Alexandre Enéas Domingues

**Estudo das alterações moleculares do gene ABO em
doadores de sangue fenotipados como A₃ e A₃B**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Hematologia

Orientadora: Prof. Dra. Marcia Cristina Zago
Novaretti

São Paulo

2007

Para meus pais Américo e Alice,
para Margarete e filhos
pelo amor, carinho e
apoio em todos os
momentos da
minha vida.

Agradecimentos

À Dra. Marcia Cristina Zago Novaretti, que além da orientação para execução desse trabalho, me proporcionou muito apoio e incentivo.

Ao Professor Dalton de Alencar Fischer Chamone pela oportunidade, confiança e apoio na realização desse trabalho.

Ao Dr. Pedro Enrique Dorlhiac-Llacer pelo apoio e estímulo para o desenvolvimento científico.

A todos os profissionais do Departamento de Tipagem sanguínea pelo apoio na triagem dos doadores.

Aos funcionários do Laboratório de Imunematologia pela ajuda e carinho.

Aos funcionários da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, pelo suporte para o desenvolvimento da dissertação.

Aos doadores de sangue que participaram desse estudo.

Agradecimento especial a Sílvia Leão Bonifácio e a Reinaldo Manhani, pelo companheirismo no dia-a-dia e pela dedicação durante toda a fase experimental.

Agradecimento à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-
FAPESP, pelo financiamento desse trabalho.

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2006.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Genética Molecular ABO.....	09
1.2	Base estrutural do alelo A	11
1.3	Subgrupos A ₁ e A ₂	12
1.4	Subgrupo A ₃	14
2	OBJETIVO.....	18
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	20
3.1	Seleção de doadores.....	21
3.2	Coleta de amostras de sangue periférico e desenho do estudo.....	22
3.3	Determinação sorológica dos grupos e subgrupos sangüíneos do sistema ABO.....	25
3.3.1	Tipagem ABO pela técnica em tubo.....	25
3.3.2	Tipagem ABO pela técnica em gel.....	26
3.3.3	Pesquisa de subgrupos ABO.....	27
3.4	Extração do DNA genômico.....	28
3.5	Quantificação do DNA genômico por Lambda-DNA.....	30
3.6	Genotipagem ABO.....	31

3.6.1 PCR-ASP	31
3.6.1.1 Amplificação por PCR-ASP.....	33
3.7 Eletroforese em gel de agarose.....	33
3.8 Análise do risco.....	34
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Dados demográficos e classificação sorológica ABO dos doadores de sangue.....	37
4.2 Classificação sorológica ABO	39
4.2.1 Estudo sorológico de subgrupos ABO.....	39
4.3 Quantificação do DNA genômico.....	41
4.4 Estudo do polimorfismo A ₃ e A ₃ B por PCR-ASP.....	41
4.5 Genotipagem ABO.....	44
4.6 Genotipagem ABO após análise do exon 7 do gene <i>ABO</i> por PCR-ASP.....	48
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÕES.....	59
7 ANEXOS.....	61
8 REFERÊNCIAS	65
9 APÊNDICES.....	79

Lista de Abreviaturas

µg – Micrograma

µL – Microlitros

µM – Micromolar

Anti-HBc – Anticorpos contra “core” do vírus B da Hepatite

ASP – “Alelic Specific Primer” – Iniciador alelo - específico

C- Consenso

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar

CM – Campo Misto

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DNA – Acido Desoxirribonucleico

DNA Ladder – Marcador de Peso Molecular

dNTP – Dideoxynucleotídeo

EDTA – Acido Etileno Diamino Tetracético

HBs-Ag – Antígeno de Superfície do Vírus B da Hepatite

He – Hemácia

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HTLV – Vírus da Leucemia T do Adulto

Kb – Kilobase

KCl – Cloreto de Potássio

Leu – Leucina

M – Mutação

mg/mL – Miligrama / Mililitro

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimol

ng – Nanograma

°C – Graus Centígrados

Pb – Pares de bases

PCR – “Polimerase Chain Reaction” – Reação da Polimerase em Cadeia

pH – Potencial de Hidrogênio

Phe – Fenilalanina

pmol - Picomol

Pro – Prolina

r.p.m – Rotações por Minuto

Taq – *Thermus aquaticus*

Tris-HCl – Hidroximetil Aminometano

U – Unidade

V – Volt

Lista de Figuras

Figura 1 - Estruturas bioquímicas dos antígenos eritrocitários humanos do sistema de grupo sanguíneo ABO.....	03
Figura 2 - Biossíntese dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo ABO e H nos eritrócitos humanos.....	04
Figura 3 - Mapa físico gene ABO.....	10
Figura 4 - Seqüência de aminoácidos dos alelos <i>A1</i> e <i>B</i>	12
Figura 5 - Seqüência de aminoácidos dos alelos <i>A1</i> e <i>A2</i>	13
Figura 6 - Seqüência de aminoácidos dos alelos <i>A1</i> e <i>A3</i>	15
Figura 7 - Fluxograma utilizado para o estudo do genótipo ABO em doadores <i>A₃</i> e <i>A₃B</i>	24
Figura 8 - Fenotipagem eritrocitária sub-grupos <i>A₃</i> e <i>A₃B</i>	40
Figura 9 - Quantificação das amostras <i>A₃</i> e <i>A₃B</i> por Lambda-DNA.....	41
Figura 10 - Amplificação amostras <i>A₃</i> e <i>A₃B</i> por PCR-ASP, região 467 C>T.....	42
Figura 11 - Amplificação amostras <i>A₃</i> e <i>A₃B</i> por PCR-ASP, região 829 G>A.....	42
Figura 12 - Amplificação amostras <i>A₃</i> e <i>A₃B</i> por PCR-ASP, região 871 G>A.....	43
Figura 13 - Amplificação amostras <i>A₃</i> e <i>A₃B</i> por PCR-ASP, região 1060 C>A (del C).....	43

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Interpretação de subgrupos sanguíneos do sistema ABO.....	07
Tabela 2 – Bases moleculares associadas à variação da transferase A.....	17
Tabela 3 – Classificação sorológica de doadores A e AB.....	38
Tabela 4 – Distribuição de doadores A ₃ e A ₃ B quanto ao sexo.....	39
Tabela 5 - Resultado da PCR - alelo específico para região 467.....	44
Tabela 6 - Resultado da PCR - alelo específico para região 829.....	45
Tabela 7 - Resultado da PCR - alelo específico para região 871	46
Tabela 8 - Resultado da PCR - alelo específico para região 1060.....	47
Tabela 9 - Provável genotipagem <i>ABO</i> de amostras A ₃	49
Tabela 10 - Provável genotipagem <i>ABO</i> de amostras A ₃ B.....	50

Resumo

Domingues, A.E. *Estudo das alterações moleculares do gene ABO em doadores de sangue fenotipados como A₃ e A₃B* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 95p.

O sistema sanguíneo ABO é o mais importante grupo sanguíneo na medicina transfusional. Atualmente, a determinação do tipo sanguíneo dos doadores de sangue é feita através de testes sorológicos rotineiros de laboratório, porém outros testes realizados com o DNA humano obtido de amostra de sangue, tornam-se complementos valiosos para a determinação correta do grupo sanguíneo do doador e do receptor, aumentando a segurança transfusional. Estudos realizados com o grupo sanguíneo A₃ e A₃B demonstraram que este subgrupo possui um alto grau de heterogeneidade, uma vez que diversos eventos moleculares foram associados a ele, embora apenas um pequeno número de amostras tenha sido testado até hoje. Nesse trabalho, foi investigada a frequência e os tipos de eventos moleculares do grupo sanguíneo A₃ e A₃B em um grupo de 100 doadores de sangue. Para seleção desse grupo foram analisadas 12.283 amostras de doadores de sangue saudáveis de ambos os sexos do grupo sanguíneo A e AB obtidas na Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, pelos métodos teste em tubo e gel teste. Obtiveram-se 13 amostras A₃ e 87 amostras A₃B. Após extração e quantificação do DNA genômico das amostras utilizou-se amplificação do DNA pela técnica de reação da polimerase em cadeia alelo específico (PCR-ASP) para as regiões 467C>T, 829G>A, 871G>A e 1060C>A (del C) do exon 7 do gene ABO. Os resultados de amplificação das regiões estudadas apontam para um novo genótipo, aqui denominado A30*/, presente em 30,7% das amostras A₃ e em 58,6% das amostras A₃B (A30*/B10*) (necessária a confirmação por sequenciamento); detectou-se também o genótipo A302/A301 em 30,7% das amostras A₃ e o genótipo A302/B104 em 17,1% das amostras A₃B; outros genótipos já descritos para subgrupo A₃ (A301/A301, A302/A302, uma amostra de cada) foram também verificados bem como presença da mutação na região 871G>A em 9 amostras A₃; verificou-se também que mutações nas regiões 467 C>T e 1060 C>A (del C), anteriormente descritas somente em indivíduos A₂ e A₂B, são muito frequentes em indivíduos A₃ e A₃B.

Descritores: 1.Sistema do grupo sanguíneo ABO 2.Genes 3.Reação em cadeia da polimerase 4. Alelos 5. Biologia molecular

Summary

Domingues, A.E. *ABO gene molecular alterations in blood bank donators phenotyped as A₃ e A₃B* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 95p.

ABO blood system is the most important blood group in transfusional medicine. Actually, the blood group type in blood donors and receptors is determined by serological laboratorial tests, complemented by human DNA blood tests that assure the correct blood group determination for the blood donor and receptor, optimizing transfusional safety. Studies on blood subgroup A₃ e A₃B demonstrated a large subgroup heterogeneity, with various associated molecular changes in small sample groups tested. At present study, it was proposed investigation about the frequency and the types of molecular alterations occurring among 100 blood donors samples phenotyped as A₃ e A₃B. These samples are selected after tub and gel tests analysis of 12.283 A and AB samples of healthy blood donors of both sex from Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. Thirteen A₃ and 87 A₃B samples were selected, each sample genomic DNA was extracted and quantified and it was performed DNA amplification by allelic specific polymerase chain reaction (PCR-ASP). It was studied exon 7 ABO gene mutations 467C>T, 829G>A, 871G>A and 1060C>A (del C). Amplification results pointed that a new genotype is present at these A₃ and A₃B subgroup, named in this study as the A30*/genotype (sequencing confirmation needed); these genotype is present in 30.7% A₃ samples and in 58.6% A₃B samples (A30*/B10*). However, it was detected the ulterior decrived genotypes: A302 present in 30.7% A₃ samples (A302/A301) and in 17.1% A₃B samples (A302/B104); for subgroup A₃ it was observed the genotypes A301/A301, A302/A302 (one sample each) and the presence of 871G>A mutation at 9 A₃ samples; 467 C>T and 1060 C>A (del C) exon 7 ABO gene mutations descrived at A₂ e A₂B samples, are very frequents at these A₃ e A₃B samples tested.

Descriptors: 1.ABO blood-group system 2.Genes 3. Polymerase chain reaction 4.Alleles 5. Molecular biology

1 INTRODUÇÃO

O sistema de grupo sanguíneo ABO foi o primeiro a ser descoberto por Karl Landsteiner no começo do século XX (1901) e, até hoje, continua sendo considerado o mais importante sistema de grupo sanguíneo na medicina transfusional. Tem ainda relevância nos transplantes, em especial nos de medula óssea e renal, além de contribuir em estudos antropológicos.

Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo ABO não estão restritos apenas à membrana dos eritrócitos, podendo ser encontrados em outras células hematopoiéticas (linfócitos e plaquetas), assim como em uma grande variedade de células como as endoteliais, intestinais, sinusoidais, esplênicas, da medula óssea, da mucosa gástrica, das glândulas mamárias, além de secreções e excreções como saliva, leite e urina (Silberstein e Spitalnik, 1991). Os antígenos ABO são oligossacárides gerados em um processo que envolve a atividade de enzimas específicas chamadas glicosiltransferases que são codificadas pelo gene H no cromossomo 19 e pelo gene ABO no cromossomo 9 (Lowe, 1993). O produto do gene H é uma enzima, a fucosiltransferase, que adiciona especificamente fucose à galactose terminal de uma substância precursora, formando a substância H.

