FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

UNICAMP

EDUARDO DARUGE JÚNIOR
CIRURGIÃO-DENTISTA
MESTRE EM CIÊNCIAS

INTERAÇÃO DOS SISTEMAS ABO, LEWIS E FATORES GRUPO - ESPECÍFICOS DA SALIVA E SUA IMPORTÂNCIA PERICIAL.

ORIENTADOR: DR. ROBERTO JOSÉ GONÇALVES

Esta tese foi apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Área de Odontologia Legal e Deontologia.

PIRACICABA
- 1998 -

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
- UNICAMP-

EDUARDO DARUGE JÚNIOR
CIRURGIÃO-DENTISTA
MESTRE EM CIÊNCIAS

INTERAÇÃO DOS SISTEMAS ABO, LEWIS E FATORES GRUPO - ESPECÍFICOS DA SALIVA E SUA IMPORTÂNCIA PERICIAL.

ORIENTADOR: DR. ROBERTO JOSÉ GONÇALVES

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Área de Odontologia Legal e Deontologia.

PIRACICABA
- 1998 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
Nº CHAMADA:
TD/Daruge J.
D257i
V. Ex.
TOMBO BC/34299
PROC. 395/98
D [x]
PREÇO R$ 11,00
DATA 11/09/98
Nº CPD

CM-00116388-2

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

D257i

Daruge Júnior, Eduardo.
Interação dos sistemas ABO, Lewis e fatores grupo-específicos da saliva e sua importância pericial. / Eduardo Daruge Júnior. - Piracicaba, SP : [s.n.], 1998. 90f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Roberto José Gonçalves.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Saliva. I. Gonçalves, Roberto José.
II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

UNICAMP **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Doutorado**, em sessão pública realizada em 17/06/98, considerou o candidato EDUARDO DARUGE JUNIOR aprovado.

1.Roberto José Gonçalves _____

2.Nelson Massini _____

3.Eduardo Daruge _____

4.Miguel Morano Junior _____

5.Nemre Adas Saliba _____

DEDICO ESTE TRABALHO

A minha querida e adorável esposa Maisa pelo carinho dispensado durante todos estes anos.

A minha mãe Cleonice (in memorian), pela compreensão e apoio que a mim devotou durante muitos anos.

Ao meu pai Dr. Eduardo Daruge, pelos ensinamentos e mensagens a mim transmitidos.

Aos meus queridos filhos Daruge Neto e Fernando pelo estímulo constante.

Ao Professor

Dr. Roberto José Gonçalves

Por toda a orientação, atenção, carinho e paciência a mim dispensados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

a ***DEUS***

Por poder contar sempre com sua ajuda e a de meus amigos leais e sinceros.

AGRADECIMENTOS

* À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas de seu Diretor, Prof. Dr. José Ranali e Diretor associado, Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida.

* A Profa. Dra. Altair A . Del Bel Cury, Coordenadora Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

* Ao amigo Prof. Dr. Nelson Massini, Professor Titular desta Faculdade da Unicamp pelas inúmeras horas a mim dispensadas.

* Aos Professores do Curso de Mestrado em Odontologia Legal e Deontologia em especial ao Prof. Dr. Miguel Morano Júnior, pela confiança e apoio a mim depositados.

* A Sônia e Silvia da Pós - Graduação da FOP/UNICAMP, pelos muitos préstimos a mim ofertados.

* A Bibliotecária Sueli Duarte Oliveira Soliani, pela presteza e atenção na revisão da literatura deste trabalho.

* Aos grandes amigos, Luiz Francesquini Júnior e Mônica Francesquini, Companheiros leais e sinceros de tantas e tantas jornadas, pelo companheirismo e estímulo constante.

* Ao meu querido irmão Darujão, pela ajuda e companhia nas horas difíceis.

* Ao grande colega Casimiro, pelas sugestões, colaboração e interesse sempre presentes.

- Aos grandes amigos Marcelo Valdrighi e Ricardo T. Yokoyama pela imensurável ajuda e colaboração.

* Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Legal e Deontologia pelas horas de conforto e pela amizade a mim demonstrada, em especial às queridas amigas **Dinoly Albuquerque Lima e Célia Regina Manesco.**

* Aos funcionários desta Faculdade, que muito me ajudaram para a conclusão deste trabalho:

* João Batista Leite de Campos
* Paulo do Amaral
* Pedro Sérgio Justino
* Paulo Roberto Rizzo do Amaral

* Meus sinceros agradecimentos a todos que direta e indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULOS	pg
LISTAS	**01**
I. FIGURAS	**02**
RESUMO	**03**
INTRODUÇÃO	**06**
PROPOSIÇÃO	**17**
REVISTA DA LITERATURA	**19**
MATERIAIS E MÉTODOS	**49**
RESULTADOS	**59**
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	**69**
CONCLUSÕES	**79**
SUMMARY	**81**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	**84**

LISTAS

LISTAS

I – QUADROS E TABELAS

NÚMERO	ASSUNTO	PÁGINA
Tabela nº01	Sequência de bases-Combinações possíveis.....	09
Quadro nº01	Resumo demonstrativo dos resultados.....	60
Quadro nº02	Resumo demonstrativo dos resultados.....	61
Quadro nº03	Resumo demonstrativo dos resultados.....	62
Quadro nº04	Resumo demonstrativo dos resultados.....	63
Quadro nº05	Resumo demonstrativo dos resultados.....	64
Quadro nº06	Resumo demonstrativo dos resultados.....	65
Quadro nº07	Resumo demonstrativo dos resultados.....	66
Quadro nº08	Resumo demonstrativo dos resultados.....	60

RESUMO

RESUMO

Até a presente data, vários trabalhos foram realizados no sentido de investigar a existência ou não de uma interação entre os grupos sanguíneos do Sistema ABO, os fenotipos do Sistema Lewis e os fatores grupo-específicos secretados ou não pela saliva humana. Neste trabalho, utilizamos amostras de sangue e de saliva de 60 indivíduos que compareceram na Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, para se submeterem a exames de investigação de paternidade por determinação judicial. Após a utilização das referidas amostras, o restante do material foi empregado neste experimento. A partir das amostras de suspensão de hemácias foram tipados os antígenos do Sistema ABO, isto é, os tipos sanguíneos A, B, AB e O, os Fatores Rh positivo e negativo, os fenótipos do Sistema Lewis (Le^a e Le^b) e a substância H, utilizando-se os soros Anti-A, Anti-B, Anti-Le^a, Anti-Le^b e soro de Lectina Anti-H, todos adquiridos da Biotest S/A. Todos os testes foram realizados de acordo com as técnicas preconizadas pelo fabricante dos soros empregados neste experimento, tendo sido feitos controles, com suspensão de hemácias já conhecidas e fornecidas gentilmente pela Biotest S/A, evitando-se assim erros na interpretação dos resultados. A determinação da função secretora ou não secretora das substâncias ABH, foi realizada pela técnica da isoaglutinação descrita por FERREIRA [13] e por BEIGUELMAN[3]. Os resultados comprovam a existência de uma interação entre o fenotipo Le^b e a função secretora das substâncias ABH, pois não foi identificado nenhum caso, na amostra estudada, de secretor com fenotipo Le^{a+}. A função não secretora destas substâncias, pela saliva humana, está mais

relacionada com o fenotipo Le^a, embora verificamos alguns casos de indivíduos não secretores com os fenotipos Le^{a-b-}. Nos indivíduos pertencentes ao grupo sanguíneo AB, verificamos que a função secretora ou não secretora, dos fatores grupo-específicos da saliva, constitui uma especificidade dos fenotipos A e B, de forma totalmente independente.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A síntese proteica é um dos mecanismos mais fascinantes da biologia humana. Os avanços alcançados nos últimos anos revelaram a importância desse fenômeno nos processos de manutenção celular, crescimento e desenvolvimento.

O primeiro passo na síntese proteica é a transcrição do gene codificador da proteina numa molecula de RNA mensageiro, com base na lei da Complementariedade. A síntese é iniciada num sítio específico no DNA, conhecido como iniciador "promotor", e continua abrangendo as bases subseqüentes, numa extensão que pode atingir um milhão de pares de bases. A inclusão de novos nucleotídeos continua até que o RNA polimerase, enzima responsável pela síntese, encontra uma certa seqüência de bases, conhecidas como seqüência de determinação.

O RNA primário é submetido a um processo de suma importância, conhecido como processamento do RNA, onde a molécula sofre adição de bases em suas extremidades e, concomitantemente, os introns, sequências de nucleotídeos não codificadores, são deslocados, ficando expostos à sintese proteica somente os extrons codificadores.

Assim o RNA é transformado numa molécula colinear pronta para a etapa subseqüente, isto é, a tradução.

O êxito na produção de uma proteina específica, se baseia no relacionamento dos aminoácidos com combinações de três bases adjacentes do RNA. Essa formação de três bases é conhecida como ***códon*** e determina a incorporação de um certo aminoácido.

