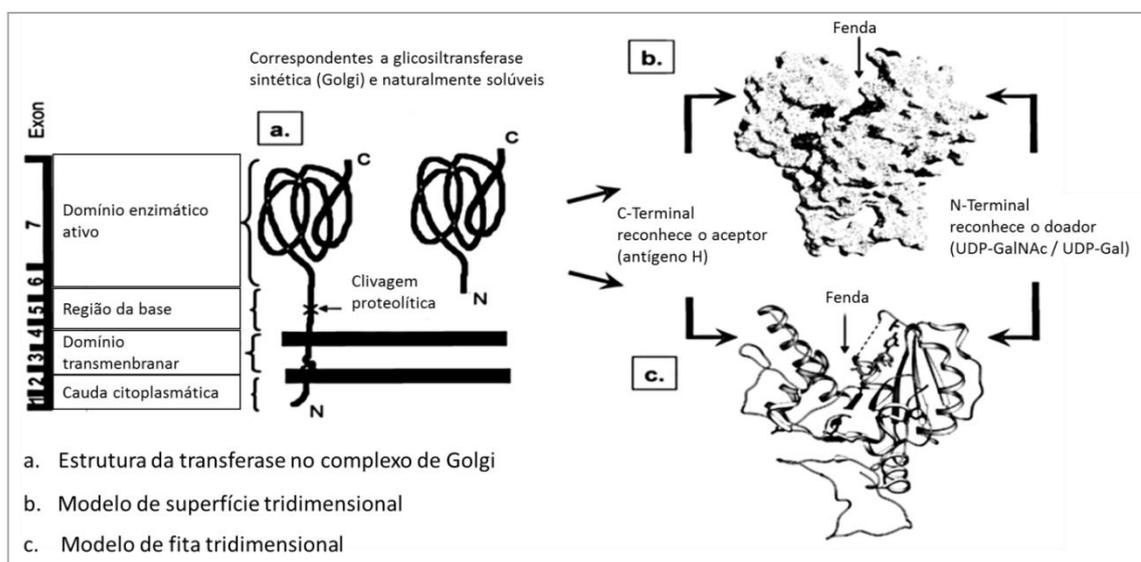
**Figura 6.** Representação das variações espaciais das estruturas moleculares (isoformas) de um antígeno em um formato tridimensional. Fuc: Fucose; Gal: Galactose; Glc: Glicose; GlcNac: N-Acetilglucosamina; GalNAc: Galactosamina. Adaptado de Schenkel-Brunner (2001).<sup>(41)</sup>

As GTs codificadas pelo gene *ABO* são enzimas transmembranares do tipo 2. Estas enzimas têm tipicamente uma cauda citoplasmática curta no N-terminal, um domínio transmembranar hidrofóbico, uma região de base com haste curta que possui um local de clivagem da protease. Finalmente, apresentam um domínio catalítico ativo que reconhece o aceptor (antígeno H) ou o doador (UDP-GalNAc / UDP-Gal), em C-terminal no lado luminal de Golgi.<sup>(42)</sup>

A imensa diversidade de estruturas de hidratos de carbono vista na natureza é determinada pelos vários tipos de GTs, que constituem uma grande família de enzimas que estão envolvidos na biossíntese de dissacarídeos, polissacarídeos e principalmente oligossacarídeos, no aparelho de Golgi. Estas GTs são definidas pelas suas especificidades doador / aceptor e as ligações glicosídicas formadas.<sup>(43)</sup> As GTs estão ligadas à membrana presentes nos diferentes compartimentos Golgi onde consecutivamente e especificamente

catalisam a adição de um açúcar para outro sobre uma glicoproteína ou glicolípido aceptor. Cada adição de um açúcar cria um novo aceptor para a próxima linha na via de glicosilação da GT. Os substratos doadores de açúcar utilizados são frequentemente ativados sob a forma de GDP-Fuc, UDP-Gal ou UDP-GalNAc. Estas são sintetizadas no citoplasma e importados para o Golgi através de transportadores de membrana.

O espectro de GTs presente no aparelho de Golgi não é estático e o efeito da glicosilação varia com o tipo de célula. Isso leva à modificação terminal das glicoproteínas e glicolípidos que aparecem de forma regular e frequentemente nos tecidos de diferentes linhagens celulares.<sup>(44)</sup> A figura 7 ilustra a organização estrutural das glicosiltransferases do tipo 2 no complexo de Golgi.

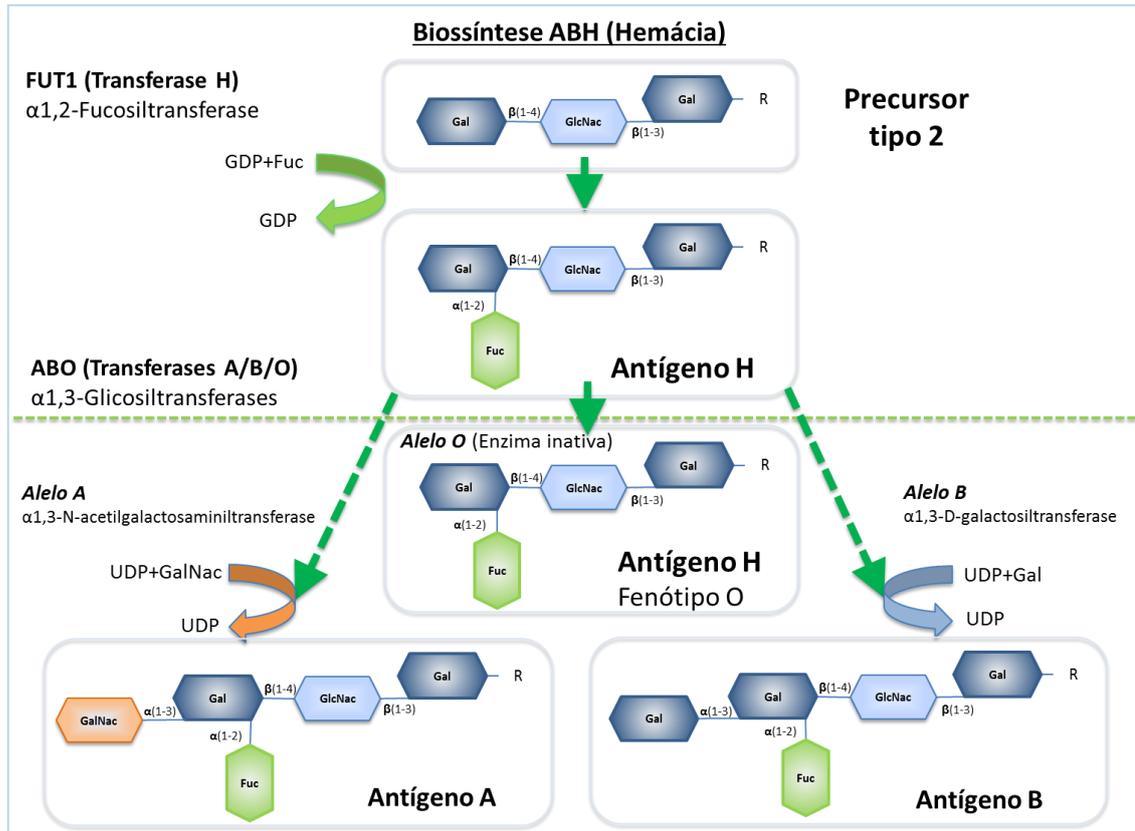


**Figura 7.** Estrutura da glicosiltransferase no complexo de golgi. C: terminação do domínio catalítico; N: terminação citoplasmática; UDP: Uracila difosfato; GalNAc: Galactosamina; Gal: Galactose. Adaptado de Storry e Olsson (2009).<sup>(42)</sup>

Entre as GTs produzidas, a transferase do grupo A (GTA) é considerado referência. Ambas, GTA e GTB, foram isoladas, purificadas e clonadas por Yamamoto e colaboradores em 1990<sup>(45, 46)</sup>, possibilitando comparação e constatação de que são altamente homólogas, com aproximadamente 99% de homologia entre os aas. Contudo, diferem na especificidade do doador a partir de N-Acetilgalactosamina para o grupo A e D-Galactose para o grupo B.<sup>(47, 48)</sup>

As estruturas imunodominantes dos antígenos A e B são GalNAc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3(Fuc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2)-Gal-R e Gal- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3(Fuc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2)-Gal-R, respectivamente. Portanto os epítomos que definem os antígenos A e B, consequentemente os grupos sanguíneos A e B, estão presentes nessas estruturas trissacarídicas terminais. Estas estruturas apresentam variações tridimensionais que são importantes para as ligações específicas dos antissoros anti-A, anti-B e anti-A,B.<sup>(7)</sup> A expressão destes antígenos A e B ocorre nos compartimentos do aparelho de Golgi das células precursoras dos eritrócitos, de onde se movem para a membrana, permanecendo durante todo período de vida na hemácia.

A biossíntese dos antígenos ABO ocorrem com a devida ação das GTA e GTB que transferem GalNAc e Gal, respectivamente, a partir de um UDP-doador para o oligossacarídeo precursor comum, composto de Fuc- $\alpha$ (1,2)-Gal-NAcGlc-Gal-R (antígeno H). O antígeno H não se altera em indivíduos do grupo O, devido uma enzima ABO não funcional. Contudo, indivíduos do grupo AB têm ambas GTs (GTA e GTB) que competem pelo precursor comum.<sup>(49)</sup> A figura 8 ilustra a biossíntese dos antígenos do sistema ABO.



**Figura 8.** Representação da biossíntese dos antígenos do grupo sanguíneo ABO a partir de estruturas precursoras tipo 2 (H), na hemácia. Adaptado de Eiji Hosoi (2008).<sup>(50)</sup>

Grande variação estrutural dos antígenos ABO é observado devido às diferenças estruturais dos oligossacarídeos precursores. As estruturas internas de glicoproteínas e glicolípidos são influenciadas pelo grau de ramificação e pela extensão das estruturas poli-N-Acetilgalactosamina repetitivas ( $\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1$ ). Estas cadeias são terminadas por diferentes variantes de oligossacarídeos conhecidos como estruturas periféricas. Elas também são afetadas pelo tipo de glicoconjugado, glicoproteínas ou glicoesfingolípidos.<sup>(22, 40)</sup>

Enfim, os níveis de expressão dos antígenos do sistema ABO são influenciados por diferentes fatores incluindo as mutações nos genes A e B, a disponibilidade de oligossacarídeos precursores, de cofatores e a ordem com que as enzimas GTA e GTB se encontram nos compartimentos do aparelho de Golgi. Variações nestes fatores podem modificar a expressão antigênica, levando inclusive a níveis sorologicamente indetectáveis, como ocorre nos raros fenótipos que caracterizam os subgrupos de A, B e AB. A fraca expressão destes antígenos ou mesmo alterações em suas estruturas podem modificar a intensidade da reação de aglutinação eritrocitária pelos antissoros monoclonais e policlonais utilizados rotineiramente na fenotipagem, levando à classificação errônea de indivíduos destes subgrupos.<sup>(41)</sup>

#### **1.4 Terminologia e nomenclatura.**

Inicialmente, os sistemas e os antígenos de grupos sanguíneos foram identificados por letras do alfabeto e posteriormente, com base no nome da primeira pessoa em que foram encontrados. Em muitos casos, a denominação dos sistemas e dos antígenos foram relacionadas aos pacientes em cujo plasma sanguíneo os anticorpos específicos foram primeiramente identificados ou ainda com base no nome do autor que descreveu o sistema pela primeira vez. Devido à ausência de regras para denominação dos sistemas de grupos sanguíneos no passado, um dado anticorpo específico encontrado em indivíduos diferentes podia receber denominação distinta. Com o objetivo de organizar e padronizar a nomenclatura dos sistemas, dos antígenos e dos anticorpos de grupos sanguíneos, a Sociedade Internacional

de Transfusão Sanguínea (ISBT) criou um comitê especializado para criar uma nova terminologia e estabelecer regras para o reconhecimento dos sistemas de grupos sanguíneos. Desde então os sistemas e seus respectivos antígenos passaram a ser reconhecidos numericamente.<sup>(3)</sup> Esta nova nomenclatura é usada principalmente para o trabalho de bancos de dados, mas também gerou uma lista de nomes alternativos recomendados.<sup>(51)</sup> O quadro 3 ilustra a nova nomenclatura aplicada ao sistema ABO.

Outra fonte de terminologia é o Banco de Dados para Mutações dos Genes e Antígenos de Grupos Sanguíneos (BGMUT), criado em 1999. Em 2006, o BGMUT passou a integrar a plataforma NCBI, se tornando uma base de dados específica para sistemas de grupos sanguíneos, contendo várias informações sobre os sistemas de grupos sanguíneos, como: genes que os codificam, os fenótipos, as características sorológicas, além de outras informações de genes ou variações genéticas que ainda não foram esclarecidas (Quadro 3).<sup>(24)</sup>

Tipicamente, os alelos ABO são referidos pela sua atividade serológica e um número. Nos últimos anos foi sugerido que os subgrupos de A ou B com reações fracas, sejam nomeados como A fraco ou B fraco. Esta proposição auxilia na atual caracterização de subgrupos com o uso de anticorpos monoclonais, em oposição à antiga classificação dos subgrupos definidos com o uso de anticorpos policlonais.<sup>(52)</sup>

Neste trabalho foi utilizada a terminologia recomendada pela ISBT e pelo dbRBC (BGMUT), além dos nomes tradicionais dos sistemas e dos antígenos ABO.<sup>(24, 25, 35, 51, 53, 54)</sup> Os alelos são referidos da forma tradicional

(Ex.: A<sup>1</sup>) ou com a terminologia dbRBC (ex.: A101). Contudo, é importante usar apropriadamente subscritos para fenótipos, sobrescritos e itálico para alelo no formato tradicional ou somente itálico no formato dbRBC e fonte normal para o antígeno. O quadro 3 contém as diferentes nomenclaturas referidas para o sistema ABO.

Quadro 3. Diferentes nomenclaturas utilizadas na identificação de fenótipos, antígenos e alelos do sistema ABO.

Fenótipos	Antígenos		Alelos		
	Numérico <sup>†</sup>	Nome <sup>†</sup>	Alternativo	dbRBC <sup>£</sup>	dbRBC <sup>#</sup>
A <sub>1</sub>	001.004	A1	<i>ABO*A1.01</i>	<i>A101</i>	<i>ABO*A1.01.01.1</i>
B	001.002	B	<i>ABO*B1.01</i>	<i>B101</i>	<i>ABO*B1.01.01.1</i>
O	**	H***	<i>ABO*O.01</i>	<i>O01</i>	<i>ABO*O.01.01.1</i>

Legenda:

<sup>†</sup>De acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT)

\*\*Não possui registro numérico para o sistema ABO

\*\*\*O antígeno H não é alterado na biossíntese de indivíduos do grupo O.

<sup>£</sup>Alelos do sistema do grupo sanguíneo ABO: Banco de Dados de Glóbulos Vermelhos Humanos (dbRBC), hospedado no Banco de Dados dos Genes, Antígenos e Mutações de Grupos Sanguíneos (BGMUT).

<sup>#</sup>Visualizador de Alinhamento de Sequência: dbRBC do BGMUT.

Fonte: <sup>†</sup> Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea - ISBT<sup>(55)</sup>; <sup>#</sup>, <sup>£</sup> Centro Nacional de Informações Biotecnológicas - NCBI<sup>(24)</sup>.

## 1.5 Subgrupos ABO

Subgrupos ABO são fenótipos que diferem na quantidade de antígenos presentes nas hemácias e secreções de indivíduos secretores. A capacidade para expressar estes antígenos é herdada de forma codominante, isto é, o fenótipo expresso irá correlacionar com os alelos presente no locus ABO. Além dos fenótipos mais comuns citados anteriormente ( $A_1$ ,  $A_2$ , B,  $A_1B$ ,  $A_2B$  e  $O_1$ ), há muitos relatos de expressão fraca e discrepâncias entre prova direta e reversa. Em muitos casos as discrepâncias resultam de alterações no gene *ABO*, as quais geram novos alelos que podem criar novas variações fenotípicas.<sup>(35, 56)</sup>

### 1.5.1 Alelos comuns

A expressão dos antígenos é definida pela atividade das GTs à qual é fortemente influenciada pela sequência de nucleotídeo que caracteriza o alelo. Existem vários alelos que dão origem a expressão normal dos antígenos ABO, indicando que alguns dos SNPs são neutros e não afetam a atividade das GTs. Estes fenótipos expressam níveis normais dos antígenos A ou B, pois a maioria das mutações silenciosas neles presentes não altera a sequência de aminoácidos das GTs. Entretanto, há exemplos de mutações *missense* cujo impacto na atividade da GT não parece ser significativo o suficiente para diminuir a expressão antigênica a ponto de dificultar sua detecção pelos testes convencionais de fenotipagens ABO utilizados na rotina.<sup>(27)</sup>

A frequência dos alelos comuns do gene *ABO* varia entre diferentes populações. O alelo O é o mais frequente, podendo ser de até 100% em tribos indígenas da América do Sul, com rara presença de alelos A ou B nos povos

Ameríndios.<sup>(57)</sup> Os alelos *A* são mais frequentes em populações da Europa do Norte e Central enquanto que os alelos *B* são mais comuns na Ásia. O alelo *A*<sup>2</sup> é raro no Sudeste Asiático e relativamente comum na Europa, África, Sul da Ásia Ocidental e na população Sami (indígenas da região norte da Escandinávia).<sup>(7)</sup> Atribui-se que a diversidade dos alelos e dos grupos ABO seja resultante de pressão natural e seleção devido a doenças causadas por microrganismos.<sup>(58)</sup> Os seis alelos mais comuns na população caucasiana ou com expressão normal, são brevemente apresentados a seguir.

O **alelo *A*<sup>1</sup>** (*ABO*\**A1.01*) possui a sequência de nucleotídeos que é considerada referência para o gene *ABO*. Este alelo resulta em antígenos *A* que não possui alteração na reatividade sorológica. Existem pelo menos dez alelos *A*<sup>1</sup> que apresentam alterações em sua sequência de nucleotídeos e que também não resultam em alterações fenotípicas.<sup>(24, 35)</sup>

O **alelo *A*<sup>2</sup>** (*ABO*\**A2.01*) possui cerca de 26 variantes depositadas no dbRBC,<sup>(24)</sup> é o segundo mais comum do grupo *A*, sendo diferenciado de *A*<sup>1</sup> por uma deleção de uma das três citosinas entre as posições 1059 e 1061. Por convenção, considera-se que esta deleção ocorre na posição 1061.<sup>(59)</sup> Esta deleção altera a sequência de leitura abolindo o códon de terminação esperado, resultando em uma GT contendo 21 aas adicionais. Admite-se que esta diferença promova variações quantitativas e qualitativas no fenótipo *A*<sub>2</sub>. Outras mutações no alelo *A*<sup>2</sup> também são comuns em determinadas populações. Em caucasianos o SNP 467C>T (P156L) é muito frequente, mas esse polimorfismo não parece ter impacto na atividade da GT de uma forma significativa, já que o mesmo também foi encontrado em uma variante do alelo

$A^1$  ( $ABO^*A1.02$ ), com expressão fenotípica normal. Este alelo é comum na maioria dos indivíduos com fenótipo  $A_1$ , na Ásia. As mutações 467C>T e 1061delC não parecem ser exclusiva do fenótipo  $A_2$  pois foram encontradas em outros alelos não relacionados a este fenótipo.<sup>(60)</sup>

Os subgrupos  $A_1$  e  $A_2$  foram primeiramente reconhecidos como alterações fenotípicas do sistema ABO em 1911.<sup>(30)</sup> Posteriormente, foi observado que existem diferenças quantitativas entre estes subgrupos e que hemácias  $A_1$  expressam cerca de cinco vezes mais antígenos A em comparação às hemácias  $A_2$ .<sup>(61)</sup> Mais recentemente foi demonstrado que estes subgrupos de A apresentam diferenças qualitativas.<sup>(62)</sup> Diferenças qualitativas entre os subgrupos  $A_1$  e  $A_2$  sempre motivaram intensos debates. Na década de 70 foi demonstrado que as GTs de  $A^1$  e  $A^2$  apresentam diferenças em relação ao pH ótimo, à Km (Constante de Molaridade), à afinidade pelo substrato e ao ponto isoelétrico.<sup>(63-65)</sup>

Em recente estudo, com base na análise de glicolipídeos, foi observado que as estruturas dos carboidratos tipo 3, repetitivo A e Tipo 4 (globo-A) são frequentes em eritrócitos  $A_1$ , mas ausentes ou indetectáveis em  $A_2$ . Em hemácias  $A_2$ , a presença dos precursores H tipo 3 e H tipo 4 (globo-H) sugerem incapacidade da GT  $A^2$  para converter estas estruturas em A. Esta tem sido considerada a principal diferença qualitativa entre os fenótipos  $A_1$  e  $A_2$ .<sup>(66, 67)</sup> Svensson e colaboradores (2008)<sup>(62)</sup> relataram que a principal diferença glicolipídica entre na expressão entre  $A_1$  e  $A_2$  é presença de A tipo 4 em  $A_1$  mas não em  $A_2$ . Além disso, observaram ausência do precursor tipo 4 (globo-A) e presença do tipo 4 (globo-H) em  $A_2$ . Os níveis iguais do tipo 3 e repetitivo A

detectados, indicam que a GT de  $A^2$  é capaz de converter o H tipo 3 em A tipo 3, mas não o H tipo 4 (globo-H) em A. Estas proposições se opõem aos relatos anteriores e portanto, a questão sobre a diferença qualitativa entre os fenótipos  $A_1$  e  $A_2$  ainda é objeto de discussão.<sup>(62, 66, 68, 69)</sup>

O **alelo B** ( $ABO^*B1.01$ ) difere do alelo  $A^1$  em sete posições, das quais três são silenciosas (297A>G, 657C>T e 930G>A), sem alteração do aa e quatro são mutações *missense* (526C>G, 703G>A, 796C>A e 803G>C) levando a mudanças de aas na região codificante da GT.<sup>(47)</sup> Estas alterações modificam a especificidade da GT no reconhecimento do substrato e conseqüentemente levam à adição da Gal ao monossacarídeo terminal do antígeno H. As substituições 796C>A (Leu266Met) e 803G>C (Gli268Ala) são as principais responsáveis pela mudança na especificidade da GTB, enquanto que as demais tem um papel na ligação do acceptor.<sup>(70)</sup>

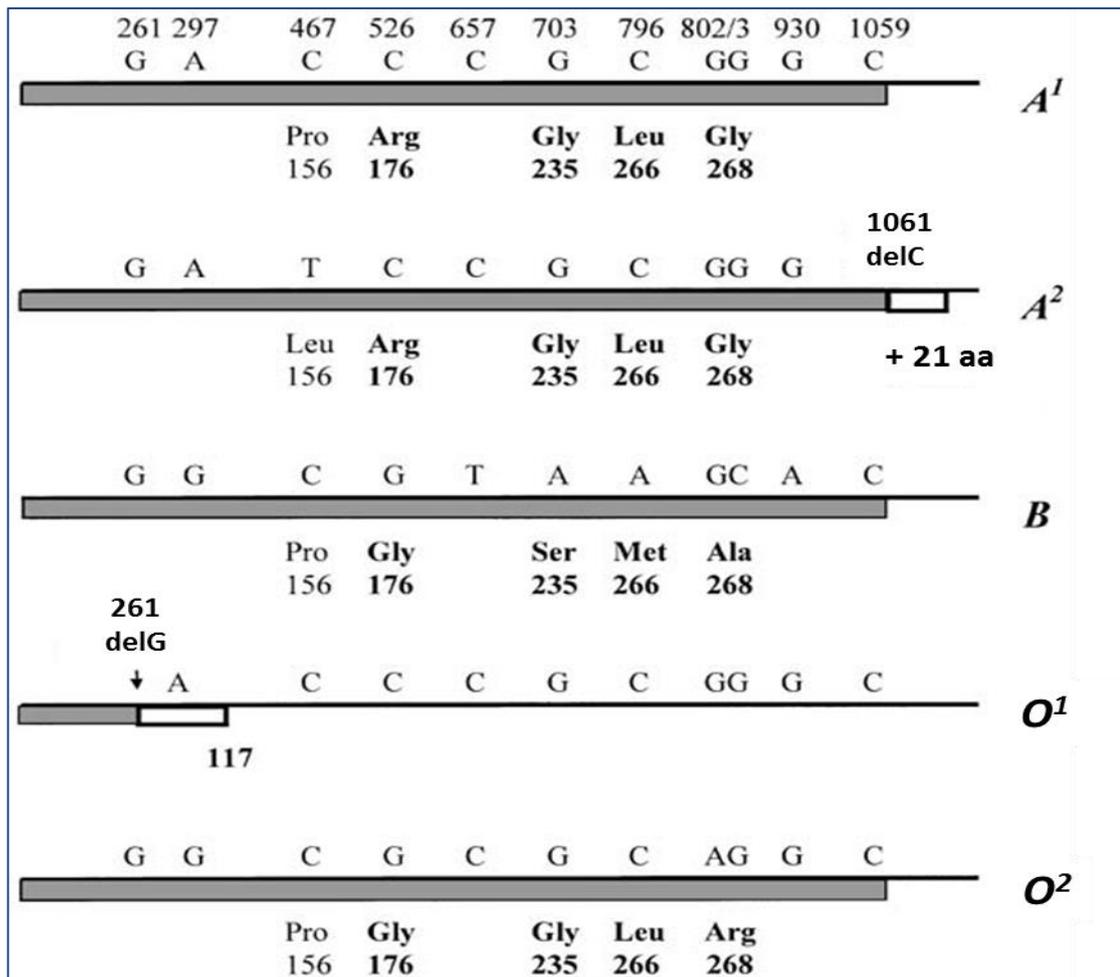
O alelo **alelo O01** ( $ABO^*O.01.01$  ou  $O^1$ ) é o mais comum determinante do grupo O e difere da sequência referência ( $A101$ ) pela deleção do nucleotídeo G na posição 261 do exon 6. Esta alteração cria um códon de parada que interrompe a inserção de aa na posição 117.<sup>(47)</sup> Como a GT truncada não é funcional, pois não contém o domínio globular catalítico da enzima ativa, é incapaz de modificar o antígeno H.<sup>(7)</sup>

Outro alelo O relativamente comum é  $O^{1v}$  [ $ABO^*O.02.01$  (dbRBC), anteriormente chamado de  $O02$ ] que tem a mesma deleção 261delG, mas possui nove SNPs adicionais entre os exons 2 a 7 que são incapazes de promover modificações fenotípicas. No entanto, em termos evolutivos, este alelo é diferente do alelo  $O01$ .<sup>(7, 71, 72)</sup>

O alelo **O02** [*ABO\*O.03.01* (dbRBC), anteriormente chamado *O03*] não possui a deleção 261G e portanto, pertence ao um grupo dos alelos *O* chamados de não delecionais.<sup>(7, 72, 73)</sup> Este alelo contém SNPs que são específicos (53G>T e 802G>A), mas também compartilha um SNP presente no alelo *B* (526C>G).<sup>(74)</sup> O SNP 802G>A que resulta na alteração do aa Gly268Arg, foi caracterizado como responsável em abolir a atividade da enzimática com bloqueio completo do local de reconhecimento do doador de monossacarídeo.<sup>(74, 75)</sup> Este alelo foi encontrado em casos com fraca expressão do antígeno A nos eritrócitos e com ausência de anti-A no plasma. Contudo, é considerado um dos determinantes dos fenótipos *O-símile*. Este fenômeno ainda não foi devidamente esclarecido e permanece como objeto de estudos.<sup>(32, 76-79)</sup>

Existem outras variantes de *O*, algumas pertencentes ao grupo não delecional e semelhantes a *O*<sup>2</sup> por compartilhar o SNP 802G>A, enquanto outros são menos comuns e apresentam alterações críticas independentes que comprometem a atividade do produto gênico, como por exemplo: *O*<sup>3</sup> (*ABO\*O.03*) e *O*<sup>4</sup> (*ABO\*O.04*).<sup>(32, 80)</sup>

Os alelos comuns e a localização das suas principais mutações estão representados na figura 9.