As enzimas A (α 1-3 N-acetilgalactosaminiltransferase) ou B (α 1-3 N-galactosiltransferase) convertem o substrato H em antígeno A ou B, respectivamente (Larsen et al., 1990; Clausen et al., 1990; Yamamoto e Hakomori, 1990; Martinko et al., 1993; Yamamoto e Mac Neill, 1996). As transferases A e B são estruturas com alto grau de homologia entre si e a

sua especificidade é determinada pelos aminoácidos localizados próximos ao sítio de ligação entre o substrato H e os açúcares receptores (Olsson e Chester, 2001) (Figura 1).

O grupo sanguíneo AB apresenta atividade das duas transferases (A e B), enquanto que o grupo sanguíneo O não tem transferases A e B, não convertendo a substância H em antígenos A e B, e portanto, tem quantidades abundantes de antígeno H na superfície dos eritrócitos.

Figura 1: Estruturas bioquímicas dos antígenos eritrocitários humanos do sistema de grupo sanguíneo ABO (Schenkel-Brunner, 2000).

Os genes *H* e *Se/se* (secretor) estão localizados no cromossomo 19 (Lowe, 1993; Daniels, 2005), e são herdados independentemente dos genes alélicos A, B, e O, que estão localizados no braço longo do cromossomo 9 (9q34.1-34.2) (Larsen et al., 1990; Anstee e Mallison, 1994; Watkins et al., 1998). O gene *H* produz substância H, sobre a qual ocorre a ação de glicosiltransferases específicas. O gene *H* é expresso tanto no estado homozigoto (*H/H*) como no heterozigoto (*H/h*). O gene *hh* é extremamente raro, e nessa situação nenhuma substância H é produzida, sendo este fenótipo chamado de Bombay (*O_h*) (Watkins et al., 1998).

O gene *Se*, chamado secretor, controla a secreção de substâncias solúveis A, B e H. Cerca de 80% da população caucasóide é constituída de indivíduos secretores. A presença de *Se* e *se* determinam presença ou ausência de substância H nas secreções (Mollison e Engelfriet, 1997) (Figura 2).

Figura 2: Biossíntese dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo ABO, e H nos eritrócitos humanos.

A expressão dos antígenos ABO varia conforme a faixa etária, não sendo completa no período neonatal, alcançando somente a expressão plena ao redor de 2 a 4 anos de idade (Mollison e Engelfriet, 1997). Algumas doenças como a leucemia aguda, também podem alterar a expressão fenotípica dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo ABO, devido a diversos mecanismos moleculares, que podem resultar em redução das transferases A e/ou B, e conseqüentemente diminuição da expressão dos antígenos A e B, dificultando a interpretação dos resultados de tipagem ABO (Reid e Bird, 1990; Bianco et al., 2001).

A freqüência populacional dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo ABO varia em diferentes populações, sendo importante ressaltar que estudos realizados em indígenas da América do Sul, demonstraram que a totalidade pertence ao grupo sanguíneo O (Matson et al., 1970), enquanto que em indianos, chineses e em negros, o grupo sanguíneo B é muito mais freqüente do que em brancos (Reed, 1968; Grunnet et al., 1997; Cho et al., 2005; Deng et al., 2005; Yip et al., 2006).

Na classificação ABO determinada sorologicamente, diferentes níveis de expressão do antígeno A ou B nos eritrócitos podem ser encontrados, sendo chamados de subgrupos de A ou subgrupos de B. A classificação desses subgrupos é baseada nos seguintes critérios: intensidade de aglutinação com soros anti-A, anti-B, anti-AB e anti-H, presença ou ausência de anticorpos contra antígenos ABO e presença ou ausência de substância A e/ou B na saliva. Os dois principais subgrupos de A são A₁ e A₂ que são diferenciados sorologicamente, pela reatividade das hemácias a serem

testadas contra lectina anti-A₁ e nos indivíduos secretores, pela presença ou não do antígeno A na saliva (Bird, 1952). Os testes para identificação de substância A, B e H na saliva são importantes na classificação de subgrupos de sistema de grupo sanguíneo ABO (Denomme et al., 2000) (Tabela 1).

As hemácias de aproximadamente 80% dos indivíduos A e AB são classificadas sorologicamente como A₁ e A₁B. As restantes, 19% são A₂ e A₂B e raramente, de outros subgrupos de A que não o A₂. Apenas 1% do total de subgrupos de A não são A₂ ou A₂B, (A₃, A₃B, A_m, A_x, A_{el}) (Salmon et al., 1984; Yamamoto et al., 1992; Yamamoto et al., 1993a, b, c, d; Olsson e Chester, 1995; Ogasawara et al., 1996; Hansen et al., 1998; Ogasawara et al., 1998).

De modo similar, existem subgrupos de B determinados sorologicamente (B₃, B_x, B_m, B_{el}), porém muito raros. Os subgrupos de A e subgrupos de B, resultam de mutações da estrutura do gene da glicosiltransferase (Yamamoto, 1995; Yamamoto, et al., 1995; Yu et al., 2002).

Tabela 1: Interpretação de subgrupos sanguíneos do sistema ABO

FENÓTIPO	Reação das hemácias com anti-soros				Reações dos soro e/ou plasma com hemácias-teste					Saliva do secretor
	Soro Anti-A	Soro Anti-B	Soro Anti-AB	Lectina Anti-H	Lectina Anti-A ₁	He A ₁	He A ₂	He B	He 0	
A ₁	4+	0	4+	0	4+	0	0	4+	0	A e H
A _{int}	4+	0	4+	3+	2+	0	0	4+	0	A e H
A ₂	4+	0	4+	2+	0	**	0	4+	0	A e H
A ₃	2+CM	0	2+CM	3+	0	**	0	4+	0	A e H
A _m	0 / + -	0	0 / + -	4+	0	0	0	4+	0	A e H
A _x	0 / + -	0	+ / 2 +	4+	0	2+ / 0	0 / +	4+	0	H
A _{el}	0	0	0	4+	0	2+ / 0	0	4+	0	H
B	0	4+	4+	0	--	4+	4+	0	0	B e H
B ₃	0	+ / CM	2+ / CM	4+	--	4+	4+	0	0	B e H
B _m	0	0	0 / + -	4+	--	4+	4+	0	0	B e H
B _x	0	0 / + -	0 / 2+	4+	--	4+	4+	0	0	H

Fonte: Vengelen-Tyler V. *Technical Manual*. 14th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks.

+ - = intensidade fraca de aglutinação

CM = campo misto

He = hemácia

Os anticorpos anti-A e anti-B são produzidos geralmente após os primeiros meses de vida, com pico de produção dos 5 aos 10 anos de idade e com diminuição progressiva na velhice (Toivanen e Hirvonen, 1969). Os anticorpos anti-A e anti-B podem ser de natureza IgM ou IgG (Issitt e Anstee, 1998), causando aglutinação direta de forte intensidade quando testados com hemácias de grupo sanguíneo A e B respectivamente. Esses anticorpos são clinicamente significantes, podendo causar reações transfusionais hemolíticas graves se sangue incompatível for administrado. A maioria das reações transfusionais fatais são causadas pelo uso inadvertido de sangue ABO incompatível (Honing, 1980). Os anticorpos anti-A e anti-B também podem causar doença hemolítica do recém-nascido com gravidade variável.

A tipagem de rotina do sistema de grupo sanguíneo ABO, é realizada com o emprego de testes chamados de tipagem direta e reversa. Na tipagem direta, utiliza-se soros anti-A e anti-B para a determinação da presença ou ausência dos antígenos do sistema de grupo sanguíneo ABO. A tipagem reversa é realizada empregando-se reagentes constituídos por suspensão de hemácias classificadas como de grupo A₁ e B para detecção sérica de anti-A e anti-B. A tipagem direta e reversa devem ser realizadas simultaneamente para a classificação do tipo sanguíneo ABO, uma vez que a incompatibilidade ABO pode ser fatal (Widman, 2005).

Apesar de os anticorpos monoclonais anti-A e/ou anti-B reconhecerem e aglutinarem a maioria dos subgrupos sanguíneos ABO, a determinação daqueles que apresentam baixíssima expressão de antígenos é laboratorialmente trabalhosa (Novaretti et al., 2000; Olsson et al., 2001; Seltsam et al., 2005; Seltsam et al., 2006). Além de ser uma ferramenta independente no laboratório clínico, a genotipagem do sistema de grupo sanguíneo ABO pode ser usada para confirmar a presença de um antígeno de fraca expressão, como os dos subgrupos A e/ou B (Fischer et al., 1992; Olsson et al., 2001). Assim, podemos afirmar que a genotipagem do sistema de grupo sanguíneo ABO, é um complemento valioso à determinação correta do grupo sanguíneo do doador e do receptor (Fischer et al., 1992; Olsson e Chester, 1995; Zago et al., 1996; Olsson e Chester, 1996; Barjas-Castro e Saad, 1997; Pearson e Hessner, 1998; Barjas-Castro et al., 2000; Novaretti et al., 2000; Yip, 2000; Olsson et al., 2001; Batissoco et al., 2001).

1.1 Genética Molecular ABO

Noventa anos após a descoberta do grupo sanguíneo ABO, a base genética molecular do sistema foi definida e estabelecidos os polimorfismos dos alelos comuns desse locus (Yamamoto, 2000). A clonagem do cDNA da transferase A, foi baseada na seqüência parcial do gene da transferase A, em sua forma solúvel, a partir do tecido de pulmão humano (Clausen et al., 1990; Yamamoto et al., 1990a, b; Lee e Reid, 2000).

O *locus* do gene *ABO* estende-se por uma região de 18-20 Kilobases (Kb), na posição 9q34.1-9q34.2, consistindo de 7 exons, estando a maior parte da seqüência codificadora presente nos exons 6 e 7 e intron 6 (Yamamoto et al., 1995; Olsson e Chester, 1996). Desse modo, o gene *ABO* desde o códon de iniciação até o códon terminal (o número exato de nucleotídeos pode variar entre os diferentes alelos), tem um total de 19.514 pares de base (pb) no alelo *ABO A101* (Olsson e Chester, 2001). Os principais alelos do sistema ABO são A, B e O, que dão origem aos quatro grupos sanguíneos: A, B, AB e O (Brecher, 2005).

Além dos alelos A1, B e O, existem outros que vem sendo detectados em amostras de sangue, inicialmente classificadas como subgrupos ABO. O sistema de grupo sanguíneo ABO estudado mostrou-se altamente polimórfico. Até o momento foram descritos 57 alelos do grupo A, 40 do grupo B e 48 do grupo O, sendo considerados alelos raros 36 do grupo A, 23 do grupo B e 5 do grupo O.

A menor reatividade encontrada nos subgrupos poderia ser explicada pelas mutações ocorridas na região codificadora do gene *ABO*, ou pela influência inibitória dos outros *locus* do mesmo gene (Olsson et al., 2001).

As mutações que ocorrem nos exons 6 e 7 do gene *ABO* podem modificar as seqüências de aminoácidos ao longo da proteína, alterando a atividade da enzima e a atividade catalítica dos antígenos resultantes das transferases A e B (Yamamoto, 2000; Olsson e Chester, 2001). O conhecimento da estrutura tridimensional da proteína juntamente com as propriedades cinéticas das enzimas em relação à especificidade entre o açúcar acceptor e o substrato, podem revelar como a substituição do nucleotídeo e/ou aminoácido afetam a atividade das glicosiltransferases dos subgrupos do sistema de grupo sanguíneo ABO (Olsson e Chester, 1996) (Figura 3).

Figura 3: Mapa físico dos exons do gene *ABO* (Bennet et al, 1995; Ogasawara et al, 1996).

1.2 Base estrutural do alelo A

A clonagem e o seqüenciamento do cDNA da célula humana de adenocarcinoma de cólon dos fenótipos A, B e O, demonstraram que os dois principais alelos do sistema de grupo sanguíneo ABO, *A1* e *B*, diferem entre si em sete substituições de nucleotídeos (nt): 297A>G, 526C>G, 657C>T, 703G>A, 796C>A, 803G>C e 930G>A, das quais apenas quatro localizadas nas posições: nt526, 703, 796 e 803, são responsáveis pelas substituições dos aminoácidos Arg176Gly, Gly235Ser, Leu266Met e Gly268Ala respectivamente (Yamamoto et al., 1990a; Yamamoto et al., 1990b; Lee e Reid, 2000; Barjas-Castro et al., 2000; Yamamoto, 2000; Yip, 2000; Olsson et al., 2001; Seltsam et al., 2003; Suzuki, 2005; Chien-Feng et al., 2006). As duas últimas substituições de aminoácidos são consideradas críticas na determinação da especificidade das glicosiltransferases (Lee e Reid, 2000) (Figura 4).