Tendo em vista que quatro bases nitrogenadas participam na síntese dos DNAs (A, G, C e T), e lembrando que a escolha de cada aminoácido é determinado por uma sequência de três bases, teremos então as seguintes combinações possíveis, baseadas na seguinte fórmula ($4^3 = 64$), conforme tabela nº 1:

TABELA 01: Sequência de bases – combinações possíveis.

1ª base			2ª base						3ª base
	U	aa	C	aa	A	aa	G	Aa	
U	UUU	phe	UCU	ser	UAU	tyr	UGU	Cys	U
	UUC	phe	UCC	ser	UAC	tyr	UGC	Cys	C
	UUA	leu	UCA	ser	UAA	pare	UGA	Pare	A
	UUG	leu	UCG	ser	UAG	pare	UGG	Trp	G
C	CUU	leu	CCU	pro	CAU	his	GGU	Arg	U
	CUC	leu	CCC	pro	CAC	his	CGC	Arg	C
	CUA	leu	CCA	pro	CAA	glr	CGA	Arg	A
	CUG	leu	CCG	pro	CAG	glr	CGG	Arg	G
A	AUU	ile	ACU	tha	AAU	asr	AGU	Ser	U
	AUC	ile	ACC	thr	AAC	asr	AGC	Ser	C
	AUA	ile	ACA	thr	AAA	lys	AGA	Arg	A
	AUG	met	ACG	thr	AAG	lys	AGG	Arg	G
G	GUU	val	GCU	ala	GAU	asp	GGU	Gly	U
	GUC	val	GCC	ala	GAC	asp	GGC	Gly	C
	GUA	val	GCA	ala	GAA	glu	GGA	Gly	A
	GUG	val	GCG	ala	GAG	glu	GGG	Gly	G

Na tabela 1, observa-se claramente que alguns aminoácidos são representados por mais de um códon. Na realidade, a terceira base, em alguns casos, pode ser alterada sem afetar a escolha do aminoácido. Muitas vezes, em poucos casos, a terceira base pode ser qualquer uma das quatro citadas, sem que isso acarrete nenhuma mudança. Este fato é conhecido como degeneração do código genético.

O fenômeno da degeneração mostra que nem todas as alterações de nucleotídeos, que ocorrem no código genético, resultam em alterações estruturais na proteína formada. Em outros casos, algumas mutações produzem uma alteração na seqüência de aminoácidos, no polipeptídeo codificado, mas sem efeito significante sobre sua estrutura tridimensional e, conseqüentemente, sua função. Essas alterações não chegam a se manifestarem fenotipicamente. A degeneração do código genético pode, ainda, produzir um terceiro tipo de alteração dos nucleotídeos, que produz efeitos detectáveis na estrutura protéica. Mas, nesse tipo de modificação, o indivíduo conserva sua capacidade de sobrevida e adaptabilidade ao meio onde vive. As alterações na estrutura proteica, nesse caso, são consideradas variações genéticas, nas populações.

Os exemplos mais antigos das variações genéticas na estrutura proteica, são os antígenos dos grupos sanguíneos. Utilizando métodos sorológicos simples, Landsteiner, em 1900, apud in PROKOP[25] descreveu as variações, atualmente conhecidas como as alterações nos "locus", dos grupos sanguíneos do Sistema ABO no cromossomo 9.

Após a descoberta dos grupos sanguíneos do Sistema ABO, em 1900, por Karl Landsteiner, apud PROKOP[25] , outros sistemas tem sido descobertos, demonstrando a complexidade da existência de substâncias antigênicas que compõem o nosso organismo.

Entretanto, apesar da importância que todas essas substâncias apresentam no desenvolvimento das atividades periciais, dedicaremos o presente trabalho ao estudo das relações de dependência e interdependência dos antígenos do Sistema ABO, do Sistema Lewis e suas relações com os fatores grupo-específicos da saliva, ressaltando a importância desses elementos na investigação pericial.

O Sistema Lewis foi descoberto por MOURANT, em 1946, apud BEILGUEMAN [(3)], que descreveu um anticorpo, no soro de uma mulher, Sra. Lewis, denominado anti-Le^a, que aglutinava as hemácias de cerca de 22% dos indivíduos caucasóides europeus. Posteriormente, em 1948, ANDRESEN, apud BEIGUELMAN[(3)] , descreveu um outro

anticorpo denominado Le^b, com características semelhantes, o qual, à semelhança da maioria dos anticorpos anti-Le^b, descobertos posteriormente, apresentava reações mais intensas com hemácias tipos O ou A_2.

Concomitantemente às inúmeras descobertas de várias substâncias antigênicas, IAMAKANI, em 1926, apud FERREIRA [13] demonstrou a existência de substâncias grupo-específicas na saliva humana.

Embora vários autores já houvessem demonstrado a presença dos fatores grupo-específicos nos líquidos orgânicos humanos, foram principalmente LEHRS e PUTKONEN, apud FERREIRA[13], os cientístas que demonstraram a existência destas substâncias em maior concentração na saliva.

No período entre 1924 e 1941, vários trabalhos foram realizados, demonstrando que os antígenos do Sistema ABO não estavam exclusivamente nas hemácias, podendo-se encontrá-los em todos os tecidos, exceto o nervoso, sob a forma álcool solúvel (glicolipídios). As formas hidrossoluveis dos antígenos do Sistema ABO (glicoproteinas), também podem ou não serem encontradas na maioria dos líquidos orgânicos, tais como, saliva, lágrima, plasma sanguíneo e esperma. Assim, os indivíduos que apresentam estas substâncias

hidrossolúveis, A, B e H, nos líquidos do organismo, são denominados de secretores das substâncias ABH, ou, simplesmente, secretores, e aqueles que não apresentam estas substâncias são denominados não secretores. Dessa forma, todos os indivíduos denominados secretores possuem nos seus líquidos orgânicos a substância H, sendo que os indivíduos pertencentes aos grupos sanguíneos A, B ou AB, além da substância H, possuem também as substâncias grupo-específicas A, B ou A+B respectivamente. Os indivíduos não secretores, não apresentam estas substâncias nos líquidos orgânicos.

Em 1940, SCHIFF [29], demonstrou o comportamento genético dos indivíduos secretores e dos não secretores. O autor constatou que o secretor é dominante em relação ao não secretor, sendo transmitidos, hereditariamente, por um par de alelos autossômicos e representados pelos fenótipos Se para os secretores e se para os não secretores e pelos genótipos SeSe ou Sese, para os secretores e sese para os não secretores.

GARDAS e KOSCIELAK apud in PROKOP[25] demonstraram que os antígenos do Sistema ABO, nos secretores, são encontrados nas hemácias sob as formas glicolipídica e glicoprotéica, sendo que, nos indivíduos não secretores, estes antígenos são encontrados sob a forma glicolipídica.

Em 1948 e 1951, GRUBB [17 e 18], em 1950, BRENDEMOEN [8], e em 1986, ERIKSSON [11] et al., comprovaram que o Sistema Lewis estava diretamente relacionado com o caráter secretor e não secretor dos indivíduos.

Em princípio, e de acordo com a opinião destes autores, os indivíduos poderiam ser separados em três grupos: os não secretores, que são portadores do alelo Le^{a+b-}, os secretores, que são portadores do alelo Le^{a-b+}, e aqueles que, na maioria se apresentavam secretores, eram portadores dos alelos Le^{a-b-}. Entretanto, não era possível se afirmar a existência de uma relação entre o Sistema Lewis e a característica secretora ou não secretora dos indivíduos, uma vez que, tanto a saliva dos indivíduos portadores do alelo Le^{a+}, quanto a saliva dos indivíduos portadores do alelo Le^{a-}, absorviam o anticorpo anti Le^{a}, apesar que a saliva dos indivíduos portadores do alelo Le^{a-} inibisse o anticorpo anti Le^{a} mais fracamente caracterizando, assim, uma pequena diferença nas propriedades antigênicas entre a saliva dos indivíduos portadores do alelo Le^{a+} e Le^{a-}.

Em 1983, SAGISAKA[27] et al. ressaltaram a importância do estudo da distinção entre o antígeno H da saliva e o antígeno H das hemácias na prática forense, demonstrando a possibilidade de se diferenciar manchas de sangue e de saliva, através dos soros anti-Hr

para identificar a presença de sangue e anti-Hs para identificar a presença de saliva.

GRUBB [17], em 1948, e BRENDEMOEN [18], em 1949, relataram uma série de observações de grande importância. Segundo esses autores os indivíduos Le(a-b+) eram sercretores, e os indivíduos Le(a+b-) eram não secretores e os indivíduos Le(a-b-) eram na maioria secretores. Segundo BEIGUELMAN [3], esses dados não permitem estabelecer uma associação direta entre a secreção ou não secreção de substâncias grupo-específicas ABH e o Sistema Lewis. Uma análise mais profunda, do ponto de vista bioquímico, mostra uma possível relação entre a secreção ou não de substâncias grupo-específicas ABH e a presença ou ausência do fator a. A semelhança de outros mecanismos biológicos, a condição secretora pode representar o estado natural do sistema, isto é, a natureza de todos os seres é de serem secretores. A presença de um fator X, induzia a inibição do sistema e resulta na condição não secretora. Se considerarmos que a+ indica a presença deste fator e a- a ausência dele, podemos compreender de maneira mais clara, as observações de GRUBB [17] e BRENDEMOEN [8].