**Figura 9.** Representação contendo a localização das principais mutações entre os alelos comuns do Sistema ABO. Adaptado de Geoff Daniels (2013).<sup>(7)</sup>

### 1.5.2 Alelos com fraca expressão ou raros

Os fenótipos raros são caracterizados em subgrupos assim como os comuns, pelo seu grau de aglutinação com antissoros e lectinas. Além disso, a presença ou ausência de anticorpos ABO no plasma é considerada importante para a interpretação dos resultados. Alguns casos requerem estudos de adsorção e eluição e/ou testes de inibição de hemaglutinação na saliva. Os subgrupos de A são mais frequentes e complexos, enquanto os de B são mais raros e apresentam menor variabilidade fenotípica.<sup>(6, 30, 36, 37)</sup> O quadro 4 ilustra os padrões sorológicos dos principais subgrupos do sistema ABO.

**Quadro 4.** Padrões sorológicos dos principais subgrupos do sistema ABO.

Subgrupos	Reação hemácias					Reação soro		Antígenos em Saliva	Ags / célula <sup>#</sup>
	Anticorpos Policlonais			Lectinas		Hemácias			
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-A <sub>1</sub>	Anti- H	A1	B		
A <sub>1</sub>	4	0	4	4	0	0	4	A (H)	10 <sup>6</sup>
A <sub>2</sub>	3/4	0	4	0	4	(+/-) <sup>***</sup>	4	A, H	2.5 x 10 <sup>5</sup>
A <sub>int</sub>	4	4	4	2/3	3	0	4	A,H	-
A <sub>3</sub>	2/3 <sup>CM</sup>	0	2/3 <sup>CM</sup>	0	4	(+/-) <sup>***</sup>	4	A,H	5.7 x 10 <sup>4</sup>
A <sub>x</sub>	0/W	0	W/2	0	4	(+/-) <sup>****</sup>	4	H	6.5 x 10 <sup>3</sup>
A <sub>end</sub>	W	0	W	0	4	(+/-) <sup>****</sup>	4	H	3.3 x 10 <sup>3</sup>
A <sub>fim</sub> <sup>**</sup>	W	0	W	0	4	(+/-) <sup>****</sup>	4	H	-
A <sub>bantu</sub> <sup>**</sup>	W	0	W	0	4	(+/-) <sup>****</sup>	4	H	-
A <sub>1ae</sub>	0	0	0	3		¥	4	H	-
A <sub>m</sub>	0*/W	0	0*/W	0	4	0	4	A,H	1 x 10 <sup>3</sup>
A <sub>y</sub>	0*	0	0	0	4	0	4	A,H	1 x 10 <sup>3</sup>
A <sub>el</sub>	0*	0	0*	0	4	(+/-) <sup>***</sup>	4	H	7 x 10 <sup>2</sup>
B	0	4	4	0		4	0	B,H	7.5 x 10 <sup>5</sup>
B <sub>3</sub>	0	2/3 <sup>CM</sup>	2/3 <sup>CM</sup>	0	4	4	0	B,H	-
B <sub>x</sub>	0	0*/W	W/2	0	4	4	(+/-) <sup>***</sup>	H	-
B <sub>m</sub>	0	0*/W	0*/W	0	4	4	0	B,H	-
B <sub>el</sub>	0	0*	0*	0	4	4	(+/-) <sup>***</sup>	H	-

Ags: antígenos; 0: reação negativa; W: reação fraca; 1-4: reação positiva em níveis de graduação do mais fraco (1) ou mais forte (4); CM: campo misto; #média aproximada;  
 ¥Soro deste subgrupo é reativo com hemácias A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>;  
 \*Anti-A pode ser adsorvido e eluído com hemácias deste subgrupo;  
 \*\*Variantes de A com características de A<sub>end</sub>;  
 \*\*\*Anti-A1 eventual;  
 \*\*\*\*Anti-A1 frequente.

**Fonte:** Adaptado de Storry, livros textos e artigos referenciados. (7, 30, 37, 42, 50)

Tradicionalmente, os fracos subgrupos de A e B são definidos sorologicamente. Contudo, seus padrões de aglutinação não podem ser considerados estáveis. As bases moleculares da maioria dos subgrupos de A e

B foram elucidadas nas últimas décadas. Em muitos casos os genótipos mostraram correspondência com as observações serológicas. Entretanto, foram observadas diferenças na fraca expressão de antígenos em indivíduos contendo em seu genoma a mesma sequência de nucleotídeos. Na maioria das vezes, a fraca expressão dos antígenos A ou B é devido a presença de um ou mais SNPs nos exons do gene *ABO*, o que pode levar à substituição de aas e a alterações na atividade da GT codificada.<sup>(23)</sup>

Até o momento, mais de 200 diferentes alelos ABO relacionados à fraca expressão dos antígenos A e B foram descritos.<sup>(24)</sup> Muitos possuem SNPs que alteram aas na região do sítio catalítico reduzindo a atividade da GT. Outros apresentam SNPs em locais distantes do sítio catalítico que não alteram a atividade da GT codificada. Contudo, Seltsam e colaboradores (2008) relataram que o 668G>C (Gly230Arg) de um alelo B provoca alterações conformacionais na GTB.<sup>(81)</sup> Além disso, a fraca expressão de antígenos também pode ser devido a alelos híbridos resultantes da recombinação de dois genes.<sup>(52, 82)</sup> Alguns dos subgrupos raros com fraca expressão antigênica mais conhecidos no sistema ABO são apresentados a seguir.

**Subgrupo A<sub>3</sub>:** é o mais comum entre os subgrupos ABO fracos e foi reconhecido pela primeira vez em 1936. O padrão de aglutinação em campo misto é uma característica típica deste fenótipo. Geralmente, A<sub>3</sub> exibe duas populações de células, uma com alta e outra com baixa expressão do antígeno A. No entanto, quando estas duas populações de células são submetidas a nova fenotipagem, mostram o mesmo padrão de reatividade.<sup>(83)</sup>

A caracterização molecular do subgrupo  $A_3$  se deu em 1993. Duas de quatro amostras com o fenótipo  $A_3$  apresentaram o SNP 871G>A (Asp291Asn) em comparação ao alelo referência  $A^1$ .<sup>(84)</sup> Este alelo foi nomeado como  $A_{301}$  ( $ABO^*A3.01$ ). Até o momento foram registrados 16 alelos diferentes no dbRBC, que supostamente dão origem ao fenótipo  $A_3$ .<sup>(24)</sup> As sequências dos alelos  $A^3$  são próximas a de diferentes alelos ancestrais ( $ABO^*A1.01$ ,  $ABO^*A1.02$ ,  $ABO^*A2.01$  e  $ABO^*A2.06$ ), porém com mutações adicionais variáveis.<sup>(83-85)</sup> No entanto, alguns relatos demonstraram padrões sorológicos  $A_3$  em indivíduos que não apresentavam alterações nucleotídicas em relação ao alelo referência  $A^1$ . Contudo, análises em citômetro de fluxo revelaram níveis intermediários de expressão antigênica nestes indivíduos.<sup>(86-88)</sup> Em contra partida, alguns indivíduos sem o padrão sorológico de campo misto foram classificados como pertencentes ao subgrupo  $A^3$  devido a presença do SNP 871G>A. Até o presente, a verdadeira causa genética da fraca expressão antigênica no subgrupo  $A_3$  permanece obscura.

**Subgrupo  $A_x$ :** O primeiro alelo  $A^x$  descrito ( $A_x-1$ , posteriormente classificado como  $ABO^*Aw.30.01$ ) apresentou um único SNP (646T>A; Fen216Ile).<sup>(89)</sup> A maioria dos alelos  $A^x$  posteriormente relatados contém, além do SNP 646T>A, mutações adicionais na região codificante da enzima, onde algumas são resultantes da junção ou entre alelos (alelos híbridos).<sup>(90)</sup> O número total de alelos  $A^x$  até o momento é de 27 ( $A^{x1}$ - $A^{x27}$ ), com mutações individuais e pelo menos um alelo híbrido devido junção de  $ABO^*O.01.02$  e  $ABO^*A1.02$ .

A definição sorológica de  $A_x$  está baseada em uma reação de aglutinação mais forte com anti-A,B do que com anticorpos anti-A. Porém, com o advento de reagentes com anticorpos ABO monoclonais, as reações não são necessariamente iguais às aquelas originalmente relatadas com reagentes policlonais (quadro 4). Portanto, é aceitável dizer que alguns subgrupos  $A_x$  podem ter sido classificados erroneamente se analisados com anticorpos monoclonais. É difícil atualmente saber se a reatividade do  $A_x$  é apenas mais uma variante de A fraco ou se houve uma modificação espacial do antígeno, a qual cria um epítipo que só reage com anticorpos anti-A,B, como proposto no passado.<sup>(91)</sup>

**Subgrupos  $A_{el}$ :** as hemácias de indivíduos  $A_{el}$  não são aglutinadas por anticorpos anti-A e nem anti-A,B, mas estes anticorpos são capazes de adsorver aos antígenos presentes nas mesmas. Com o uso do método de eluição é possível recuperá-los e concentrá-los no eluato. É esperado que o eluato proveniente de hemácias  $A_{el}$  apresente reação positiva quando testado com hemácias do grupo A.

Como ocorrem em outros subgrupos ABO, há diferentes explicações para as bases moleculares o fenótipo  $A_{el}$ . O primeiro relato mostrou que o alelo  $A^{el}$  possui a inserção de uma base G em uma das sete guaninas localizadas entre as posições 798-804.<sup>(80)</sup>

Esta inserção no alelo  $A^{el}$  (nomeado  $ABO^*AEL.01$ ), além de alterar a sequência de leitura após o códon que determina o aa 268, em uma região da GT que faz o reconhecimento do substrato doador, insere 37 aas a mais na estrutura enzimática.<sup>(58, 82)</sup> O alelo  $ABO^*AEL.03$  possui a deleção de uma

guanina na mesma área em que se dá a inserção no alelo *ABO\*<sup>AEL</sup>.01*, mas devido a deleção 804G (por convenção) apresentam um códon de parada prematuro.<sup>(92)</sup> De maneira geral, a inserção ou deleção de uma G nos alelos *A<sup>el</sup>* produz uma GT com atividade severamente reduzida. Até o momento já foram descritos 12 alelos *A<sup>el</sup>*.<sup>(24)</sup>

**Subgrupos de AB:** são caracterizados por alterações fenotípicas resultantes de alelos que codificam GTs com atividade mista (GTA e GTB) tais como observado nos fenótipos cisAB e B(A). Estas alterações fenotípicas resultam de mutações que alteram as próximas ou mesmo em uma ou mais das quatro posições que diferenciam os alelos *A* e *B*.<sup>(93-96)</sup> De maneira geral, o fenótipo cisAB apresenta expressão normal do antígeno A, mas de forma semelhante ao fenótipo *A<sub>2</sub>*, e fraca expressão do antígeno B. Por outro lado B(A) apresenta expressão muito fraca do antígeno A, mas expressão normal de B.<sup>(7)</sup>

O raro **fenótipo cisAB** foi primeiramente descrito em um caso de mãe AB com filho O.<sup>(97)</sup> Seus autores sugeriram que este fenótipo se formou por interação de dois genes, um gene *A<sup>2</sup>* e outro *B* atípico, localizados no mesmo locus. No entanto, com a caracterização molecular do alelo *cisAB-1* (*ABO\*cisAB.01*), observou-se que uma sequência do alelo *ABO\*A1.02* contendo uma mutação adicional na posição 803G>C (Gly268Ala) era capaz de sintetizar uma GT com atividade mista. O alelo *cisAB-1* é mais comum nas populações asiáticas e considerando as quatro posições que diferenciam os alelos *A* e *B*, pode ser descrito como AAAB.<sup>(98)</sup> Num estudo de 16 doadores de sangue coreanos heterozigotos para o alelo *ABO\*cisAB.01*, foi demonstrado que

tanto a GTA como a GTB possuem atividade claramente diminuída. A atividade da GTA foi de 29% da GTB foi de 27% em comparação à GTA selvagem codificada pelo alelo  $A^1$ .<sup>(99)</sup>

O **fenótipo B(A)** foi detectado pela primeira vez quando reagentes ABO monoclonais se tornaram disponíveis para uso comercial. Este fenótipo exibe níveis normais do antígeno B e níveis muito baixos do antígeno A em testes com alguns reagentes monoclonais anti-A.<sup>(7)</sup> A GT deste fenótipo tem a capacidade de produzir níveis normais do antígeno B, mas também utilizar a UDP-GalNAc como substrato para produzir níveis detectáveis do antígeno A.

Os alelos  $B(A)$  são variantes do alelo  $B$  e o primeiro deles ( $ABO^*BA.01$ ) foi identificado por Yamamoto e colaboradores.<sup>(89)</sup> Este alelo é comumente referido como BABB devido ao aa da posição 235 ser o mesmo do consenso  $A^1$ . O segundo alelo  $B(A)$  ( $ABO^*BA.02$ ) possui a sequência de aa do alelo  $B$ , sendo referido como BBBB, mas contém uma mutação adicional na posição 700C>G (Pro234Ala) a qual está próxima ao aa 703, um dos quatro que diferenciam o alelo  $A$  do  $B$ .<sup>(100, 101)</sup> Até o momento foram identificados 10 alelos  $cisAB$  e 7  $B(A)$ .<sup>(24)</sup>

Uma GTB normal codificada pelo alelo  $B$  consenso tem a capacidade de sintetizar quantidades mínimas do antígeno A as quais são detectáveis por alguns reagentes anti-A. Por outro lado, a GTA codificada pelo alelo  $A$  consenso também pode sintetizar quantidades mínimas do antígeno B, as quais são detectáveis por alguns reagentes anti-B. Estes reagentes foram considerados impróprios para a rotina de fenotipagem ABO,<sup>(102)</sup> por exemplo, o anticorpo monoclonal anti-B (BS-85), relatado por Voak e colaboradores.<sup>(103)</sup>

**Subgrupos Bw:** A classificação dos diferentes subgrupos B é mais complexa do que dos subgrupos A. Para facilitar interpretação sorológica tem sido proposto que estes subgrupos sejam nomeados B fracos (Bw) e não como B<sub>3</sub>, B<sub>el</sub>, B<sub>x</sub>, etc. Embora os subgrupos B também são mais raros, especialmente em populações caucasianas, o número de alelos *Bw* vem aumentando e atualmente existem 77 alelos descritos.<sup>(24, 31, 60)</sup> O fenótipo A<sub>1</sub>B<sub>3</sub> foi o primeiro subgrupo de B a ter sua base molecular caracterizada. Foi observada a presença da mutação na posição 1054C>T (Arg352Trp), comparada ao alelo *ABO\*B.01*.<sup>(84)</sup>

Assim como ocorre com o fenótipo A<sub>el</sub>, a expressão mais fraca do antígeno B também caracteriza o fenótipo B<sub>el</sub>. Os dois primeiros alelos *B<sup>el</sup>* identificados foram *ABO\*BEL.01* e *ABO\*BEL.02*. Estes alelos apresentaram mutações nas posições 641T>G (Met214Arg) e 669G>T (Glu223Asp), respectivamente.<sup>(31, 104)</sup> Um dos alelos *B<sup>el</sup>* identificado posteriormente, *ABO\*BEL.07*, possui uma mutação no início do exon 1 [7G>T (Glu3stop)] que dá origem a um códon de parada. Teoricamente, este alelo deveria ser considerado como alelo O, em analogia ao alelo *ABO\*O.01.01*, que possui a deleção 261G no exon 6. Entretanto, análises de adsorção e eluição revelaram a presença de baixos níveis do antígeno B. Situação semelhante foi observada com o alelo *ABO\*BEL.08*. Estas observações despertam a atenção para o fato de que potenciais mecanismos genéticos podem reativar a GT por meio de códons de iniciação alternativos, recombinações com alelos em posição trans (quimerismo autólogo) ou reparação em menor fração de células precursoras hematopoiéticas.<sup>(32, 105)</sup>

Mutações relacionadas à fraca expressão dos antígenos A e B foram detectadas em ambos os alelos A e B. Por exemplo, a mutação 539G>A (Arg180His) quando presente no alelo A (*ABO*\*A3.04) pode produzir o fenótipo A3. Quando presente no alelo B (*ABO*\*BW.05), pode produzir o fenótipo Bw.<sup>(52, 106)</sup> A mutação 871G>A (Aps291Asn) do alelo *ABO*\*BW.01,<sup>(82)</sup> anteriormente descrita em um alelo A3 (*ABO*\*A3.01),<sup>(89)</sup> foi observada em 52 amostras japonesas com fenótipo Bx.

Mesmo diante da complexidade molecular dos fenótipos comuns e raros do sistema histo-sanguíneo ABO, sua importância na medicina transfusional é inquestionável. A incompatibilidade ABO é uma das principais causas de morte relacionadas à procedimentos transfusionais, que pode ser prevenida, mesmo sendo resultante de erros técnicos ou falhas no seguimento dos processos pré e pós-transfusionais.<sup>(107)</sup>

Embora raros, há relatos de transfusão de hemácias com fraca expressão antigênica que causam reações transfusionais hemolíticas.<sup>(108)</sup> Portanto, a correta fenotipagem de pacientes e doadores de sangue é indispensável. A resolução sorológica e molecular de fracos e incomuns fenótipos ABO constitui um dos grandes desafios técnicos para profissionais de bancos de sangue. A classificação correta dos grupos sanguíneos ABO de doadores e receptores é o mais importante teste pré-transfusional. Porém, sua correta determinação envolve diversos fatores (intrínsecos e extrínsecos) que podem levar a erros de interpretação, além de outros.<sup>(7, 36, 50, 109)</sup>

## 1.6 Discrepâncias ABO

Discrepâncias entre as fenotipagens ABO direta e reversa comumente surgem a partir de alterações no padrão sorológico esperado. Podem sugerir a presença do antígeno A ou B, fracamente expressos no tecido hematopoiético ou em outros tecidos. Esta condição pode levar a tolerância imunológica conferindo ausência ou baixos títulos do anticorpo esperado. Os resultados sorológicos que devem despertar atenção são: reações fracas em prova direta ( $\leq 3+$ ), reações fracas em prova reversa ( $\leq 3+$ ), discordância entre prova direta e reversa (por exemplo: prova direta de A e reversa de B) ou reações de campo misto. As causas de discrepâncias podem ser agrupadas em três tipos: 1. Resultantes das discordâncias entre prova direta e reversa; 2. Alterações de reatividade nos padrões de aglutinação; e 3. Causas artificiais e/ou imunodeficientes. O quadro 5 apresenta as principais causas de discrepâncias entre as provas direta e reversa.

A investigação das discrepâncias se inicia pela diferenciação entre as causas artificiais e genéticas. Os passos a serem tomados a seguir dependem do tipo de discrepância e da interpretação técnica.<sup>(30)</sup> As discrepâncias com base genética ocorrem devido a mutações na sequência de aas que codificam as GTs alteradas ou ineficientes, levando a significativa redução ou falta de sítios antigênicos nas hemácias. Estas alterações são comumente relacionadas aos subgrupos ABO ou mesmo ao grupo O.<sup>(30)</sup> Portanto, as discrepâncias sorológicas de origem genética geram resultados contraditórios entre as tipagens direta e reversa, devido a reações inesperadas, fracas ou negativas.

**Quadro 5.** Principais causas de discrepâncias do sistema ABO.

<b>1.Prova direta (pesquisa do antígeno na hemácia)</b>	
<b>Tipo de reação</b>	<b>Causas prováveis</b>
Reatividade fraca ou ausente	Subgrupos* Fenótipo Bombaim* Excesso de antígenos ABH solúveis Leucemias Transfusões ABO não idênticos Transplantes alogênicos
Reatividade inesperada	TAD positivo / autoanticorpos / crioaglutininas Tn Excesso de proteínas plasmáticas Reação com constituintes dos reagentes Transplantes alogênicos Fenótipo B adquirido Fenótipo B(A)*
Reatividade em Campo Misto	Transfusões recentes Transplantes alogênicos Microquimerismo materno-fetal* Quimerismo entre gêmeos*
<b>2.Prova reversa (pesquisa do anticorpo no soro ou plasma)</b>	
Reatividade fraca ou ausente	Idade (crianças < 4-6 meses, idosos) Subgrupos* Hipogamaglobulinemia (Imunodeficiência Humoral) Transplantes Medicamentos imunossupressores Imunotolerância*
Reatividade inesperada	Autoanticorpos reativos a frio Aloanticorpos reativo a frio Anticorpos ABO irregulares* Soro com anticorpos contra componentes dos reagentes Excesso de proteína plasmática Transfusão de componentes plasmáticos ABO incompatível Transplantes Infusão de imunoglobulina intravenosa
*Causas com base genética ligada ao sistema ABO.	

Fonte: Adaptado do Livro Técnico da AABB, pág. 297.<sup>(30)</sup>

As causas mais comuns de discrepâncias não são de origem genética ou natural e sim relacionadas a outros fatores (Quadro 5).<sup>(37)</sup> Para exemplificar, pode-se analisar a categoria de campo misto. Microquimerismo e quimeras naturais são fenômenos relativamente raros porém, o quimerismo artificial por transfusão e transplantes é comum, principalmente em serviços de hemoterapia com rotinas que envolvam a investigação sorológica de receptores.<sup>(110)</sup> Antes de se iniciar as investigações sorológicas e moleculares, deve se conhecer o histórico detalhado da causa, separando as genéticas e/ou naturais das artificiais.<sup>(30)</sup> Estes cuidados direcionam os recursos e o tempo investidos em casos importantes. Neste estudo analisamos somente discrepâncias com causas genéticas ou naturais.

Os subgrupos ABO são os responsáveis pelas discrepâncias com maior importância na medicina transfusional moderna.<sup>(23)</sup> Ocorrem com frequência baixa, quase sempre com fraca expressão dos antígenos A ou B, devido mutações na sequência de nucleotídeos do gene *ABO*.<sup>(31, 111)</sup> Porém, nem sempre a fraca expressão dos antígenos A ou B é devida a mutações no gene *ABO*.

Fracas expressões dos antígenos ABO podem resultar de mutações no gene *FUT1* as quais inativam ou enfraquecem a ação da fucosiltransferase 1 (FUT1), mas não da fucosiltransferase 2 (FUTII), a qual atua na síntese do antígeno H nas secreções exócrinas, caracterizando o fenótipo Secretor. Como o antígeno H é o precursor dos antígenos A e B, portadores do fenótipo para-Bombaim podem expressar estes antígenos nas secreções exócrinas e parte deles podem ser adsorvidos às hemácias. Diferente do fenótipo para-Bombaim,

portadores do fenótipo Bombaim não expressam os antígenos A ou B devido a mutações em ambos os genes *FUT1* e *FUT2*. Estas mutações inativam as respectivas enzimas impedindo a formação do antígeno H nas hemácias e nas secreções exócrinas. Estes indivíduos são caracterizados como não Secretores.<sup>(112)</sup>

Contudo, os indivíduos para-Bombaim que contém os alelos *A* e/ou *B* funcionais, produzem os antígenos A e/ou B, pois são capazes de expressar a *FUT2* que sintetizar o antígeno H a partir do oligossacarídeo precursor do tipo 1. Estes antígenos solúveis podem ser absorvidos à membrana da hemácia originando fenótipos caracterizados pela fraca expressão de A ou B, respectivamente  $A_h$  ou  $B_h$ , mesmo na ausência fenotípica de H na hemácia.<sup>(7, 34, 113, 114)</sup>

### 1.6.1 Competição entre GTA e GTB pelo antígeno H

Em fenótipos comuns como  $A_1B$  e  $A_2B$  há competição entre a GTA e a GTB pelo antígeno precursor (H), resultando em menor quantidade de antígenos A e B do que se apenas uma das enzimas estiver presente. De fato, o número de aceptores H é fixo e a ação GTs é gradual e irreversível. Esta condição foi observada em indivíduos com genótipo AO (O deletional) e AB nos quais a expressão do antígeno A é fraca em AO e ainda mais reduzida em AB, em comparação a AA e AO (O não deletional).<sup>(115)</sup> Acredita-se que a forte competição da GTB com a GTA reduz consideravelmente a disponibilidade de antígeno H, levando a expressão do antígeno A à níveis indetectáveis em

casos de Aw, fato que pode não ocorrer em portadores do genótipo AO, principalmente se o alelo O não possuir a deleção 261G.