É importante lembrar que a seqüência do alelo *A1* (*ABO**A101**), é tomada como referência em relação a todos os outros alelos do sistema de grupo sanguíneo ABO (Seltsam et al., 2003; Chien-Feng et al., 2006).

Figura 4: Sequência de aminoácidos dos alelos *A101* e *B101* (Schenkel-Brunner, 2000)

1.3 Subgrupos A1 e A2

A mudança estrutural no alelo *A1* (*A101*), deu origem ao primeiro subtipo descrito (*A102*), decorrente da mutação no 467C>T, que resulta na substituição do aminoácido Pro156Leu. Os dois alelos são comuns, porém com freqüências diferentes, nas poucas populações estudadas (Fukumori et al., 1996; Kang et al., 1997; Yip, 2000; Olsson et al., 2001; Seltsam et al., 2003).

Outros subtipos *A₁* foram descritos, como o (*A103*), decorrente da mutação 467C>T (Pro156Leu) com uma mutação silenciosa adicional 564C>T, enquanto que o segundo alelo mutante, difere do não mutado por uma mutação silenciosa 297A>G. As mutações presentes nesses alelos descritos, aparentemente não afetam a atividade das transferases (Olsson et al., 2001; Chien-Feng et al., 2006). O fenótipo *A₂*, comum em caucasianos, é detectado sorologicamente pela sua capacidade de aglutinar na presença do soro anti-A, mas não na presença da lectina anti-*A₁*, diferentemente do

fenótipo A₁, cujas hemácias são aglutinadas na presença desses dois reagentes (Ogasawara et al., 1996; Olsson et al., 2001; Brecher, 2005). O alelo A2 (A201) é caracterizado pela substituição de uma única base, 467C>T e uma deleção 1060 C (Yip, 2000; Lee e Reid, 2000; Yamamoto, 2000). Até o momento foram descritos 9 subtipos de alelo A2 caracterizados molecularmente (A201 a A209) (Tsai et al., 2000; Yip et al., 2006) (Figura 5).

Figura 5: Seqüência de aminoácidos dos alelos A101 e A201 (Schenkel-Brunner, 2000)

1.4 Subgrupo A3

Os estudos moleculares realizados sobre o alelo A3 (A301) têm demonstrado que esse subgrupo apresenta um alto grau de heterogeneidade, uma vez que três mutações já foram associadas a ele, mas que envolveram pequeno número de amostras dada a sua raridade.

Yamamoto et al. (1993a) em suas investigações com cDNA de indivíduos com o tipo sanguíneo A₃, encontrou em dois exemplos de amostras A₃B uma substituição na posição 871G>A do exon 7, tendo como resultado uma substituição do aminoácido na posição 291 (Ácido Aspártico → Asparagina). Nas outras amostras pesquisadas as seqüências dos exons VI e VII mostraram-se idênticas a da transferase A (Figura 6).

Barjas-Castro e Saad, (1997) em um estudo com 3 famílias brasileiras e com um total de 12 indivíduos, sobre a heterogeneidade molecular do alelo A3, não encontrou a mutação 871G>A, mas na análise da seqüência dos nucleotídeos dessas amostras identificou outras substituições. Em duas amostras da mesma família, A₃ (A301) e A₃B foi encontrada a mutação 467C>T associada a deleção 1060 C, essa última responsável pela redução da atividade da transferase e característica do alelo A2 (A201). Na segunda família, em outras duas amostras analisadas, ambas (A301), somente a deleção 1060 C estava presente e, por fim, em dois membros da terceira família (A301^{var} e A301) foram encontradas a deleção 1060 C e a mutação 829G>A associadas (Barjas-Castro et al., 2000).

Figura 6: Seqüência de aminoácidos dos alelos A101, A301, A302, A303 e A304 (Schenkel-Brunner, 2000).

Chien-Feng et al. (2003) descreveram uma mutação 838C>T em indivíduo A₃B que resulta em alteração Leu280Phe na seqüência da transferase A. Recentemente foi descrito por Svensson et al. (2005) nova mutação 539G>A que associada com 467C>T e 1060 (del C), resulta na alteração Phe156Leu também na seqüência da transferase A.

Portanto, até o momento sabe-se que apenas o subgrupo A_3 apresenta heterogeneidade molecular, sendo que um pequeno número de amostras foi testada molecularmente.

A relevância desse projeto é justamente o de reunir uma maior casuística de amostras fenotipadas como A_3 e A_3B , para investigação da frequência e estudo das mutações no gene ABO que levam a esses fenótipos. Esse estudo pode auxiliar no entendimento das bases moleculares desse importante sistema de grupo sanguíneo e também resultar em procedimentos transfusionais e de transplante de órgãos mais seguros (Olsson et al., 2001).

As alterações moleculares descritas para os diferentes alelos A encontram-se sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2: Bases moleculares associadas à variação da transferase A

Fenótipo / genótipo	Mudança de nucleotídeo	Mudança de aminoácido
A ₁	467C>T	Pro156Leu
A ₂ A201 a A209	467C>T; 1060 del C 1054C>T 1054C>G 526C>G; 703G>A; 829G>A	Pro156Leu; e 21 aminoácidos extras Arg352Trp Arg352Gly Arg176Gly, Gly235Ser, Val277Met
A ₃ A301 a A304	467C>T; 1060 del C 829G>A, 838 C>T, 871G>A, 539G>A,	Asp291Asn, Val277Met, Leu280Phe, Pro156Leu, Arg180His
Outros subgrupos de A		
A _x	646 T>A	P216Ile
A _{el}	467C>T, 646T>A 203G>C, 350C>G	P216Ile, Val277Met, P156Leu
A _w	407C>T, 467C>T, 965A>G, 1060 del C	Thr136Met, Pro156Leu, Gly177Ala, Arg68Thr, Glu322Gly, Arg168Gly

ABO*A101 – sequência considerada referência

A terminologia aqui utilizada é a apresentada no sítio eletrônico
<http://www.bioc.aecom.yu.edu/bgmur/index.htm>.

Objetivo

2 OBJETIVO

Determinar o genótipo ABO em amostras de doadores de sangue fenotipadas sorologicamente como A₃ e A₃B.

Casuística e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Seleção de doadores

Foram analisadas 12.283 amostras de doadores de sangue saudáveis de ambos os sexos, dos grupos sanguíneos A e AB da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, no período de abril de 2004 a abril de 2005. Os participantes deste estudo foram incluídos após explanação dos objetivos desta pesquisa e após obtenção de consentimento individual por escrito.

As informações sociais de cada participante da pesquisa foram obtidas antes da coleta do sangue: nome, data de nascimento, idade, sexo, procedência dos pais e avós, número de doador, endereço, bairro, cep, telefone (residencial e comercial), profissão, antecedentes transfusionais, uso de medicamentos e antecedentes gestacionais (para o sexo feminino). Foi elaborada uma ficha para o registro das informações coletadas (anexo A termo de consentimento livre esclarecido).

Participaram desta pesquisa os candidatos considerados aptos à doação de sangue, após triagem clínica e laboratorial, de acordo com os critérios para aceitação de doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo e Normas Técnicas do Ministério da

Saúde para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados em hemoterapia (BRASIL, Ministério da Saúde, 2004).

Foram incluídos neste estudo somente os doadores de sangue que apresentaram testes sorológicos negativos para doenças transmissíveis pelo sangue, ou seja, teste para sífilis, doença de Chagas, hepatite B (antígeno de superfície da hepatite B - HBs-Ag e anti-HBc), hepatite C, HIV 1/2 e teste para o vírus da leucemia T do adulto (HTLV 1/2).

Apenas as amostras dos doadores de sangue com o teste de solubilidade da hemoglobina negativo (Nalbadian et al., 1971), que detecta a presença de traço falciforme nas amostras, foram incluídas neste estudo.

Todos os dados coletados e os resultados laboratoriais foram armazenados em um software especialmente desenvolvido para este fim. Esse programa possibilita a recuperação de qualquer informação inserida, quer isolada ou associada a outros dados.

3.2 Coleta das amostras de sangue periférico e desenho do estudo

Todos os testes laboratoriais imunematológicos foram realizados no Departamento de Imunematologia de Doadores da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

Por ocasião da doação de sangue são coletados, rotineiramente, cerca de 5 mL de sangue, em um tubo de vidro 12x75 mm com E.D.T.A (ácido etilenodiamino tetracético) para a realização das tipagens direta e reversa de grupo sanguíneo ABO, conforme exigência das Normas Técnicas

para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados (BRASIL. Ministério da Saúde, 2004). Com o mesmo volume de sangue foram realizados testes adicionais para determinação sorológica de subgrupo ABO. Todos os testes laboratoriais foram realizados dentro de 24 horas após a coleta. Enquanto eram aguardados os resultados dos testes sorológicos para doenças transmissíveis pelo sangue, as amostras foram mantidas a 4°C em refrigerador específico para banco de sangue (Sanyo Blood Bank Refrigerator, E.U.A).

Os reagentes imunonematológicos utilizados para a classificação sorológica do grupo sanguíneo ABO foram testados previamente a sua utilização pelo Departamento de Controle de Qualidade em Imunohematologia da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. Somente foram empregados os reagentes que atingiram ou superaram as especificações técnicas mínimas, conforme orientação para controle de qualidade de reagentes imunohematológicos utilizados internacionalmente.

Essa pesquisa foi aprovada pelas comissões de ética e de pesquisa da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A seguinte estratégia foi usada neste estudo: tipagem ABO direta e reversa em tubo em todas as amostras de sangue com no máximo 24 horas após a coleta; determinação sorológica do subgrupo do sistema ABO; extração e quantificação do DNA genômico; reação da polimerase em cadeia por PCR/ASP das amostras de grupos sanguíneos A₃ e A₃B (Figura 7)

Figura 7: Fluxograma utilizado para estudo do genótipo ABO em doadores A₃ e A₃B.

3.3 Determinação sorológica dos grupos e subgrupos sanguíneos do sistema ABO

Todas as amostras de sangue classificadas como A e AB por método automatizado na triagem imunematológica de doadores de sangue (Olympus PK7200, Tóquio, Japão) foram centrifugadas em tubo de vidro 10,5 x 75 mm a 3.400 r.p.m em centrífuga de mesa (Clay Adams-Serofuge II, New Jersey, E.U.A.) e lavadas com uma solução de cloreto de sódio a 0,9%. A seguir foi realizada uma suspensão de hemácias na concentração de 5%.

A classificação ABO das amostras pesquisadas foi obtida após realização da tipagem ABO direta e reversa, pelos métodos de tubo e gel teste, simultaneamente.

3.3.1 Tipagem ABO pela técnica em tubo

Foram utilizados anti-soros comerciais monoclonais anti-A, anti-B e anti-AB (Fresenius Hemocare, Brasil), para determinar a tipagem ABO direta e hemácias comerciais A₁ e B (Diamed-ID, Diamed Latino América, Brasil), para a determinação da tipagem ABO reversa. Para a técnica em tubo, foram utilizados os soros anti-A, anti-B e anti-AB monoclonal, lectinas anti-A₁ e anti-H (Fresenius Hemocare, Brasil) e suspensão a 5% de hemácias comerciais A₁ e B (Diamed-ID, Diamed Latino América, Brasil). Na tipagem ABO direta, foram adicionados 100 µl de cada soro comercial,

separadamente, em um tubo de vidro 10,5x 75 mm, limpo e identificado e 50 µl da suspensão 3% de hemácias - teste lavadas três vezes em solução de cloreto de sódio a 0,9% (JP Indústria Farmacêutica, Brasil); em seguida foi feita homogeneização e centrifugação a 3.400 r.p.m em centrífuga de mesa (Clay Adams-Serofuge II, New Jersey, E.U.A.) por 15 segundos. Para os testes com as lectinas (anti-H, anti-A₁) os tubos contendo as hemácias a serem testadas foram incubados em temperatura e tempo determinados de acordo as instruções do fabricante, e depois centrifugados a 3.400 r.p.m por 15 segundos em centrífuga de mesa. A seguir, foi observada a presença ou não de aglutinação e os resultados registrados. Na tipagem ABO reversa, foram adicionados 100 µL plasma teste em cada tubo de vidro 10,5 x 75mm (limpos e identificados) e 50 µL das hemácias comerciais A₁ e B, respectivamente em cada tubo. Após homogeneização e centrifugação a 3.400 r.p.m por 30 segundos, o “botão” de hemácias foi delicadamente ressuspenso, observando-se a presença ou ausência da aglutinação macro e microscopicamente.