A conversão das hemácias Le(a-) em Le(a+) após serem incubadas por 24 horas em plasma de indivíduos Le(a+) relatada por

Smeath e Smeath em 1955 apud in BEIGUELMAN [3] em 1979., não significa mudança dos caracteres genéticos das hemácias convertidas. Como foi mencionado anteriormente, a expressão genética se manifesta na produção de proteinas específicas codificadas nos genes. A absorção ou adsorção do polipeptídeo, que caracteriza o alelo a+ pelas hemácias Le (a-) faz com que elas se comportem como se fossem Le(a+), porém isso não significa nenhuma mudança na sua composição gênica. A verdadeira mudança das características genéticas ocorrem somente quando há uma alteração na estrutura do seu genoma, alteração esta que deve ser estável e transmitida através dos processos de divisão celular.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem por objetivo avaliar as relações das propriedades antigênicas existentes entre os antígenos dos Sistema ABO, do Sistema Lewis e dos fatores grupo-específicos da saliva, bem como a dependência e a interdependência destes três sistemas, na sua formação fenotípica, e sua importância pericial.

REVISTA DA LITERATURA

REVISTA DA LITERATURA

FERRI [14], et al, em 1922, demonstraram que 78% da população dos E.U.A. secretam, na saliva, substâncias da mesma especificidade de sua hemácias. Informam que a síntese das substâncias A,B e H é dirigida pelos respectivos genes A, B e H, sendo que o aparecimento, na saliva, é regulado pelo gene secretor Se. Segundo os autores, os heterozigotos Sese e os homozigotos SeSe são secretores e os homozigotos sese não apresentam essas substâncias na saliva e são chamados não secretores. Descrevem a existência de uma relação entre a substância H e o Sistema Lewis, com as especificidades L^a e L^b. Segundo os autores, na presença do gene Se (secretor), a substância Lewis usualmente aparece na forma Le^b, tanto no soro como nos eritrócitos, e ambas as substâncias, Le^a e Le^b aparecem na saliva. Os autores afirmam, também, que indivíduos com genótipo sese e com pelo menos um gene Le, apresentam, somente, a substância Le^a, tanto na saliva como nos eritrócitos.

SCHIFF [29], em 1940, estudou a ocorrência dos secretores e não secretores em dois grupos de 580 indivíduos brancos de Berlim,

Alemanha e Nova Iorque, e também um grupo de 367 negros. Utilizando a técnica de inibição da aglutinação através de saliva, hemácias e anti-soros humanos, o autor estabeleceu que na saliva de um secretor são encontradas substâncias específicias do grupo sanguíneo A ou B, de acordo com as características do indivíduo e, nos indivíduos não secretores, há ausência das substâncias específicas referente ao grupo sanguíneo das células vermelhas e na saliva. Tal característica é mendeliana. No estudo, a porcentagem de secretores encontradas entre os brancos foi de 78% em Berlim, 82,4% em Nova Iorque, e 61,2% entre os negros.

GRUBB [17], em 1948, demonstrou a íntima relação entre as características secretoras e o grupo sanguíneo de Lewis, estabelecendo que todo indivíduo portador do fenótipo Le(a-b+) é secretor das substâncias ABH, enquanto que os indivíduos Le(a+b-) são não secretores das substâncias ABH. Sessenta e duas amostras de saliva e de sangue foram analisadas atraves de soros anti-Lewis e testes de inibição da aglutinação. Vinte das amostras estudadas, eram portadores do fenótipo Lewis positivo e quarenta e duas eram portadoras do fenótipo Lewis negativo. Para a pesquisa das substâncias grupo-específicias na saliva, o autor empregou, basicamente, dois métodos. O primeiro, denominado de análise quantitativa, onde procurava estabelecer a quantidade das substâncias ABH nas secreções, e o segundo, denominado de análise qualitativa, no qual o autor procurava

demonstrar a presença ou ausência destas substâncias. Neste trabalho, o autor observou a existência de uma nítida relação entre os grupos sanguíneos do Sistema Lewis e o caráter secretor e não secretor nos indivíduos examinados.

BRENDEMOEN [8], em 1950, realizou um trabalho baseado em quatro soros Anti-Le(a) e dois soros Anti-Le(b), que foram usados para estudar a distribuição das substâncias Le(a) e Le(b) na saliva e no soro e suas relações com as células vermelhas e os fenótipos Le(a+b-) e Le (a-b+). Foram estudadas duzentas e tres amostras de sangue dos grupos A1, A2 e O, testados por meio de um Anti-Le(b) AAGAARD, que aglutinou sangue dos tipos A1, A2 e O, com a mesma freqüência e por meio de quatro soros Anti-Le(a), um deles, INGIER, sendo usado como padrão. As frequências foram as seguintes: Le(a+b-) em 18%, Le(a-b+) em 76%, Le(a-b-) em 4,9%, e Le(a+b+) em 0,4%. Um segundo tipo de soro Anti-Le(b), Mathiusen apud in Brendemoen[8], mostrou estreitos resultados paralelos com o Anti-Le(b), AAGAARD, em sangue tipo A2, mas este fenótipo foi largamento inibido com sangue tipo A1 e sangue tipo B. O autor testou amostras de saliva de 108 indivíduos pelas substâncias A, B, H, Le(a) e Le(b), constatando que os não secretores de substâncias A, B, e H, correpondiam aos fenótipos Le(a+b-), exceto

um, cujo fenótipo foi Le(a-b-), não secretor de Le(a) e Le(b). A secreção da substância Le(a) foi encontrada em todas as amostras de saliva, obtidas de pessoas de fenótipo Le(a-b+); posteriormente, foi encontrada na saliva das pessoas com fenótipo Le(a-b+), mas não com a mesma intensidade. Substâncias Le(a) não foram encontradas em quatro amostras de saliva de pessoas do fenótipo Le(a-b-), secretores no Sistema ABO.

GRUBB [18], em 1951, estudou a correlação precisa entre o grupo sanguíneo de Lewis e o caráter secretor, numa amostra de 1000 indivíduos. Em seu estudo, estabeleceu que todos os indivíduos Le(a+b-) não são secretores e todos os indivíduos Le(a-b+) são secretores. Segundo o autor, essas regras não oferecem exceção e a maioria dos indivíduos Le(a-b-) são secretores de ABH.

BOYD e SHAPLEIGH [7], em 1954, analisaram uma aglutinina anti-H, preparada a partir de sementes de "Ulex europaeus", utilizada para a separação de indivíduos secretores e não secretores. Os autores primeiramente prepararam a aglutinina do "Ulex", através de moagem, filtragem e centrifugações sucessivas, obtendo uma concentração de 0,9% em solução salina. Posteriormente, observaram a

inibição da aglutinina em relação à vinte e cinco amostras de saliva, sendo 22 secretores e 3 amostras de não secretores dos grupos O, A1, A2, B e AB. Tais resultados, foram comparados com a inibição provocada pelos reagentes usuais. Esse processo permitiu a introdução do extrato de "*Ulex europaeus*" na determinação de secretores e não secretores desde que, tanto a saliva quanto o extrato, sejam não diluídos.

PLATO e GERSHOWITZ [24], em 1961, realizaram um trabalho, utilizando amostras de saliva coletadas ao acaso, de 50 indivíduos de cada um dos cinco grupos sanguíneos do Sistema ABO,isto é, A1, A2, O, B e AB, com um número total de 250 amostras concentradas e testadas, sendo que do grupo A1B consistiram 42 amostras e do grupo A2B 8 amostras. Os testes foram realizados com dois reagentes Anti-H, comumente usados, extratos do "Cytisus sessifolius" e "Ulex europaes", demonstrando que o grupo secretor O tem a mais alta concentração de substância H, seguindo, na ordem descrescente, os tipos sanguíneos A2, A1, B e AB. Uma comparação entre os dois extratos, indicam que a saliva pertencente a pessoas do grupo A1 tem aproximadamente a mesma quantidade de ambos os reagentes empregados. Por outro lado, os autores demonstraram que os

grupos A2 e O tem a mais alta concentração de substância Hu que Hc e o grupo AB tem concentrações opostas, com maior teor de Hc e menor de Hu. A mais plausível explicação, dada pelos autores, parece ser que os dois últimos tipos diferentes de reagentes Anti-H específicos estão envolvidos (Anti-Hc e Anti-Hu). Ocorre que esses extratos diferem não somente quantitativamente mas qualitativamente.