Esta melhor reatividade de alelos A ou B fracos, que foi associado ao O não delecional, pode ser explicado pelo fenômeno conhecido como realce alélico, descrito em 1976.<sup>(116)</sup> O mecanismo que fundamenta o realce alélico não foi elucidado, mas é provável que as GTs formam dímeros na região da haste que dá estabilidade às suas estruturas, aumentando assim a especificidade e a eficiência destas enzimas.<sup>(117, 118)</sup> Um exemplo de realce alélico foi descrito em indivíduos portadores do alelo  $A^{x-4}$  ( $ABO^*AW31.03$ ). Quando acompanhado de um alelo O delecional,  $A^{x-4}$  dá origem ao fenótipo O, mas quando acompanhado de um alelo  $O^2$  ou B a expressão do antígeno A é fracamente detectada.<sup>(86, 119)</sup>

Assim, um alelo em heterozigose pode influenciar na expressão dos antígenos ABO, enfraquecendo quando associado com uma enzima truncada do O delecional, melhorando na presença do alelo O não delecional (AO - GTA ou BO - GTB) ou com outra enzima normal (AB – GTA/GTB). Desta forma, alguns subgrupos ABO só poderão ser identificados sorologicamente se associados ao alelo O, principalmente os deleccionais, ou alelos opostos ao seu grupo ABO. Contudo, um alelo com mutação que altera a atividade enzimática não será notado se o outro alelo for normal e do mesmo grupo ABO.<sup>(117, 118)</sup>

As bases que fundamentam a fraca expressão antigênica em alguns subgrupos ABO ainda não foram esclarecidas. Parte dos estudos que exploraram este tema demonstraram, com base em análises de famílias, que as alterações estão ligadas ao locus *ABO*.<sup>(7, 23, 120)</sup> Contudo, são necessários

novos estudos para entender melhor a complexa regulação do locus *ABO*. É possível que potencializadores ou supressores de transcrição atuem sobre a regulação do locus *ABO*.<sup>(121)</sup> Além disso, especula-se que potenciais variações ao longo do intron 1 possam influenciar a fraca expressão antigênica na linhagem hematopoiética mielóide.<sup>(7, 52, 121, 122)</sup>

### **1.6.2 Anticorpos Anti-A e Anti-B: origem e importância na fenotipagem ABO.**

A origem dos anticorpos regulares anti-A e anti-B em soros humanos é objeto de debate a muito tempo e ainda permanece obscura. A questão principal é se estes anticorpos são produzidos de forma natural ou se são resultado de estimulação antigênica da resposta imune adaptativa humoral.<sup>(6)</sup>

Os primeiros experimentos realizados por Springer na década de 50 esclareceram parte desta questão.<sup>(123)</sup> Após fornecer alimentos contendo bactérias a frangos vivendo em ambiente livre de germes, esses autores observaram a presença de anticorpos anti-B no soro destas aves. Esta mesma constatação não ocorreu em um grupo controle mantido no mesmo ambiente. Entretanto, o exato mecanismo que leva os humanos a produzirem anticorpos regulares anti-A e anti-B ainda não foi esclarecido.<sup>(5, 124, 125)</sup>

Em um estudo realizado por Daniel-Johnson e colaboradores (2009)<sup>(126)</sup> com dependentes de alimentação parenteral do grupo A e com níveis normais de imunoglobulinas, foi observada ausência do anticorpo anti-B. Neste estudo foi relatado um caso de um doador de plaquetas cujo aumento do título do anticorpo anti-B foi associado ao uso de probióticos três semanas

antes da doação. Esta constatação se deu pelo fato de dois receptores desenvolverem reação hemolítica aguda após transfusão das plaquetas.<sup>(126)</sup>

Uma recente descoberta de dois subconjuntos distintos de linfócitos B, um denominado B1(CD5+), células T independentes, que não requer estimulação prévia e é responsável pela produção de “anticorpos naturais” e outro subconjunto B2(CD5-), células T dependentes, responsável pela resposta imune adaptativa humoral acrescentou complexidade a esta questão. Alguns pesquisadores acreditam que anticorpos ABO são inicialmente produzidos “espontaneamente”, a partir de um conjunto fixo de genes da linhagem germinal dos ancestrais, encontrados nos subconjuntos B1 dos linfócitos B.<sup>(127)</sup> De fato, os linfócitos B de recém-nascidos são na maior parte B1 e produzem somente os anticorpos de classe IgM no início da vida.<sup>(128)</sup> O subconjunto B2 dos linfócitos B requer estímulos da resposta imune adaptativa (citocinas, por exemplo) e sabe-se que anticorpos IgG podem ser produzidos em resposta a antígenos bacterianos e/ou alimentos. Wuttke e colaboradores,<sup>(129)</sup> descobriram que anticorpos IgM contra antígenos ABO de origem endógena são sempre encontrados em recém-nascidos aos 8 meses de vida ou até muito mais cedo. Aos 8 meses, ambos os subconjuntos de linfócitos B, B1 e B2, estão produzindo anticorpos.<sup>(6)</sup>

Os anticorpos Anti-A e anti-B são produzidos por clones celulares distintos. Entretanto, os estímulos ambientais e a resposta imune não devem ser diferentes a ponto de permitir que indivíduos do grupo O apresentem apenas um destes anticorpos em níveis normais. A ausência do anticorpo anti-A em indivíduos do grupo O foi relatada, mas a causa para esta situação não

usual é desconhecida.<sup>(77, 79)</sup> É possível que falhas nos mecanismos de regulação gênica possam abolir a expressão do gene *ABO* apenas no tecido hematopoiético, mas não em outros tecidos.<sup>(32)</sup>

Fraca expressão ou mesmo ausência de anticorpos anti-A na presença de anti-B normal foi observada em indivíduos do grupo O, portadores do alelo não deletional *O02*.<sup>(77)</sup> Nestas condições se verifica padrão sorológico de não reatividade com anti-A e anti-B na prova direta, e ausência ou fraca reatividade com hemácias *A<sub>1</sub>* e *A<sub>2</sub>* e forte com hemácias B, na prova reversa.<sup>(79)</sup> Atribui-se a este fenômeno a presença, de níveis indetectáveis pelos reagentes comerciais, do antígeno A nas hemácias.<sup>(76)</sup>

Este padrão sorológico não ocorre em todos os portadores do alelo *O02*. Também pode ser observado em fenótipos aparentemente do grupo O sem alelo *O* não deletional. Além disso, a presença do antígeno A fracamente expresso na hemácia,<sup>(31)</sup> a presença do antígeno A em outros tecidos,<sup>(111)</sup> a recombinação gênica em células somáticas e a potencial tolerância imunológica são apontadas como causas responsáveis pelo padrão sorológico acima descrito.<sup>(130)</sup>

### 1.6.3 Quimerismo

Os indivíduos quiméricos podem apresentar duas populações diferentes de hemácias exibindo distintos perfis antigênicos. Nestes casos os antígenos *ABO* são normalmente expressos e nas distintas populações celulares. Embora esta mistura de células possa aparentemente indicar a ocorrência de um subgrupo fraco, de fato esta condição difere daquela que

caracteriza os verdadeiros subgrupos.<sup>(131)</sup> As distintas populações celulares observadas em quimeras não apresentam necessariamente a mesma proporção, uma em relação à outra. Esta proporção depende da quantidade de células que formaram a quimera bem como do nível de expressão dos alelos presentes em cada célula. Estes fatos poderão influenciar a intensidade da reação de aglutinação bem como a intensidade da amplificação gênica durante análises moleculares.<sup>(132)</sup>

Quimerismo em doador sangue pode se constituir num problema de segurança transfusional.<sup>(132, 133)</sup> De fato, concentrado de hemácias quiméricas incompatíveis transfundidas podem gerar reações transfusionais graves. Contudo a gravidade dependerá da quantidade de hemácias incompatíveis presentes na quimera. Pruss e colaboradores (2003)<sup>(107)</sup> relataram um caso em que uma bolsa de concentrado de hemácias de doador quimérico foi transfundida e o receptor apresentou reação hemolítica aguda. Este quimerismo não foi detectado durante a fenotipagem ABO. Análises posteriores por citometria de fluxo demonstrara que o concentrado continha 5% de hemácias B e 95% de hemácias O.<sup>(107)</sup>

Dois tipos de quimerismo são considerados os mais importantes: o quimerismo gemelar (ou duplo) e o microquimerismo materno-fetal. Como ambos acometem o tecido hematopoiético podem gerar reação de campo misto e até discrepâncias entre as provas direta e reversa.<sup>(132, 134)</sup>

O primeiro exemplo de quimerismo gemelar em humanos foi descrito em 1953 e após, outros casos foram relatados.<sup>(135)</sup> O quimerismo gemelar resulta da troca de células precursoras hematopoiéticas por meio da

anastomose de vasos de sangue fetais.<sup>(7)</sup> Em gêmeos, quimerismo de grupo sanguíneo é um evento raro e os poucos casos foram descritos em gêmeos dizigóticos, expressando diferentes antígenos de grupo sanguíneos. Além disso, a redução de células sanguíneas quiméricas para menos que 1% ao longo da vida limita a detecção deste evento.<sup>(132, 136)</sup>

O microquimerismo materno-fetal é a troca bidirecional de células do sangue no período gestacional podendo ocorrer desde o primeiro trimestre.<sup>(137, 138)</sup> Células fetais podem ser detectadas entre a quarta e a sexta semana de gestação na circulação materna. Contudo na trigésima quarta semana, 90% das mulheres grávidas têm células fetais circulantes no sangue periférico.<sup>(138)</sup> Esta troca celular pode contribuir com a imunotolerância passageira e específica de células T maternas, para aloantígenos de origem paterna.<sup>(139)</sup>

A presença de quimerismo pode levar a tolerância imunológica, com ausência do anticorpo correspondente ao antígeno presente. Este antígeno pode estar presente em tecidos não hematopoiético, nos casos de quimera de células somáticas ou a níveis indetectáveis no sangue. No passado, enxertos de células maternas que persistiram na circulação de crianças foram relacionados com deficiências imunológicas. Estudos relativamente recentes, revelou que quimerismo de origem materna pode persistir até 49 anos após o nascimento e não necessariamente possui um envolvimento com deficiência imunológica. Estas hemácias podem estar presentes no sangue, no entanto em quantidades indetectáveis. Contudo o conhecimento destes eventos genéticos podem ajudar na resolução de discrepâncias sem causa aparente.<sup>(132, 134, 135,</sup>

### 1.7 Resolução de discrepâncias ABO

A resolução de casos com reduzida expressão fenotípica em comparação ao esperado, com ou sem discrepâncias entre as fenotipagens direta e reversa, poder ser complexa e requer uso de reagentes e métodos que nem sempre estão disponíveis na rotina. Envolve vários fatores intrínsecos e extrínsecos e requer estratégias fundamentadas no conhecimento do histórico do indivíduo e de seus familiares. Além disso, requer o uso de técnicas sorológicas sempre associadas a técnicas moleculares.<sup>(7)</sup>

Mesmo com o uso de métodos avançados e técnicas modificadas aplicadas a hemaglutinação, alguns casos são de difícil resolução e interpretação e dificultam a inferência dos fenótipos eritrocitários observados em subgrupos com fraca expressão antigênica.<sup>(141)</sup> Estas limitações resultam em uma série de problemas práticos, tais como a ausência inesperada de aglutinação, bem como a difícil interpretação de sua intensidade, principalmente na prova reversa. Estes problemas variam entre laboratórios, entre diferentes amostras do mesmo receptor ou doador e também entre diferentes amostras analisadas no mesmo laboratório. Além disso, podem ser influenciadas pelas variações na reatividade dos diferentes clones de anticorpos monoclonais contidos nos antissoros, bem como entre diferentes lotes de fabricação dos reagentes anti-A, anti-B e anti-AB. Aliado a estes fatores, somam-se ainda o enorme polimorfismo do sistema histo-sanguíneo ABO com diferentes variações que podem alterar a expressão das GTs codificadas, resultando no enfraquecimento da expressão antigênica.<sup>(111)</sup>

Mesmo com os avanços tecnológicos e melhora na qualidade dos reagentes, erros na identificação de fenótipos ainda constituem a causa de reações transfusionais incompatíveis observadas em receptores de sangue. O monitoramento da transfusão de 343.432 unidades de concentrado de hemácias observou que 13 delas foram transfundidas em receptores incompatíveis no sistema histo-sanguíneo ABO, e destes, 3 foram resultantes de erros nos testes sorológicos destinados a identificação dos fenótipos eritrocitários dos doadores.<sup>(142)</sup> Embora outros tipos de erros também ocorram em bancos de sangue, os de natureza técnica representam risco aos receptores e são considerados importantes pela gravidade e principalmente, porque podem ser evitados.<sup>(142)</sup>

Assim, podemos dividir as estratégias para resolução de discrepâncias ABO em duas etapas. Em primeiro lugar, deve-se avaliar detalhadamente a história individual (idade, etnia e gestações), a familiar (irmãos gêmeos) e médica (diagnóstico, transfusão, transplante e medicamentos) para determinar fatores extrínsecos que podem influenciar ou direcionar a resolução da discrepância sendo considerado indispensável antes de iniciar qualquer teste (Quadro 6).

A segunda etapa está baseada na associação de métodos, podendo ser subdividida em estratégias sorológicas (convencionais e adaptadas) e moleculares com o uso de métodos baseados na amplificação de segmentos gênicos (PCR-RFLP) e sequenciamento.<sup>(30, 86, 111, 143, 144)</sup> Amostras de sangue e saliva são comumente utilizadas na resolução da maioria dos casos. Contudo, na suspeita de quimerismos, outros tecidos devem ser examinados. Os tecidos

mais utilizados para confirmar ou excluir quimeras de grupos sanguíneos inclui amostras de esfregaço bucal, raízes do cabelo, recorte de unhas e biópsia de tecido.<sup>(132)</sup>

Quadro 6. Fatores que influenciam ou causam discrepância ABO.

Fatores extrínsecos		
Fatores	Motivo	Orientação
Amostra	Características (aglutinação espontânea, hemólise, etc.), erros de coleta, identificação ou registro	Conferir; Repetir com nova amostra; Lavar e repetir.
Método	Falta ou excesso no tempo de incubação ou centrifugação	Rever, repetir; Testar método diferente.
Reagentes	Fora da validade, contaminados ou problemas de reatividade relacionado ao clone;	Conferir; Repetir com clones diferentes.
Temperatura/tempo	Falta ou excesso podem levar a reações inesperadas;	Rever; Repetir.
Suspensão de hemácias	Inadequada ao método, muito concentrada ou diluída	Rever; Repetir.
Leitura	Vigor ao ressuspender, falta de atenção a reações fracas, aquecimento na centrifugação	Repetir; Solicitar que outro técnico realize a leitura.
Registros	Erros de transcrição dos resultados	Conferir; Repetir
Fatores intrínsecos		
Variação quantitativa	Subgrupos, idade, doenças, transfusões, transplantes, quimeras	Rever histórico; Seguir com testes adicionais relacionados ao motivo.
Variação qualitativa	Subgrupos, clones inespecíficos	Repetir com clones diferentes; Seguir com testes adicionais.
Poligênico	Bombaim	Testar com anti-H; Confirmar com molecular

Fonte: Brecher (2005),<sup>(30)</sup> Harmening (2006),<sup>(37)</sup> e Daniels (2013).<sup>(7)</sup>

### 1.7.1 Estratégias Sorológicas Deste Estudo

A caracterização sorológica de amostras que apresentam discrepâncias ABO é uma tarefa difícil e que requer grande experiência prática e conhecimentos teóricos por parte dos imunohematologistas.<sup>(42, 145)</sup> Além disso, requer cuidadosa seleção de reagentes e modificações de técnicas que possam oferecer condições ótimas para as reações entre antígenos e anticorpos do sistema ABO. As estratégias sorológicas são mostradas no quadro 7.

**Quadro 7.** Estratégias sorológicas para resolução de discrepâncias ABO.

<b>Passos</b>	<b>Métodos</b>
<b>1</b>	Métodos convencionais com antissoros anti-A, anti-B, anti-A,B de clones diferentes;
<b>2</b>	Testes com lectinas anti-A1, anti-H de diferentes espécies;
<b>3</b>	Métodos modificados (no tempo e temperatura de incubação, uso de enzimas proteolíticas) analisados em tubo e gel com o maior número de clones possíveis;
<b>4</b>	Testes de inibição da hemaglutinação em saliva;
<b>5</b>	Investigação da presença do antígeno por adsorção-eluição e/ou citometria de fluxo;
<b>6</b>	Separação de células com reatividade de campo misto.

Basicamente, a investigação sorológica inicia-se a partir da observação das discrepâncias e descartando-se potenciais fatores extrínsecos e intrínsecos artificiais ou relacionados ao comprometimento imune. Em seguida, recomenda-se a repetição dos métodos convencionais com soros monoclonais diversos, testes de adsorção e eluição e uso das lectinas anti-A1 e anti-H em colunas de gel e/ou tubos. No entanto, o teste de inibição da hemaglutinação não deve ser negligenciado haja vista ser essencial para identificação de antígenos solúveis na saliva.

Nas técnicas modificadas utiliza-se de três recursos conhecidos por melhorar a reatividade da aglutinação: tempo, temperatura e tratamento das hemácias com enzimas proteolíticas. Estas modificações podem exacerbar reações fracas ou indetectáveis pelos métodos convencionais.<sup>(7, 30, 145)</sup> O uso destes recursos favorece a obtenção de resultados precisos em menor tempo.

Neste estudo, para resolução da fenotipagem ABO, optamos realizar os testes com incubação a 4°C por 15 minutos e utilizar a enzima bromelina para tratamento das hemácias, na prova direta. Este teste deve ser realizado em colunas de gel neutro as quais permitem a análise simultânea de vários clones, possibilitando a incubação dos antissoros com as hemácias na câmara de reação, de forma homogênea.

A adsorção-eluição tem a finalidade de recuperar os anticorpos absorvidos às hemácias e concentrá-los, por eluição. Assim, em nosso protocolo modificado utilizamos adsorção por uma hora em uma proporção reduzida de salina, de 1 para 2, ao invés de 1 para 3, conforme proposto no protocolo da Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB), no sentido de se obter maior concentração de anticorpos no eluato.<sup>(30)</sup>

Adaptamos o método de Svensson e colaboradores (2011)<sup>(83)</sup> para separação de hemácias não reativas das reativas em colunas de gel e em tubos, utilizando o anticorpo correspondente ao antígeno presente nas hemácias do campo misto, para resolução sorológica. A técnica consiste em separar as duas populações de hemácias para fenotipagem de cada uma, separadamente. As células negativas estarão prontas para retipagem logo após a separação, em método direto. No entanto as hemácias positivas deverão

sofrer tratamento com DTT (0,2M)<sup>(30)</sup> para retirar o anticorpo correspondente (eluição), utilizado na reação de separação. Assim, fenótipos mistos podem ser adequadamente caracterizados. Como não há registros de técnica similar para este propósito na literatura, acreditamos que estas adaptações são inovadoras e que também poderão ser úteis no auxílio de fenotipagens de pacientes politransfundidos, assim como no esclarecimento de duplas populações de hemácias nos casos de quimeras entre gêmeos, demonstradas neste estudo.<sup>(83)</sup>

Contudo, os métodos sorológicos apresentam limitações e não são conclusivos em muitos casos de discrepâncias ABO, pois permitem apenas a identificação de fenótipos expressos nas hemácias e saliva, dependentes da quantidade de antígenos limitada por célula.<sup>(30, 52, 130)</sup>

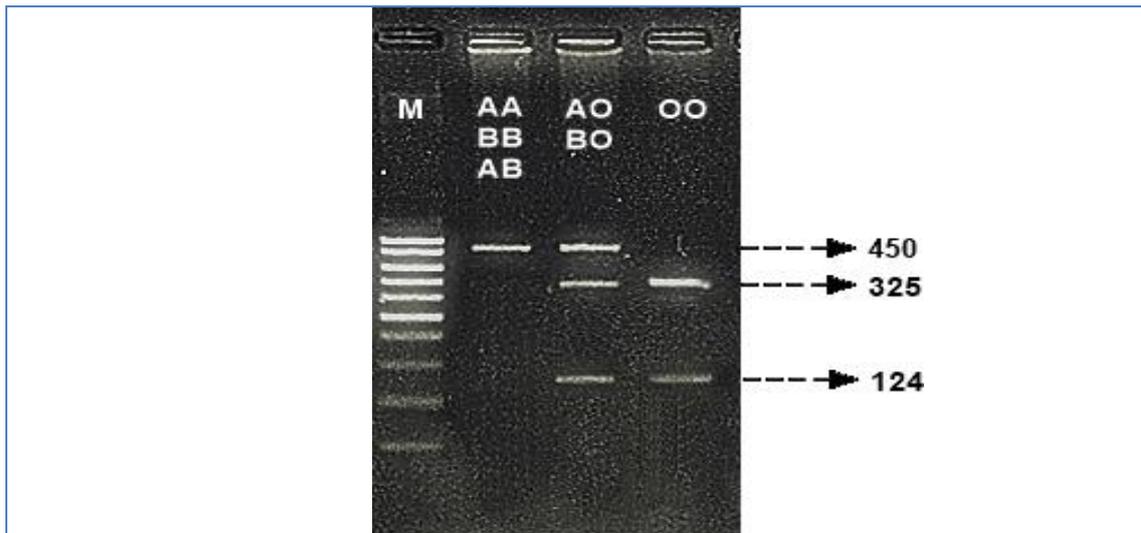
### 1.7.2 Estratégias Moleculares Deste Estudo

Os avanços da biologia molecular têm possibilitado o conhecimento de diferentes mutações que dão origem aos alelos do sistema ABO.<sup>(23)</sup> Diversas técnicas foram testadas e com o passar do tempo, observou-se que muitas delas podem falhar devido a ocorrência relativamente comum de mutações neste sistema.<sup>(42, 111)</sup> Assim, os resultados fornecidos por alguns métodos nem sempre são precisos. No entanto, a deleção 261G do exon 6, característica do alelo O, é facilmente detectada por PCR-RFLP e proporciona a diferenciação do alelo O de alelos A, B e O não delecional.<sup>(7, 146)</sup> O quadro 8 contém as técnicas utilizadas na elucidação de casos de discrepâncias e de fraca expressão antigênica.

**Quadro 8.** Estratégias moleculares para resolução de discrepâncias ABO

Passos	Métodos
1	PCR-RFLP, método de triagem: Investigação da presença da mutação 261delG do gene <i>ABO</i> , com amplificação do exon 6 e tratamento do fragmento com a enzima de restrição <i>Kpn</i> I;
2	Sequenciamento direto dos exons 6 e 7 do gene <i>ABO</i> ;
3	PCR-RFLP para investigação da mutação 428G>A e caracterização do status secretor;
4	Sequenciamento dos genes <i>ABO</i> , <i>FUT1</i> e <i>FUT2</i>

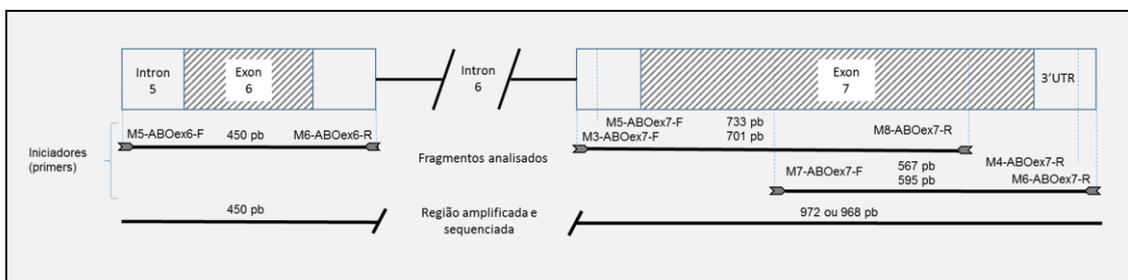
O método de triagem com PCR-RFLP, é baseado na investigação molecular da deleção 261G do exon 6 do gene *ABO* que caracteriza os indivíduos com a presença de um alelo *O*. Este protocolo foi adaptado a partir de Mattos e colaboradores.<sup>(146)</sup> Resumidamente, o fragmento obtido a partir da amplificação com os primers M5-*ABO*ex6-F e M6-*ABO*ex6-R, é tratado com a enzima de restrição *Kpn* I e revelados por eletroforese, em gel de agarose a 2%. O padrão eletroforético pode ser observado na figura 10. Alelos *AA*, *BB* e *AB* não possuem a mutação, portanto não são clivados com a *Kpn* I apresentando uma única banda de 450 pares de base (pb). Alelo *O* em heterozigose com *A* ou *B* apresentam três bandas com 450, 325 e 124 pb, enquanto alelo *O* em homozigose apresenta duas bandas com 325 e 124 pb.



**Figura 10.** Padrão eletroforético da reação de PCR-RFLP e corte enzimático com enzima Kpn I. M: marcador de 50 pares de bases; 450, 325 e 124: tamanho dos fragmentos em pares de bases; AA, BB e AB: alelos com mutação 261delG ausente; AO e BO: mutação 261delG em heterozigose; OO: mutação 261delG em homozigose. Alelo O não deletional não foi considerado nesta representação.

O sequenciamento direto dos exons 6 e 7 é indicado sempre que as etapas anteriores apresentarem limitações no esclarecimento dos casos. Neste trabalho, uma estratégia de sequenciamento direto foi testada, realizando múltiplas reações em cadeia da polimerase (PCR), utilizadas para amplificar todo os exons 6 e 7, parte da região não codificadora (3' – UTR) e parte dos introns 5 e 6, principalmente regiões de “*splice site*” (figura 11). Os iniciadores (Quadro 9) foram desenhados utilizando o programa Primer3Plus<sup>(147)</sup>, os fragmentos foram alinhados com a sequência de A101 (Blast-NCBI) amplificados por PCR-RFLP e confirmados por eletroforese. O produto de PCR remanescente, foi purificado e utilizado para realizar a sequenciamento direto. Iniciadores *sense* e *nonsense* (Quadro 9) foram utilizados e analisados com kit de sequenciamento do ciclo BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o equipamento ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante, no Laboratório de Diagnóstico Molecular e Sequenciamento do Instituto de Biotecnologia da Unesp de Botucatu – SP. Os resultados foram analisados através dos programas: Sequence Scanner Software 2, para avaliar a qualidade e editar a sequência de cada fragmento, e BioEdit sequencer editor<sup>(148)</sup>, para determinar a sequência consenso da amostra analisada e alinhar com as sequências dos alelos conhecidos.