3.3.2 Tipagem ABO pela técnica em gel

Para o método em gel teste, foram utilizados os cartões específicos com microtubos preenchidos com anti-soros comerciais Anti-A, Anti-B, Anti-AB, e com o uso de suspensão de hemácias comerciais A₁ e B (Diamed-ID Micro Typing System, Diamed Latino América, Brasil). O teste foi realizado conforme as recomendações do fabricante para determinar a tipagem ABO

direta e reversa. Na tipagem ABO direta e reversa, foram utilizadas hemácias comerciais A₁ e B na concentração de 0,8% e solução de bromelina ou solução de baixa força iônica (Diamed Latino América, Brasil). Na tipagem direta foi preparada uma suspensão com 10 µL de suspensão de hemácias a serem testadas em 1 mL de solução de baixa força iônica. A seguir foram pipetados 50 µL dessa suspensão nos microtubos identificados do cartão correspondente. Para a tipagem reversa foram adicionados 50 µL do plasma a ser testado em microtubos, ao quais já se havia acrescentado 50 µL de suspensão de hemácias A₁ ou de hemácias B.

Esses cartões foram centrifugados por 10 minutos a 910 r.p.m em centrífuga própria para cartões da Diamed, efetuada a leitura e a seguir registrados os resultados (Lapierre et al., 1990).

3.3.3 Pesquisa de Subgrupos ABO

As amostras que apresentaram tipagem A ou AB, foram testadas com lectina anti-H obtida a partir de *Ulex europeaus* e lectina anti-A₁ obtida a partir do *Dolichos biflorus*, ambas de Diamed Latino América, Brasil, para determinação do subgrupo ABO. Essa técnica foi realizada em tubos de vidro 10x75 mm limpos e identificados, onde separadamente foram adicionados 100 µL de cada soro comercial (lectina anti-A₁ e lectina anti-H) e 50 µL da suspensão 5% de hemácias-teste lavadas três vezes em solução de cloreto de sódio a 0,9% (JP Indústria Farmacêutica, Brasil); em seguida as amostras foram homogeneizadas e incubadas em temperatura e tempo

determinados de acordo as instruções constantes na bula do fabricante. Esses tubos contendo as amostras e os anti-soros comerciais foram então centrifugados a 3.400 r.p.m em centrífuga de mesa (Clay Adams-Serofuge II, New Jersey, E.U.A.) por 15 segundos. Após a centrifugação, foi observada a presença ou não de aglutinação e os resultados registrados.

Uma vez determinado o subgrupo, somente foram utilizadas para o estudo as amostras que apresentaram características fenotípicas de A₃ e A₃B.

3.4 Extração do DNA genômico

O DNA genômico das amostras selecionadas (fenótipo A₃ e A₃B), foi extraído em triplicata, utilizando kit de extração de DNA genômico do sangue (QIAamp DNA mini kit, Qiagen, Alemanha).

Utilizou-se 0,2 mL de cada amostra previamente selecionada para a extração de DNA. Esse volume de cada amostra foi transferido para microtubos de polipropileno (Eppendorf, Alemanha) de 1,5 mL estéreis, e então adicionados 20 µL de proteinase K (protease QIAGEN, Alemanha), de forma a homogeneizar as amostras. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução tampão de lise a cada microtubo, homogeneizando as amostras por agitação em agitador de tubos (AT56, Phoenix, Brasil), por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas por 10 segundos a 5.000 r.p.m em

centrífuga de microtubos (Biofuge Haemo, Heraeus Instruments, Alemanha), para retirada dos respingos da tampa, e então incubadas em termobloco (Multi Block Heater, Lab Line, E.U.A.) a 56 °C por 10 minutos. Após esse procedimento, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto e realizada a homogeneinização em agitador de tubos, por 15 segundos. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 segundos para retirada de respingos na tampa.

A seguir as amostras foram cuidadosamente adicionadas à colunas de separação previamente conectadas a um microtubo de polipropileno de 2 mL de descarte, que foi centrifugado por 1 minuto a 8.000 r.p.m, sendo o sobrenadante descartado. Foram adicionados às colunas 500 µL de tampão de lavagem 1, novamente centrifugadas por 1 minuto a 8.000 r.p.m e desprezados os sobrenadantes. Foram então adicionados 500 µL de tampão de lavagem 2 a cada coluna, sendo centrifugadas por 3 minutos a 13.000 r.p.m e os sobrenadantes descartados. As colunas foram então conectadas a novos microtubos de 1,5 mL em polipropileno autoclavado, sendo então adicionados 150 µL de tampão de eluição, permanecendo as amostras a temperatura ambiente por 5 minutos. As colunas contendo as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 8.000 r.p.m, e então desprezadas. Os microtubos de polipropileno contendo o DNA genômico extraído de cada uma das amostras selecionadas, foram armazenados a temperatura de 4 °C em refrigerador específico para banco de sangue (Sanyo, Blood Bank Refrigerator, E.U.A.), para posterior quantificação de DNA.

As demais alíquotas de reserva de cada amostra foram armazenadas em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (REVCO Scientific Inc., Asheville, E.U.A.).

3.5 Quantificação das amostras de DNA por Lambda-DNA

Inicialmente foi preparada solução de agarose a 1% à qual foi acrescentada solução de brometo de etídeo $0,5\text{ }\mu\text{g/mL}$; a seguir foi feita aplicação da solução em cuba de eletroforese e aguardada a solidificação do gel.

As amostras de DNA a serem quantificadas foram aquecidas em banho-seco a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, para solubilização completa do DNA. Foi pipetado $1\text{ }\mu\text{L}$ de cada amostra em um microtubo, acrescentados $1\mu\text{L}$ de solução tampão de aplicação de DNA “loading buffer” e $8\text{ }\mu\text{L}$ de água processada em equipamento de purificação (Milli Q Millipore, EUA), e realizada a homogeneização. Em cada poço do gel, foram aplicados $10\text{ }\mu\text{L}$ de cada uma das diluições de Lambda-DNA (500, 250, 125 e $62,5\text{ ng}/\mu\text{L}$), (Invitrogen, Brasil), nas quatro primeiras posições do gel e nos poços seguintes as amostras de DNA previamente preparadas. Os segmentos foram separados eletroforéticamente durante 15 minutos sob uma voltagem de 100 V. A visualização foi realizada, posteriormente, sob luz ultravioleta e os resultados documentados com uma câmera monocromática (Eagle Eye Stratagene, E.U.A.). O cálculo da quantidade aproximada de DNA de cada

amostra foi feita, baseando-se na imagem apresentada pelos padrões de lambda-DNA.

3.6 Genotipagem ABO

3.6.1 PCR-ASP

Foram usados os pares de primers para as mutações do exon 7 do gene *ABO*, que amplificam fragmentos de peso molecular diferentes, de acordo com cada região estudada, tanto para o alelo contendo a mutação quanto para o alelo que não contenha a mutação (Seltsam et al., 2003):

Mutação 467 C>T – fragmento de 107 pb

PRIMERS: 041s – 5'-ACG TGG CTT TCC TGA AGC TG-3'

046as – 5'-GCG GGG CAC CGC GGC CA-3' (mutado)

047as – 5'-GCG GAG CAC CGC GGC CG-3' (não mutado)

Mutação 829G>A – fragmento de 218 pb

PRIMERS: 093s – 5'-GGG GGT CGG TGC AAG AGA-3' (mutado)

094s – 5'-GGG GGT CGG TGC AAG AGG-3' (não mutado)

244as – 5'-CGC AGT GAA CCT CAG CTT C-3'

Mutação 871 G>A – fragmento de 177 pb

PRIMERS: 095s – 5'-CAC CAG GCC ATG ATG GTC A-3' (mutado)
096s – 5'-CAC CAG GCC ATG ATG GTC G-3' (não mutado)
244as – 5'-CGC AGT GAA CCT CAG CTT C-3'

Mutação 1060 C>A (del C) – fragmento de 203 pb

PRIMERS: 097s – 5'-CAG GCC AAC GGC ATC GAG-3'
103as – 5'-CTG GCA GCC GCT CAC GGT-3' (mutado)
104as – 5'-CTG GCA GCC GCT CAC GGG-3' (não mutado)

Controle GH – fragmento de 1069 pb

PRIMERS: GHs – 5'-CCT TCC CAA CCA TTC CCT TA-3'
GHas – 5'-GTC CAT GTC CTT CCT GAA GCA-3'

A análise inicial foi executada pela amplificação do DNA por meio da reação de polimerase em cadeia empregando o método PCR-ASP.

Cada amostra de DNA foi submetida a duas amplificações com o intuito de que o polimorfismo do gene *ABO* fosse detectado por meio do uso de oligonucleotídeos específicos para a sequência pesquisada, sendo considerada positiva a reação que apresentasse o alelo pesquisado e negativa a reação que não apresentasse o alelo em questão.

As seqüências dos oligonucleotídeos e as condições das reações foram desenvolvidas de modo a assegurar que as amplificações fossem altamente específicas (Seltsam et al., 2003).

3.6.1.1 Amplificação por PCR-ASP

A mistura de PCR (volume final 25 μ L) continha 100 ng de DNA genômico de cada amostra, tampão de PCR (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM), $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 0,2 mM de cada, DMSO 0,02%, 12 pmoles de cada primer senso ou antisenso tanto sequência-específico como controle GH e 1,5 unidades de DNA polimerase (*Taq Platinum*, Invitrogen, Brasil). A reação de PCR foi realizada em termociclador gradiente (Techne Touchgene, Reino Unido). Após desnaturação inicial de 2 minutos a 94 °C, as amostras foram submetidas a: 1) 30 ciclos de 10 segundos a 94 °C e 1 minuto a 65 °C; 2) 20 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 50 segundos a 61 °C e 30 segundos a 72 °C.

3.7 Eletroforese em gel de agarose

Após a realização da PCR, foram utilizados 10 μ L da solução de cada microtubo contendo os fragmentos já amplificados, e a eles foram adicionados 2 μ L de tampão de amostra (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25%) e realizada a aplicação de cada amplificado em gel de agarose 2,5% contendo Brometo de Etídeo 10 μ g/mL.

A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba específica para eletroforese horizontal sendo aplicada uma corrente elétrica de 100 V por período de uma hora e quarenta minutos. Simultaneamente foi utilizado em

cada corrida um padrão de peso molecular de 100 pb “DNA Ladder” (Pharmacia, Brasil). Os fragmentos foram separados por peso molecular e por carga elétrica no próprio gel. Após o término do tempo de corrida, o conteúdo do gel foi visualizado em aparelho transiluminador ultra-violeta e documentado em foto monocromática (Eagle-Eye Stratagene, E.U.A).

3.8 Análise do risco

Esta pesquisa estudou amostras de doadores de sangue com o intuito de detectar possíveis mutações genéticas. Os riscos envolvidos para o doador foram os mesmos envolvidos em uma doação de sangue normal, ou seja, mínimos. Uma vez que este material foi coletado por pessoal altamente treinado para tal, funcionários da coleta de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, o doador contou com toda a assistência necessária para qualquer eventualidade decorrente deste procedimento.

As pessoas envolvidas na pesquisa dispuseram de todos os equipamentos de proteção individual necessários para a manipulação de sangue e seus derivados e fizeram uso destes sempre que estavam manipulando tais materiais. Além disto, este laboratório possui uma área reservada para a realização da extração de DNA, PCR e eletroforese, dispondo de fluxo laminar, estufas e centrífugas designadas única e exclusivamente para a manipulação de amostras de sangue, visando a

proteção não apenas dos experimentos em andamento, mas principalmente a proteção das pessoas envolvidas nas pesquisas realizadas no laboratório.