PLATNIK, BENEVIDES e SALZANO [23], EM 1969, realizaram um estudo sobre o polimorfismo e prevalência de secretores e não secretores, em amostras de saliva obtidas de 424 indivíduos da raça negra e 267 da raça branca. Estas amostras foram obtidas de crianças, de ambos os sexos, com idades variando entre 6, 9 e 12 anos. Os indivíduos foram classificados, arbitrariamente, em brancos, mulatos-claros, mulatos-escuros e brancos, de acordo com as características da cor da pele, espessura dos lábios e forma dos cabelos. As amostras de saliva foram colhidas em tubos estéreis e conservadas a -22° C. Nos indivíduos que mostraram discrepância entre os testes com soros Anti-H, Anti-A e Anti-B, foram colhidas novas amostras de saliva juntamente com amostras de sangue. Os autores utilizaram-se de um método denominado teste de dois tubos, que consiste no uso de saliva não diluida e saliva diluida em 1:2. Os testes para H foram realizados com

extrato de "Ulex europaeus". Os não secretores de H foram subseqüentemente, testados com soros Anti-A e Anti-B, usando-se o mesmo processo. Os autores utilizaram, sempre, células vermelhas frescas O, A2 ou B, sendo a primeira de um único doador e as outras de dois doadores. Os resultados demonstram uma porcentagem de 14,2% de não secretores para a população branca e 18,6% para a população de negros.

FERREIRA [13], em 1962, descreve uma técnica para evidenciar as substâncias grupo específicas na saliva. Esta técnica foi desenvolvida por Ferreira e Novah e consiste em se fazer testes de inibição da hemaglutinação, utilizando-se de tubos capilares e vidros de relógio. Neste trabalho, os autores recomendam o uso de anti-soros naturais anti-A e anti-B, titulados a 1/64 e 1/32, respectivamente, e saliva diluída a 1/10 para os grupos A e B e 1/15 para o grupo O. Este mesmo autor, demonstra, ainda, a possibilidade de se detectar substâncias grupo-específicas em manchas de tecido. Os fragmentos de tecidos manchados são picotados em pequenas partes e colocados em um vidro de relógio. Estes fragmentos são levados para o interior de um tubo de ensaio e embebidos em água destilada, onde, com o auxílio de um bastão de vidro, são expremidos contra as paredes do tubo. A

seguir, uma " bomba de água" é colocada no interior do tubo, onde permanece por 10 minutos. A partir daí, incuba-se o material por 10 minutos em temperatura ambiente e 10 minutos em geladeira. Removendo-se, então, o líquido do tecido manchado se procede os testes. O autor não recomenda o uso da técnica em papéis de cigarro e envelopes, pois os resultados são falseados. Quando a saliva vier acompanhada de sangue ou hemácias, a técnica é também contra-indicada.

DOUGLAS [9] et al., em 1966, analisaram amostras de sangue e de saliva coletadas de 323 voluntários, nascidos na Ilha de Rarotonga[1], em relação aos grupos sanguíneos do Sistema ABO, MN, Lewis e grupos Gm^a, heptoglobina, transferrina e hemoglobina. As amostras sanguíneas foram coletadas e refrigeradas e as de saliva foram fervidas e refrigeradas. Em relação ao Sistema Lewis, as amostras foram testadas com dois soros anti-Le^a e anti-Le^b. Os autores obtiveram 85 indivíduos Le^{a+} (27,27%), 181 Le^{a-b+}(58,33%) e 14 Le^{a-b-} (4,49%). Destes 213 eram secretores e 99 eram não secretores, sendo que a freqüência gênica foi de 0,4396 para Se e 0,504 para se. Entre os indivíduos não secretores, nenhum indivíduo desta amostra apresentou reação positiva para o soro anti-Le^b.

SATO e OTTENSOOSER [28], em 1967, realizaram um trabalho em amostras de saliva e de sêmen, para avaliarem o grau de concentração dos fatores grupo-específicos, existentes ou não, nestes fluidos corporais. Após a realização de experimentos em várias concentrações, os autores constataram que o sêmen contém mais substâncias do grupo sanguíneo que a própria saliva, confirmando observações anteriores de outros autores. Segundo os autores, os exames médico-legais dão reações mais claras que a saliva. O sêmen é prontamente identificado pelo teste da fosfatase ácida e exame microscópico e apresenta grupos de substâncias que não estão sujeitas à destruição por enzimas, ao contrário da saliva.

BOETTCHER [5], em 1967, demonstrou que a concentração de inibição de aglutinação de secretores pertencentes aos grupos A_1, A_2, B e O tem sido determinada, utilizando-se de soros Anti-A e Anti-B e extratos de "Ulex europaes" e "Dolichos biflorus". A concentração média de inibição de saliva pertencente ao grupo sanguíneo A_1 com soro Anti A e extrato de "Dolichos biflorus" é significativamente maior do que

aquelas salivas pertencentes ao indivíduos do grupo sanguíneo A_2. A concentração média de inibição de saliva pertencentes a indivíduos de diferentes grupos sanguíneos com extrato "Ulex europaeus" decresce na ordem dos tipos O, A_2, A_1 e B, denotando ser diferente a ordem de aglutinação das células sanguíneas destes grupos pelo extrato "Ulex".

O coeficiente de correlação para as concentrações de saliva pertencente a indivíduos A_1 e A_2 com soro Anti-A e extrato "Ulex", e com extrato "Dolichos" e "Ulex" não são signifcativamente diferentes de O, nenhum destes coeficientes de correlação da concentração de saliva pertencente a indivíduo tipo B com soro Anti-B e extrato "Ulex", visto que para saliva de indivíduos pertencentes ao grupos A_1 e A_2 com soro Anti-A e extrato "Dolichos" é significativamente maior que O. Conclui-se que as proporções de fatores antigênicos controlados pelo loci H e ABO são independentes e que "secretores aberrantes" são indivíduos nos quais estas proporções diferem grandemente.

MOORES e BRAIN [21], em 1968, estudaram a função secretora e o Sistema Lewis, em 181 indivíduos sul-africanos, de ambos os sexos, de uma tribo zulu, em cuja seleção não foi considerado os grupos sanguíneos. Estudantes universitários europeus doaram amostras sanguíneas usadas para comparação e foram selecionados a partir do grupo sanguíneo, sendo poucos do grupo A. Os autores obtiveram o grupamento sanguíneo através de centrifugação das amostras e observacão a olho nú e classificaram em A1 as reacões de

forte aglutinação com reagente "Dolichos". O grupamento do Sistema Lewis foi determinado através de uma técnica descrita em trabalho anterior. Quanto à saliva, após o aquecimento, a função secretora foi definida com o emprego de soros Anti-A, Anti-B e "Ulex". Posteriormente, células apropriadas foram adicionadas a 2%, em suspensão. Para o teste de Lewis, foram utilizados, após centrifugação e leitura, um soro Anti-A com bromelin e um anti-Le^b, não diluido em solução salina. Em relação ao soro, os testes foram feitos exatamente como para saliva, mas os autores encontraram dificuldade na interpretação dos resultados, principalmente com o reagente anti-H. Foi verificado que 27% eram não secretores das substâncias ABH e 25% foram não secretores da substância Le^a; 54% apresentaram secretores e as hemácias com os fenótipos Le(a-b+), 22% se apresentaram não secretores com fenótipos Le(a+b-) e 23% não secretores das substâncias ABH apresentaram os fenotipos Le(a-b-). Entre os secretores do gupo O, os autores não verificaram corelação entre a quantidade de antígeno H nas hemácias e a quantidade de substância H secretada na saliva.

PLATNIK, BENEVIDES e SALZANO [23], em 1969, realizaram um estudo em crianças escolares de escolas primárias de Porto Alegre, no Brasil, na faixa etária de 6, 9 e 12 anos, com pele de cor branca, mulatos-claros, mulatos-escuros e negros. Os autores explicam o polimorfismo da secreção salivar ABH, ressaltando que importantes aspectos deste assunto ainda não se encontram completamente claros, como o caso dos secretores aberrantes. Devido

as dificuldades técnicas, sua distribuição em muitas populações também não está completamente conhecida. Este fato ocorre, principalmente, nos grupos negróides, pois o numero de indivíduos testados na África não é muito maior que mil. Os autores sentiram que deve ser muito importante verificar a incidência desses genes na população de Porto Alegre. Posteriormente, estes estudos puderam ser relatados em um longo projeto do fluxo gênico de brancos/negros de Porto Alegre. A descoberta de alguns secretores anômalos, neste estudo, também promoveu uma revisão da incidência de cada indivíduo nos diferentes grupos raciais.