**Figura 11.** Representação dos fragmentos amplificados por PCR-RFLP, analisados com corte enzimático (fragmento do exon 6) e sequenciamento (fragmentos dos exons 6 e 7). Os tamanhos dos fragmentos foram calculados a partir de alinhamentos com a sequência do alelo *A*<sup>1</sup>.

Os genótipos de FUT2 resultantes da homozigose ou heterozigose da substituição G428A podem ser caracterizados pelo método PCR-RFLP, conforme protocolo de Svensson e Colaboradores.<sup>(149)</sup> O fragmento contendo 808 pares de bases, após a digestão com a enzima *Ava* II, é clivado em número variável de fragmentos de acordo a mutação diferencial do alelo presente, em: 326, 295, 130 e 57 pares de bases para o alelo contendo base G; 425, 326 e 57 pares de bases para o alelo contendo a base A. Indivíduos GG e GA são considerados secretores e aqueles AA, não secretores dos glicoconjugados ABH.

**Quadro 9.** Relação dos primers, localização no cromossomo, tamanho do fragmento e gene, utilizados neste trabalho.

Nome	Primer 5' → 3'	Localização	*pb	Gene
<b>M5-ABOex6-F</b>	AGCTGAGTGGAGTTTCCAGGT	Intron 5	450**	ABO
<b>M6-ABOex6-R</b>	GAAGGAGCTGGGTTTTACCG	Intron 6		
<b>M3-ABOex7-F</b>	GCTGGGAAGAGGATGAAGTGA	Intron 6	972	ABO
<b>M4-ABOex7-R</b>	GGACGGACAAAGGAAACAGA	3' – UTR		
<b>M5-ABOex7-F</b>	AGGACTCGCTCAGGACAGG	Intron 6	968	ABO
<b>M6-ABOex7-R</b>	GGGGCCTAGGCTTCAGTTAC	3' – UTR		
<b>M5-ABOex7-F</b>	AGGACTCGCTCAGGACAGG	Intron 6	701	ABO
<b>M8-ABOex7-R</b>	CTTGTTTCAGGTGGCTCTCGT	Exon 7		
<b>M7-ABOex7-F</b>	CTTCCTCAGCGAGGTGGATT	Exon 7	567	ABO
<b>M4-ABOex7-R</b>	GGACGGACAAAGGAAACAGA	3' – UTR		
<b>M3-ABOex7-F</b>	GCTGGGAAGAGGATGAAGTGA	Intron 6	733	ABO
<b>M8-ABOex7-R</b>	CTTGTTTCAGGTGGCTCTCGT	Exon 7		
<b>M7-ABOex7-F</b>	CTTCCTCAGCGAGGTGGATT	Exon 7	595	ABO
<b>M6-ABOex7-R</b>	GGGGCCTAGGCTTCAGTTAC	3' – UTR		
<b>F1-FUT2ex2-F</b>	CCTGTGCACATAGGCAAGTATG	Intron 1	808***	FUT2
<b>F2-FUT2ex2-R</b>	CACCCCTTCCACACTTTTG	Exon 2		
<b>F3-FUT2ex2-F</b>	AACGACTGGATGGAGGAGGA	Exon 2	802	FUT2
<b>F4-FUT2ex2-R</b>	CAGGCCACTGTTCAGTACTGAGATT	3' - UTR		

\*Tamanho dos fragmentos em pares de base (pb) desenhados com programa Primer3Plus<sup>(147)</sup>; \*\*Fragmento utilizado para corte enzimático com *Kpn* I; \*\*\*Fragmento utilizado para corte enzimático com *Ava* II

O gene *FUT2* codifica a fucosiltransferase FUTII a qual é crucial para formação do antígeno H nas secreções, possibilitando a biossíntese dos antígenos A e/ou B nos indivíduos secretores. Portanto estratégias de sequenciamento deste gene é indispensável na investigação de determinadas discrepâncias como quimerismos e fenótipo Bombaim, além de auxiliar na interpretação dos casos não resolvidos nas etapas anteriores.<sup>(150)</sup>

## **1.8 Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo foi investigar as variações na expressão dos antígenos do sistema histo-sanguíneo ABO.

### **1.8.1 Objetivos específicos**

Seleção de receptores e doadores de sangue que apresentaram discrepâncias entre os resultados das fenotipagens direta e reversa do sistema histo-sanguíneo ABO;

Investigação, com o uso de métodos sorológicos e moleculares, das causas das alterações fenotípicas e discrepâncias entre os resultados das fenotipagens direta e reversa no sistema histo-sanguíneo ABO nos receptores e doadores de sangue.

## 2. MANUSCRITOS

---

## **MANUSCRITO 1**

**Título:** Use of serological and molecular methods to resolve ABO discrepancies

**Autores:** Marcos Paulo Miola; Tatiana Elias Colombo; Roberta Maria Fachini; Octávio Ricci Junior; Cínara de Cássia Brandão de Mattos; Luiz Carlos de Mattos.

**Submissão:** *Vox Sanguinis*

## **MANUSCRITO 2**

**Título:** Quimerismo entre gêmeos dizigóticos com campo misto na fenotipagem eritrocitária ABO.

**Autores:** Marcos Paulo Miola; Alessandra Pulier da Silva; Alessandro Garcia Lopes; Roberta Maria Fachini; Octávio Ricci Junior; Cínara de Cássia Brandão de Mattos; Luiz Carlos de Mattos.

**Formato:** Revista *Blood*



## Vox Sanguinis



### Use of serological and molecular methods to resolve ABO discrepancies

Journal:	<i>Vox Sanguinis</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Miola, Marcos; Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto, Molecular Biology Department Colombo, Tatiana; Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto, Department of dermatological, infectious and parasitic diseases Fachini, Roberta; Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto, Department of Medicine I Ricci Junior, Octávio; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, Molecular Biology Brandão de Mattos, Cinara; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, Molecular Biology de Mattos, Luiz; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, Molecular Biology;
Keywords:	Blood groups, Serological testing, Molecular testing

## Vox Sanguinis

1

**Original Manuscript****Title:** Use of serological and molecular methods to resolve ABO discrepancies**Abstract.**

**Introduction.** The variability ABO histo-blood group system extends beyond the four main phenotypes. ABO subgroups are characterized by modified antigen expression on the red blood cell membrane allowing discrepancies between forward and reverse phenotyping in some cases. Serological methods applied to resolve these discrepancies present limitations. **Objectives.** The aim of this study was to resolve forward and reverse ABO discrepancies using serological and molecular methods. **Material and Methods.** Samples from blood donors (n=6) and patients (n=2) presenting forward and reverse ABO discrepancies were analyzed. Different commercial monoclonal antisera anti-A, anti-B and anti-A,B plus lectins anti-A1 and anti-H were used in a modified forward and reverse phenotyping as well as in adsorption and elution modified methods. Genomic DNA was used to identify common SNP (261delG) by PCR-RFLP and the exons 6 and 7 were analyzed by direct sequencing. **Results.** From four cases with weak agglutination with anti-A with the modified method, two were confirmed to A<sub>2</sub>B, one A<sub>el</sub> and one A<sub>w38</sub>. The four remaining cases presented common alleles and were identified as one A<sub>2</sub>B, one A<sub>1</sub> and two O phenotypes. A new allele ABO\*Aw.38 associated allowing an Aweak phenotype was described by sequencing. **Conclusions.** The use of serological and molecular analyses by sequencing allows the resolution of ABO discrepancies resulting from rare and common alleles with weak antigen expression.

## Vox Sanguinis

2

**Keywords.** ABO subgroups, red blood cell phenotyping, blood group genotyping

### ***Introduction***

ABO histo-blood group system is the most important alloantigen system in blood transfusion. It is characterized by the presence or absence of both antigens A and/or B in the red blood cell membrane in combination with two regular antibodies anti-A and/or Anti-B in the plasma [1-3]. The serological identification of the four main phenotypes A, B, AB and O is based on the combination of the results of the forward and reverse phenotyping tests and the results of both tests must be complementary to allow the correct phenotyping [4, 5].

However, under some circumstances discrepancies, which is defined as inconsistent results between forward and reverse phenotyping, can occur due to weak antigen expression on the red blood cells, weak expression of regular anti-A and or anti-B antibodies, among others [6-8]. Discrepancies can be transitory as results of some diseases (cancer, leukemia, for instance) as well as polymorphisms in the promoter region of the ABO gene or in the exons coding the functional region of the glycosyltransferases [1, 7, 9-15].

The ABO gene located at the chromosome 9 (q34.2) contain various single nucleotide polymorphisms which besides promote population variability reduce the affinity of the coded glycosyltransferases for specific substrates [12, 16]. Added to other mechanisms as availability of substrate within the Golgi apparatus as well as the competition with other glycosyltransferases, all affect the amount of antigen expressed in the red blood cell membrane, creating weak A, B and AB phenotypes, which can present discrepancies between forward and reverse phenotyping [13, 17-20].

## Vox Sanguinis

3

The resolution of discrepancies in ABO phenotyping is mandatory but sometimes the use of serological methods alone is not enough reach the correct phenotype. Some published papers explored this matter. In one of them, Kaur and colleagues [21] resolved ABO discrepancies using only serological methods based on adsorption and elution as well as analysis of saliva by hemagglutination inhibition tests. In another one, Sharma and colleagues [22] reported with the use of serological methods that the most frequent cause of discrepancy in discrepancies was the weak A or B antigen expressions combined with decreased anti-B titers among Indian blood donors. These authors reached desired results using only serological methods in some cases but in another they were unable to resolve them. It has been stated that the more consistent resolution of ABO discrepancies requires, besides serology, an extensive molecular approach to identify the alleles and to state the correct phenotypes [7, 13, 23, 24]. The aim of this study was to resolve forward and reverse ABO discrepancies using serological and molecular methods.

### **Material e Methods**

#### ***Ethical aspects of the research***

This study was approved by Ethics and Research Committee from Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (case 784.164).

#### ***Casuistic***

Blood samples from blood donors and patients who presented discrepancies between forward and reverse phenotyping were analyzed. Relatives from blood donors were also analyzed when necessary. All blood donors were able to donation and the patients required transfusion of blood products.

## Vox Sanguinis

4

### ***Criteria adopted to establish discrepancies***

Unexpected agglutination reactions non concordant between red blood cell phenotyping (forward) and serum typing (reverse). Additionally unexpected weak reactions that could hide any discrepancies were considered.

### ***Conventional forward and reverse ABO phenotyping***

Forward and reverse ABO phenotyping were carried out using standard test tubes and gel columns. Commercial antisera Anti-A (cell lines LC A5 and 9113D10), anti-B (cell lines LC G1/2 and 9621A8), and Anti-A,B (LC Birna-1, ES-4, ES131(ES15), 9113D10+152D12) and commercial A1 and B red blood cells were used in both test tubes and gel columns. All the manufacturer's instructions were followed.

### ***Modified forward and reverse ABO phenotyping***

With the same commercial antisera and red blood cells aforementioned we performed a modified forward and reverse and phenotyping in neutral gel columns. Additionally gel cards were incubated at 4 °C for 15 minutes. Blood donor and patient red blood cells were previously treated with bromelin for 10 minutes. Also the blood donors and patients red blood cells were tested with anti-A1 (*Dolichos biflorus*) and anti-H (*Ulex europaeus*) lectins. All the manufacturer's instructions were followed.

### ***Modified adsorption and elution tests***

Adsorption and elution tests were performed according to the American Association for Blood Banks protocol [4] in parallel with following modifications: red blood cells from blood donors and patients were incubated at 4°C for 60 minutes for adsorption of

## Vox Sanguinis

5

anti-A, anti-B, and anti-A, B antisera. Eluates obtained using one part of red blood cells to two parts of isotonic saline solution were tested in tubes and neutral gel columns.

### **Extraction of genomic DNA**

Genomic DNA extraction was performed using QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). All the manufacturer's instructions were followed.

### **Molecular analysis of the exon 6 and exon 7 of the ABO gene**

To analyze the SNP 261delG of the exon 6 by PCR-RFLP and amplify the fragments from exon 6 and exon 7 of the ABO gene which were submitted to sequencing, we used the following protocol with 25 µL as final volume. Buffer: 10X, 2.5 mM (MgCl<sub>2</sub>: 1.5 mM; dNTP: 0.4 mM; Primers: 10 µM; Taq DNA polymerase: 1.0 U) (Invitrogen, Brazil). 5 ng of genomic DNA were added in each tube reaction. The set of amplification was: pre-denaturation at 94 °C (3 min) followed by 35 cycles (94 °C: 45 seconds, 61 °C: 30 seconds; 72 °C: 90 seconds). An additional extension time set at 72 °C for 10 minutes was used. The set of primers (**table 1**) was designed Primer3Plus [25].

The fragment amplified from exon 6 containing 449/450 base pairs, after digestion with *Kpn* I enzyme revealed a variable number of fragments according to the presence (325 + 124) or absence (450) of 261delG SNP (**table 2**). These fragments were separated in electrophoresis in 2% agarose gel stained with SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Brazil) under UV light.

Later the fragments amplified from exons 6 and 7 were sequenced using commercial kits BigDye Terminator and ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). The sequenced fragments were analyzed with the Sequence

## Vox Sanguinis

6

Scanner Software 2 (Applied Biosystems Software) and the BioEdit sequencer alignment editor [26]. All the manufacturer's instructions were strictly followed.

**Table 1** shows the sequence of primers used in the molecular analysis of the exon 6 and exon 7 of the ABO gene.

### Results

**Tables 3 and 4** present the data obtained with the serological and molecular analysis of eight samples being six blood donors and two patients. The case M3D was confirmed by serological and sequencing analysis as A<sub>2</sub>B presenting an irregular anti-A<sub>1</sub> antibody.

The modified forward and reverse ABO phenotyping method combined with modified adsorption and elution methods allow us to conclude that M1P, M2P and M14D cases have at least one A weak allele allowing the weak expression of A antigen. The case M1P reacted weakly with anti-A (cell line 9113D10) and anti-A,B (cell line 152D12+9113D10) antisera in gel columns using the modified method. In this case, a new A allele (*ABO\*Aw.38*) was described and registered in GenBank database as **KT906366.1**.

The cases M5D and M9D did not react with anti-A, anti-B, and anti-A,B from different cell clones in the forward phenotyping using the modified method. However, the plasma from M5D presented strong reaction with A<sub>1</sub> and weak reaction with B red blood cells in the modified reverse phenotyping as well as strong reaction with anti-H lectin. The plasma from M9D presented weak reaction with A and B red blood cells when using the modified reverse phenotyping as well as strong reaction with anti-H lectin. Both cases presented homozygosis for 261Gdel in the exon 6 compatible with O

## Vox Sanguinis

7

phenotype. However, the sequencing analysis showed heterozygosis for M5D [*ABO\*O.01/ABO\*O.02.04 (O.11)*] and homozygosis for MD9 (*ABO\*O.01/ABO\*O.01*).

The discrepancy observed in the M7D case is not apparently related to the absence or the weak expression of B antigen in the red blood cell. The modified method applied to the reverse phenotyping showed the anti-B antibody in the blood plasma. The adsorption/elution test showed negative reaction with B red blood cell. Finally, the molecular analysis demonstrated the homozygosis of *ABO\*A1.01* allele which was confirmed by sequencing.

The molecular analysis of the M10D case demonstrated the presence of A weak subgroup heterozygous for *ABO\*Ael.01* combined with *ABO\*O.02* alleles. In this case only the modified eluate was able to show a weak reaction with A<sub>1</sub> red blood cells.

Family studies (mother and son) of the case M1P allowed to confirm two new mutations at intron 6 (1007G>A) and exon 7 (429G>A). This last mutation does not alter the amino acid Valine at position 143 of the protein (**Figure 1**). Based on the analysis of the son of the patient M1P we conclude that these two mutations are located in the A allele since the son do not carry the new allele *ABO\*Aw38* but is homozygote for O allele which was identified by the 261delG (data not show).

### Discussion

The aim of this study was to resolve forward and reverse ABO discrepancies using serological modified and molecular methods. Eight blood samples were eligible for study. The results obtained with the serological analysis in combination with

### Vox Sanguinis

8

identification of the main mutation determining the common O allele (*ABO\*O.01*) and the sequencing allowed us to define the ABO genotypes of the eight analyzed cases. Additionally, we were able to register a new allele (**KT906366.1**) carrying two mutations not previously identified located at the intron 6 (1007G>A) and exon 7 (429G>A) in the case M1P. This case was the genotyped as *Aw38/O01*.

These two new mutations seem do not modify the sequence of amino acid in the GTA and apparently do not alter the expression of A antigen in red blood cells. However, this A allele have also the common mutations 467C>T and 1061delC in the exon 7 which weak the activity da GTA allowing weak expression of A antigen in the red blood cell membrane. [1, 27]

The cases M2, M3 and M14 do not carry this new mutation but they are heterozygous for the mutations 467C>T and 1061delC. Since they were genotyped *A201/B101*, the competition of the GTA and GTB for precursor H antigen could explain the weak expression of A antigen in the red blood cell. However, this is not an absolute rule since the case M3 present a reactivity equal 3+ in test tubes and in gel column which is commonly observed in the majority of A<sub>2</sub> and A<sub>2</sub>B subgroups. [28]

Curiously, in the case M1P this situation cannot be applied since it has the genotype *O01/Aw38* and therefore the competition with GTB do not happen. It is possible that mutations in other points of the gene not explored in this study contribute with the weak expression of A antigen in the red blood cell surface of this case [7].

The use of modified methods to investigate discrepancies between forward and reverse ABO phenotyping deserves some additional considerations. These methods can reveal the presence of A or B antigens weakly expressed on the red blood cell

## Vox Sanguinis

9

surface and not detected by conventional phenotyping. This situation was observed in the cases M1P, M2P and M14D. On the other hand, these methods can offer false positive results when applied to reverse phenotyping since they can reveal irregular anti-A<sub>1</sub> antibodies which could mask the discrepancies towards a wrong interpretation of the results. This situation was observed in the case M14D in which it is observed a strong reaction of the plasma with A<sub>1</sub> red blood cells. However, the weak expression of A antigen was only observed when we used the modified forward phenotyping and the studies of the eluate. Therefore if the modified forward phenotyping does not reveal the presence of antigen in the red blood cell, the correct phenotype might not be inferred from the modified reverse phenotyping.

The presence of an irregular anti-A<sub>1</sub> antibody in the plasma is common event in some ABO subgroups [1, 29] and therefore it constitutes a confounding factor in the interpretation of the results. This situation was observed in the case M10D in which we concluded to be an A weak subgroup after perform the modified eluate and the sequencing. This case presents a strong anti-B reacting with B red blood cell but a weak anti-A<sub>1</sub> reacting with A<sub>1</sub> red blood cells in the reverse phenotyping. This situation has been reported in many cases of O phenotype carrying the O alleles non-deletional [29-34]. Therefore the use of combined of serological and molecular methods allowed us to assign the correct allele *ABO\*Ael.01* and define the ABO phenotype of the case M10D as A<sub>eI</sub>. A<sub>eI</sub> is known as the most weak A subgroup and the *ABO\*Ael.01* allele contains only one G insertion between the positions 798 and 804. This insertion reduce the activity of the GTA allowing a weak expression of A antigen [33, 35-37].

### Vox Sanguinis

10

The cases M7 and M9 deserve some additional discussion. In both cases the regular antibodies were not detected in the conventional phenotyping but they demonstrated using the modified method. After the use of PCR-RFLP and sequencing we concluded that in both the phenotypes are A and O, respectively. We believe that it is more important to resolve cases like these the use of forward modified phenotyping combined with molecular analysis. Spend time performing modified reverse phenotyping do not help to define the real red blood cell phenotype since this method does not identify the cause of absence or weak reaction of blood plasma antibodies. Besides the main aim of red blood cell phenotyping is to detect the antigen to attend the requirements of transfusional purposes.

We noticed in this study that the ABO subgroup forward phenotyping when performed in gel column presents less reactivity in comparison with test tubes. Additionally, this less reactivity was observed in all cases where an irregular anti-A<sub>1</sub> antibody was investigated. Maybe the g force destabilizes the reactions with weak interactions in the gel column. For example, the case M1P presented better reactivity with the anti-A,B from the cell clone 152D12+9113D10 in test tubes than in gel columns.

Two additional points must be appointed here. Modified methods aiming to investigate ABO subgroups work better in the forward phenotyping. However, reverse phenotyping by modified methods do not explain why an expected antibody is absence being therefore unnecessary to resolve ABO subgroups. Taking into account that differences in the reactivity of anti-A and anti-B is not expected in the conventional reverse phenotyping, it possible that this situation observed in the case M5D results

## Vox Sanguinis

11

from immune tolerance and deserve additional investigations not necessarily required to solve the ABO subgroup.

Finally, the results of this study demonstrate that only serological tests present limitations and sometimes are inconclusive to identify ABO subgroups. Besides, the combination of these tests with molecular investigations (PCR-RFLP and sequencing) are good tool for allow the clear identification of ABO subgroups.

**Referências:**

- 1 Daniels G: *Human blood groups: Human Blood Groups*. 3rd edn. Oxford, Wiley Blackwell, 2013.
- 2 Reid ME Lomas-Francis CG, Olsson ML: *The Blood Group Antigen FactsBook*, 3rd edn. London, Academic Press, 2013.
- 3 Klein HG, Anstee DJ: *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 11 edn. Malden, MA: Blackwell-Publ., 2005.
- 4 Brecher ME: *Technical manual, AABB*, 15rd edn. Maryland, Bethesda, 2005.
- 5 Harmening DM: *Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão*, 4rd edn. Revinter, 2006.
- 6 Hosoi E: Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest* 2008; 55: 174-82.
- 7 Cai X, Jin S, Liu X, et al.: Molecular genetic analysis of ABO blood group variations reveals 29 novel ABO subgroup alleles. *Transfusion* 2013; 53: 2910-6.
- 8 Yudin J, Heddle NM: A 13-question approach to resolving serological discrepancies in the transfusion medicine laboratory. *Lab Med* 2014; 45: 193-206.
- 9 Sano R, Nakajima T, Takahashi K, et al.: Expression of ABO blood-group genes is dependent upon an erythroid cell-specific regulatory element that is deleted in persons with the B(m) phenotype. *Blood* 2012; 119: 5301-10.
- 10 Yamamoto F, Cid E, Yamamoto M, et al.: ABO research in the modern era of genomics. *Transfus Med Rev* 2012; 26: 103-18.
- 11 Hata Y, Kominato Y, Yamamoto FI, et al.: Characterization of the human ABO gene promoter in erythroid cell lineage. *Vox Sang* 2002; 82: 39-46.
- 12 Storry JR, Olsson ML: The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology* 2009; 25: 48-59.
- 13 Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, et al.: Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001; 98: 1585-93.
- 14 Bianco T, Farmer BJ, Sage RE, et al.: Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *Blood* 2001; 97: 3633-9.
- 15 Bianco-Miotto T, Hussey DJ, Day TK, et al.: DNA methylation of the ABO promoter underlies loss of ABO allelic expression in a significant proportion of leukemic patients. *PLoS One* 2009; 4: e4788.
- 16 Castilho L, Pellegrino Junior J, Reid ME: *Fundamentos de Imuno-hematologia*, São Paulo, Atheneu, 2015.
- 17 Stanley P: Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3.