Em se tratando de um estudo *in vitro*, não encontramos nenhuma hipótese em que fosse necessária a interrupção ou encerramento deste trabalho.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos e classificação sorológica ABO dos doadores de sangue.

Foram estudadas 12.283 amostras de sangue de doadores saudáveis em ordem de coleta aleatória, da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, classificados sorologicamente como de grupos sanguíneos A e AB. A idade dos doadores variou de 18 a 60 anos. Do total das amostras tipadas como A e AB no período descrito acima, 11.216 amostras (91,3%) foram classificadas sorologicamente como sendo do grupo sanguíneo A e 1.067 (8,7%) de grupo sanguíneo AB. O subgrupo A_1 foi o mais comumente observado nas amostras classificadas como A, 8.756 (78,06%), enquanto 2.447 (21,82%) foram classificadas como de subgrupo A_2 e 13 (0,12%) classificadas como de subgrupo A_3 . Das amostras tipadas como AB, 391 (36,65%) foram classificadas como subgrupo A_1B , 559 (52,39%) foram classificadas como subgrupo A_2B e 117 amostras (10,96%) foram classificadas como A_3B . Foram selecionadas para esse estudo 130 amostras que apresentaram classificação sorológica como de subgrupos A_3 e A_3B (Tabela 3). Desses 130 doadores selecionados, 84 (64,6%) eram do sexo masculino, sendo 11 classificados como de subgrupo A_3 e 73 de subgrupo A_3B ; e 46 (33,8%) eram do sexo feminino, sendo 2 classificados como de subgrupo A_3 e 44 classificados como de subgrupo A_3B (Tabela 4).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na análise da distribuição dos doadores de sangue de subgrupos A₃ e A₃B quanto ao sexo ($p=0.0095$), sendo o sexo masculino o mais frequente na nossa população de estudo (Tabela 4).

Tabela 3: Resultado da classificação sorológica de subgrupos ABO de 12.283 doadores de grupos sanguíneos A e AB.

Classificação sorológica ABO		N*	%	Total
A	A ₁	8.756	78,06%	11.216
	A ₂	2.447	21,82%	
	A ₃	13	0,12%	
				11.216
AB	A ₁ B	391	36,65%	1.067
	A ₂ B	559	52,39%	
	A ₃ B	117	10,96%	
				1.067
TOTAL				12.283

N* = número de amostras testadas.

$p= <0,001$

Tabela 4: Distribuição de doadores de sangue de grupos sanguíneos A₃ e A₃B quanto ao sexo.

Tipagem sorológica	A ₃		A ₃ B		Total	
	N*	%	N*	%	N*	%
Sexo						
Masculino	11	84,6	73	62,3	84	64,6
Feminino	02	15,3	44	37,6	46	35,3
TOTAL	13		117		130	

N* = número de amostras testadas.
 $p=0.095$

4.2 Classificação sorológica ABO

4.2.1 Estudo sorológico de subgrupos ABO

As 130 amostras classificadas como A₃ e A₃B apresentaram na tipagem ABO direta (suspensão das hemácias a serem testadas + soro anti-A e anti-AB) pelo método em tubo, a presença característica de aglutinação tipo “campo misto” (pequenos aglutinados de células ao redor de uma suspensão de hemácias não aglutinadas). No método gel-teste, todas as amostras A₃ e A₃B apresentaram resultado de aglutinação de moderada intensidade. Em ambos os métodos, todas as amostras apresentaram forte reação de aglutinação com o soro anti-H e não aglutinaram com o soro anti-A₁ (Figura 8).

Os resultados de tipagem ABO direta e reversa em tubo apresentaram 100% de concordância quando comparados com os resultados obtidos pelo método gel-teste.

Figura 8: Resultado da fenotipagem eritrocitária de amostras de doadores classificados sorologicamente como subgrupo A₃ e A₃B pelo método tubo e gel-teste.

4.3. Quantificação do DNA genômico

Previamente à sua amplificação, as amostras foram quantificadas com o emprego de diversas concentrações de DNA Lambda (Invitrogen, Brasil) para estimativa da quantidade de DNA da amostra (Figura 9). Foi observado baixo rendimento de extração do DNA em 30 amostras de doadores (23,0% do total) e essas amostras foram excluídas do estudo.

Figura 9: Quantificação do DNA genômico das amostras de doadores classificadas sorologicamente como A₃ e A₃B por Lambda DNA (ng/μL). Linha 1, 2, 3 e 4 – Lambda-DNA 500, 250, 125 e 62.5 ng/μL, respectivamente; linha 5 - doador 1 alíquota com 500 ng DNA; linha 6 - doador 2 alíquota com 125 ng de DNA; linha 7 - doador 3 alíquota com 125 ng DNA e linha 8 - doador 4 alíquota excluída do estudo, amostra com concentração inferior a 100 ng/μL.

4.4 Estudo dos polimorfismos dos subgrupos A₃ e A₃B por PCR-ASP

O DNA das amostras selecionadas foi submetido a amplificações por PCR-ASP das regiões 467 (Figura 10), 829 (Figura 11), 871 (Figura 12) e 1060 (Figura 13) do exon 7 do gene *ABO*. As regiões 829 e 871 correspondem aos alelos *ABO**A301 e *ABO**A302. O estudo das regiões 467 e 1060 é fundamental para a determinação do genótipo A3 e A3B.

Figura 10: Resultado da amplificação das amostras A_3 e A_3B por PCR-ASP, região 467C>T do exon 7 do gene *ABO*. Linha 1: marcador 100 pb; linhas 2-3: doador 1; linhas 4-5: doador 2, ambos positivos para amplificação das sequências mutada e não mutada e do controle de amplificação GH.

Figura 11: Resultado da amplificação das amostras A_3 e A_3B por PCR-ASP, região 829G>A do exon 7 do gene *ABO*. Linha 1: marcador 100pb; linhas 2-3: doador 1; linhas 4-5: doador 2; linhas 6-7: doador 3, todos positivos para amplificação das sequências mutada e não mutada e do controle de amplificação GH.

Figura 12: Resultado da amplificação das amostras A_3 e A_3B por PCR-ASP, região 871G>A do exon 7 do gene *ABO*. Linhas 1-2: doador 1; linhas 3-4: doador 2, linhas 5-6: doador 3; linhas 7-8: doador 4, todos positivos para amplificação das sequências mutada e não mutada e do controle de amplificação GH; linha 9: marcador 100pb.

Figura 13: Resultado da amplificação das amostras A_3 e A_3B por PCR-ASP, região 1060 C>A (del C) do exon 7 do gene *ABO*. Linhas 1-2: doador 1; linhas 3-4: doador 2; linhas 5-6: doador 3, todos positivos apenas para amplificação da sequência mutada e do controle de amplificação GH; linha 7: marcador 100pb.

4.5 Genotipagem ABO

Após a amplificação por PCR-ASP das amostras de doadores classificadas sorologicamente como A₃ e A₃B para as regiões 467, 829, 871 e 1060 do exon 7 do gene *ABO*, foram obtidos os seguintes resultados: (Tabelas 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

Tabela 5: Resultados da PCR alelo-específico da região 467 C>T do exon 7 do gene *ABO*.

Região 467	Doadores			
	A ₃		A ₃ B	
	N*	%	N*	%
- / -	03	23,0	19	21,8
+ / -	08	61,5	56	64,3
+ / +	02	15,3	12	13,8
Total de doadores	13	100	87	100

+ = presença da mutação 467C>T.

- / - = sem amplificação

+ / - = amplificação do alelo mutado

+ / + = amplificação dos alelos mutado e não mutado

N* = número de amostras testadas.

O resultado mais frequentemente observado em nosso estudo da região 467 do exon 7 do gene *ABO* foi o obtido com oito amostras classificadas sorologicamente como A₃ (61,5%) e 56 amostras como A₃B (64,3%) nas quais houve amplificação somente do fragmento correspondente ao alelo mutado para a mutação C>T, seguido de três

amostras (23,0%) classificadas como A_3 e 19 amostras como A_3B (21,8%), que não apresentaram a mutação em estudo. Apenas duas amostras (15,3%) classificadas como A_3 e 12 amostras (13,8%) como A_3B apresentaram a amplificação tanto do alelo mutado quanto do alelo não mutado para a mutação na região 467C>T.

Tabela 6: Resultados da PCR alelo-específico da região 829 G>A do exon 7 do gene *ABO*.

Região 829	Doadores			
	A_3		A_3B	
	N*	%	N*	%
- / -	03	23,0	08	9,1
+ / -	10	76,9	77	88,5
+ / +	--	--	02	2,2
Total de doadores	13	100	87	100

+ = presença da mutação 829G>A.

- / - = sem amplificação

+ / - = amplificação do alelo mutado

+ / + = amplificação dos alelos mutado e não mutado

N* = número de amostras testadas.

O estudo da mutação 829G>A, descrita em indivíduos classificados sorologicamente como subgrupo A_3 (A_{302}) e A_3B , verificou que em 10 amostras (76,9%) classificadas como A_3 e 77 amostras (88,5%) como A_3B , houve amplificação somente do fragmento referente ao alelo contendo a mutação G>A. Somente 3 amostras (23,0%) classificadas sorologicamente como A_3 e 8 amostras (9,1%) como A_3B , não apresentaram a mutação em

estudo. Nenhuma das amostras classificadas sorologicamente como A_3 e somente 2 amostras (2,2%) classificadas como A_3B apresentaram amplificações tanto do fragmento relacionado ao alelo mutado quanto ao alelo não mutado para a mutação 829G>A .

Tabela 7: Resultados da PCR alelo-específico da região 871G>A do exon 7 do gene *ABO*.

Região 871	Doadores			
	A_3		A_3B	
	N*	%	N*	%
- / -	04	30,8	07	8,0
+ / -	09	69,2	79	90,8
+ / +	--	--	01	1,1
Total de doadores	13	100	87	100

+ = presença da mutação 871G>A.
 - / - = sem amplificação
 + / - = amplificação do alelo mutado
 + / + = amplificação dos alelos mutado e não mutado
 N* = número de amostras testadas.

O estudo da mutação 871G>A, descrita em indivíduos classificados sorologicamente como subgrupo A_3 (A_{301}), mostrou que o resultado mais comum encontrado em nossos estudos foi o observado em 9 amostras (69,2%) classificadas sorologicamente como A_3 e 79 amostras (90,8%) como A_3B que apresentaram amplificação somente do fragmento correspondente ao alelo mutado. Quatro amostras (30,8%) classificadas como A_3 e 7 amostras (8,0%) como A_3B não apresentaram amplificação de nenhum dos

alelos para a região 871G>A. Nenhuma amostra classificada sorologicamente como A₃ e apenas 1 amostra (1,1%) como A₃B apresentou a amplificação tanto do alelo mutado quanto do alelo não mutado na região 871 do exon 7 do gene ABO.

Tabela 8: Resultados da PCR alelo-específico da região 1060 C>A (del C) do exon 7 do gene ABO.

Região 1060	Doadores			
	A ₃		A ₃ B	
	N*	%	N*	%
- / -	02	15,3	09	10,3
+ / -	03	23,0	24	27,5
+ / +	08	61,5	54	62,0
Total de doadores	13	100	87	100

+ = presença da mutação 1060 C>A (del C).

- / - = sem amplificação

+ / - = amplificação do alelo mutado

+ / + = amplificação dos alelos mutado e não mutado

N* = número de amostras testadas.

No estudo da região 1060, o resultado mais comumente observado foi o observado com 8 amostras (61,5%) classificadas sorologicamente como A₃ e 54 amostras (62,0%) como A₃B que apresentaram amplificação dos fragmentos referentes tanto ao alelo contendo a mutação quanto ao alelo não mutado, para a mutação C>A (del C). Três amostras (23,0%) classificadas como A₃ e 24 amostras (27,5%) como A₃B apresentaram

amplificação somente do fragmento referente ao alelo mutado. Somente 2 amostras (15,3%) classificadas como A₃ e 9 amostras (10,3%) como A₃B não amplificaram fragmento relacionado a região 1060 do exon 7 do gene ABO.