STURGEON e ARCILLA [32], em 1970, realizaram estudos quantitativos sorológicos em celulas vermelhas e saliva de oito indivíduos Le(a+b+x+) de duas familias de japoneses e uma de ancestrais do nordeste europeu e numa criança que foi acompanhada desde o nascimento até os nove meses de idade. Os autores verificaram que, no caso do bebê, os dados sugerem que o gene Le tem dois determinantes (citrons) para os quais um produto Le^a e o outro Le^x. Com a influência dos genes Se-H, a substância Le^a é convertida para substância Le^b mas o Le^x permanece imutável. Os autores comprovaram que as substâncias Le^a e Le^x estão ativas antes do

nascimento no líquido salivar, mas somente Le^x está ativa na produção da substância Lewis nos eritrócitos. Demonstraram, também, que a produção da substância Le^a é ativada nos eritrócitos no período perinatal e se torna totalmente ativa pouco depois do nascimento, aos quatro meses, nos casos examinados. Além de indicarem uma comparação do sistema gênico Se-H com a taxa de ativação do Sistema Lewis e a maturação da produção completa da substância Le^b nos eritrócitos, aconselham a realização de outros estudos, no sentido de se abrir maior ou menor gradação contínua de variantes Se, além dos dois sugeridos neste trabalho.

RANDERIA e BHATIA [25], em 1971, realizaram um estudo quantitativo de inibição de antígenos na saliva e indicaram mais substância A nos indivíduos A1 que em A2. Verificaram também que as substâncias antigênicas A estiveram em maior concentração nos indivíduos do grupo A que nos indivíduos do grupo AB. Nenhuma diferença significante foi observada na quantidade de antígenos A e B detectados pelos soros Anti-A no grupo B e Anti-B no grupo A. Além de outros resultados, os autores verificaram que o conteúdo de antígeno H em diferentes salivas e em diferentes grupos ABO variaram bastante, dependendo do reagente utilizado. As diferenças em especificidades

sorológicas de vários Anti-H, são também mostradas com base em testes de inibição fracionada. Os antígenos Lewis foram encontrados em 93,54% dos indivíduos. A variação na quantidade deste antígeno depende não somente do estado secretor ou não secretor, mas também do grupo ABO salivar. Os autores constataram, ainda, que o antígeno Le(a) é supostamente o produto da interação entre Le(a) e H. Neste estudo, apontaram vários casos de secretores de Le(a) e H sem antígeno Le(b). Estas observações são discutidas com base em aspectos quantitativos de diferentes antígenos à luz da biossíntese de antígeno ABH e Le(a) e Le(b).

BOETTCHER e KENNY [6] em 1971, realizaram um trabalho sobre o estudo quantitativo dos antígenos L^a, A e H, na saliva de indivíduos caucasianos e aborígenes australianos. A amostra estudada se constituiu de amostras de saliva pertencentes a 20 secretores e 16 não secretores, dos grupos A1 e O, de estudantes da "Flinders University", e 65 amostras de saliva de aborígenes da Australia Central, escolhidos ao acaso, sendo todos secretores, e, destes, 43 do grupo A1 e 22 do grupo O. Para a realização dos testes, os autores utilizaram de soros anti-H (extratos de "*Ulex europeus*"), anti-A e anti-B ("*Dolichos biflorus*"), e soros anti-Le^a e anti-Le^b, empregando-se a técnica da

inibição de aglutinação. Entre os resultados mais relacionados com o presente trabalho, os autores demonstraram, em todas as amostras de saliva, a concentração da inibição de aglutinação nos indivíduos dos tipos A, H e substâncias Le^a, sendo que esta concentração de inibição não foi determinada no Le^b. Os autores demonstraram que o grupo secretor O, dos aborígenes e caucasianos, apresentam maior expressão de antígeno H do que os secretores do grupo A1, sendo que os caucasianos não secretores, dos gurpos O e A1, apresentam maior expressão do antígeno Le^a que os secretores.

GIUSTI, PANARI e FIORIS [16], em 1972, realizaram estudo para analisar a saliva de 600 indivíduos, sendo 369 tomados ao acaso e 231 distribuidos em 42 familias, bem como, para detectar a concentração das substâncias específicas ABO e H.

As amostras de saliva foram coletadas, sem estimulação, de estudantes universitários e de suas famílias, sendo, ao mesmo tempo, determinado o grupo sanguíneo de cada um deles. Imediatamente após a coleta, a saliva foi submetida a uma centrifugação na velocidade de 3000 mil r.p.m., por 10 minutos. O sobrenadante, sem ter sido submetido a desnaturação, foi estocado a 4° C, até que os testes fossem feitos, num período de no máximo 24 horas. Os eritrócitos foram

obtidos do Serviço de Transfusão Sanguínea da Universidade Católica SH de Roma. Após três lavagens em solução salina, foram preparadas as suspensões à 2% de celulas vermelhas em solução salina. Os autores empregaram a técnica da inibição da hemoaglutinação. Os resultados foram ordenados da seguinte forma: C - completa aglutinação; +++ - aglutinação muito forte; ++ - forte aglutinação; + - aglutinação incompleta ou inibição incompleta; - nenhuma aglutinação ou inibição completa. Os autores concluiram que, com base nos resultados acima descritos, a distinção comum entre secretores e não secretores, baseando-se nos valores dos limites de diluição arbitrariamente escolhidos, é uma distinção falsa e necessita de novas bases, como recentemente foi relatado por FIORI [16] e Col.. Existe, uma boa relação na população, entre a quantidade de substância específica e a quantidade de substância H. A boa relação, encontrada entre pais e parentes, sugere a possibilidade de um controle genético sobre a substância ABH solúvel secretada na saliva.

STURGEON, MAcQUISTON e CAMP [32], em 1973, desenvolveram um sistema automático, para a quantificação de substâncias dos grupos sanguíneos salivares, utilizado para determinar a concentração de substâncias ABH e Le^a na saliva de uma população

normal. O método e as condições sorológicas empregadas, demonstraram uma clara e quantitativa divisão da população em secretores ABH e não-secretores. Há uma significante diferença em meio a concentrações A, B e H, quando indivíduos são agrupados de acordo com os tipos ABO. Dentro desses grupos, as médias dos valores representam, na maioria, diferenças individuais, além da soma de variáveis metodológicas e da amostragem. A concentração média da substância Le^a, em indivíduos dos três maiores tipos de células vermelhas: Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-), é marcadamente diferente, mas não há influência do Tipo ABO na concentração Le^a. O método tornou possível quantificar, em termos relativamente parecidos, a magnitude dessas diferenças e as médias normais.

BEÇAK e FROTA-PESSOA [2] , em 1973, relataram, no capítulo referente aos grupos sanguíneos, no livro de sua autoria, que o tipo Lewis de hemácias pode ser determinado, com soros de indivíduos sensibilizados por transfusão e na gestação. Tal soro, pode conter tanto anti-Le^a como Le^b, aglutinando hemácias Le(a+b-) tratadas com ficina e incubadas a 37° C. Já as hemácias negativas, serão lavadas e adicionadas ao soro de Coombs. Se forem aglutinadas, serão Le(a-b+) e se permanecerem negativas serão Le(a-b-). Ainda, segundo os autores, esses três tipos apresentam sensibilidade maior, menor e nula em relação a anti-Lewis, lembrando as reações de hemácias A1, A2 e O com reagentes anti-A. Além disso, o tipo Le(a-b-) é raro em brancos e mais freqüente em negros. Para a sua determinação, é utilizada a prova

de inibição, misturando saliva diluida com hemácias ficinizadas Le(a+b-), assemelhando-se à obtenção de H. Desse mecanismo, resultam quatro fenótipos, possuindo só substância Lewis ou só H, ambas ou nenhuma. Os quatro genótipos são análogos. A transmissão dos alelos Se-se e também de ABO independem de Le-le.

ERSKINE e SOCHA [12], em 1978, descreveram algumas considerações em relação as bases bioquímicas do grupamento Lewis e relataram que nos indivíduos Lewis positivos, secretores de ABH, o determinante fucose adicional, que é responsável pela especificidade de H, está também presente na cadeia de oligossacarídeo. Segundo os autores, a presença simultânea de dois grupos determinantes fucose, dão a especificidade sorológica adicional Le^b (Le2), da mesma forma que a presença simultânea, na mesma molécula de determinantes hr' e hr'', do sistema Rh-Hr, fornece a especificidade hr.