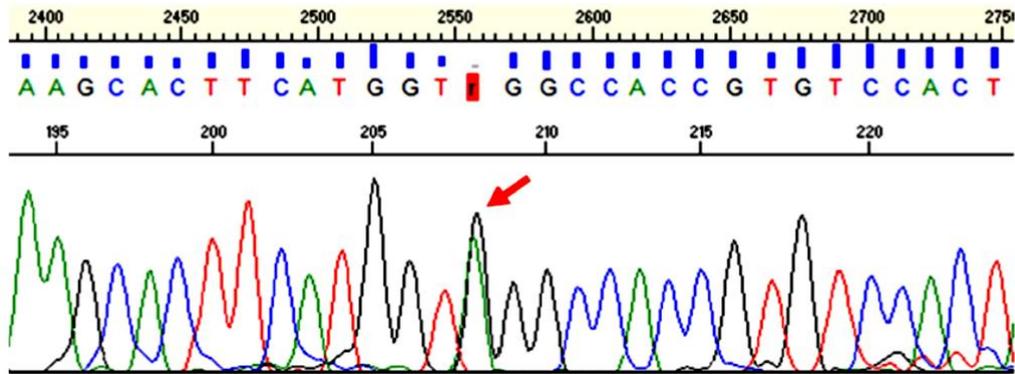
## Vox Sanguinis

12

- 18 Salmon C, Cartron JP. Le renforcement allelique [Allelic enhancement]. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1976; 19: 145-55.
- 19 Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Rodrigues MJ, et al.: ABO exon and intron analysis in individuals with the AweakB phenotype reveals a novel O1v-A2 hybrid allele that causes four missense mutations in the A transferase. *BMC Genet* 2003; 4: 17.
- 20 Hassinen A, Rivinoja A, Kauppila A, et al.: Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 17771-7.
- 21 Kaur G, Kaur P, Basu S, et al.: Blood group discrepancies at a tertiary care centre - analysis and resolution. *Int J Lab Hematol* 2014; 36: 481-7.
- 22 Sharma T, Garg N, Singh B: ABO blood group discrepancies among blood donors in Regional Blood Transfusion Centre GTB Hospital, Delhi, India. *Transfus Apher Sci* 2014; 50: 75-80.
- 23 Storry JR, Condon J, Hult AK, et al.: An age-dependent ABO discrepancy between mother and baby reveals a novel A(weak) allele. *Transfusion* 2015; 55: 422-6.
- 24 Quraishy N, Sapatnekar S: Advances in Blood Typing. *Adv Clin Chem* 2016; 77: 221-69.
- 25 Untergasser A, Nijveen H, Rao X, et al.: Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: W71-4.
- 26 Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. . *Nucl. Acids. Symp. Ser.* , 1999: p. 95-8. .
- 27 Hult AK, Yazer MH, Jørgensen R, et al.: Weak A phenotypes associated with novel ABO alleles carrying the A2-related 1061C deletion and various missense substitutions. *Transfusion* 2010; 50: 1471-86.
- 28 Ying Y, Hong X, Xu X, et al.: Serological characteristic and molecular basis of A2 subgroup in the Chinese population. *Transfus Apher Sci* 2013; 48: 67-74.
- 29 Seltsam A, Das Gupta C, Wagner FF, et al.: Nondeletional ABO\*O alleles express weak blood group A phenotypes. *Transfusion* 2005; 45: 359-65.
- 30 Yazer MH, Hult AK, Hellberg A, et al.: Investigation into A antigen expression on O2 heterozygous group O-labeled red blood cell units. *Transfusion* 2008; 48: 1650-7.
- 31 Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Chester MA, et al.: An extensive polymerase chain reaction-allele-specific polymorphism strategy for clinical ABO blood group genotyping that avoids potential errors caused by null, subgroup, and hybrid alleles. *Transfusion* 2007; 47: 2110-25.
- 32 Wagner FF, Blasczyk R, Seltsam A: Nondeletional ABO\*O alleles frequently cause blood donor typing problems. *Transfusion* 2005; 45: 1331-4.
- 33 Yazer MH, Hosseini-Maaf B, Olsson ML: Blood grouping discrepancies between ABO genotype and phenotype caused by O alleles. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 618-24.
- 34 Obukhova P, Korchagina E, Henry S, et al.: Natural anti-A and anti-B of the ABO system: allo- and autoantibodies have different epitope specificity. *Transfusion* 2012; 52: 860-9.
- 35 Joo SY, Shim YS, Kim MJ, et al.: [A case of ABO\*Ael02/O04 genotype with typical phenotype O]. *Korean J Lab Med* 2008; 28: 319-24.
- 36 Medina A, Jiménez JM, Caso F, et al.: [AEL: a rare variant of blood group A]. *Sangre (Barc)* 1994; 39: 49-51.
- 37 Olsson ML, Chester MA: Evidence for a new type of O allele at the ABO locus, due to a combination of the A2 nucleotide deletion and the Ael nucleotide insertion. *Vox Sang* 1996; 71: 113-7.

## Vox Sanguinis

13



**Figure 1:** Electropherogram showing the mutation 429G>A (arrow) in the exon 7 of the *ABO\*Aw38* allele.

For Peer Review

## Vox Sanguinis

14

**Table 1:** Primers sequences, localization and fragments amplified for sequencing.

PCR	Primers	Sequence (5' → 3')	Localization	Sequenced fragment (bp)
1	M5-ABOex6-F	AGCTGAGTGGAGTTCCAGGT	Intron 5	450
	M6-ABOex6-R	GAAGGAGCTGGGTTTTACCG	Intron 6	
2	M5-ABOex7-F	AGGACTCGCTCAGGACAGG	Intron 6	701
	M8-ABOex7-R	CTTGTCAGGTGGCTCTCGT	Exon 7	
3	M7-ABOex7-F	CTTCCTCAGCGAGGTGGATT	Exon 7	567
	M4-ABOex7-R	GGACGGACAAAGGAAACAGA	3' – UTR	

For Peer Review

## Vox Sanguinis

15

**Table 2:** Alleles, length of fragment amplified and number of fragments obtained after digestion with the enzyme *Kpn* I.

Genotypes	Amplified Fragments (bp)	Fragments after digestion with <i>Kpn</i> I (bp)
AA	450	450
AO	450/449	450 / 325/ 124
BB	450	450
BO	450/449	450 / 325 / 124
AB	450	450
OO	449	325 / 124

Non deletional O shows the same pattern of A or B.

For Peer Review

**Table 3:** Combined results of serological and molecular analysis of the cases investigated in this study.

Cases	Conventional		Modified methods						Conventional/ Modified				Phenotypes <sup>a</sup>	261G>del	ABO genotypes	Phenotypes <sup>c</sup>
	FP	RP	Antiserum			Red blood cells			Lectins		Eluates					
			A	B	AB	A1	B	O	A1	H	A1	B				
M1P	O	A	w	0	w	1	4	1	0	4	4	NT	Aweak	G/del	O01/Aw38 <sup>b</sup>	A <sub>w</sub>
M2P	B	AB	w	4	4	2	0	0	0	1	4	NT	AweakB	G	A201/B101	A <sub>2</sub> B
M3D	AB	B	3	4	4	4	0	0	0	0	NT	NT	AB	G	A201/B101	A <sub>2</sub> B
M5D	O	B	0	0	0	4	2	0	0	4	NT	0	O	del	O01/O11	O <sub>1</sub>
M7D	A	AB	4	0	4	0	2	0	4	0	NT	0	A	G	A101/A101	A <sub>1</sub>
M9D	O	AB	0	0	0	w	1	0	0	3	0	0	O	Del	O01/O01	O <sub>1</sub>
M10D	O	A	0	0	0	w	4	0	0	4	0/1 <sup>e</sup>	NT	Aweak	G/del	Ae101/O02	A <sub>w</sub>
M14D	B	B <sup>d</sup>	w	4	4	3-4	0	0	0	2	4	NT	AweakB	G	A201/B101	A <sub>2</sub> B

<sup>a</sup> Inferred from serology;<sup>b</sup> New allele;<sup>c</sup> Inferred from sequencing;<sup>d</sup> Weak reactive in microplate test;<sup>e</sup> Modified methods

FP, forward phenotyping; RP, reverse phenotyping.

**Table 4:** Results of the main variants identified by sequencing.

Locus ABO Nucleotide	Exon 6 261	Intron 6 1007	429	467	526	542	646	657	681	Exon 7						3' UTR		
NG006669.1 <sup>a</sup>	G	G	G	C	C	G	T	C	G	G	C	C	G	G	G	G	C	
Case																	Allele name	
M1P	G/del	<b>G/A</b>	<b>G/A</b>	C/T													C/del	O01/Aw38 <sup>b</sup>
M2P				C/T	C/G			C/T		G/A		C/A	G/C			G/A	C/del	A201/B101
M3D				C/T	C/G			C/T		G/A		C/A	G/C			G/A	C/del	A201/B101
M5D	del					A/G	T/A		G/A		C/T				G/A			O01/O11
M7D																		A101/A101
M9D	del																	O01/O01
M10D	G/del						T/A		G/A		C/T		insG	G/A				Ae101/O02
M14D				C/T	C/G			C/T		G/A		C/A	G/C			G/A	C/del	A201/B101

<sup>a</sup>Reference sequence of the ABO system;<sup>b</sup>New allele.



**Título: Quimerismo entre gêmeos dizigóticos com campo misto na fenotipagem eritrocitária ABO.**

**Autores:** Marcos Paulo Miola; Alessandra Pulier da Silva; Alessandro Garcia Lopes; Roberta Maria Fachini; Octávio Ricci Junior; Cínara de Cássia Brandão de Mattos; Luiz Carlos de Mattos.

***Pontos chave:***

- Primeiro estudo de quimerismo gemelar descrito no Brasil
- Resolução sorológica de discrepância em campo misto.
- DNA extraído a partir da saliva não é adequado para resolução de quimerismo.

**Resumo:** Quimerismo gemelar é um evento raro em humanos e sua detecção é geralmente incidental. O esclarecimento destes eventos requer estudos de familiares, antecedentes médicos além de análise de células hematopoiéticas e de outros tecidos. As interações sorológicas, bioquímicas e genéticas entre os sistemas ABO, Lewis e Secretor, embora sejam bem conhecidas, nem sempre são exploradas na resolução de casos de quimerismo hematopoiético. Neste estudo, descrevemos um caso raro de quimerismo entre gêmeos de sexos distintos, com aparente fenótipo AB em campo misto, resolvido com uma abordagem sorológica baseada na separação de hemácias e confirmado pela análise molecular dos genes *ABO* e *FUT2*. Os resultados revelaram a presença de quatro alelos *ABO* (*A101*, *B101*, *O01* e *O02*) e três alelos *FUT2*

(SE\*01.04.01/SE\*01.06.03/SE\*25.01.01) no DNA do sangue periférico de ambos os gêmeos. O DNA extraído de swab bucal revelou os genótipos ABO (A101/B101) e FUT2 (SE\*25.01.01/SE\*25.01.01) no gêmeo masculino e os genótipos ABO (O01/O02) e FUT2 (SE\*01.04.01/SE\*01.06.03) no gêmeo feminino. Nossos resultados demonstram a importância do uso combinado de métodos sorológicos e moleculares na resolução de casos de quimerismo gemelar em humanos.

**Palavras-Chave:** Quimera, Eritrócitos, Gêmeos Dizigóticos, Sistema do Grupo Sanguíneo ABO

## **Introdução**

A identificação dos fenótipos eritrocitários do sistema histossanguíneo ABO, com o uso de reações de hemaglutinação, é crucial para a medicina transfusional e o transplante de órgãos sólidos.<sup>1</sup> Reações de hemaglutinação em campo misto, ocorrem devido a diferentes fatores tais como: troca de células materno-fetal (miroquimerismo), troca de sangue entre os gêmeos por fusão dos vasos sanguíneos (quimerismo gemelar) ou por transfusão ABO heterogrupo. Estas situações requerem investigação imediata para evitar o comprometimento da segurança transfusional.<sup>2</sup>

Quimerismo gemelar é um evento raro, normalmente encontrado por acaso, pois não causa necessariamente alterações fisiológicas, mas pode apresentar dupla população de eritrócitos. Pode ser observado entre gêmeos dizigóticos que possuem antígenos eritrocitários distintos em diferentes

sistemas de grupos sanguíneos.<sup>3</sup> A diminuição de células quiméricas ao longo da vida pode dificultar a detecção e caracterização de quimerismos.<sup>4</sup> Nestas condições, torna-se necessário o uso combinado de métodos sorológicos e moleculares para resolução adequada.<sup>3,5</sup>

Estudos de quimerismo são mais comuns em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea.<sup>4,6</sup> Contudo, com pouco mais de 100 casos na literatura, este fenômeno é raramente descrito entre gêmeos.<sup>7-9</sup> Rodriguez-Buritica e colaboradores<sup>10</sup> relataram um caso onde a comparação de genótipos de sangue e pele revelou que o quimerismo também estava presente na pele. Lee e colaboradores<sup>8</sup> descreveram um caso em que os gêmeos foram classificados como subgrupo B3 ao nascimento. Posteriormente, novos testes puderam concluir pela quimera com presença dos grupos B e O. Pruss e colaboradores<sup>7</sup> descreveram um caso de paciente que apresentou reação hemolítica após receber uma bolsa de doador quimérico. Estes estudos se valeram do uso de métodos sorológicos e moleculares, muitas das vezes aplicados a outros tecidos além do hematopoiético para elucidá-los. O objetivo deste estudo foi esclarecer um caso de quimerismo entre gêmeos dizigóticos com reação de hemaglutinação de campo misto na fenotipagem ABO direta.

## **Material e Método:**

### ***Descrição do caso:***

Um caso de doador de sangue AB (probando) com reação em campo misto na prova direta, sem discrepância aparente com prova reversa, observado no Serviço de Hemoterapia do Hospital Naval Marcílio Dias da

cidade do Rio de Janeiro foi encaminhado ao nosso laboratório para estudos sorológicos e moleculares.

O doador possui uma irmã gêmea não idêntica e sexo oposto que apresentou o mesmo perfil sorológico para o sistema ABO. A investigação foi ampliada com análises de outros membros da família (Pai, Mãe e irmã não gêmea) para resolução do caso. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CAAE 34163114.6.0000.5415). Todos os sujeitos da pesquisa receberam informações sobre os objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento informado.

### ***Estudo Sorológico:***

A fenotipagem eritrocitária ABO do doador e de sua irmã gêmea, realizada em tubos e em colunas de gel neutro (DiaMed – Latino América, Brasil) com os antissoros anti-A (clones LC A5 e 9113D10), anti-B (clones LC G1/2 e 9621A8) e anti-A,B [clones LC Birna-1, ES-4, ES131(ES15) e 9113D10+152D12] de três fabricantes diferentes (Diamed, Fresenius e Lorne). Também foram utilizadas colunas de gel (DiaClon ABO/Rh para Recém-nascidos, DiaMed Latino América, Brasil) contendo os antissoros anti-A [(clone LM 297/628 (LA-2)], anti-B [(clone LM 306/686 (LB-2)] e anti-A,B [clones ES131 (ES-15) + Birna-1 + ES-4]. Os testes de inibição de hemaglutinação em saliva para análise dos antígenos ABH foram realizados em tubos utilizando-se os mesmos antissoros da fenotipagem eritrocitária ABO.

Foram realizadas fenotipagens eritrocitárias em colunas de gel para os sistemas Rh (C, c, E, e), MNS(S, s), Duffy (Fya, Fyb) e Kidd (Jka, Jkb)

(DiaMed Latino América, Brasil). As fenotipagens eritrocitária e salivar do sistema Lewis (Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>), foram realizadas em tubos e por inibição da hemaglutinação, respectivamente, com os antissoros anti-Le<sup>a</sup> (clones LEA2; e3643B9) e anti-Le<sup>b</sup> (clones LEB2; GX336) (Lorne Laboratories, US; Fresenius-Kabi, Brasil).

#### ***Separação das hemácias em campo misto:***

As hemácias em campo misto, observadas na coluna de gel, foram separadas de acordo com a reatividade utilizando-se o anticorpo anti-A,B (Clones 9113D10 + 152D12). As hemácias reativas foram separadas em tubos e tratadas com Ditiotretol (DTT) 0,2M para remoção dos anticorpos anti-A,B.<sup>11</sup> Em seguida foram refenotipadas em tubos e em colunas de gel com os anticorpos anti-A, anti-B e anti-A,B. As hemácias não reativas foram lavadas para remoção microesferas do gel, refenotipadas em tubos e em colunas de gel para os antígenos ABO (A, B, AB) e Rh (C, E) que apresentavam campo misto.

#### ***Estudos Moleculares dos genes ABO e FUT2 (Secretor):***

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico com o uso de kits comerciais (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, da QIAGEN, Hilden, Alemanha), de swab do epitélio bucal e da saliva com o uso da técnica de fenol-clorofórmio. As genotipagens convencionais ABO e FUT2 foram realizadas com o uso do método PCR-RFLP e enzima de restrição *Kpn* I e *Ava* II, respectivamente, com modificações do protocolo de Mattos e colaboradores (2001)<sup>12</sup> e Svensson e colaboradores.<sup>13</sup>

O sequenciamento dos exons 6 e 7 do gene *ABO* e exon 2 do gene *FUT2* para caracterização dos alelos, foram realizados com o uso de kits comerciais (BigDye Terminator, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em equipamento ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os fragmentos submetidos ao sequenciamento foram purificados com o kit comercial GenElute PCR Clean-up (Sigma-Aldrich Brasil Ltda). Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer3Plus.<sup>14</sup> Todos os primers utilizados nas análises do sistema ABO neste estudo estão na tabela 1.

**Tabela 1.** Relação dos primers, localização no cromossomo, tamanho do fragmento e genes sequenciados.

Nome	Primer 5' → 3'	Localização	Fragmento (pb)	Gene
M5-ABOex6-F	AGCTGAGTGGAGTTTCCAGGT	Intron 5	449/450*	<i>ABO</i>
M6-ABOex6-R	GAAGGAGCTGGGTTTTACCG	Intron 6		
M5-ABOex7-F	AGGACTCGCTCAGGACAGG	Intron 6	701	<i>ABO</i>
M8-ABOex7-R	CTTGTCAGGTGGCTCTCGT	Exon 7		
M7-ABOex7-F	CTTCCTCAGCGAGGTGGATT	Exon 7	567	<i>ABO</i>
M4-ABOex7-R	GGACGGACAAAGGAAACAGA	3' – UTR		
F1-FUT2ex2-F	CCTGTGCACATAGGCAAGTATG	Intron 1	808**	<i>FUT2</i>
F2-FUT2ex2-R	CACCCCCTCCCACTTTTG	Exon 2		
F3-FUT2ex2-F	AACGACTGGATGGAGGAGGA	Exon 2	802	<i>FUT2</i>
F4-FUT2ex2-R	CAGGCCACTGTTCCTGAGATT	3' – UTR		

\*Fragmento utilizado no corte enzimático com enzima de restrição *Kpn* I, para avaliação da mutação 261delG (além do sequenciamento); \*\* Fragmento utilizado no corte enzimático com enzima de restrição *Ava* II, para avaliação da mutação 428A>G (além do sequenciamento).

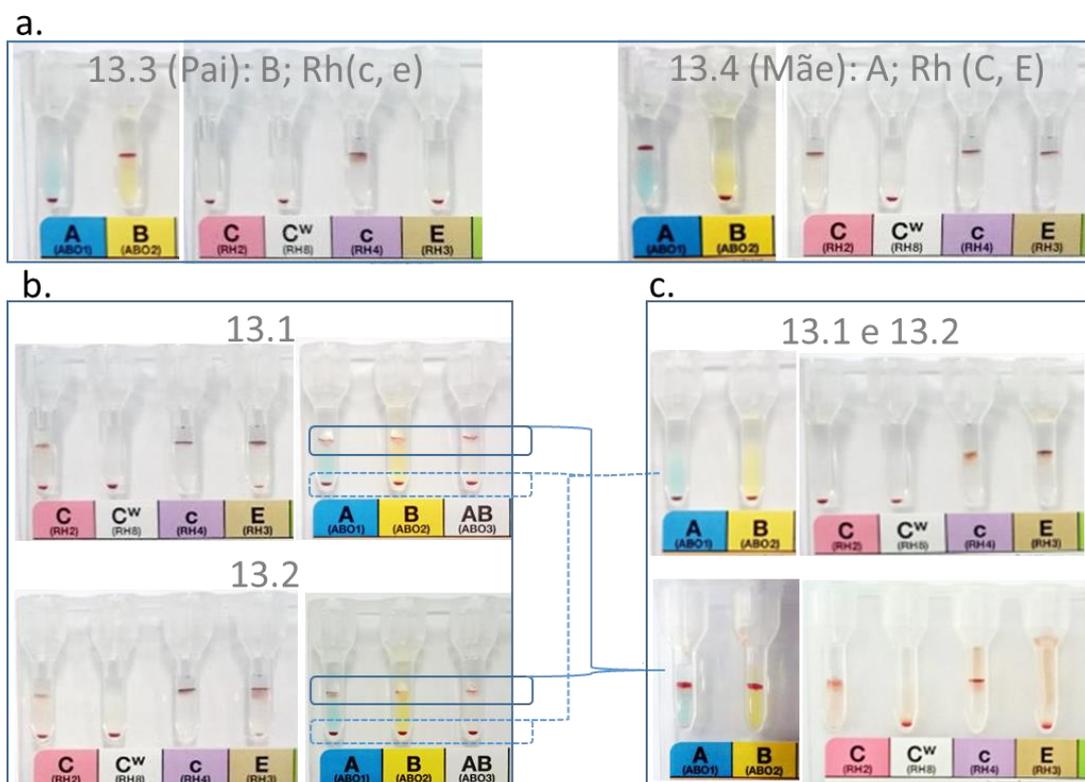
Neste estudo, utilizamos a terminologia tradicional para fenótipos e antígenos.(7, 30, 42) Para os alelos utilizamos a terminologia disponível no Banco de dados de glóbulos vermelhos humanos (dbRBC).<sup>16</sup>

## Resultados e Discussão

As análises sorológicas do probando (M13.1) apresentaram resultado em campo misto quanto do uso dos antissoros para os antígenos ABO (A, B, AB) e Rh (C, E). Seus resultados foram idênticos aos de sua irmã gêmea (M13.2). Estes padrões não foram observados nas análises sorológicas realizadas em amostras dos demais membros da família (Figura 1). A reatividade em campo misto com o antissoros anti-AB (fig. I-b), sugere que os pais são heterozigotos para o sistema ABO (AO x BO) e que o probando e sua irmã gêmea sejam portadores de ambos os genótipos AB e OO. Não foi observada reação em campo misto na fenotipagem eritrocitária do sistema Lewis de ambos os gêmeos [13.1: Le(a+b-); 13.2: Le(a-b+)]. Esta observação permitiu inferir que um deles possui o fenótipo não Secretor e outro Secretor, fato que foi confirmado pelo teste de inibição da hemaglutinação em saliva, pela genotipagem por PCR-RFLP e por sequenciamento (tabela 2). Estas observações demonstram que o quimerismo exclusivo do tecido hematopoiético não modifica a expressão dos antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos ABO e Lewis em outros tecidos. Pelo seu caráter de exclusividade, o gene *FUT2* atua no controle dos sistemas ABO e Lewis no intestino delgado, pâncreas rins e glândulas exócrinas, mas não no tecido hematopoiético.<sup>17,18</sup>

Com o propósito de ampliar a investigação sorológica, utilizamos um protocolo adaptado de Svensson e colaboradores,<sup>13</sup> para separação das hemácias em campo misto nas colunas de gel do probando e de sua irmã gêmea, com o antissoros anti-A,B. As hemácias inicialmente reativas presentes

no topo da coluna de gel foram tratadas com DTT 0,2M para remoção dos anticorpos anti-A,B. Em seguida foram refenotipadas em tubo para os sistemas ABO e Rh e não mais apresentaram reação em campo misto (figura 1). As hemácias inicialmente não reativas foram refenotipadas em tubos e em colunas de gel para os sistemas ABO e Rh e também não mostraram reação em campo misto (figura 1). Estas estratégias metodológicas adotadas demonstraram ser cruciais para a resolução sorológica do quiremismo hematopoiético com métodos sorológicos. Estes resultados combinados com aqueles obtidos das análises da saliva nos permitiram inferir que o probando (13.1) é do grupo AB e sua irmã gêmea (13.2) é do grupo O.



**Figura 1.** Fenotipagens ABO, RhC, RhE dos pais (a), dos gêmeos quiméricos (b) e repetição da fenotipagem após separação dos eritrócitos reativos dos não reativas com anti-AB (c).

A investigação molecular do DNA genômico extraído do sangue periférico, com o uso do método PCR-RFLP, demonstrou que o probando (13.1) e sua irmã gêmea (13.2) apresentavam padrão de heterozigose compatível com a presença de um alelo não O combinado a um alelo O deletional, no gel de agarose, após a digestão do fragmento amplificado com a enzima de restrição *Kpn* I. Esta análise é compatível com a presença da deleção 261delG no exon 6 em um dos alelos.

As análises de sequenciamento dos exons 6 e 7 e regiões marginais de aproximadamente 100pb dos introns 5, 6 e região não transcrita (3'UTR), revelou a presença de quatro alelos no tecido hematopoiético (sangue periférico) de ambos os gêmeos (Tabela 2). Considerando-se que o sistema ABO apresenta padrão de herança mendeliana autossômica,<sup>15</sup> a presença de quatro alelos no mesmo indivíduo sugere fortemente a ocorrência de quimerismo hematopoiético. A combinação dos resultados sorológicos e moleculares indica dupla população de eritrócito (AB e O) no sangue periférico de ambos os gêmeos. Pelo conhecimento dos autores, esta condição não foi previamente descrita.

Para confirmar o quimerismo hematopoiético, O DNA genômico extraído da saliva e de swab bucal foi analisado por PCR-RFLP e sequenciamento os exons 6 e 7 e comparado àquele obtido do DNA genômico do sangue periférico. A análise da saliva apresentou resultado idêntico àquele do sangue periférico. É possível que contaminação da saliva com células hematopoiéticas decorrentes de microlesões, inflamações ou linfa tenha contribuído para esta concordância. Estas observações corroboram os dados

relatados por Endler e colaboradores<sup>19</sup> em estudos com pacientes transplantados.

Por outro lado, o sequenciamento do DNA genômico extraído do Swab bucal mostrou a presença dos alelos *A101* e *B101* no probando (13.1) e dos alelos *O01* e *O02* em sua irmã gêmea (13.2) (Tabela 2). O DNA genômico extraído do swab bucal parece ser mais adequado para esclarecimentos de casos de quimerismo hematopoiético uma vez oferece menor risco de contaminação com células hematopoiéticas. Sua coleta não implica forçar a mucosa para o processo de salivação, fato que pode contribuir com a contaminação. Além disso, possibilita a escolha da área da mucosa na qual o swab será levemente friccionado. Os cuidados adotados neste estudo para obtenção e análise do DNA genômico da saliva corroboram os relatos de Thiede e colaboradores.<sup>20</sup> A fim de esclarecer a ausência de antígenos A e B nos eritrócitos com fenótipo O e dar maior fundamentação a este caso, utilizamos os métodos PCR-RFLP e sequenciamento do intron 1, do exon 2 e da região 3'UTR do gene *FUT2* com o propósito de confirmar o status Secretor, haja vista as fenotipagens eritrocitárias Lewis e a reação de inibição da hemaglutinação da saliva sugerirem que o probando (13.1) é não Secretor e sua irmã gêmea (13.2), Secretor.

As análises do sangue periférico do probando (13.1) e de sua irmã gêmea (13.2) indicaram a presença de heterozigose do gene *FUT2* (Tabela 2), com o uso do método PCR-RFLP. Este dado é discordante daquele verificado na fenotipagem eritrocitária Lewis e na reação de inibição da hemaglutinação da saliva para o probando (13.1), mas não para sua irmã gêmea (13.2).