4.6 Genotipagem ABO após análise do exon 7 do gene ABO por PCR-ASP.

Os resultados obtidos com a genotipagem das amostras classificadas sorologicamente como A₃, mostraram que os genótipos mais freqüentes foram A30*/presente em 4 amostras (30,7%) (sugerindo um novo alelo A3 a ser confirmado por seqüenciamento do fragmento amplificado), e o genótipo A301/A302 em 4 amostras (30,7%); ainda foi verificado genótipo A301/A301 em 1 amostra (7,6%), 1 amostra (7,6%) apresentou o provável genótipo A302/A302, 1 amostra (7,6%) apresentou o genótipo A208 e 1 amostra (7,6%) apresentou o genótipo A304, necessitando de estudo de região adicional para confirmação; 1 amostra (7,6%) apresentou o genótipo Ae/07/O02, o que totaliza as 13 amostras estudadas (Tabela 9).

Tabela 9: Resultado da genotipagem ABO de amostras de doadores classificadas sorologicamente como A₃ determinada por PCR-ASP.

Provável genótipo	N*	%
<i>A30*</i> /	4	30,7
<i>A301/A302</i>	4	30,7
<i>A301/A301</i>	1	7,6
<i>A302/A302</i>	1	7,6
<i>Ael07/O02</i>	1	7,6
<i>A304</i> §	1	7,6
<i>A208</i>	1	7,6
Total	13	100

*A30** = “novo” alelo A3 a ser confirmado por seqüenciamento.

§ necessita do estudo de região adicional 539 do exon 7.

N* = número de amostras testadas.

Os resultados obtidos com a genotipagem das amostras classificadas sorologicamente como A₃B, mostraram que o genótipo mais freqüente foi *A30*/B10** presente em 51 amostras (58,6%) (a ser confirmado por seqüenciamento do fragmento amplificado), seguido do genótipo *A302/B104* em 15 amostras (17,2%), *Ael07/B104* em 7 amostras (8,0%), *A304/B104* em 7 amostras (8,0%), *A302/B101* em 2 amostras (2,3%), *A302/B305* em 2 amostras (2,3%), *A302/B10** em 1 amostra (1,1%), *A204/B104* em 1 amostra (1,1%) e *A204/Cis-AB01* em 1 amostra (1,1%), totalizando 87 amostras estudadas.

Esses resultados foram repetidos mais de uma vez, confirmando assim seu genótipo. As amostras foram encaminhadas para o seqüenciamento do produto de PCR amplificado nessas regiões do exon 7 do gene *ABO*, consideradas chave para o entendimento do subgrupo A₃ e A₃B (Tabela 10).

Tabela 10: Resultado da genotipagem ABO das amostras de doadores classificadas sorologicamente como A₃B determinada por PCR-ASP.

Provável genótipo	N*	%
<i>A30*/B10*</i>	51	58,6
<i>A302/B104</i>	15	17,2
<i>Ael07/B104</i>	7	8,0
<i>A304/B104</i>	7	8,0
<i>A302/B101</i>	2	2,3
<i>A302/B305</i>	2	2,3
<i>A204/B104</i>	1	1,1
<i>A302/B10**</i>	1	1,1
<i>A204/Cis-AB01</i>	1	1,1
Total	87	100

A30* = “novo” alelo A3 a ser confirmado por seqüenciamento.

** a ser confirmado por seqüenciamento.

N* = número de amostras testadas.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Desde a descoberta do sistema de grupo sanguíneo ABO por Landsteiner em 1901 que deu origem à hemoterapia moderna, grandes avanços em imunematologia ocorreram no século XX, como a descoberta de sistema de grupo sanguíneo Rh, de outros sistemas de grupos sanguíneos e o desenvolvimento da técnica de antiglobulina humana (Mollison et al., 1997).

Outro feito relevante foi liderado por Yamamoto et al., (1990 a e b), pioneiro nos estudos das bases moleculares do sistema ABO. A partir de então, inúmeros pesquisadores tem se dedicado à descrição de alelos desse sistema, sendo considerado hoje um dos mais polimórficos do genoma humano.

Durante a embriogênese os antígenos ABO são expressos precocemente desde os primeiros estágios do desenvolvimento (4ª e 5ª semana após a fertilização) e posteriormente estão presentes na superfície da maioria das células epiteliais e do endotélio vascular (Reid, 2003), tornando-se fator limitante em transfusão de sangue como em transplantes, notadamente nos renais e hepáticos, onde especula-se sobre a função desses antígenos, porém quase nada deles se sabe. É postulado que, por serem carboidratos, tenham função como adesinas na oncogênese (Cartron, 2001; Glinsky, 2000), e também façam parte da resposta imune primária a patógenos (Storry, 2004).

Os testes sorológicos para a determinação de grupos sanguíneos é tradicionalmente baseada na reatividade imunológica entre os antígenos A, B e H com reagentes específicos, porém não é possível extrapolar informações quanto ao genótipo ABO. Existem muitos casos em que as pesquisas sorológicas extensivas falharam em determinar o grupo sanguíneo ABO (Reid e Bird, 1990).

Enquanto que sorologicamente foram determinados 12 subgrupos de A e 5 de B, (Issitt e Anstee, 1998), é importante ressaltar que estudos realizados em indígenas da América do Sul demonstraram que a totalidade pertence ao grupo sanguíneo O (Matson et al., 1970), enquanto que em indianos, chineses e em negros o grupo sanguíneo B é muito mais freqüente que em brancos (Reed, 1968).

Em vários tipos de câncer, como o de pequenas células de pulmão e carcinoma de mama, a atividade das transferases do gene *ABO* pode se apresentar alterada, levando a fenótipos ABO aberrantes (Hakomori, 1989).

Comparações entre as seqüências de nucleotídeos das regiões codificadoras dos vários alelos do sistema ABO tem revelado diferenças que diminuem quase que totalmente a atividade enzimática, originando os subgrupos de A e subgrupos de B.

Até o momento foram descritos 56 alelos para A, 41 para B, 68 para O sendo que ultimamente, esse número tem aumentado com grande rapidez (Ogasawara et al., 1996; Yip et al., 2006).

Apesar de o sistema ABO ter importantes implicações clínicas, em estudos populacionais e forenses, são relativamente poucas pesquisas em

que um número grande de amostras foram estudadas. A maioria dos estudos moleculares do gene *ABO* são relatos de casos.

A importância dos estudos moleculares do gene *ABO* é de elucidar os mecanismos moleculares que levam a determinados subgrupos *ABO* (Takahashi, 2006).

Em revisão da literatura pudemos encontrar apenas escassos estudos sorológicos sobre os subgrupos A_3 e A_3B e menor ainda referente a estudos moleculares. Até o momento 4 alelos A_3 foram reportados na literatura (*A301*, *A302*, *A303* e *A304*) e a sua análise genética molecular foi estudada em pequena casuística.

Yamamoto et al. foram os primeiros a determinar a sequência de nucleotídeos da região codificadora dos exons 6 e 7 do gene *ABO* em 4 indivíduos de genótipo A_3 , sendo que em 2 casos identificou uma mutação 871G>A no exon 7 que resultou na substituição de 1 aminoácido, tendo esse alelo recebido a denominação de *A301*.

Em 2000, Barjas-Castro et al. estudaram 5 indivíduos de fenótipo A_3 e 1 A_3B pertencentes a 3 famílias não encontraram nenhum caso o alelo *A301*, mas sim a mutação 829G>A e a deleção 1060 C em 3 casos estudados. Esse alelo recebeu a denominação de *A302*.

Chien-Feng et al. em 2003 descreveram os resultados de testes moleculares realizados em 1 caso A_3B tendo documentado a mutação 838C>T a qual leva a substituição do aminoácido Leu280Phe na transferase A. Esse achado não foi encontrado em 30 amostras de doadores de sangue classificados como A_3 e A_3B .

Recentemente, Svensson et al. utilizou as técnicas de PCR-ASP e PCR-RFLP e encontrou um novo alelo A3 (A304), que apresentava além das mutações características do alelo A2 (467C>T e 1060 del C) uma mutação adicional no exon 7, 539G>A, levando a uma alteração Arg180His na transferase A.

Nos últimos anos tem sido motivo de interesse o entendimento sobre a função biológica e o papel na interação da glicosilação ABO em seres humanos. Sabe-se que as glicosiltransferases ABO podem modificar a expressão de antígenos fucosilados, bem como os antígenos fucosilados podem modificar os antígenos ABO (Svensson et al., 2005).

É também desconhecido o papel dos antígenos ABO na interação célula-célula (Henry e Samuelsson, 2000).

Pode-se especular que as mutações genéticas dos subgrupos ABO e consequentemente transferases variantes não apenas tenham uma menor eficiência atuando na substância H, mas eventualmente alterando a especificidade da substância precursora e/ou seu substrato, resultando em novas estruturas.

Alguns autores afirmam que, apesar de o polimorfismo ABO ser resultante de pressões biológicas não há explicação biológica plausível para o desenvolvimento dos subgrupos de A (Svensson et al., 2005).

Similarmente, não há vantagem aparente de qualquer dos tipos ABO, mas pesquisas recentes que tem caracterizado as diferenças glicolípídicas em amostras de subgrupos ABO (poliglicosilceramidas) mostram que essas

novas estruturas podem ter um potencial significado biológico, uma vez que estão expressos na superfície de diversos tecidos.

Esta é a primeira pesquisa em que um grande tamanho amostral foi testado com o intuito de elucidar as bases moleculares dos subgrupos A_3 e A_3B .

Utilizamos neste estudo as análises de DNA para verificar as alterações moleculares no gene *ABO*, em doadores de sangue classificados sorologicamente como A_3 e A_3B .

Diferenças no DNA e nas transferases desses genes podem ser determinadas pela amplificação por PCR com “primers” que amplificam o exon 7 do gene *ABO*, seguido de seqüenciamento dos nucleotídeos.

Foi utilizada análise por PCR-ASP para estudar o DNA de 100 amostras de doadores de sangue, classificados sorologicamente como A_3 e A_3B , para detectar os polimorfismos em regiões consideradas chaves para o estudo do fenótipo A_3 .

Nossos estudos demonstraram que, utilizando técnicas de genética molecular para genotipagem ABO é possível distinguir os diferentes tipos de alelos A. A genotipagem ABO é utilizada em pesquisas em bancos de sangue, análises forenses, estudos populacionais e proporciona um importante avanço na distinção da similaridade sorológica em fenótipos idênticos.

Neste estudo, o primeiro com grande quantidade de amostras de subgrupo A_3 e A_3B , pode-se inicialmente verificar sorologicamente que a freqüência desses subgrupos é semelhante ao já descrito na literatura, para

indivíduos classificados como subgrupo A_1 (78%), como A_2 (22%) e como A_3 (0,1%) (Issitt e Anstee, 1998; Brecher, 2005).

Quando comparada a frequência dos subgrupos A_1 , A_2 e A_3 com A_1B , A_2B e A_3B , nota-se que apesar de o subgrupo A_2B ter sido mais frequentemente encontrado que o reportado na literatura, a frequência de A_3 (0,1%) foi igual ao relatado, porém a frequência de A_3B (10,9%) foi superior ao anteriormente documentado.

A análise sorológica dos subgrupos de A, mostrou predominância de A_1 (78,0%) em relação a A_2 e A_3 , porém dentre as amostras classificadas como AB, o mais freqüente encontrado foi o subgrupo A_2B (52,3%).

A análise estatística preliminar da classificação ABO dos resultados sorológicos, mostrou uma diferença estatisticamente significante entre A_1 e A_1B ($p < 0,001$), A_2 e A_2B ($p < 0,001$) e A_3 e A_3B ($p < 0,001$).

Os resultados de tipagem ABO direta e reversa tanto em tubo como em gel teste apresentaram concordância total, estando em conformidade com o já relatado por Novaretti et al., 2001.

A padronização das reações de PCR-ASP para as diversas regiões do exon 7 analisadas nesse estudo foi feita tendo como base os trabalhos publicados por Seltsam et al. (2002, 2003) e modificados ligeiramente para obtenção de maior especificidade das regiões estudadas. Conseguiu-se amplificação quer para a seqüência consenso e/ou seqüência mutada em todas as amostras selecionadas, com DNA íntegro à quantificação.