BEIGUELMAN [3], em 1979, descreve uma técnica para investigação do fenótipo secretor de substâncias grupo-específicas ABH na saliva humana. Com salivação estimulada com parafina, o autor colhe cerca de 01 ml. de saliva em um pequeno copo de Becker, quando se trata de doadores adultos. No caso de crianças pequenas, o autor recomenda que esta saliva seja recolhida com o auxílio de chumaços de algodão. Posteriormente, o algodão, embebido com a saliva da criança,

é expremido contra as paredes de um tubo de ensaio e diluídos em 0,5ml de água destilada. Logo depois de obtida a saliva, ou no máximo uma hora após a coleta, deve-se transferir a amostra para um tubo de ensaio, que é mantido por 10 minutos em banho-maria, com a água em ebulição. Esta operação é destinada à desnaturação das enzimas que possam atuar sobre as substâncias grupo-específicas eventualmente existentes na saliva. O tubo é, então, centrifugado durante 3 minutos a 3000 rpm, para sedimentar o muco e os restos celulares, transferindo-se o sobrenadante para outro tubo de ensaio. Tal sobrenadante, pode ser examinado imediatamente ou mantido em congelador a menos de 20°C, para exame posterior. Para a pesquisa do fenótipo secretor, o autor utiliza duas séries de tubos de ensaio (10x75mm). Em uma delas, os tubos são identificados por 1-A, 1-B e 1-H e na outra por 2-A, 2-B e 2-H. Nas duas séries, pipeta-se uma gota de anti-soro anti-a nos tubos A, uma gota de anti-soro anti-B, nos tubos B e uma gota de lectina anti-H de "*Ulex europaes*" nos tubos H. Tais anti-soros, devem ser titulados, previamente, contra suspensões de hemácias salinas de A_2, B e O a 5%. Para tanto, é necessário fazer uma série de 10 diluições e utilizar a diluição precedente àquela que provoca uma aglutinação forte (+4) das hemácias com antigeno correspondente. Depois de pipetar os anti-soros, acrescenta-se, nos tubos da série 1, uma gota de saliva sobre o

exame e, na série 2, uma gota de solução salina. Depois de agitados e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos, acrescenta-se à suspensão de hemácias a 5% nos tubos correspondentes. Os tubos são agitados e mantidos em repouso, por uma hora, `a temperatura ambiente. Nos tubos da série 2 sempre ocorrerá aglutinação, pois constituem os tubos controle. Nos tubos da série 1, a ausência de aglutinação indica a presença de substâncias grupo específicas correspondentes a cada tubo. Nesse caso, a substância grupo-específica reagiu com o anti-corpo, esgotando-o do meio e impedindo que ele atuasse sobre os antígenos das hemácias. O autor cita, ainda, o valor médico-legal e genético antropológico na investigação das substâncias grupo- específicas.

BARRANTES e SALZANO [1], em 1979, realizaram um trabalho, utilizando-se de saliva e leite de 250 mulheres parturientes, em relação aos níveis de antígenos ABH. Parte destas amostras foram, também, investigadas para determinar a presença de substância Lewis Le^a. Os autores demonstraram que os níveis de A e B são mais altos na saliva, e aqueles de H e Le^a são mais altos no leite. A média de concentrações de substância H salivares, apresentaram a relação $O>A_2>A_1>B>AB$, mas estas diferenças não estiveram presentes no leite.

Além disso, os níveis salivares de A e B são semelhantes, nos indivíduos desses grupos, embora B se apresenta maior que A nos indivíduos do tipo AB, e A_1 maior que A_2. No leite, A foi maior que B nos indivíduos A, B e AB e A_1 era relativamente igual a A_2. A quantidade de substância Le^a depende da situação do ABH secretor nas duas secreções, mas é independente dessa diferença, sendo que os níveis dessa substância eram sempre maiores no leite. Os coeficientes de correlação entre dos níveis observados nas duas secreções, são estatisticamente significantes para a substância A em indivíduos do tipo A (0,46), para a substância H em indivíduos tipo B (0,58) e para Le^a em todos os indivíduos examinados (0,47). Numa análise de regressão múltipla, realizada para verificar a influência de quatro variáveis genéticas e seis não genéticas, sobre os níveis de ABH em ambos os fluidos, mostrou que somente um único fator se apresenta como um modificador consistente; o tipo ABO.

GERARD [15] et al., em 1982, realizaram um estudo em indivíduos portadores do fenótipo de Bombay (h/h), na Ilha de Reunion, a sudeste da África. Neste trabalho, os autores analisaram os "pedigrees" de 14 famílias, verificando a veracidade dos modelos genéticos propostos, na segregação dos genes Se e H. Quatorze mapas

genéticos (hederogramas) de Bombay foram estudados, sendo que 85% eram leucodermas. As pessoas foram divididas em dois grupos: indivíduos de Bombay e indivíduos não afetados. Os indivíduos eram considerados Bombay, quando na realizaçào dos testes notava-se a ausência do antígeno H nos eritrócitos e substância H presente nos soros. Três diferentes métodos foram usados na determinação do caráter secretor das substâncias ABH na saliva. O primeiro teste foi realizado nas hemácias e foi o grupo sanguíneo de Lewis, com reagentes da Ortho Diagnostics (Ratitan, N.J.). Os indivíduos eram considerados secretores quando os genótipos de Lewis era Le(a-b+) e não secretores quando Le(a+b-). O segundo, foi realizado pelo método da inibição da hemaglutinação, usando-se hemácias, saliva em diluição de 1/1 a 1/5 e os reagentes convencionais. E, por último, foi realizado o RIA (radioimunoteste), com reagentes preparados pela Universidade de Alberta, Edmonton, Canadá. Os resultados dos três testes, segundo os autores, estavam em acordo. Os autores, após identificarem o caráter secretor e o fenótipo de Bombay, realizaram um estudo detalhado dos hederogramas e analisaram duas hipóteses, relacionando os estruturais H e Se. Na primeira hipótese, o gene Se é completamente expressado em indivíduos de Bombay, existindo, portanto, secretores e não secretores. Na segunda hipótese, a expressão fenotípica de Se é

suprimida em não secretores de Bombay; entretanto, os seus genótipos secretores podem ser SeSe, Sese ou sese. Todos os indivíduos de Bombay foram não secretores, de acordo com as duas hipóteses testadas. Somente um caso, descrito na literatura, em 1955, contraria a segunda hipótese, mostra uma criança secretora, filho de não secretor Bombay. Entretanto, os autores concordam que o mais viável seria o modelo genético proposto por Oriol apud in Gerard [15], que Se e H seriam genes estruturais, proximamente ligados. Com base neste trabalho, os autores descrevem que a área de Cilaos, na África, possa ser hoje a que possui o maior número de pessoas com fenótipo de Bombay.

STEPLEWSKI [31] et al, em 1983, realizaram um estudo para a determinação dos fenótipos Lewis na saliva humana. Os autores utilizaram anticorpos monoclonais secretados por hibridomas, estabelecidos após a fusão de esplenócitos de ratos, imunizados por injeção de células de carcinoma de colon SW116 e SW12222, com mieloma de ratos P3X63Ag8 variação 653. O anticorpo IgM do hibridoma 116NS-10cl.17 (10-17) é diretamente contra o antígeno Le^b do sistema do grupo sanguíneo humano Lewis. O anticorpo monoclonal 151-5-A7-9 (A7-9) recentemente desenvolvido, IgG3 tipo-iso reconhece

especificamente a estrutura lacto-N-fucopentaose II - uma sequência terminal Le^a ativo. Dois outros anticorpos monoclonais 151-5-G3-5 (G3-5) e 151-5-G2-12), ligam-se aos glicolipídeos Le^a e Le^b do sistema do grupo sanguíneo Lewis e reconhecem estruturas lacto-N-difucopentaose II (Le^a) e lacto-N-difucohexaore I (Le^b). Os autores selecionaram quatro anticorpos monoclonais "murine", que especificamente ligam-se aos haptenos do grupo sanguíneo Lewis, para estabelecer um ensáio, no qual antígenos presentes na saliva humana são unidos a gotas de imunoensáios de "polystyrene". Dois desses anticorpos detectam determinantes Le^a e Le^b (Le^{ab}), um anticorpo detecta somente Le^a e outro somente Le^b. Todos os fenótipos Lewis (Le^{a-b-}, Le^{a+b-}, Le^{a-b+}, Le^{a+b+}) são facilmente detectáveis nesse ensáio. Dos 60 indivíduos examinados, um foi Le^{a+b+}, quatro Le^{a-b-} doze Le^{a+b-} e quarenta e três Le^{a-b+}.

DUBE [10] et al., em 1984, estudaram os grupos sanguíneos do sistema ABO, o Sistema Lewis e a função secretora de 546 indivíduos normais, sendo 241 masculinos e 305 femininos. Os soros foram testados a uma temperatura de 4° C, para a aglutinação das hemácias do grupo O. Os grupos ABO e o Sistema Lewis, dos doadores, foram determinados utilizando-se de técnicas padronizadas e anti-soros comerciais. As células A, que não reagiram com "Dolichos biflorus" foram categorizadas como A_2, sendo que os indivíduos com

fenótipos Le(a+b-) foram classificados como não secretores e os portadores dos fenótipos Le(a-b+) foram classificados como secretores. As atividades H e Le^a foram determinadas na saliva de indivíduos com fenótipos Le(a-b-), utilizando-se de ensáios de inibição de hemaglutinação.