**Tabela 2.** Resultados dos testes sorológicos e moleculares (sangue, saliva e swab).

	ABO			Saliva		Fenótipo		Genotipagem**			
	Prova Direta			Antígenos				ABO		FUT2 (Status secretor)	
Amostras	A	B	AB	O	Lewis	ABO	Lewis	Sangue	Swab	Sangue	Swab
<b>13.1</b> (Probando)	CM	CM	CM	0	a+b-	AB/O	a+b-	A101/B101/O01/O02	A101/B101	SE*01.04.01/SE*01.06.03/SE*25.01.01 (Se/Se/se)	SE*25.01.01/SE*25.01.01 (se/se)
<b>13.2</b> (Irmã gêmea)	CM	CM	CM	+	a+b+	AB/O	a-b+	A101/B101/O01/O02	O01/O02	SE*01.04.01/SE*01.06.03/SE*25.01.01 (Se/Se/se)	SE*01.04.01/SE*01.06.03 (Se/Se)
<b>13.3</b> (Pai)	0	4	4	NT	NT	B	a-b+	B1/O02	-	SE*01.06.03/SE*25.01.01 (Se/se)	-
<b>13.4</b> (Mãe)	4	0	4	NT	NT	A	a-b+	A1/O01	-	SE*01.04.01/SE*25.01.01 (Se/se)	-
<b>13.5</b> (Irmã)	4	4	4	NT	NT	AB	a+b-	A101/B101	-	SE*25.01.01/SE*25.01.01 (se/se)	-

NT = Não testado;

Se: alelo secretor;

se: alelo não secretor;

SE\*01.06.03: novo alelo caracterizado neste estudo (GenBank acesso: KX550421);

\*\*Análise de saliva apresentou os mesmos resultados que o sangue periférico;

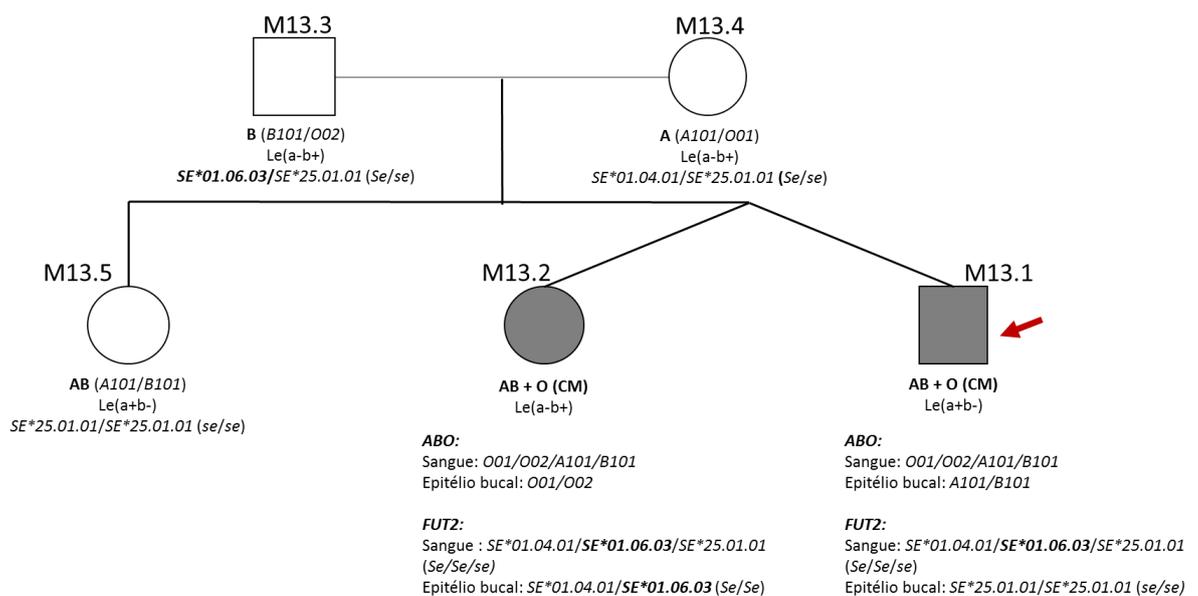
O sequenciamento do intron 1, do exon 2 e da região 3'UTR no DNA genômico do sangue periférico do probando (13.1) e sua irmã gêmea (13.2) revelou a presença de dois alelos Secretor e de um não Secretor. Esta mesma análise a partir do DNA genômico do swab bucal revelou que o probando (13.1) é de fato não Secretor e sua irmã gêmea (13.2) é Secretor. Este último resultado é concordante com aqueles verificados tanto nas fenotipagens eritrocitária e salivar do sistema Lewis.

O sequenciamento das regiões do gene *FUT2* demonstrou a presença de um alelo não previamente relatado, mas não registrado nas bases de dados. Este alelo foi depositado no GenBank com número de acesso KX550421 e nomeado como FUT2 375G, 1009G (*SE\*01.06.03*).

A duas mutações presentes neste alelo foram relatadas por Koda et al em um estudo de filogenia em africanos.<sup>21</sup> O SNP da posição 375A>G foi encontrado pela primeira vez na população Africana em 1998 (alelo *Se*<sup>375</sup>), com uma frequência de 0,015<sup>22</sup> e posteriormente na população de Nova Guiné, com frequência de 0,37. O nucleotídeo G na posição 1009, que ocorre com frequência de 33% na população em geral e em até 55% dos africanos, está associado ao SNP 1011C na região 3'UTR, formando um haplótipo. Contudo, todos os outros alelos *FUT2* descritos, exceto o *se*<sup>428</sup>, possuem os nucleotídeos A e T nas posições 1009 e 1011, respectivamente.

O alelo *SE\*01.06.03* encontrado na irmã gêmea (13.2) e em seu pai (13.3) possui a mesma sequência daquele relatado por Koda e colaboradores<sup>21</sup> em um africano, no alelo *Se*<sup>375</sup> com o SNP 1009G. Em outro estudo, Koda e colaboradores sugere que o SNP *Se*<sup>375</sup> é ancestral e reflete a migração dos

primeiros humanos da África para a Nova Guiné.<sup>23</sup> Diante deste quadro, supomos que mutação 1009G surgiu pontualmente neste caso, pois este é o primeiro relato que descreve o SNP 1009G sem alteração na posição 1011 em um indivíduo Brasileiro de etnia mista, com ascendência caucasiana e ameríndia. Pelo conhecimento dos autores este é o primeiro relato de quimerismo duplo com a presença de quatro alelos do gene ABO e três alelos do gene *FUT2*, ambos com os alelos funcionais e não funcionais em heterozigose no tecido hematopoiético. A figura 2 mostra o heredograma da família investigada.



**Figura 2.** Heredograma familiar com caso de quimerismo e descrição de alelos ABO e FUT2

## Conclusão

Este estudo esclareceu um caso de quimerismo hematopoiético permanente entre gêmeos com o uso de uma técnica diferenciada de separação de células em campo misto combinada a métodos sorológicos e moleculares.

**Referências:**

1. Daniels G. Human blood groups: Introduction. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2013.
2. Storry JR, Condon J, Hult AK, Harrison A, Jørgensen R, Olsson ML. An age-dependent ABO discrepancy between mother and baby reveals a novel A(weak) allele. *Transfusion*. 2015;55(2):422-426.
3. Bluth MH, Reid ME, Manny N. Chimerism in the immunohematology laboratory in the molecular biology era. *Transfus Med Rev*. 2007;21(2):134-146.
4. Drexler C, Wagner T. Blood group chimerism. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(6):484-489.
5. Cho D, Lee JS, Yazer MH, et al. Chimerism and mosaicism are important causes of ABO phenotype and genotype discrepancies. *Immunohematology*. 2006;22(4):183-187.
6. Abuelo D. Clinical significance of chimerism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2009;151C(2):148-151.
7. Pruss A, Heymann GA, Hell A, et al. Acute intravascular hemolysis after transfusion of a chimeric RBC unit. *Transfusion*. 2003;43(10):1449-1451.
8. Lee OJ, Cho D, Shin MG, et al. The first known case of blood group chimerism in monozygotic dizygotic twins in Korea. *Ann Lab Med*. 2014;34(3):259-262.
9. Chen K, Chmait RH, Vanderbilt D, Wu S, Randolph L. Chimerism in monozygotic dizygotic twins: case study and review. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(7):1817-1824.

10. Rodriguez-Buritica D, Rojnueangnit K, Messiaen LM, Mikhail FM, Robin NH. Sex-discordant monozygotic twins with blood and tissue chimerism. *Am J Med Genet A*. 2015;167A(4):872-877.
11. Brecher ME. Technical manual, AABB: Bethesda, Maryland; 2005.
12. Mattos LC, Sanchez F, Cintra JR, Quartos ABCF, Bonini-Domingos CR, Moreira HW. Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. *Rev Bras Hematol Hemoter*. Vol. 23; 2001:15-22.
13. Svensson L, Bindila L, Angström J, et al. The structural basis of blood group A-related glycolipids in an A3 red cell phenotype and a potential explanation to a serological phenomenon. *Glycobiology*. 2011;21(2):162-174.
14. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W71-74.
15. Storry JR, Olsson ML. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology*. 2009;25(2):48-59.
16. Patnaik SK, Helmberg W, Blumenfeld OO. BGMUT: NCBI dbRBC database of allelic variations of genes encoding antigens of blood group systems. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D1023-1029.
17. Zhang A, Chi Q, Ren B. Genomic analysis of para-Bombay individuals in south-eastern China: the possibility of linkage and disequilibrium between FUT1 and FUT2. *Blood Transfus*. 2015;13(3):472-477.

18. Henry SM. Review: phenotyping for Lewis and secretor histo-blood group antigens. *Immunohematology*. 1996;12(2):51-61.
19. Endler G, Greinix H, Winkler K, Mitterbauer G, Mannhalter C. Genetic fingerprinting in mouthwashes of patients after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999;24(1):95-98.
20. Thiede C, Prange-Krex G, Freiberg-Richter J, Bornhäuser M, Ehninger G. Buccal swabs but not mouthwash samples can be used to obtain pretransplant DNA fingerprints from recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(5):575-577.
21. Koda Y, Tachida H, Pang H, et al. Contrasting patterns of polymorphisms at the ABO-secretor gene (FUT2) and plasma alpha(1,3)fucosyltransferase gene (FUT6) in human populations. *Genetics*. 2001;158(2):747-756.
22. Liu Y, Koda Y, Soejima M, et al. Extensive polymorphism of the FUT2 gene in an African (Xhosa) population of South Africa. *Hum Genet*. 1998;103(2):204-210.
23. Koda Y, Ishida T, Tachida H, et al. DNA sequence variation of the human ABO-secretor locus ( FUT2) in New Guinean populations: possible early human migration from Africa. *Hum Genet*. 2003;113(6):534-541.

### **3. CONCLUSÕES**

---

### 3.1 Conclusões Gerais

As análises dos casos com discrepâncias estudados indicaram que antígenos do sistema histo-sanguíneo ABO apresentam melhor reatividade em técnicas adaptadas, tanto na prova direta quanto na reversa, porém concluímos desnecessário o uso de métodos de reforço na prova reversa, por não acrescentarem resultados confiáveis ou que contribuam com a identificação do antígeno.

Os resultados deste estudo demonstram que testes sorológicos apresentam limitações e nem sempre são conclusivos na resolução de discrepâncias entre fenotipagens direta e reversa, indicando que análises moleculares (PCR-RFLP, sequenciamento) são importantes para adequada identificação e classificação dos alelos dos genes *ABO* e *FUT2*.

As investigações de tecido do epitélio bucal e secreções salivares demonstraram ser fundamentais no esclarecimento de um caso com reatividade em campo misto. No entanto, foi constatada contaminação da saliva por células do tecido hematopoiético, demonstrando que este não é um bom material para os testes moleculares em casos de quimerismos hematopoiéticos.

## **4. REFERÊNCIAS**

---

1. Lefrère JJ, Berche P. [Karl Landsteiner discovers the blood groups]. *Transfus Clin Biol.* 2010;17(1):1-8.
2. Figl M, Pelinka LE. Karl Landsteiner, the discoverer of blood groups. *Resuscitation.* 2004;63(3):251-4.
3. Castilho L, Pellegrino Junior J, Reid ME. *Fundamentos de Imuno-hematologia.* Atheneu; 2015.
4. Klein H, Anstee DJ. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine.* Oxford: Blackwell Science; 2005.
5. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med.* 2001;11(4):243-65.
6. Branch DR. Anti-A and anti-B: what are they and where do they come from? *Transfusion.* 2015;55 Suppl 2:S74-9.
7. Daniels G. *Human blood groups: Introduction.* Oxford, UK: Wiley-Blackwell2013.
8. Decastello A. Über die Iso-agglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. *Munch med Wchnschr.* 1902;49:1090-5.
9. Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Klin Wochenschr;* 1901.
10. Giangrande PL. The history of blood transfusion. *Br J Haematol.* 2000;110(4):758-67.

11. Boulton F, Roberts DJ. Blood transfusion at the time of the First World War--practice and promise at the birth of transfusion medicine. *Transfus Med.* 2014;24(6):325-34.
12. Moore S, Chirnside A, Micklem LR, McClelland DB, James K. A mouse monoclonal antibody with anti-A,(B) specificity which agglutinates Ax cells. *Vox Sang.* 1984;47(6):427-34.
13. Springer GF, Tegtmeyer H. Apparent violation of "Landsteiner's law". *Klin Wochenschr.* 1974;52(6):295-7.
14. Bugert P, Klüter H. 100 Years after von Dungern & Hirschfeld: Kinship Investigation from Blood Groups to SNPs. *Transfus Med Hemother.* 2012;39(3):161-2.
15. Schwarz HP, Dorner F. Karl Landsteiner and his major contributions to haematology. *Br J Haematol.* 2003;121(4):556-65.
16. Yamamoto F. Review: ABO blood group system--ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematology.* 2004;20(1):3-22.
17. Bernstein F. Ergebnisse einer biostatistischen zusammenfassenden Betrachtung über die erblichen Blutstrukturen des Menschen: *Klin Wschr*, 1924. 1495–7 p.
18. Gottlieb AM. Karl Landsteiner, the melancholy genius: his time and his colleagues, 1868-1943. *Transfus Med Rev.* 1998;12(1):18-27.

19. Thomsen O, Friedenreich V, Worsaae E. - Über Die MÖGlichkeit Der Existenz Zweier Neuer Blutgruppen; Auch Ein Beitrag Zur Beleuchtung Sogenannter Untergruppen.
20. Yamamoto F. Cloning and regulation of the ABO genes. *Transfus Med.* 2001;11(4):281-94.
21. Olsson ML, Chester MA. Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfus Med.* 2001;11(4):295-313.
22. Clausen H, Hakomori S. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang.* 1989;56(1):1-20.
23. Yamamoto F, Cid E, Yamamoto M, Blancher A. ABO research in the modern era of genomics. *Transfus Med Rev.* 2012;26(2):103-18.
24. Patnaik SK, Helmberg W, Blumenfeld OO. BGMUT: NCBI dbRBC database of allelic variations of genes encoding antigens of blood group systems. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D1023-9.
25. Reid ME. The ISBT 700 series of low-incidence and 901 series of high-incidence blood group antigens. *Immunohematology.* 2011;27(4):131-5.
26. de Mattos LC. Genetic diversity of the human blood group systems. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;35(6):383-4.

27. Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, Blasczyk R. The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood*. 2003;102(8):3035-42.
28. Mielke JH, Konigsberg LW, Relethford JH. *Human Biological Variation*. Oxford University Press, New York, NY, USA2010.
29. Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood*. 2010;115(23):4635-43.
30. Brecher ME. *Technical manual*, AABB: Bethesda, Maryland; 2005.
31. Cai X, Jin S, Liu X, Fan L, Lu Q, Wang J, et al. Molecular genetic analysis of ABO blood group variations reveals 29 novel ABO subgroup alleles. *Transfusion*. 2013;53(11 Suppl 2):2910-6.
32. Hosseini-Maaf B, Irshaid NM, Hellberg A, Wagner T, Levene C, Hustinx H, et al. New and unusual O alleles at the ABO locus are implicated in unexpected blood group phenotypes. *Transfusion*. 2005;45(1):70-81.
33. Fernandez-Mateos P, Cailleau A, Henry S, Costache M, Elmgren A, Svensson L, et al. Point mutations and deletion responsible for the Bombay H null and the Reunion H weak blood groups. *Vox Sang*. 1998;75(1):37-46.
34. Zhang JP, Zheng Y, Sun DN. [Formation of para-Bombay phenotype caused by homozygous or heterozygous mutation of FUT1 gene]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014;22(1):195-8.

35. Reid ME L-FC, Olsson ML. The Blood Group Antigen FactsBook.: London: Academia de Imprensa; 2012.
36. Daniels G, Reid ME. Blood groups: the past 50 years. *Transfusion*. 2010;50(2):281-9.
37. Harmening DM. Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4a ed. Revinter Ltda. 2006.
38. Bennett EP, Steffensen R, Clausen H, Weghuis DO, Geurts van Kessel A. Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;211(1):347.
39. Myers R, Sutton G, Eicher E. Genome Reference Consortium 2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/issues/>.
40. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, Clément M, et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*. 2001;83(7):565-73.
41. Schenkel-Brunner H. [Biochemical basis of the ABO system subgroups]. *Wien Klin Wochenschr*. 2001;113(20-21):787-98.
42. Storry JR, Olsson ML. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology*. 2009;25(2):48-59.

43. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D233-8.
44. Stanley P. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(4).
45. Yamamoto F. Cloning the ABH genes. *Transfusion.* 1990;30(8):671-2.
46. Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, White T, Clausen H, Hakomori S. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1----2Gal alpha 1----3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J Biol Chem.* 1990;265(2):1146-51.
47. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature.* 1990;345(6272):229-33.
48. Ferguson-Smith MA, Aitken DA, Turleau C, de Grouchy J. Localisation of the human ABO: Np-1: AK-1 linkage group by regional assignment of AK-1 to 9q34. *Hum Genet.* 1976;34(1):35-43.
49. Watkins WM. Biochemistry and Genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Adv Hum Genet.* 1980;10:1-136, 379-85.
50. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest.* 2008;55(3-4):174-82.

51. Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel WA, Garratty G, Francis CL, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Berlin report. *Vox Sang.* 2011;101(1):77-82.
52. Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Moulds MK, Sareneva H, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood.* 2001;98(5):1585-93.
53. Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, Henry S, Jørgensen J, Judd WJ, et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang.* 2004;87(4):304-16.
54. Daniels G, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, Lomas-Francis C, et al. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens: Cape Town report. *Vox Sang.* 2007;92(3):250-3.
55. ISBT: International Society of Blood Transfusion. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology [Table of blood group antigens v4.0 141124]. Available from: <http://www.isbtweb.org/nc/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>.

56. Storry JR, Condon J, Hult AK, Harrison A, Jørgensen R, Olsson ML. An age-dependent ABO discrepancy between mother and baby reveals a novel A(weak) allele. *Transfusion*. 2015;55(2):422-6.
57. Corvelo TC, Schneider H, Harada ML. ABO blood groups in the primate species of Cebidae from the Amazon region. *J Med Primatol*. 2002;31(3):136-41.
58. Chester MA, Olsson ML. The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev*. 2001;15(3):177-200.
59. Yamamoto F, McNeill PD, Hakomori S. Human histo-blood group A2 transferase coded by A2 allele, one of the A subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187(1):366-74.
60. Blumenfeld OO, Patnaik SK. Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database. *Hum Mutat*. 2004;23(1):8-16.
61. Economidou J, Hughes-Jones NC, Gardner B. Quantitative measurements concerning A and B antigen sites. *Vox Sang*. 1967;12(5):321-8.
62. Svensson L, Rydberg L, de Mattos LC, Henry SM. Blood group A(1) and A(2) revisited: an immunochemical analysis. *Vox Sang*. 2009;96(1):56-61.

63. Schachter H, Michaels MA, Tilley CA, Crookston MC, Crookston JH. Qualitative differences in the N-acetyl-D-galactosaminyltransferases produced by human A1 and A2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(1):220-4.
64. Topping MD, Watkins WM. Isoelectric points of the human blood group A-1, A-2 and B gene-associated glycosyltransferases in ovarian cyst fluids and serum. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975;64(1):89-96.
65. Hult AK, Yazer MH, Jørgensen R, Hellberg A, Hustinx H, Peyrard T, et al. Weak A phenotypes associated with novel ABO alleles carrying the A2-related 1061C deletion and various missense substitutions. *Transfusion*. 2010;50(7):1471-86.
66. Clausen H, Lavery SB, Nudelman E, Tsuchiya S, Hakomori S. Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A1-specific monoclonal antibody TH-1: chemical basis of qualitative A1 and A2 distinction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(4):1199-203.
67. Clausen H, Lavery SB, Kannagi R, Hakomori S. Novel blood group H glycolipid antigens exclusively expressed in blood group A and AB erythrocytes (type 3 chain H). I. Isolation and chemical characterization. *J Biol Chem*. 1986;261(3):1380-7.
68. Kościelak J. The hypothesis on function of glycosphingolipids and ABO blood groups revisited. *Neurochem Res*. 2012;37(6):1170-84.

- 
69. Furukawa K, Mattes MJ, Lloyd KO. A1 and A2 erythrocytes can be distinguished by reagents that do not detect structural differences between the two cell types. *J Immunol.* 1985;135(6):4090-4.
  70. Patenaude SI, Seto NO, Borisova SN, Szpacenko A, Marcus SL, Palcic MM, et al. The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat Struct Biol.* 2002;9(9):685-90.
  71. Roubinet F, Kermarrec N, Despiau S, Apoil PA, Dugoujon JM, Blancher A. Molecular polymorphism of O alleles in five populations of different ethnic origins. *Immunogenetics.* 2001;53(2):95-104.
  72. Olsson ML, Chester MA. Frequent occurrence of a variant O1 gene at the blood group ABO locus. *Vox Sang.* 1996;70(1):26-30.
  73. Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Bromilow IM, Duguid JK. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. Another type of O allele. *Vox Sang.* 1993;64(3):175-8.
  74. Amado M, Bennett EP, Carneiro F, Clausen H. Characterization of the histo-blood group O(2) gene and its protein product. *Vox Sang.* 2000;79(4):219-26.
  75. Lee HJ, Barry CH, Borisova SN, Seto NO, Zheng RB, Blancher A, et al. Structural basis for the inactivity of human blood group O2 glycosyltransferase. *J Biol Chem.* 2005;280(1):525-9.

76. Seltsam A, Das Gupta C, Wagner FF, Blasczyk R. Nondeletional ABO\*O alleles express weak blood group A phenotypes. *Transfusion*. 2005;45(3):359-65.
77. Yazer MH, Hult AK, Hellberg A, Hosseini-Maaf B, Palcic MM, Olsson ML. Investigation into A antigen expression on O2 heterozygous group O-labeled red blood cell units. *Transfusion*. 2008;48(8):1650-7.
78. Wagner FF, Blasczyk R, Seltsam A. Nondeletional ABO\*O alleles frequently cause blood donor typing problems. *Transfusion*. 2005;45(8):1331-4.
79. Yazer MH, Olsson ML. The O2 allele: questioning the phenotypic definition of an ABO allele. *Immunohematology*. 2008;24(4):138-47.
80. Olsson ML, Chester MA. Evidence for a new type of O allele at the ABO locus, due to a combination of the A2 nucleotide deletion and the Ael nucleotide insertion. *Vox Sang*. 1996;71(2):113-7.
81. Seltsam A, Grüger D, Just B, Figueiredo C, Gupta CD, Deluca DS, et al. Aberrant intracellular trafficking of a variant B glycosyltransferase. *Transfusion*. 2008;48(9):1898-905.
82. Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, Saitou N, Bannai M, Nakata K, et al. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood*. 1996;88(7):2732-7.

83. Svensson L, Bindila L, Angström J, Samuelsson BE, Breimer ME, Rydberg L, et al. The structural basis of blood group A-related glycolipids in an A3 red cell phenotype and a potential explanation to a serological phenomenon. *Glycobiology*. 2011;21(2):162-74.
84. Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T, Judd WJ, et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 1. Weak subgroups: A3 and B3 alleles. *Vox Sang*. 1993;64(2):116-9.
85. Barjas-Castro ML, Carvalho MH, Locatelli MF, Bordin S, Saad ST. Molecular heterogeneity of the A3 subgroup. *Clin Lab Haematol*. 2000;22(2):73-8.
86. Hult AK, Olsson ML. Many genetically defined ABO subgroups exhibit characteristic flow cytometric patterns. *Transfusion*. 2010;50(2):308-23.
87. Bianco T, Farmer BJ, Sage RE, Dobrovic A. Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *Blood*. 2001;97(11):3633-9.
88. Bianco-Miotto T, Hussey DJ, Day TK, O'Keefe DS, Dobrovic A. DNA methylation of the ABO promoter underlies loss of ABO allelic expression in a significant proportion of leukemic patients. *PLoS One*. 2009;4(3):e4788.
89. Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3. A(X) and B(A) alleles. *Vox Sang*. 1993;64(3):171-4.

90. Olsson ML, Chester MA. Heterogeneity of the blood group Ax allele: genetic recombination of common alleles can result in the Ax phenotype. *Transfus Med.* 1998;8(3):231-8.
91. WIENER AS. The blood factor C of the A-B-O system, with special reference to the rare blood group C. *Ann Eugen.* 1953;18(1):1-8.
92. Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, Burkhart J, Blasczyk R. Systematic analysis of the ABO gene diversity within exons 6 and 7 by PCR screening reveals new ABO alleles. *Transfusion.* 2003;43(4):428-39.
93. Roubinet F, Janvier D, Blancher A. A novel cis AB allele derived from a B allele through a single point mutation. *Transfusion.* 2002;42(2):239-46.
94. Chen DP, Tseng CP, Wang WT, Wang MC, Tsao KC, Wu TL, et al. A novel cis-AB allele derived from the A transferase gene by nucleotide substitution C796A. *Ann Clin Lab Sci.* 2004;34(4):437-42.
95. Yazer MH, Olsson ML, Palcic MM. The cis-AB blood group phenotype: fundamental lessons in glycobiology. *Transfus Med Rev.* 2006;20(3):207-17.
96. Nishida C, Tomita T, Nishiyama M, Suzuki R, Hara M, Itoh Y, et al. B-transferase with a Pro234Ser substitution acquires AB-transferase activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(8):1570-5.