A análise preliminar do provável genótipo das 13 amostras classificadas como A_3 mostrou que os genótipos mais detectados foram um novo alelo A_3 ,

aqui representado como *A30** (30,7%), que será confirmado pelo seqüenciamento do exon 7 do gene *ABO*, e o genótipo *A301/A302* (30,7%).

A análise dos prováveis genótipos em 87 amostras classificadas sorologicamente como *A₃B* é mais complexa, sendo o genótipo *A30*/B10** (58,6%) o mais freqüentemente encontrado. A seguir, o genótipo *A302/B104* (17,2%), foi o mais detectado. Esses resultados também carecem de confirmação por seqüenciamento.

Finalizando, neste estudo detectou-se um provável novo alelo de *A3* que é altamente prevalente tanto em amostras classificadas sorologicamente como *A₃* como *A₃B*. As alterações moleculares que podem justificar a detecção de subgrupos *A₃* e *A₃B* sugerem que mais de um mecanismo está envolvido.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- O estudo permitiu concluir que a mutação na região 467 C>T e a mutação na região 1060 C>A (del C), anteriormente descritas somente em indivíduos A_2 e A_2B , são muito frequentes em indivíduos A_3 e A_3B .
- Foi encontrado o primeiro exemplo de mutação 871G>A em doador de sangue classificado sorologicamente como subgrupo A_3 .
- Na população estudada encontramos os alelos $A301$, $A302$ e $A304$ tanto em amostras A_3 como A_3B .
- Um novo alelo $A30^*$ foi identificado em amostras A_3 e em A_3B sendo o mais prevalente nos dois subgrupos estudados.
- A discrepância observada entre fenótipo e genótipo em 2 amostras classificadas sorologicamente como A_3 e em 9 A_3B permitem concluir que o subgrupo A_3 e A_3B sejam resultantes de fenômenos de recombinação gênica alterando estruturalmente as moléculas desses subgrupos.
- Os resultados permitiram concluir que o subgrupo A_3 é heterogêneo em nível molecular.

Anexo A: Termo de consentimento livre esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(DOADOR)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO DOADOR:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N.º: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: N.º:
APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD(.....).....
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: N.º:
APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Estudo das alterações moleculares do gene *ABO* em doadores de sangue fenotipados como A₃ e A₃B.
2. PESQUISADOR: Alexandre Enéas Domingues CRBio Nº.: 31595/01
3. CARGO/FUNÇÃO: Analista de Laboratório
UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica Hematologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
sem risco	risco mínimo X	risco médio
risco baixo	risco maior	
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : Aproximadamente 20 meses.

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DA PESQUISADOR AO DOADOR SOBRE A PESQUISA CONSIGNADA:

O sistema sangüíneo ABO é o mais importante grupo sangüíneo na medicina transfusional. Atualmente a determinação do tipo sangüíneo dos doadores de sangue é feita somente através de testes rotineiros de laboratório.

Com o avanço dos estudos na área da biologia molecular, outros testes estão sendo desenvolvidos para aumentar ainda mais a segurança transfusional; esses testes são realizados com o DNA humano obtido de uma amostra de sangue, tornando o resultado muito mais fiel.

Logo podemos afirmar que, juntos esses dois testes se tornam um complemento valioso à determinação correta do grupo sangüíneo do doador e do receptor.

Os estudos realizados sobre o grupo sangüíneo A_3 e A_3B tem demonstrado um alto grau de heterogeneidade, uma vez que diversos eventos moleculares já foram associados a ele, sendo que apenas um pequeno número de amostras foram testadas até hoje.

O objetivo da pesquisa é justamente convidar o Sr. (a) para participar de uma pesquisa para investigação da freqüência e estudo dos eventos moleculares do grupo sangüíneo A em doadores de sangue. Para isso é preciso que o Sr. (a) concorde que possamos utilizar parte da amostra de sangue que já é coletado para os exames laboratoriais de rotina. As amostras de sangue serão acondicionadas em condições favoráveis para que no futuro, se necessário, possamos dispor de tais materiais para outros estudos.

A sua participação nesse estudo é muito importante. Isso não trará nenhum desconforto ou risco esperado pois será usada amostra de sangue já coletada regularmente durante a coleta de sangue. É importante lembrar que o Sr. (a) tem a liberdade de acessar qualquer informação sobre os procedimentos que estarão sendo realizados como também tirar todas as dúvidas sobre o assunto. Poderá também retirar o seu consentimento e/ou deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isso traga nenhum tipo de prejuízo à continuidade de sua assistência na Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. As informações obtidas durante essa pesquisa terão total sigilo e privacidade.

IV - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 200

assinatura do participante da pesquisa

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Referências

8 REFERÊNCIAS

Anstee DJ, Mallison G. The biochemistry of blood group antigens - some recent advances. *Vox Sang*. 1994; 67(suppl3):1-6.

Barjas-Castro MLR, Saad STO. Absence of the G871A mutation in A₃ blood donors from Brazil. *Transfusion*. 1997; 37(5):564.

Barjas-Castro ML, Carvalho MH, Locatelli MF, Bordin S, Saad STO. Molecular heterogeneity of the A₃ subgroup. *Clin Lab Haem*. 2000; 22(2): 73-8.

Batissoco AC, Novaretti MC, Bueno VJ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Easy method for determining the frequency of O1 and O2 alleles in Brazilian blood donors by PCR-RFLP. *Immunohematol*. 2001; 17(4):111-6.

Bennett EP, Steffensen R, Clausen H, Weghuis DO, Van Kessel AG. Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 206(1):318-25.

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.

Bird GW. Relationship of the blood sub-groups A₁, A₂ and A₂B to hemagglutinins presents in the seeds of *Dolichos biflorus*. *Nature*. 1952; 170(4329):674.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº.153 de 14 de junho de 2004. Normas técnicas para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, processamento, testagem, armazenamento, transporte, controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 2004 24 jun.;Seção 1:120.

Brecher ME. *Technical Manual*. 15thed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks; 2005. p.269-85.

Cartron JP, Colin Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol*. 2001; 8(3):163-99.

Chien-Feng S, Lung-Chih Y, Ding-Ping C, Ming-Lun C, Yuh-Ching T, Wei-Ting W, Lin M. Molecular genetic analysis for the *Ael* and *A3* alleles. *Transfusion*. 2003; 43(8):1138-44.

Chien-Feng S, Ding-Ping C, Ching-Ping T, Wei-Ting W, Jui-Ping L. Identification of a novel *A1O1* hybrid allele with G829A mutation in a chimeric individual of A_{el} B_{el} phenotype. *Immunohematol*. 2006; 46:780-89.

Cho D, Shin MG, Yazer MH, Kee SJ, Shin JH, Suh SP, Jeon MJ, Song, JW, Ki CS, Ryang DW. The genetic and phenotypic basis of blood group A subtypes in Koreans. *Transfus Med.* 2005; 15(4):329-34.

Clausen H, White T, Takio K, et. al. Isolation to homogeneity and partial characterization of a histo-blood group A defined Fuc α 1 $\rightarrow$ 2Gal α 1 $\rightarrow$ 3-N-acetylgalactosaminyltransferase from human lung tissue. *J Biol Chem.* 1990; 265(2):1139-45.

Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transplant Immunol.* 2005; 14(3-4):143-53.

Deng Zh, Yu Q, Wu GG, Lian YI, Su YQ, Li DC, Wang DM, Zhang SY. Molecular genetic analysis for Ax phenotype of the ABO blood group system in Chinese. *Vox Sang.* 2005; 89:251-6.

Denomme GA, Rios M, Reid ME. *Molecular Protocols in Transfus Med.* Academic Press; 2000. p.186.

Fischer GF, Fae I, Dub E, Pickl WF. Analysis of the gene polymorphism of ABO blood group specific transferases helps diagnosis of acquired B status. *Vox Sang.* 1992; 62:113-6.

Fukumori Y, Ohnoki S, Chibata H, Nishimukai H. Suballeles of the ABO blood group system in a Japanese population. *Hum Hered.* 1996; 46(2):85-91.

Glinsky GV, Ivanova AB, Welsh J, McClelland M. The role of blood group antigens in malignant progression, apoptosis resistance, and metastatic behavior. *Transfus Med Rev.* 200;14(4):326-50.

Grunnet N, Steffensen R, Bennet EP, Clausen H. Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a Danish population: frequency of a novel allele defined as O2. *Vox Sang.* 1997; 67:210-5.

Hakomori, SI. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res.* 1989; 52:257-331.

Hansen T, Namork E, Olsson ML, Chesser MA, Heier HE. Different genotypes causing indiscernible patterns of A expression on A_{el} red blood cells as visualized by scanning immunogold electron microscopy. *Vox Sang.* 1998; 75(1):47-51.

Henry SM, Samuelsson BE. ABO polymorphisms and their putative biological relationships with disease; in King M-J (ed.): *Human Blood Cells: Consequences of Genetic Polymorphisms and Variation*, Chapter 2. London, Imperial College Press, 2000:15-103.

Honing CL, Bowe JR. Transfusion-associated fatalities:review of Bureau of Biologics reports 1976-1978. *Transfusion*. 1980; 20:653-61.

Issitt PD, Anstee DJ. *Applied blood group serology*.4Th ed. Montgomery Scientific Publications; 1998. p.175-89.

Kang SH, Fukumori Y, Ohnoki S, Shibata H, Han KS, Nishimukai H, Okubo Y. Distribution of ABO genotypes and allele frequencies in a Korean population. *Jpn J Hum Genet*. 1997; 42(20):331-5.

Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, Drot C. The gel test: a new way to detect red blood cell antigen-antibody reactions. *Transfusion*. 1990; 30(2):109-13.

Larsen RD, Enst LK, Nair RP, Lowe JB. Molecular cloning sequence, and expression of a human GPD-L-fucose: B-D-galactose 2 alfa-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(17):6674-8.

Lee AH, Reid ME. ABO blood group system: a review of molecular aspects. *Immunohematol*. 2000; 16: 1-6.

Lowe JB. *The blood group-specific human glycosyltransferases*. In: Tanner MJA, Anstee DJ (eds). *Baillieres Clin Haematol*. Oxford. 1993; 6(2):465-92.

Martinko JM, Vincek V, Klein D, Klein J. Primate ABO glycosyltransferases: evidence for trans-species evolution. *Immunogenetics*. 1993; 37:274-8.

Matson GA, Sutton E, Pessoa EM, Swanson J, Robinson A. Distribution of hereditary blood groups among indians in South America. *Am J Phys Anthropol*. 1970; 28(3):303-30.

Mollison PL, Engelfriet CP. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10th ed. London: Blackwell Science Publications; 1997. p.149-75.

Nalbandian RM. Dithionite tube test: A rapid, inexpensive technique for the detection of hemoglobin S and non-S sickling hemoglobin. *Clin Chem*. 1971; 17(10):1208-71.

Novaretti MC, Batissoco AC, Bueno VJ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Solving an ABO complex discrepancy by rapid genotyping using PCR-RFLP. *Transfusion*. 2000; 40:113.

Novaretti MC, Silveira EJ, Filho EC, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Comparison of tube and gel techniques for antibody identification. *Immunohematol*. 2001;17(4):138-41.

Ogasawara K, Bannai M, Saitou N, Yabe R, Nakata K, Takenaka M, Fujisawa K, Uchikawa M, Ishikawa Y, Juji T, Tokunaga K. Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Hum Genet.* 1996a; 97:777-83.

Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, Saitou N, Bannai M, Nakata K, Takenaka M, Fujisawa K, Ishikawa Y, Juji T, Tokunaga K. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood.* 1996b; 88:2732-7.

Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, Bannai M, Nakata K, Takenaka M, Takahashi Y, Yuji T, Takunaga K. Different alleles cause an imbalance in A₂ and A₂B phenotypes of the ABO blood group. *Vox Sang.* 1998; 74:242-7.

Olsson ML, Chester MA. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O2 versus A/O2 discriminating nucleotide at the ABO locus. *Vox Sang.* 1995; 69:242-47.

Olsson ML, Chester MA. Polymorphisms at the ABO locus in subgroup A individuals. *Transfusion.* 1996; 36:309-13.