ERIKSSON [11] et al., em 1986, testaram a secreção de antígenos ABH na saliva de indivíduos indígenas de diversas populações, no período de 1966 a 1976, islandeses de Reykjavik e Husavik, finlandeses, húngaros (Finlândia, Lapônia e Komi) e esquimós do noroeste da Groelândia. As amostras salivares foram fervidas e estocadas a -20° C. Após centrifugação, o sobrenadante foi diluido, gradativamente, associando "Ulex" e soros anti-A e anti-B. Também células frescas O, A_1 e B foram usadas como teste. As frequências de não secretores de ABH, entre o islandeses (28-36%) estiveram entre as mais altas observadas nos europeus. Entre os islandeses e suecos da Finlândia, a frequência (por volta de 20%) foi comparável aos valores da Suécia, mas consideravelmente mais altas entre a Finlândia e Komi (por volta de 9%), sendo intermediários, entre os valores, os lapões (5%) e escandinavos (15-26%), excluindo-se os islandeses (28-41%). A freqüência média de não secretores, entre os lapões na Finlândia foi a mais baixa observada entre as populações brancas. Como outras populações árticas das raças mongólicas, os esquimós da Groelândia tinham uma freqüência muito baixa de não secretores. Os autores admitiram, como provável explicação, a ausência de não secretores entre os anciãos lapões e esquimós da Groelândia e sua introdução pelas populações invasoras. Concluiram que as frequências de ABH foram muito mais encontradas entre as populações do norte da Europa

do que se presumia e, baseados em outros estudos, relatam que os estado não secretor das substâncias dos grupos sanguíneos ABH, nos fluidos mucosos, está associado a condições patológicas das membranas mucosas dos sistemas digestivo e respiratório. Em vista das desvantagens do estado não secretor e da alta freqüência de ABH nos islandeses, os autores consideraram este fenômeno paradoxal.

MOTTA [22], em 1988, relatou, no capítulo referente ao grupos sanguíneos e proteínas do soro, que o grupo Lewis foi primeiramente descrito em 1946 e os fenótipos mais comuns entre os caucasianos são: Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-), este último comum entre os hispânicos e no oeste da África. Além disso, segundo o autor, o desenvolvimento dos antígenos Lewis inicia-se na lactância e as hemácias dos recém-nascidos não são aglutinadas nem pelo soro anti-Le(a) e nem pelo soro anti-Le(b), mas estão presentes, ao nascimento, na saliva e no soro dos indivíduos com fenótipos específicos. Observa, também, que há uma interação complexa com os sistemas ABO, H e secretores, explicada por uma hipotética substância precursora, convertida na presença do gene Lewis (Le) em substância Le(a) nas secreções do corpo. Segundo o autor, quando o gene H e o gene Se estão presentes, parte da substância H solúvel é convertida pelo gene Le em antígeno Le(b). Nos não secretores, a conversão de Le(a) em H, nos tecidos, não ocorre, daí a ausência das substância A ou B nas secreções. O alelo inativo le, quando em homozigose, leva a uma substância H sem atividade Le, quando o gene Se está presente. Outro aspecto, ressaltado pelo autor, é a hipótese de que os antígenos Le possa ser adquiridos de antígenos do plasma, porém não revela

detalhes.

HENRY, KSIMPSON e WOODFIELD [19], em 1988, realizaram um trabalho, analisando a presença de um fenótipo raro do Sistema Lewis a+b+, encontrado em vários grupos polinésios, incluindo Maoris, Samoas, Cook Islanders, Nuieans e Tokelau Islanders. A amostra foi obtida de polinésios, predominantemente de um grupo étnico, na faixa etária de 16 a 60 anos de idade. Foram coletados sete ml de sangue venoso, de cada indivíduo, com um ml de anticoagulante de citrato fosfato dextrose. As amostras foram estocadas à 4 ° C e testadas em 24 horas. As células vermelhas remanescentes foram glicerolisadas e congeladas em nitrogênio líquido. Os autores utilizaram sete reativos diferentes de Anti-Le^a, para o teste inicial com seis diferentes para o Le^b. Os testes foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes dos anti-soros, usando incubação de células suspensas em solução salina, em temperatura ambiente, por 30 minutos, seguida de centrifugação. O fenótipo foi encontrado em polinésios de todos os grupos sanguíneos e a freqüência aumentou significativamente, com a reatividade H nos doadores pertencentes ao gupo sanguíneo O. O fenótipo não esteve associado, significativamente, com a reatividade da substância H, nos doadores pertencentes ao grupo sanguíneo A e também não mostrou correlação com a idade ou sexo.

BLACKWEELL [4] et al, em 1989, realizaram estudo para determinar a incapacidade genética de indivíduos secretarem uma glicoproteina, na forma solúvel em água, dos antígenos dos grupos sanguíneos ABO, na saliva e outros líquidos orgânicos, sendo reconhecido como um fator de risco para a doença meningocócica. Examinaram 4.906 residentes em Stonehouse (Cidade do interior da Austrália). Os testes, de saliva e grupo sanguíneo Lewis, indicaram que havia uma maior proporção de não-secretores nesta cidade que o previsto, isto é, 20 a 25%. Constataram que dos 15 residentes em Stonehouse, que apresentavam a infecção meningocócica, dos quais, foram examinadas as amostras de saliva de 13, 7 eram não-secretores. Os autores constataram que, das amostras de sangue examinadas, 672 eram Lewis negativo e 632 eram Lewis positivo. Do restante, 484 eram Lewis^{b} e 148 eram Lewis^{a}. Verificaram, também, que os indivíduos que se apresentaram Lewis^{a} eram não-secretores e os Lewis^{b} eram secretores.

LE PENDU^{a}, [20] et al, em 1983, realizaram um estudo sobre as relações entre as enzimas gene-especificas ABO e o Sistema Lewis, tendo sido preparados ensaios radioimunes, usando dois reagentes: Anti-A e Anti-B. A especificidade dos procedimentos foi

avaliada com treze antígenos artificiais. As quantidades de antígenos naturais A e B, na saliva de secretores ABH do fenótipo Lewis conhecido, foram medidos com esses ensaios. Os resultados confirmam que a quantidade média de antígeno A é mais baixa nos indivíduos Lewis positivo Le^b que Lewis negativo Le^d, bem como é mais baixa em indivíduos A_2 que em A_1. Entretanto, as diferenças entre os quatro fenótipos combinados A e Lewis foram, somente, suportadas em quantias significativamente mais baixas de determinantes de antígeno A em A_2Le^b, quando comparado nos três fenótipos (A_1Le^b, A_1Le^d, e A_2Le^d) que tinham semelhantes valores de determinantes antígenos B, entre indivíduos B,le^b e indivíduos B,le^d. Os resultados são discutidos em termos de relação entre enzimas-gene-específicas A, B e Lewis, para seus receptores comuns. A diferença na eficácia da enzima A_2, quando comparada à enzima A_1, é proposta como uma possível explicaçào para a diferença fenotípica de A_1 e A_2.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados, no desenvolvimento do presente trabalho, constituiu-se de 60 amostras de sangue e 60 amostras de saliva, obtidas de pessoas que nos foram encaminhadas pela Justiça para se submeterem aos exames periciais de investigação de paternidade, através da assistência judiciária gratuita.

As amostras de sangue venoso foram colhidas, no período da manhã, em tubos à "vacuum II", com EDTA K_3, reagente biológico molecular, à 15%, com tampa de silicone, no total de 5ml de cada indivíduo, em ótimas condições de esterilização. Após a realização dos exames, requisitados pela Justiça, dos antígenos eritrocitários e leucocitários e, em alguns casos, do DNA, apenas o restante de sangue, destas amostras, foram aproveitadas para a realização do presente trabalho, com autorização devidamente assinada pelos doadores ou seus representantes legais.

As amostras de saliva também foram colhidas, no período da manhã, estando o indivíduo em "jejum", determinando-se que se fizesse, previamente, um bochecho com água destilada, a fim de se eliminar possíveis substâncias, ou detritos alimentares, existentes no interior da boca de cada pessoa. Após esses procedimentos, os

indivíduos cuspiam no interior de um pequeno frasco de vidro (becker), da marca "pirex", de 10ml, obtendo-se um volume de 2ml de saliva de cada pessoa. Dos indivíduos fumantes, a coleta foi realizada sem que estes indivíduos tivessem feito uso do cigarro por um perído de 12 horas, no mínimo, no sentido de se evitar interferência de algumas substâncias contidas no tabaco.

PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS

Os tubos, contendo as amostras de sangue, eram imediatamente identificados com o nome de cada indivíduo e, após retirada a quantidade necessária de sangue para a realização dos exames requisitados pela Justiça, os mesmos foram colocados em geladeira, à uma temperatura controlada de 4 gráus centígrados, durante um período de 30 a 40 minutos, tempo suficiente para que os elementos figurados do sangue se decantassem no fundo do tubo, separando-se do plasma.

Utilizando-se uma pipeta de 1ml, retiramos esta quantidade de "papa" de hemácias do fundo do tubo, transferindo-a para um outro tubo de10mm x 75mm, acrescentando-se 5ml de solução salina (NaCl à 7%). Protegendo-se a boca do tubo com papel de alumínio, agitamos,

lentamente o mesmo, por três ou quatro vezes, no sentido de lavarmos as hemácias. A seguir, este material foi centrifugado, durante 3 minutos, à 3.400 r.p.m.. O sobrenadante foi retirado, mantendo-se, no tubo a "papa" de hemácias. Essa operação de lavagem das hemácias foi repetida, no mínimo, por três vezes, eliminando-se todas substâncias que pudessem estar aderidas à membrana dessas células.