97. Seyfried H, Walewska I, Werblinska B. Unusual inheritance of ABO group in a family with weak B antigens. *Vox Sang.* 1964;9:268-77.
98. Yamamoto F, McNeill PD, Kominato Y, Yamamoto M, Hakomori S, Ishimoto S, et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 2. cis-AB alleles. *Vox Sang.* 1993;64(2):120-3.
99. Cho D, Shin MG, Yazer MH, Kee SJ, Shin JH, Suh SP, et al. The genetic and phenotypic basis of blood group A subtypes in Koreans. *Transfus Med.* 2005;15(4):329-34.
100. Haslam DB, Baenziger JU. Expression cloning of Forssman glycolipid synthetase: a novel member of the histo-blood group ABO gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):10697-702.
101. Yu LC, Lee HL, Chan YS, Lin M. The molecular basis for the B(A) allele: an amino acid alteration in the human histoblood group B alpha-(1,3)-galactosyltransferase increases its intrinsic alpha-(1,3)-N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;262(2):487-93.
102. Goldstein J, Lenny L, Davies D, Voak D. Further evidence for the presence of A antigen on group B erythrocytes through the use of specific exoglycosidases. *Vox Sang.* 1989;57(2):142-6.
103. Voak D, Sonneborn H, Yates A. The A1 (B) phenomenon: a monoclonal anti-B (BS-85) demonstrates low levels of B determinants on A1 red cells. *Transfus Med.* 1992;2(2):119-27.

104. Yamamoto F. Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. *Vox Sang.* 1995;69(1):1-7.
105. Anstee DJ, Parsons SF, Mallinson G, Spring FA, Judson PA, Smythe J. Characterization of monoclonal antibodies against erythrocyte sialoglycoproteins by serological analysis, immunoblotting and flow cytometry. *Rev Fr Transfus Immunohematol.* 1988;31(2):317-32.
106. Race C, Watkins WM. The action of the blood group B gene-specified - galactosyltransferase from human serum and stomach mucosal extracts on group O and 'Bombay' O h erythrocytes. *Vox Sang.* 1972;23(5):385-401.
107. Pruss A, Heymann GA, Hell A, Kalus UJ, Krausch D, Dörner T, et al. Acute intravascular hemolysis after transfusion of a chimeric RBC unit. *Transfusion.* 2003;43(10):1449-51.
108. SCHMIDT PJ, NANCARROW JF, MORRISON EG, CHASE C. A hemolytic reaction due to the transfusion of Ax blood. *J Lab Clin Med.* 1959;54(1):38-41.
109. Franchini M, Liumbruno GM. ABO blood group: old dogma, new perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(8):1545-53.
110. Chen K, Chmait RH, Vanderbilt D, Wu S, Randolph L. Chimerism in monozygotic dizygotic twins: case study and review. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(7):1817-24.

- 
111. Goebel M, Halm-Heinrich I, Parkner A, Rink G, Heim MU, Bugert P. A Novel ABO Gene Variant Leads to Discrepant Results in Forward/Reverse and Molecular Blood Grouping. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(6):454-8.
  112. Oriol R, Candelier JJ, Mollicone R. Molecular genetics of H. *Vox Sang*. 2000;78 Suppl 2:105-8.
  113. Storry JR, Johannesson JS, Poole J, Strindberg J, Rodrigues MJ, Yahalom V, et al. Identification of six new alleles at the FUT1 and FUT2 loci in ethnically diverse individuals with Bombay and Para-Bombay phenotypes. *Transfusion*. 2006;46(12):2149-55.
  114. Salmon C, Cartron JP, Rouger P, Liberge G, Juszcak G, Mulet C, et al. H deficient phenotypes: A proposed practical classification Bombay Ah, Hz, Hm. *Rev Fr Transfus*. 1980;23(3):233-48.
  115. Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Rodrigues MJ, Chester MA, Olsson ML. ABO exon and intron analysis in individuals with the AweakB phenotype reveals a novel O1v-A2 hybrid allele that causes four missense mutations in the A transferase. *BMC Genet*. 2003;4:17.
  116. Salmon C, Cartron JP. [Allelic enhancement]. *Rev Fr Transfus Immunohematol*. 1976;19(1):145-55.
  117. Hassinen A, Rivinoja A, Kauppila A, Kellokumpu S. Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17771-7.

118. Seko A, Yamashita K. Characterization of a novel galactose beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta3Gn-T8): the complex formation of beta3Gn-T2 and beta3Gn-T8 enhances enzymatic activity. *Glycobiology*. 2005;15(10):943-51.
119. Olsson ML, Michalewska B, Hellberg A, Walaszczyk A, Chester MA. A clue to the basis of allelic enhancement: occurrence of the Ax subgroup in the offspring of blood group O parents. *Transfus Med*. 2005;15(5):435-42.
120. Yamamoto F, Cid E, Yamamoto M, Saitou N, Bertranpetit J, Blancher A. An integrative evolution theory of histo-blood group ABO and related genes. *Sci Rep*. 2014;4:6601.
121. Sano R, Nakajima T, Takahashi K, Kubo R, Kominato Y, Tsukada J, et al. Expression of ABO blood-group genes is dependent upon an erythroid cell-specific regulatory element that is deleted in persons with the B(m) phenotype. *Blood*. 2012;119(22):5301-10.
122. Nakajima T, Sano R, Takahashi Y, Watanabe K, Kubo R, Kobayashi M, et al. ABO alleles are linked with haplotypes of an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 with a few exceptions attributable to genetic recombination. *Vox Sang*. 2015.
123. SPRINGER GF, HORTON RE, FORBES M. [Origin of anti-human blood group B agglutinins in white Leghorn chicks]. *J Exp Med*. 1959;110(2):221-44.

124. Springer GF, Horton RE. Blood group isoantibody stimulation in man by feeding blood group-active bacteria. *J Clin Invest.* 1969;48(7):1280-91.
125. Cooling L, Hoffmann S, Herrst M, Muck C, Armelagos H, Davenport R. A prospective randomized trial of two popular mononuclear cell collection sets for autologous peripheral blood stem cell collection in multiple myeloma. *Transfusion.* 2010;50(1):100-19.
126. Daniel-Johnson J, Leitman S, Klein H, Alter H, Lee-Stroka A, Scheinberg P, et al. Probiotic-associated high-titer anti-B in a group A platelet donor as a cause of severe hemolytic transfusion reactions. *Transfusion.* 2009;49(9):1845-9.
127. Arend P. Ancestral gene and "complementary" antibody dominate early ontogeny. *Immunobiology.* 2013;218(5):755-61.
128. Merbl Y, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Cohen IR. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest.* 2007;117(3):712-8.
129. Wuttke NJ, Macardle PJ, Zola H. Blood group antibodies are made by CD5+ and by CD5- B cells. *Immunol Cell Biol.* 1997;75(5):478-83.
130. Cho D, Lee JS, Park JY, Jeon MJ, Song JW, Kim SH, et al. [Resolution of ABO Discrepancies by ABO Genotyping.]. *Korean J Lab Med.* 2006;26(2):107-13.

131. Bluth MH, Reid ME, Manny N. Chimerism in the immunohematology laboratory in the molecular biology era. *Transfus Med Rev.* 2007;21(2):134-46.
132. Drexler C, Wagner T. Blood group chimerism. *Curr Opin Hematol.* 2006;13(6):484-9.
133. Mifsud NA, Haddad AP, Hart CF, Holdsworth R, Condon JA, Swain M, et al. Serologic and molecular investigations of a chimera. *Immunohematology.* 1999;15(3):100-4.
134. Maloney S, Smith A, Furst DE, Myerson D, Rupert K, Evans PC, et al. Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *J Clin Invest.* 1999;104(1):41-7.
135. Rinkevich B. Human natural chimerism: an acquired character or a vestige of evolution? *Hum Immunol.* 2001;62(6):651-7.
136. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7(9):473-85.
137. Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood.* 1999;93(6):2033-7.

138. Aractingi S, Uzan S, Dausset J, Carosella ED. Microchimerism in human diseases. *Immunol Today*. 2000;21(3):116-8.
139. Tafuri A, Alferink J, Möller P, Hämmerling GJ, Arnold B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science*. 1995;270(5236):630-3.
140. Boyon C, Collinet P, Boulanger L, Rubod C, Lucot JP, Vinatier D. Fetal microchimerism: benevolence or malevolence for the mother? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;158(2):148-52.
141. Chiaroni J, Legrand D, Dettori I, Ferrera V. Analysis of ABO discrepancies occurring in 35 French hospitals. *Transfusion*. 2004;44(6):860-4.
142. Ahrens N, Pruss A, Kiesewetter H, Salama A. Failure of bedside ABO testing is still the most common cause of incorrect blood transfusion in the Barcode era. *Transfus Apher Sci*. 2005;33(1):25-9.
143. Aki K, Izumi A, Hosoi E. The evaluation of histo-blood group ABO typing by flow cytometric and PCR-amplification of specific alleles analyses and their application in clinical laboratories. *J Med Invest*. 2012;59(1-2):143-51.
144. Denomme GA. Prospects for the provision of genotyped blood for transfusion. *Br J Haematol*. 2013;163(1):3-9.

145. Chiaroni J, Lauroua P, Roubinet F, Mannessier L. [Problem-solving in immunohematology: interpretation of ABO typing and its difficulties]. *Transfus Clin Biol.* 2000;7(1):84-95.
146. Mattos LC, Sanchez F, Cintra JR, Quartos ABCF, Bonini-Domingos CR, Moreira HW. Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2001:15-22.
147. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W71-4.
148. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. . *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999. p. 95-8.
149. Svensson L, Petersson A, Henry SM. Secretor genotyping for A385T, G428A, C571T, C628T, 685delTGG, G849A, and other mutations from a single PCR. *Transfusion.* 2000;40(7):856-60.
150. Daniels G, Imelda B. *Essential Guide to Blood Groups.* First ed. 2007: Blackwell Publishing Ltd. Oxford(UK) 2007;100.

## **5. APÊNDICES**

---

## Apêndice 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**(Conselho Nacional de Saúde - Resolução CNS 196/96)**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa denominada **Investigação sorológica e molecular das variações na expressão dos antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos humanos**, avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto. Sistemas de grupos sanguíneos humanos são características genéticas que produzem variações nas moléculas (antígenos) presentes na membrana dos eritrócitos (glóbulos vermelhos do sangue).

Esta pesquisa tem como objetivos identificar os fatores que interferem na identificação dos tipos sanguíneos ABO (A, B, AB e O). Os resultados desta pesquisa poderão ajudar na compreensão dos fatores que dificultam a correta identificação dos tipos sanguíneos de algumas pessoas que possuem tipos sanguíneos ABO raros (receptores e doadores de sangue) e ainda auxiliar os hemocentros, os bancos de sangue e os laboratórios clínicos a classificarem corretamente o sangue destas pessoas para efeito de transfusão e doação.

A sua participação nessa pesquisa é voluntária e de extrema importância e você não perderá os benefícios do atendimento médico aos quais tem direito, caso decida não participar ou mesmo se você se retirar dessa pesquisa a qualquer tempo. Você poderá ter acesso a todos os seus dados coletados para esta pesquisa bem como aos resultados de todos os exames realizados nas amostras de seu sangue e terá também o direito de retirar a amostra ou quaisquer de seus dados de nosso banco de armazenamento de dados no momento em que você desejar. Em hipótese alguma, seus dados serão divulgados de forma individual.

Para participar como voluntário nessa pesquisa será necessário você nos autorizar a colher duas amostras de seu sangue para a realização dos exames de tipagem sanguínea. A coleta de sangue é realizada com a introdução de uma agulha estéril na veia e de acordo com a sua sensibilidade, você poderá sentir uma leve ardência no local. O risco da coleta de sangue poderá incluir vermelhidão e raramente deixa o local de introdução da agulha inchado e com manchas roxas. O seu sangue será utilizado apenas para análises científicas e será estocado em um banco de amostras do Laboratório de Imunogenética, podendo ser utilizado para novas pesquisas, dentro de no máximo cinco anos. Quaisquer análises adicionais a serem realizadas em sua amostra de sangue deverão obrigatoriamente estar vinculadas ao presente projeto. Você deve saber que não haverá riscos de qualquer tipo de contaminação durante a coleta de seu sangue, pois o material utilizado será individual e não contaminado. Esse material é totalmente estéril (seringa, agulha, algodão com álcool) e único para cada pessoa. Após a coleta de seu sangue, as agulhas, seringas e algodão utilizados serão colocados em saco de lixo e descartados em local seguro. Esses procedimentos serão realizados por profissionais com experiência.

Se for seu desejo, você será informada (o) de todos os resultados dos exames que serão realizados em seu sangue e eles serão mantidos em absoluto sigilo. Se essa pesquisa for encerrada antes do período previsto, você também será informada. Caso ocorram danos de qualquer natureza durante a coleta de sua amostra de sangue, você receberá toda assistência médica gratuitamente.

Se você tiver qualquer dúvida sobre essa pesquisa ou mesmo sobre lesões relacionadas à coleta de sangue, entre em contato com o Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos pelo telefone ou pelo endereço abaixo indicados. Caso você tenha qualquer dúvida sobre seus direitos como sujeito de pesquisa, você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo telefone (17) 3201-5813. Você receberá uma cópia deste formulário de consentimento livre e esclarecido assinado e datado.

**Declaração do sujeito da pesquisa**

Eu voluntariamente aceito participar da pesquisa **“Investigação sorológica e molecular das variações na expressão dos antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos humanos”**. Autorizo a estocagem da amostra de meu sangue no banco de amostras do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e sua utilização para novas pesquisas vinculada a este projeto, desde que seja mantido o sigilo absoluto das informações por mim prestadas. Li e compreendi essa declaração de consentimento livre e esclarecido e os riscos descritos. Entendo que posso retirar meu consentimento ou retirar-me dessa pesquisa a qualquer momento, sem perder nenhum benefício aos quais tenho direito.

(  ) Desejo saber os resultados de meus exames    (  ) Não desejo saber os resultados de meus exames

....., ..... de ..... de .....

----- ----	----- ----
Responsável pela discussão do consentimento livre e esclarecido	Assinatura do sujeito da pesquisa ou seu representante legal

---

Pesquisador responsável  
 Endereço para contato:  
 Laboratório de Imunogenética  
 Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de S J do Rio Preto  
 Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416  
 São José do Rio Preto - 15090-000  
 Fones: (17) 3201-5854 (Faculdade)

## Apêndice 2. Ficha de dados clínicos e familiar

### 2 FORMULÁRIO DE INVESTIGAÇÃO DO SISTEMA HISTO-SANGUÍNEO ABO



#### **DADOS E QUESTÕES NECESSÁRIAS PARA RESOLUÇÃO DE DISCREPÂNCIA ABO**

Nome:

Data de Nascimento:

Identificação numérica:

Local de origem (Instituição):

*Descrição do caso, incluir:* informações clínicas disponíveis (idade, sexo, etnia, história transfusional, diagnóstico, medicamentos usados, etc.), além dos resultados obtidos nos testes realizados no laboratório do respectivo serviço.

---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---

#### **Dados adicionais:**

1. Possui irmãos? Quantos?
2. Possui irmão(s) gêmeo(s)?
3. Qual o grupo sanguíneo dos pais e dos irmãos?
4. Fica doente com frequência?
5. Faz uso de medicamentos, quais?
6. Fez cirurgias, transplantes?
7. Fez tratamento para alguma doença?
8. Qual a profissão?

**Obs.:** O estudo familiar pode estabelecer um padrão de herança e o background genético. Portanto é importante amostras de ascendentes e descendentes, sempre que possível.

### Apêndice 3. Protocolos de coleta, armazenamento e transporte de amostra de sangue periférico

#### 1 FORMULÁRIO DE INVESTIGAÇÃO DO SISTEMA HISTO-SANGUÍNEO ABO



##### ROTEIRO:

Para encaminhamento de amostras de sangue ao Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, providenciar:

1) Preencher os dados e as questões relacionados ao Doador/Paciente e familiares. Providenciar o termo de consentimento livre e esclarecido dos participantes.

2) Para a coleta das amostras de sangue, não é necessário nenhum preparo prévio do doador ou paciente:

- ✓ Preferencialmente, enviar amostras recentemente colhidas.
- ✓ As amostras devem estar claramente identificadas com nome, número de prontuário ou número de identificação do paciente.

**MATERIAL / AMOSTRAS:** Investigações de discrepâncias ABO, não resolvida sorologicamente.

- ✓ Sangue periférico ou concentrado de hemácias:

A fim de garantir que a quantidade de amostra será suficiente para a realização de todos os testes necessários, enviar no mínimo 10 mL (2-3 tubos) de sangue total colhido com anticoagulante EDTA.

**Não enviar concentrado de hemácias de bolsas filtradas.**

- ✓ Soro:

Separar o soro do coágulo e enviar apenas o soro, em torno de 5 mL.

- ✓ Saliva:

Solicitar protocolo se requerida a coleta

3) Transporte das amostras - Caixa de isopor com gelo reciclável.

- ✓ Os tubos devem estar bem tampados e não podem ficar em contato direto com o gelo.

**Encaminhar A/C de Marcos Miola ou Prof. Luiz C. de Mattos:**

Endereço:

Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 - CEP: 15090-000 – Vila São Pedro - São José do Rio Preto, SP.

Telefone: (17) 3201-5854 - Fax: (17) 3201-6201

E-mail: [luiz.demattos@famerp.br](mailto:luiz.demattos@famerp.br) / [mpmiola@gmail.com](mailto:mpmiola@gmail.com)

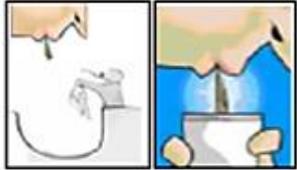
## Apêndice 4. Protocolos de coleta, armazenamento e transporte de amostras de saliva e swab

---

**PROTOCOLO PARA COLETA DE SALIVA E SWAB**

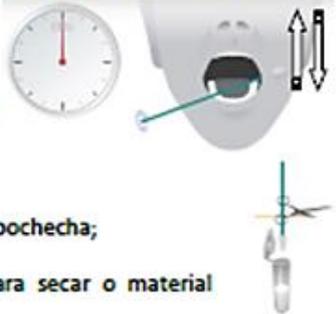
---

1. **Procedimento de preparo, salivação e coleta da saliva:**
  - 1.1. Lavar a boca (bochecho) com H<sub>2</sub>O destilada ou filtrada;
  - 1.2. Coletar a saliva (não o escarro) no pote coletor.  
Estimular a salivação natural e cuspir no pote (+/-4mL);
  - 1.3. Congelar (-20°C) e encaminhar no gelo seco.



---

2. **Coleta de com Swab de células da mucosa bucal (raspagem):**
  - 2.1. Esfregue um swab estéril na parte interna da bochecha por cerca de 60 segundos. Realize movimentos para cima, para baixo e circulares;
  - 2.2. Corte a haste do swab e coloque o material em um microtubo tipo eppendorf de 2ml, devidamente identificado;
  - 2.3. Colete dois swabs para cada indivíduo. Um para cada bochecha;
  - 2.4. Deixe os microtubos abertos por até uma hora para secar o material coletado.
  - 2.5. As amostras coletadas em swabs e secas podem ser transportadas em temperatura ambiente, refrigeradas ou até congeladas, sendo estáveis por até uma semana.



**Obs.:** É importante não comer ou beber nada além de água no período de uma hora antes da realização da coleta. Também não deve-se fumar. Teste de DNA podem ser dificultados se essas etapas não forem seguidas, porque o perfil do DNA pode ficar degradado.

---

**Encaminhar A/C de Marcos Miola ou Prof. Luiz C. de Mattos:**

Endereço: Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 - CEP: 15090-000 – Vila São Pedro - São José do Rio Preto, SP.

Telefone: (17) 3201-5854 - Fax: (17) 3201-6201 - E-mail: [luiz.demattos@famerp.br](mailto:luiz.demattos@famerp.br) / [mmiola@email.com](mailto:mmiola@email.com)

**Apêndice 5.** Resumo apresentado na forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2014, 6-9 de novembro de 2014, Florianópolis, SC, Brasil.

**838. TRANSFUSÃO DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS RH FENOTIPICAMENTE COMPATÍVEIS NÃO EXCLUI RISCO DE IMUNIZAÇÃO POR ANTI-F**

Miola MP<sup>a</sup>, Fernandes RG<sup>a</sup>, Fachini RM<sup>a,b</sup>, Júnior OR<sup>a,b</sup>, Mattos LC<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Hemocentro de São José do Rio Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil

<sup>b</sup> Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

**Introdução:** A identificação dos antígenos eritrocitários mais imunogênicos é recomendada para prevenção da aloimunização na politransfusão. Os antígenos **D, C, c, E e e** do sistema Rh são comumente fenotipados, pois induzem a produção de anticorpos de importância clínica. A identificação destes e outros aloanticorpos pode ser dificultada na presença de autoanticorpos anti-Rh. O antígeno **f(ce;ISBT RH6)** é expresso apenas a partir de haplótipos em que **c** e **e** estão ligados no mesmo gene **RHCE** em posição **cis** [**R<sup>1</sup>r(DCe/dce), R<sup>0</sup>R<sup>0</sup>(Dce/Dce)**etc], mas não em **trans** [**R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>(DCe/DcE)** etc]. É mais frequente em africanos(92%) que em caucasianos(65%) e asiáticos (12%). O anticorpo anti-f é clinicamente importante e pode ter implicações na doença hemolítica do recém-nascido e na reação transfusional tardia. **Relato do caso:** Paciente caucasiana, 74 anos, em tratamento de mielofibrose há cinco anos, com hipertensão arterial sistêmica. Refere dor epigástrica, com hiporexia e adinamia importante, hemoglobina de 6 g/dL. Solicitado duas unidades de concentrados de hemácias(CH) para transfusão. Registros dos últimos cinco anos mostraram teste de antiglobulina direta (TAD) e pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) negativos. Após três anos, apresentou PAI+ com anticorpo não determinado (AcND), TAD+ e eluato negativo. Na fenotipagem Rh (RH: 1, 2,\*3, 4, 5) foi observada dupla população de células em E\*, sendo considerado E negativo para transfusão. Nos últimos dois anos, recebeu 20 unidades de CH R<sup>1</sup>R<sup>0</sup>e R<sup>1</sup>r mantendo PAI+, com AcND e TAD+/(eluato negativo). No momento, apresenta PAI, TAD e eluato positivos. Sua reafenotipagem mostrou: 1, 2, 3, 4, 5 (R<sup>1</sup>r\*, R<sup>2</sup>r\*ou R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>). Os anticorpos irregulares identificados foram: anti-f, autoanti-e e AcND. A paciente recebeu CH R<sup>2</sup>R<sup>2</sup> devido à associação do autoanti-e com anti-f. **Discussão:** A presença de aloanticorpo anti-f em paciente com autoanti-e e histórico de transfusões fenotipicamente semelhantes para os antígenos Rh chama a atenção para a presença de um antígeno “oculto” em determinadas fenotipagens que não distinguem CH f+(R<sup>2</sup>r, R<sup>0</sup>r) de f-(R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, R<sup>1</sup>r\*, R<sup>2</sup>r\*) sem uso de genotipagem. A presença de anti-f no receptor permite excluir, por meio da fenotipagem, as combinações alélicas que expressam o antígeno f. CH R<sup>1</sup>R<sup>0</sup> ou R<sup>1</sup>r(D, C, c, E, e) são compatíveis com R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, R<sup>1</sup>r\*ou R<sup>2</sup>r\* do receptor, mas podem induzir a produção de anti-f. É comum na rotina transfusional o uso de CH compatível com o fenótipo negativo do receptor, mas a preocupação com seus fenótipos positivos é menor. Do ponto de vista prático, respeita-se muito mais a fenotipagem Rh do que as combinações de seus haplótipos. Devido à baixa frequência de anti-f, a preocupação em identificá-lo é menor. Sua comum associação com autoanticorpos (anti-e ou anti-c) também dificulta a identificação, podendo o mesmo ser incluído entre os AcND. Portanto, a presença do antígeno f no CH nem sempre é considerada e a transfusão é liberada com base nas provas de compatibilidade negativas. Uma solução relativamente simples é selecionar CH R<sup>1</sup>R<sup>1</sup> ou R<sup>2</sup>R<sup>2</sup> para transfusão em pacientes imunizados ou na prevenção dos não imunizados. **Conclusão:** Este relato demonstra que apenas a fenotipagem idêntica no sistema Rh não traz segurança absoluta ao receptor e desperta a atenção para os cuidados que se deve ter com os haplótipos Rh necessários para prevenir a imunização por anti-f.

**Apêndice 6.** Resumo apresentado na forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2015, 19-22 de novembro de 2015, São Paulo, SP, Brasil.