Olsson ML, Chester MA. Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfus Med.* 2001; 11:295-313.

Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, Helberg A, Moulds MK, Sareneva H, Chester MA. 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.

Pearson SL, Hessner MJ. A(1,2) BO(1,2) genotyping by multiplexed allele-specific PCR. *Br J Haematol*. 1998; 100:229-34.

Reed TE. Distributions and tests of Independence of seven blood group systems in a large multiracial sample from California. *Hum Genet*. 1968; 20:142-50.

Reid ME, Bird GWG. Associations between human red cell blood group antigens and disease. *Transf. Med*. 1990; 4:47-55.

Reid ME. Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion*. 2003; 43:1748-57.

Salmon C, Cartron JP, Rouger P. *The human blood groups*. New York: Masson Publishing; 1984. p.56-80.

Schenkel-Brunner H. *Human blood groups. Chemical and biochemical basis of antigen specificity*. 2nd ed. New York: Springer Viena; 2000. p.67-135.

Seltsam A, Hallensleben M, Eiz-Vesper B, Lenhard V, Heymann G, Blasczyk R. A weak blood group A phenotype caused by a new mutation at the ABO locus. *Immunohematol.* 2002; 42:294-00.

Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, Blasczyk R. The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood.* 2003a; 03:03-34.

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. *Immunohematol.* 2003b; 43:428-39.

Seltsam A, Das Gupta C, Wagner FF, Blasczyk R. Nondeletional ABO *O alleles expressed weak blood group A phenotypes. *Immunohematol.* 2005; 45:359-65.

Seltsam A, Das Gupta C, Bade-Doeding C, Blasczyk R. A weak blood group A phenotype caused by a translation-initiator mutation in the ABO gene. *Immunohematol.* 2006; 46:434-40.

Silberstein L, Spitalnik SL. *Blood group antigens and antibodies.* In: Rossi E. Principles of transfusion medicine. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1991; 63-78.

Storry JR. Review: the function of blood group - specific RBC membrane components. *Immunohematol.* 2004; 20(4):206-16.

Svensson L, Rydberg L, Hellberg A, Gilliver LG, Olsson ML, Henry SM. Novel glycolipid variations revealed by monoclonal antibody immunochemical analysis of weak ABO subgroups of A. *Vox Sang.* 2005; 89:27-38.

Suzuki K. ABO blood group alleles and genetic recombination. *Leg Med.* 2005; 7:205-12.

Takahashi K, Saito K. Present status of ABO – incompatible kidney transplantation in Japan. *Xenotransplantation* 2006; 13 (2):118-22.

Toivanen P, Hirvonen T. Iso-and heteroagglutinins in human fetal and neonatal sera. *Scand J Haematol.* 1969; 6:42-8.

Tsai L, Kao L, Chang J, Lee H, Linacre A, Lee JC. Rapid identification of the ABO genotypes by their single-stand conformation polymorphism. *Electrophoresis.* 2000; 21:537-40.

Watkins WM, Greenwell P, Yates AD, Johnson PH. Regulation of expression of carbohydrate blood group antigens. *Biochimie.* 1998; 70:1597-611.

Widman FK. *Standards for blood banks and transfusion medicine services*. 23rd ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2005. p.182-5.

Yamamoto F, Hakomori S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferase is based on amino acid substitutions. *J Biol Chem*. 1990; 265:19257-62.

Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*. 1990a; 345:229-33.

Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, White T, Clausen H, Hakomori S. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc:fuc-alpha1-2Gal alpha1-3GalNAc transferase (histo-blood group a transferase) mRNA. *J Biol Chem*. 1990b; 265:1146-51.

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 results in a additional domain at the carboxyl terminal. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 187:366-74.

Yamamoto F, McNeil PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T, Judd WJ, Davenport RD. Molecular genetic analysis of the ABO blood system: I. Weak subgroups: A₃ and B₃ alleles. *Vox Sang*. 1993a; 64:116-9

Yamamoto F, McNeil PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T. Molecular genetic analysis of the ABO blood system: III. *A_x* and *B(A)* alleles. *Vox Sang.* 1993b; 64:171-4.

Yamamoto F, McNeil PD, Kominato Y, et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood system: II. *Cis-AB* alleles. *Vox Sang.* 1993c; 64:120-3.

Yamamoto F, McNeill P, Yamamoto M, Hakomori S, Bromilow I, Duguid JKM. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: IV. Another type of *O* allele. *Vox Sang.* 1993d; 64:175-8.

Yamamoto F. Molecular genetics of the ABO histo-blood group. *Vox Sang.* 1995; 69:1-7.

Yamamoto F, McNeil PD, Hakomori S. Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology.* 1995; 5:51.

Yamamoto F, Mac Neill PD. Amino acid residue at codon 268 determines both activity and nucleotide-sugar donor substrate specificity of human histo-blood group A and B transferases. In vitro mutagenesis study. *J Biol Chem.* 1996; 271:10515-20.

Yamamoto F. Molecular genetics of ABO. *Vox Sang.* 2000; 78:91-103.

Yamamoto F. Cloning and regulation of the *ABO* genes. *Transfus Med.* 2001; 11:281-94.

Yip SP. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common *ABO* alleles and readily identifies new alleles. *Blood.* 2000; 95:1487-92.

Yip SP, Choi PS, Lee SY, Leung KH, El-Zawahri MM, Luqmani YA. *ABO* blood group in Kwaitis: detailed allele frequency distribution and identification of novel alleles. *Immunohematol.* 2006; 46(5):773-9.

Yu LC, Twu YC, Chou ML, Chang CY, Wu CY, Lin M. Molecular genetic analysis for the *B3* allele. *Blood.* 2002; 100:1490-2.

Zago MA, Tavella MH, Simões BP, Franco RF, Guerreiro JF, Santos SB. Racial heterogeneity of DNA polymorphisms linked to the *A* and the *O* alleles of the *ABO* blood group gene. *Ann Hum Genet.* 1996; 60:67-72.

Apêndices

Apêndice 1 – Resultado de genotipagem das regiões 467,829,871 e 1060 do exon 7 do gene *ABO* por PCR-Alelo específico em amostras de doadores de sangue classificadas sorologicamente como de grupo A₃.

Número da amostra	Região 467 (C>T)	Região 829 (G>A)	Região 871 (G>A)	Região 1060 (del C)	Provável genótipo
03	+	-	-	+	A304 [§]
48	-	+	+	+	A302/A301
53	+	+	-	+	A302/A302
54	+	+	+	+	A30*/
77	-	+	+	+	A302/A301
80	+	+	+	+	A30*/
90	+	+	-	-	Ae107/O02
94	+	+	+	+	A30*/
99	+	+	+	+	A30*/
100	+	+	+	+	A30*/
104	+	-	-	-	A208 **
111	+	+	+	+	A30*/
128	-	-	+	+	A301/A301

A30* = “novo” alelo A3 a ser confirmado por seqüenciamento

** a ser confirmado por seqüenciamento.

[§] necessita do estudo de região adicional 539 (539G>A)

Apêndice 2 – Resultado de genotipagem das regiões 467,829,871 e 1060 do exon 7 do gene *ABO* por PCR-Alelo específico em amostras de doadores de sangue classificadas sorologicamente como de grupo A₃B.

Número do cadastro	Região 467 (C>T)	Região 829 (G>A)	Região 871 (G>A)	Região 1060 (del C)	Provável genótipo
01	+	+	+	+	A30*/B10*
02	+	+	+	+	A30*/B10*
04	-	+	+	+	A302/B104
05	-	+	+	-	A204/B104
06	-	+	+	+	A302/B104
07	-	+	+	+	A302/B104
08	+	+	+	+	A30*/B10*
09	+	+	+	+	A30*/B10*
10	+	+	+	+	A30*/B10*
19	+	+	+	+	A30*/B10*
20	-	+	+	+	A302/B104
21	+	+	+	+	A30*/B10*
22	+	+	+	+	A30*/B10*
24	+	+	+	+	A30*/B10*
26	+	+	+	+	A30*/B10*
27	+	+	+	+	A30*/B10*
28	-	+	-	+	A302/B101
29	+	+	+	+	A30*/B10*
30	+	+	+	+	A30*/B10*
31	+	+	+	+	A30*/B10*
32	+	+	+	+	A30*/B10*
33	+	+	-	+	A302/B10*
34	+	+	+	+	A30*/B10*
35	-	+	+	+	A302/B104
36	+	+	+	+	A30*/B10*
37	+	+	+	+	A30*/B10*
38	+	+	+	+	A30*/B10*
40	+	+	+	+	A30*/B10*
44	+	+	+	-	Ael07/B104
45	+	+	+	+	A30*/B10*
46	+	+	+	+	A30*/B10*
47	+	+	+	+	A30*/B10*
49	+	+	+	+	A30*/B10*

Número do cadastro	Região 467 (C>T)	Região 829 (G>A)	Região 871 (G>A)	Região 1060 (del C)	Provável genótipo
50	-	+	+	+	A302/B104
51	-	+	+	+	A302/B104
52	+	+	+	+	A30*/B10*
55	+	+	+	+	A30*/B10*
57	+	+	+	+	A30*/B10*
58	+	+	+	+	A30*/B10*
59	+	+	+	+	A30*/B10*
60	+	+	+	+	A30*/B10*
61	+	+	+	+	A30*/B10*
62	+	-	+	+	A304/B104
63	+	-	+	+	A304/B104
64	+	+	+	+	A30*/B10*
65	+	-	+	+	A304/B104
66	+	-	-	+	A304/B101
67	+	+	+	+	A30*/B10*
68	+	-	+	+	A304/B104
69	+	+	+	+	A30*/B10*
70	+	-	+	+	A304/B104
72	-	+	+	+	A302/B104
73	+	-	+	+	A304/B104
74	+	+	+	-	Ael07/B104
75	+	+	+	+	A30*/B10*
76	+	+	+	-	Ael07/B104
78	+	+	+	+	A30*/B10*
79	+	+	+	+	A30*/B10*
81	+	+	+	+	A30*/B10*
82	+	+	+	-	Ael07/B104
84	+	+	+	+	A30*/B10*
89	+	+	+	+	A30*/B10*
96	+	+	+	+	A30*/B10*
97	+	+	+	+	A30*/B10*
98	+	+	+	+	A30*/B10*
101	+	+	+	+	A30*/B10*
102	+	+	+	-	Ael07/B104
103	+	+	+	+	A30*/B10*
105	+	+	+	+	A30*/B10*
106	+	+	+	+	A30*/B10*
108	+	+	+	-	Ael07/B104
109	+	+	-	-	A201/Cis-AB01
110	+	+	-	+	A302/B305
114	+	+	+	+	A30*/B10*
115	+	+	+	-	Ael07/B104
116	-	+	-	+	A302/B101

Número do cadastro	Região 467 (C>T)	Região 829 (G>A)	Região 871 (G>A)	Região 1060 (del C)	Provável genótipo
117	+	+	-	+	A302/B305
118	-	+	+	+	A302/B104
119	-	+	+	+	A302/B104
121	-	+	+	+	A302/B104
122	-	+	+	+	A302/B104
123	-	+	+	+	A302/B104
124	+	+	+	+	A30*/B10*
125	-	+	+	+	A302/B104
126	-	-	+	+	A30*/B10*
128	-	+	+	+	A302/B104
129	+	+	+	+	A30*/B10*

Apêndice 3 – Trabalhos e publicações

Novaretti MCZ, Domingues AE, Pares MMNS, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Rapid detection of 871G>A mutation by sequence specific PCR in A301 blood donors. *Blood* 46th ASH The American Society of Hematology Annual Meeting, volume 104-(11);111b, Abstrac 4098;San Diego-California, 2004.

Domingues AE, Pares MMNS, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF, Novaretti MCZ. Sequence specific primers detection of 871G>A mutation in A₃ and A₃B brazilian blood donors. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2004; volume 26-(2); 829:271.

Novaretti MCZ, Pares MMNS, Domingues AE, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. First exemple of A3 blood donor due to 871G>A mutation. *Transfusion*.2003;43:94.

Novaretti MCZ, Domingues AE, Pares MMNS, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Primeiro exemplo de doador de grupo sanguíneo A3 devido à mutação 871G>A. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2003; volume 25-(2); 768:233.