### **811. ELEVAÇÃO DE TÍTULO DE ANTI-C E ANTI-FY<sup>a</sup> RESULTA EM REAÇÃO HEMOLÍTICA TARDIA**

Miola MP<sup>a,b</sup>, Fachini RM<sup>a,b</sup>, Junior OR<sup>a,b</sup>, Mattos LC<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Hemocentro de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>b</sup> Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

**Introdução:** A exposição a antígenos eritrocitários alogênicos por meio de transfusões sanguíneas e/ou gestações pode resultar na produção de autoanticorpos específicos. Anticorpos IgM de baixos títulos são geralmente observados na primeira exposição. Em uma resposta anamnésica, o anticorpo detectável (IgG) aparece entre 2 a 7 dias, podendo atingir títulos elevados de 7 a 10 dias. **Relato do caso:** Paciente do sexo feminino, 61 anos, com histórico de cirrose hepática não alcoólica, *diabetes mellitus* e hipertensão arterial sistêmica, diarreia há sete dias, internada com desidratação. Apresentando hemoglobina (Hb) de 7,7 g/dL, foram solicitados dois concentrados de hemácias (CHs). Exames pré-transfusionais (PT): ABO/RhD: A+; pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), autocontrole (AC) e prova cruzada (gel Liss/Coombs): negativos. Após transfusão dos dois CHs, a Hb aumentou (10,7 g/dL) no primeiro dia de internação (DI). No terceiro DI observou-se queda da Hb (7,5 g/dL) e foram solicitados dois CHs. A nova amostra para os PT, por ter ultrapassado 72 horas da primeira, mostrou resultados idênticos aos da anterior. Portanto, a segunda transfusão foi liberada. O acompanhamento da Hb (g/dL) entre o quarto e o oitavo DI (exceto sexto DI) revelou: 10,7, 10,0, 8,5 e 7,6, respectivamente. Foram solicitados mais dois CHs no nono DI. PT: PAI positivo; AC e TAD negativos; fenotipagem RH: 1, 2, -3, -4, 5, (R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>); KEL: -1 (K-); JK: 1, 2 [Jk (a+b+)]; FY: -1, 2 [Fy (a-b+)]; MNS: -3, 4 [MNS (S-s+)], sem sinais de dupla população de células. Painel gel Liss/Coombs mostrou-se positivo com todas as células (4+), com autocontrole negativo. Painel enzimático revelou anti-c (título 1/4096, score 133) e aloadsorção com 4 ciclos (BioPeg + Bromelina) revelou anti-Fy<sup>a</sup>. **Evolução:** Relatada enterorragia no segundo DI. Para localizar a origem, foram realizados retossigmoidoscopia rígida (quarto DI), colonoscopia (sétimo DI) e cintilografia com hemácias marcadas (décimo DI), os quais não evidenciaram sinais de sangramento intestinal. Foi registrada elevação de ferritina de 134 ng/dL para 257 ng/dL entre o primeiro e o sexto DI e observada icterícia (+/4) no décimo DI pela primeira vez. **Discussão:** O sangramento por enterorragia no segundo DI pode justificar a queda da hemoglobina e a não percepção da ocorrência de hemólise. Não houve registro de reação hemolítica transfusional. Contudo, a redução da Hb entre o quarto e o oitavo DI, o TAD negativo no nono DI, a ausência de dupla população de células nas fenotipagens, o aparecimento de icterícia leve e a não evidência de novo sangramento sugerem hemólise devido à presença dos anticorpos irregulares anti-c e anti-Fy<sup>a</sup>. De fato, os quatro CH transfundidos entre o primeiro (R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>) e o terceiro (R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> e R<sub>1</sub>R<sub>0</sub>) DI apresentavam antígeno C e dois (um no primeiro e outro no terceiro DI), o antígeno Fy<sup>a</sup>. **Conclusão:** Houve reação hemolítica transfusional tardia, resultante da súbita elevação dos títulos de anti-c e anti-Fy<sup>a</sup> após a transfusão de CHs incompatíveis (c+; Fy<sup>a</sup>+); a repetição da PAI em 72 horas não evitou uma segunda exposição a eritrócitos contendo antígenos incompatíveis.

**Apêndice 7.** Resumo apresentado na forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2015, 19-22 de novembro de 2015, São Paulo, SP, Brasil.

### 873. USO DE MÉTODOS MOLECULARES NA RESOLUÇÃO DE DISCREPÂNCIAS DO SISTEMA ABO

Miola Mp<sup>a,b</sup>, Fernandes RG<sup>a</sup>, Fachini RM<sup>a,b</sup>, Junior OR<sup>a,b</sup>, Mattos LC<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Hemocentro de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>b</sup> Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

**Introdução:** Apesar da facilidade de identificação sorológica dos quatro fenótipos do sistema ABO, a caracterização dos subgrupos de A e de B requer análises adicionais para esclarecer os fatores que afetam a expressão dos antígenos e/ou dos anticorpos regulares deste sistema. A combinação de métodos sorológicos e moleculares tem se mostrado essencial na investigação dos subgrupos. **Objetivo:** Investigar, com métodos sorológicos e moleculares, as discrepâncias nas fenotipagens direta e reversa do sistema ABO. **Método:** Análise de amostras de receptores (R, n = 2) e doadores (D, n = 3) com discrepâncias não resolvidas na rotina. Testes sorológicos adicionais e análises do DNA genômico [PCR-RFLP (del261G, Kpn I)] e sequenciamento [éxon 6(ex6) e éxon 7 (ex7)] foram realizados. **Resultados:** As análises sorológicas mostraram os seguintes resultados: R1 (direta: O; reversa: A) e R2 (direta: B; reversa: AB): adsorção/eluição revelaram fraca expressão do antígeno A; D5 (direta: O; reversa: B), D9 (direta: O; reversa: AB) e D10 (direta: O; reversa: A): adsorção/eluição indicou ausência de antígenos. Análises da mutação 261delG no ex6 por PCR-RFLP mostraram os seguintes resultados: D5 e D9: homozigose; R1 e D10: heterozigose; R2: ausência. O sequenciamento de ex6 e ex7 revelou as seguintes mutações – reportadas e não reportadas (8) – em comparação ao alelo referência ABO\*A1.01: R1, ex6: 261delG/G; íntron 6 (int6): 1007G/A8; ex7: 429G/A8, 467C/T e 1061delC/C, indicando presença de um alelo A fraco e outro ABO\*O.01. R2, ex6: 297A/G; int6: 42G/T, 163T/C e 179C/T; ex7: 467C/T, 526C/G e 1061delC/C, indicando presença de um alelo ABO\*B1.01 e outro A fraco. D5: íntron 5 (int5): 527G/A; ex6: 261delG e 297A/G; int6: 89T/A, 163T/C, 188G/A e 1007G/A8; ex7: 429A/G8, 542G/A, 646T/A, 681G/A, 771C/T e 829G/A, indicando presença dos alelos ABO\*O.01 e ABO\*O.02. D9: ex6: 261delG, indicando presença de dois alelos ABO\*O.01. D10: int5: 527G/A; ex6: 261delG/G e 297A/G; int6: 89T/A, 163T/C, 1007G/A8, 1011A/G e 1013G/A; ex7: 646T/A, 681A/G, 771C/T, 804insG/G e 829G/A, indicando presença dos alelos ABO\*Ael.01 e ABO\*O.02. **Discussão:** A fraca expressão do antígeno A responsável pela discrepância em R1 e R2 resulta das mutações 467C>T e 1061delC no ex7, conhecidas por caracterizar alelos A fracos. A presença deste alelo é concordante com a heterozigose (R1) e ausência (R2) da mutação 261delG no ex6. As amostras D5 e D9 são do grupo O devido à homozigose da mutação 261delG, e as discrepâncias resultaram da ausência indeterminada dos anticorpos anti-B (D5) e anti-A e anti-B (D9). A amostra D10 é de fato do grupo A, devido à presença de um alelo A fraco (ABO\*Ael.01) contendo a inserção de uma base G na posição 804 do ex7 e em heterozigose com a mutação 261delG. **Conclusão:** Os resultados deste estudo demonstram que testes sorológicos de adsorção/eluição podem apresentar limitações e nem sempre são conclusivos na resolução de discrepâncias entres tipagens direta e reversa, indicando que análises moleculares (PCR-RFLP, sequenciamento) são importantes para a adequada classificação dos alelos variantes de subgrupos do sistema ABO.

**Apêndice 8.** Participação como palestrante no First Latin American Transfusion Science Course, 18-20 de abril de 2016, Lagoa Santa, MG, Brasil.

**Tema:** Discrepâncias do sistema histo-sanguíneo ABO: resolução sorológica e molecular




## Marcos Paulo Miola

Participou como palestrante no:

First Latin American

Transfusion Science Course

Local/Data

Lagoa Santa/MG - 18 a 20 de abril de 2016

Organização/Palestrante

  
Ana Cláudia Peron

Gerente de Assuntos Científicos Latino América  
Divisão de Imuno-hematologia - Bio-Rad Laboratories

Palestra:

- Discrepâncias do sistema histo-sanguíneo ABO: resolução sorológica e molecular



**Apêndice 9.** Resumo apresentado na forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2016, 10-13 de novembro de 2016, Florianópolis, SC, Brasil.

**949. SISTEMA GERBICH E OUTROS SANGUES RAROS – UM PROBLEMA A SER RESOLVIDO NO BRASIL**

Hirose FF<sup>a,b,c</sup>, Garcia LA<sup>a,b,c</sup>, Buka ML<sup>a,b,c</sup>, Bassi MLB<sup>a,b,c</sup>, Furlan AM<sup>a,b,c</sup>, Júnior FAAES<sup>a,b,c</sup>, Miola MP<sup>a,b</sup>, Júnior OR<sup>a,b,c</sup>, Fachini RM<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>b</sup> Hospital de Base, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>c</sup> Hemocentro de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

**Relato:** Paciente masculino, 49 anos, negro, com distensão abdominal, dispneia, perda ponderal e constipação. TC de abdômen, Laparotomia Exploradora, Bx e IHQ de lesão em Epíplon e Omento revelaram carcinomatose avançada com Adenocarcinoma Mucinoso sugestivos de sítio primário em estômago. Devido a neoplasia avançada e más condições clínicas, optou-se por medidas antidistanásia, com evolução a óbito. Relato de transfusão de 1 CH e 1 Bolsa de PFC em outro serviço. Exames pré-transfusionais: ABO/RhD: A+; pesquisa de anticorpos irregulares: positiva; autocontrole (AC): negativo; identificação de anticorpos irregulares (IAI) com painel testado na fase de antiglobulina humana: positivo para todas as hemácias-teste, AC negativo; IAI com painel de hemácias-testes tratadas com enzimas: negativo; fenótipos: M+N+S+s-; D+C-E+c+e+; K-k+, Kp(a-b+); Le(a-b+); Fy(a+b-); JK(a+b+); P1-; Lu(a-b+); PP1PK+; Dib+; JMH+; LWa+; Yt(a+); Ge2-. Antígenos destruídos após tratamento com a enzima Tripsina, resistente com a enzima alfa-quimiotripsina e ao tratamento por DTT 0,2M. Teste de inibição Anti-Ch/-Rg positivo. Prova cruzada compatível com 4 hemácias Ge-, sendo inferida presença de anti-Ge2 (exames realizados em parceria com BioRad). Após contato com diversos serviços, identificamos um cadastro nacional de doadores raros, que contava com 3 doadores: 1 inapto por cardiopatia e 2 por doação recente, não possuindo hemácias congeladas. **Discussão:** Descrito em 1960, tornou-se um sistema de grupo sanguíneo em 1990, nomeado Gerbich, em homenagem a uma das pacientes. Possui três antígenos alta frequência (> 99,9%): GE2, GE3 e GE4, que, associados, formam os fenótipos variantes Ge-negativo: Yus (Ge:-2, 3, 4), Gerbich (Ge:-2, -3, 4) e Leach (Ge: -2, -3, -4). Anti-Ge tem importância clínica variável, geralmente IgG1, mas pode ter um componente IgM. O Ministério da Saúde não possui uma política bem implementada em relação ao gerenciamento de hemácias Ge- congeladas e à tecnologia/treinamento para realizar o descongelamento. Se as bolsas estivessem disponíveis, o ideal seria descongelar no momento da transfusão. Caso os doadores não estivessem inaptos, haveria possibilidade de aguardar a doação, liberação, alinhar transporte, receber o CH e realizar o procedimento com segurança. Neste relato, a transfusão era incerta, mas optar pelo procedimento sem dispor de reserva foi arriscado. Pelo fato de ter sido um paliativo, a transfusão não foi realizada. Embora fenótipos Ge- sejam muito raros no Brasil e no mundo, exceto na região da Melanásia, o suporte transfusional a pacientes imunizados pode ser agravado pela falta de investimentos e/ou gerenciamento em programas para triagem de doadores raros, cadastro, armazenamento por congelamento e coordenação do banco de sangue raro. Nos EUA, o cadastro funciona desde 1959 (Tibor Greenwalt), atualmente com 51 mil doadores e em torno de 90% de efetividade. Há uma tentativa brasileira com a portaria Nº1440 de Setembro de 2015 que institui a Comissão de Assessoramento Técnico em Sangue Raro. **Conclusão:** Apesar da raridade, é uma questão atual a ser resolvida. Investimentos em fenotipagens e genotipagens fomentando o cadastro nacional de doadores com fenótipos raros em um Programa e protocolos em nível nacional e internacional poderão proporcionar uma oportunidade de encontrar fenótipos compatíveis para pacientes aloimunizados, com rapidez e diminuição dos riscos.

**Apêndice 10.** Resumo apresentado na forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2016, 10-13 de novembro de 2016, Florianópolis, SC, Brasil.

**953. PRESENÇA DE ANTI-A1 PODE MASCARAR UMA DISCREPÂNCIA ABO**

Miola MP<sup>a,b</sup>, Fachini RM<sup>a,b</sup>, Júnior OR<sup>a,b</sup>, Mattos LC<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Hemocentro de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>b</sup> Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

**Objetivo:** Discrepâncias ABO são caracterizadas por reações inesperadas, fracas ou negativas, com as hemácias (Prova Direta, PD) ou com o soro (Prova Reversa, PR), levando a resultados contraditórios. Subgrupos ABO são fenótipos que diferem na quantidade de antígenos. A expressão dos antígenos A e B não é estável e pode ser alterada em vários processos biológicos. Anticorpos regulares são esperados na ausência do antígeno correspondente, proporcionando a formação de padrões de aglutinação. Anticorpos irregulares anti-A1, presentes em alguns subgrupos de A, reagem com epítomos de hemácias A1. É possível que anticorpos anti-A1 obscureça discrepâncias entre as PD e PR, dificultando a correta interpretação de alguns fenótipos ABO. O objetivo deste trabalho foi demonstrar que o anticorpo anti-A1 pode mascarar discrepância do sistema ABO. **Material e métodos:** Oito amostras de doadores (D) e receptores (R), classificados como B ou AB na PD e com reatividade fraca ( $\leq 3$ ) com hemácia A1, na PR, com ou sem discrepâncias, foram analisados. Reagentes monoclonais anti-A, anti-B, anti-AB e lectinas anti-A1 e anti-H foram testadas em tubos e Gel Convencional (GC). Testes em Gel Neutro (GN) também foram realizados (15 min a 4°C com hemácias, PD, tratadas com enzimas). Três amostras foram selecionadas para sequenciamento dos éxons 6 e 7. **Resultados:** No teste em tubo, todas as amostras apresentaram PD: AB e PR: B. No GC, amostras R1, D3 e D4 não reagiu com anti-A (PD: B) e R2, D3 e D5 reagiu com hemácia A1 (PR: B); portanto, D3 não apresentou discrepância (PD e PR: B). Em GN, todas as amostras apresentaram reações intensificadas na PD e PR em comparação ao GC, inclusive D3. GN, em comparação com tubo, apresentou maior reatividade somente em PR, sendo PD equivalente. Sequenciamento de R1, R2 e D3 identificou que ambas possuem os alelos A201/B101. **Discussão:** Testes em GC apresentaram reatividade mais fraca em comparação aos testes em tubo, principalmente na pesquisa de anti-A1. É possível que a força centrífuga desfaça as reações fracas durante o trajeto das hemácias na coluna de gel. A presença conjunta de anti-A1 e fraca expressão do antígeno A nos grupos AB pode mascarar a discrepância, sugerindo tratar-se de fenótipo B. Portanto, este anticorpo irregular pode constituir um fator de risco na correta classificação sorológica ABO. O anticorpo anti-A1 anulou a discrepância na amostra D3 em GC, mas não em tubo. A fraca expressão do antígeno A responsável pela discrepância nas amostras analisadas por sequenciamento resultou, em parte, da presença das mutações 467C > T e 1061delC no éxon 7, reconhecidas por caracterizar alelos A fracos. Contudo, não é suficiente para explicar a reatividade sorológica distinta de R2, que possui padrão sorológico de A2 em relação a R1 e D3, que apresentam reatividade mais fraca com anti-A do que o convencional para A2. Como os alelos A201/B101 expressam GTA variante e GTB funcional, respectivamente, a competição entre estas enzimas pelo antígeno H favorece a síntese de maior quantidade do antígeno B em relação a A. Este fenômeno, na ausência dos anticorpos regulares, mas na presença de anti-A1 irregular, pode criar limitações para a correta interpretação de PD e PR de subgrupos ABO. **Conclusão:** A presença de anti-A1 irregular pode anular as discrepâncias no grupo AB, as quais podem ser devidamente esclarecidas pela combinação de métodos sorológicos adicionais e sequenciamento.



**Anexo 1.** Tabela com os resultados sorológicos e moleculares dos casos analisados

Amostras	Reação c/ hemácias					Reação c/ Plasma			Adsorção-Eluição		Fenótipo	nt 261	Genótipo ABO	FUT2 Secretor
	Soro			Lectinas		Hemácias			A1	B				
	Anti-		AB	A1	H	A1	B	O						
	A1	B												
<b>M1.1</b>	0/w	0	0/w	0	4	0/1	4	0/1	4	NT	A <sub>w</sub>	G/del	O01/Aw38*	AA
<b>M1.2(Filho)</b>	0	0	0	0	4	4	4	0	0	NT	O	del	O01/O01	AG
<b>M2</b>	0/w	4	4	0	1/4	0/1	0	0	4	NT	A <sub>w</sub> B	G	A201/B101	AA
<b>M3</b>	3	4	4	0	0/4	2/4	0	0	NT	NT	AB	G	A201/B101	AA
<b>M5</b>	0	0	0	0	4	4	0/2	0	NT	0/1	O	del	O01/O11	AA
<b>M7</b>	4	0	4	3/4	0/4	0	0/2	0	NT	0	A <sub>1</sub>	G	A101/A101	AA
<b>M8.1</b>	0	0	0/2	0	2/4	4	0	0	NT	0/4	B <sub>w</sub>	del	O01/O01	NT
<b>M8.2(Mãe)</b>	0	0	0	0	4	4	4	0	NT	NT	O	del	NT	NT
<b>M9</b>	0	0	0	0	3/4	0/w	0/1	0	0	0	O	del	O01/O01	GG
<b>M10</b>	0	0	0	0	4/4	0/w	4	0	w/1	NT	A <sub>w</sub>	G/del	Ae1101/O02	AA
<b>M13.1(GI)</b>	CM	CM	CM	1/CM	2/4	0	0	0	NT	NT	AB/O	G/del	A101/B101/O01/O02	GG
<b>M13.2(GII)</b>	CM	CM	CM	1/CM	2/4	0	0	0	NT	NT	AB/O	G/del	A101/B101/O01/O02	GG
<b>M13.3(Pai)</b>	0	4	4	0	2/4	4	0	0	NT	NT	B	G/del	B101/O02	GG
<b>M13.4(Mãe)</b>	4	0	4	3/4	1/4	0	4	0	NT	NT	A	G/del	A101/O01	GG
<b>M13.5(Irmã)</b>	4	4	4	1/4	1/4	0	0	0	NT	NT	AB	G	A101/B101	AA
<b>M14</b>	0/W	4	4	0	1/4	0-4	0	0	4	NT	A <sub>w</sub> B	G	A201/B101	GA

Legenda: nt = nucleotídeo; NT = Não testado; CM = Campo Misto; 0/w = Reação negativa com técnica padrão e positiva fraca com protocolo adaptado; 0 = negativo; 1, 2, 3 e 4 são graduações de intensidade de reação, onde 1 é mais fraco e 4 mais forte; 0-3/1-4 = resultado de técnica padrão versus adaptada; AA = não secretor; GG e GA = secretor; Números de identificação de amostras fracionados correspondem a estudos de família, onde 0.1 é o probando; GI = Gemelar um; GII = Gemelar dois; \*Alelo identificado neste estudo

**Anexo 2.** Resultados identificados com sequenciamento direto a partir da sequência referência do sistema ABO

Localização	Ex. 6	Int. 6	Ex. 7														3' UTR		
Nucleotídeo	261	1007	429	467	526	542	646	657	681	703	771	796	803	804	829	930	1061		
Fragmentos	PCR-1	PCR-2																	
		PCR-3																	
		PCR-4														Genótipo			
NG006669.1 <sup>†</sup>	G	G	G	C	C	G	T	C	G	G	C	C	G	G	G	G	C	A101	
AJ536135.1				G	G		T	T		A		A	C			A		B101	
M1.1	G/del	G/A	G/A	C/T														C/del	O01/Aw38*
M1.2	del																		O01/O01
M2				C/T	C/G			C/T		G/A		C/A	G/C				G/A	C/del	A201/B101
M3				C/T	C/G			C/T		G/A		C/A	G/C				G/A	C/del	A201/B101
M5	del					A/G	T/A		G/A		C/T				G/A				O01/O11
M7																			A101/A101
M8	del																		O01/O01
M9	del																		O01/O01
M10	G/del						T/A		G/A		C/T			insG	G/A				Ael101/O02
M13.1(GI)	G/del				C/G		T/A	C/T	G/A	G/A	C/T	C/A	G/C		G/A	G/A			A101/B101/O01/O02
M13.2(GII)	G/del				C/G		T/A	C/T	G/A	G/A	C/T	C/A	G/C		G/A	G/A			A101/B101/O01/O02
M13.3(Pai)	G/del				C/G		T/A	C/T	G/A	G/A	C/T	C/A	G/C		G/A	G/A			B101/O02
M13.4(Mãe)	G/del																		A101/O01
M13.5(Irmã)				C/T	C/G			C/T		G/A		C/A	G/C				G/A	C/del	A201/B101
M14				C/T	C/G			C/T		G/A		C/A	G/C				G/A	C/del	A201/B101
Códon	88		143	156	176	181	216	219	227	235	257	266	268	269	277	310	354		
aa ancestral			V	P	R	W	F	H	P	G	P	L	G		V	L			
Alteração	fs		V	L	G	X	I	H	P	S	P	M	A	fs	M	L	fs+el		

Legenda: aa = aminoácido; <sup>†</sup>Sequencia Referência; \*novo alelo; fs = deslocamento do quadro de leitura; el = alongamento do quadro de leitura em 21aas.

**Anexo 3.** Quadro com os resultados do momento da resolução ABO diante dos protocolos utilizado neste estudo

Casos	Etapas	M1	M2	M3	M5	M7	M8	M9	M10	M14
SC	1	-	-	AB	-	-	-	-	-	-
SR	2.1	A	AB	AB	-	-	-	-	-	AB
AE	2.2	A	AB	NT	-	A(?)	-	O(?)	A(?)	AB
261delG	3	O/A	AB	AB	O/O	A(?)	O/O	O/O	O/(?)	AB
Seq.	4	<i>Aw38*/O1</i>	<i>A2/B1</i>	<i>A2/B1</i>	<i>O1/O11</i>	<i>A1/A1</i>	<i>O1/O1</i>	<i>O1/O1</i>	<i>Ae/O2</i>	
Resolução-Etapa		1-2.1*	1-2.1	1	1-3	1-2.2	1-3	1-2.2	1-4	1-2.1
Motivo		↓Ag	↓Ag	anti-A1	↓Ac.	↓Ac.	↓Ac.	↓Ac	↓Ag	↓Ag/anti-A1

**Legenda:** SC: técnica sorológica convencional; SR: técnica sorológica de reforço (adaptada); AE: adsorção-eluição convencional e de reforço (adaptada); Seq.: sequenciamento; ↓Ag: baixa expressão do antígeno na hemácias; ↓Ac: baixo título ou ausência do anticorpo no plasma; 1-5: etapas do protocolo; \*Só foi possível caracterizar o alelo com o estudo familiar (etapa 5).

### Anexo 4. Resultados identificados no caso M13 com sequenciamento direto a partir da sequência referência do gene *FUT2*

Identificação	Material	Alelos	Frequência	Fenótipos	Variações <i>FUT2</i> (gDNA)													
					nucleotídeos -->													
					.139	.102	.75	171	216	357	375	428	739	960	1009	1011		
					Origem	5'UTR >												
					cód. dbRBC	< 3'UTR												
					Referência	301	C	G	C	A	C	A	G	G	A	A	T	
		SE*25.01.01	0.495	A; a-b+	Austria	1136	G	C	T	G	T		A	A	G	G	C	
		SE*01.04.01 (Se2: Se357)	0.46	secretor	Japão; Tai; NG	304					T							
		SE*01.06? (Se375 South Africa)	raro	secretor	África do Sul	319						G						
		<b>SE*01.06.03 (FUT2: 375G, 1009G)</b>	raro	Secretor	Brasil	<a href="#">KX550421</a>						G				G		
13.3 (Pai)	Sangue	SE*25.01.01/ <b>SE*01.06.03</b>		B; Le(a-b+)	Brasil (Pardo)		G/C	G/C	C/T	A/G	C/T		A/G	G/A	G/A	A/G	G	T/C
13.4 (Mãe)	Sangue	SE*25.01.01/SE*01.04.01		A; Le(a-b+)	Brasil (Branco)		G/C	G/C	C/T	A/G	C/T	C/T		G/A	G/A	A/G	A/G	T/C
13.1 (GI)	Swab	SE*25.01.01/SE*25.01.01		AB; Le(a+b-)	Brasil (Pardo)		G	C	T	G	T			A	A	G	G	C
	Sangue	SE*25.01.01/SE*01.04.01/ <b>SE*01.06.03</b>					G/C	G/C	C/T	A/G	C/T	C/T	A/G	G/A	G/A	A/G	A/G	T/C
13.2 (GII)	Swab	SE*01.04.01/ <b>SE*01.06.03</b>		O; Le(a-b+)	Brasil (Branco)							C/T	A/G				A/G	
	Sangue	SE*25.01.01/SE*01.04.01/ <b>SE*01.06.03</b>					G/C	G/C	C/T	A/G	C/T	C/T	A/G	G/A	G/A	A/G	A/G	T/C
13.5 (Irmã)	Sangue	SE*25.01.01/SE*25.01.01		AB; Le(a+b-)	Brasil (Branco)		G	C	T	G	T			A	A	G	G	C
					<b>Resíduo</b>	5'UTR >												
					<b>Na referência</b>													
					<b>Na variante</b>													
						57	72	119	125	143	247	320	< 3'UTR					
						A	Y	N	E	W	G	T						
						A	Y	N	E	X	S	T						

Legenda: GI: gêmeo e probando; GII: irmã gêmea; NG: Nova Guiné; Tai: Taiwan; SE\*01.06.03 (FUT2: 375G, 1009G): alelo raro, sem registro nas bases de dados genéticas; KX550421: código da submissão ao banco de dados (BGMUT-dbrBC).

**Anexo 5.** Eletroferograma com as variações de intensidade promovidas pela quimera dupla em gêmeos dizigóticos envolvendo quatro alelos.