Após a última centrifugação e retirada total do sobrenadante, utilizando-se uma pipeta retiramos uma gota de "papa" de hemácias devidamente lavadas, e colocamo-las no interior de um tubo de ensáio de 10mm. x 75mm., acrescentando-se 1ml. de solução salina. Com esses procedimentos, temos preparada a suspensão de hemácias, prontas para os testes, conforme técnica preconizada pelo fabricante dos soroclones Anti-Le^a e Anti-Le^b (Anticorpos Monoclonais Murinos), Anti-A, AntiB e Anti-H (Lectina "Ulex europaeus"), da Biotest S/A.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SALIVA

As amostras de saliva foram coletadas em recipientes de vidro tipo "pirex" (becker) de 10ml., sendo que cada indivíduo cuspia no seu interior, sem estimulação, até que completasse o volume de 2ml. de saliva, o que dependia do grau de salivação de cada um. No caso de

crianças, utilizamos algodão esterilizado, embebendo os pequenos chumachos de algodão em saliva, diretamente na boca da criança, e com auxílio de uma pinça, estes chumaços foram espremidos contra a parede do recipiente de vidro, desprezando-se o algodão utilizado.

As amostras de saliva foram, então, imediatamente transferidas para um tubo de ensáio tamanho 10mm. x 75mm, devidamente esterilizado, identificado com o nome de cada indivíduo e lacrado com papel alumínio.

O processo de desnaturação (inibição) da saliva foi feito, logo após a coleta, para se evitar a interferência de enzimas no processo de inibição. Foram utilizados um bico de bunsen, um suporte metálico em tripé e uma tela de amianto, ligados a um botijão de gás. Os tubos de ensaio, contendo as amostras de saliva, foram colocados no interior de um becker de 500ml, com água ao nível de 300ml, sendo submetidos ao aquecimento até 100 graus centrígrados, mantendo-se nesta temperatura durante 20 minutos. Dessa forma, as amostras de saliva foram mantidas em "banho-maria", a fim de serem eliminadas outras proteinas que pudessem comprometer o processo de inibição. A seguir, os tubos foram centrifugados, em alta rotação (3000 rpm durante 3 minutos) sendo, ao final, recolhido o sobrenadante, isto é, a saliva já desnaturada foi transferida, para outros tubos, protegidos com papel

alumínio e mantidos em geladeira, prontos para a realização dos testes.

IDENTIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS DAS HEMÁCIAS

A partir das amostras de suspensão de hemácias, foram tipados os antígenos do Sistema ABO, isto é, o tipo sanguíneo A, B, AB ou O, do Sistema Lewis Le^a e Le^b, e a substância H, utilizando-se os soros Anti-A e Anti-B, soros Anti-Le^a e Anti-L^b e soro de Lectina Anti-H, todos adquiridos da Biotest S/A.

Primeiramente, foram determinados os grupos sanguíneos (A, B, AB ou O) a que pertenciam cada uma das amostras de suspensão de hemácias analisadas. Este procedimento foi realizado utilizando-se 4 (quatro) tubos de ensáio de 10mm. x 75mm., colocando-se no tubo nº 01, 1 (uma) gota de soro Anti-A e 1 (uma) gota de suspensão de hemácias, no tubo nº 02, 1 (uma) gota de soro Anti-B e 1 (uma) gota de suspensão de hemácias, no tubo nº 03, 1 (uma) gota de soro Anti-AB e 1 (uma) gota suspensão de hemácias e no tubo nº 04, 1 (uma) gota de soro Anti-H e 1 (uma) gota de suspensão de hemácias.

Cada tubo foi agitado, com a finalidade de provocar a mistura das hemácias e do soro, sendo incubado durante 15 minutos, à temperatura ambiente, conforme recomendação do fabricante dos soros.

Após o período de incubação, foi feita a centrifugação durante 15 segundos, à 3.400 r.pm.

Imediatamente após esse procedimento, o botão de hemácias foi ressuspendido, com agitação delicada, e feita a leitura, observando-se a presença ou ausência de aglutinação e anotando-se numa ficha preparada especificamente para esse fim.

A identificação dos antígenos do Sistema Lewis, Le^a e L^b, foi realizada obedecendo-se aos mesmos procedimentos, porém a incubação foi feita à 5 graus centígrados, durante 15 minutos, utilizando-se uma geladeira regulada para esse fim. A seguir, foram feitas as leituras, que foram anotadas nas fichas preparadas para o presente trabalho.

Todos esses testes, para a identificação dos tipos sanguíneos do Sistema ABO, do Sistema Lewis e da substância H, foram realizados concomitantemente com testes para controle, com suspensão de hemácias já conhecidas e fornecidas gentilmente pela Biotest S/A, fabricante dos soros utilizados em nossos experimentos. Os

testes controles nos permitiam avaliar, com maior segurança, o fato de haver ou não aglutinação.

IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES GRUPO-ESPECÍFICOS DA SALIVA.

A identificação dos fatores grupo-específicos da saliva, das amostras dos indivíduos examinados, foi feita pelo método qualitativo. Foram identificados os fatores grupo-específicos existentes na saliva com relação as substâncias A, B, A + B e O. Considerando que as amostras de suspensão de hemácias, de cada indivíduo, estava previamente tipada, quanto aos seus grupos sanguíneos, procedemos da seguinte maneira:

Tubo nº 01A- 1 gota de soro anti-A + 1 gota de suspensão de hemácias A – incubação por 15 minutos à temperatura ambiente: resultado = aglutinação;

Tubo nº 02A- 1 gota de soro anti-A + 1 gota de saliva - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente - acrescenta-se 1 gota de suspensão de hemácias A - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente: resultado = aglutinação (não secretor da substância A); ausência de aglutinação (secretor da substância A);

Tubo nº 01B- 1 gota de soro anti-B + 1 gota de suspensão de hemácias B - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente: resultado = aglutinação;

Tubo nº 02B- 1 gota de soro anti-B + 1 gota de saliva - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente - acrescenta-se 1 gota de suspensão de hemácias B - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente: resultado = aglutinação (não secretor da substância B); ausência de aglutinação (secretor da substância B);

Tubo nº 01AB- 1 gota de soro anti-AB + 1 gota de suspensão de hemácias AB - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente: resultado = aglutinação;

Tubo nº 02AB- 1 gota de soro anti-AB + 1 gota de saliva - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente - acrescenta-se 1 gota de suspensão de hemácias AB - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente: resultado = aglutinação (não secretor das substâncias A e B); ausência de aglutinação (secretor das substâncias A e B);

Tubo nº 03AB- 1 gota de soro anti-A + 1 gota de saliva - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente - acrescenta-se 1 gota da suspensão de hemácias AB - incubação por 15 minutos à

temperatura ambiente: resultado = aglutinação (não secretor da substância A); ausência de aglutinação (secretor da substância A),

Tubo nº 04AB- 1 gota de soro anti-B + 1 gota de saliva - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente - acrescenta-se 1 gota da suspensão de hemácias AB - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente: resultado = aglutinação (não secretor da substância B); ausência de aglutinação (secretor da substância B).

Tubo nº 01H- 1 gota de soro anti-H + 1 gota de suspensão de hemácias tipo O - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente: resultado = aglutinação;

Tubo nº 02H- 1 gota de soro anti-H + 1 gota de saliva - incubação por 15 minutos à temperatura ambiente - acrescenta-se 1 gota de suspensão de hemácias tipo O: resultado = aglutinação (não secretor da substância H); ausência de aglutinação (secretor da substância H).

RESULTADOS

RESULTADOS OBTIDOS

QUADRO Nº 01 – Resumo demonstrativo dos Resultados

PACIENTE	SISTEMA ABO	FATOR RH	SORO ANTI-H	SISTEMA LEWIS Le^a	Le^b	SALIVA Secretor	Não Secretor
01- A.T.C..	A	Negativo	Negativo	a+	b-		Não Secretor
02- J.M.	O	Negativo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub.H	
03- A.M.R.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.A	
04- D.W.	O	Positivo	Positivo	a-	b-		Não Secr. H
05- D.R.	O	Positivo	Positivo	a+	b-		Não Secr. H
06- A.M.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.A	
07- M.J.P.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub.H	
08- I.A.	O	Positivo	Positivo	a+	b-		Não Secr. H
09- O.J.C	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
10- L.M.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	

QUADRO Nº 02 - Resumo demonstrativo dos Resultados

PACIENTE	SISTEMA ABO	FATOR RH	SORO ANTI-H	SISTEMA LEWIS Le^a	Le^b	SALIVA Secretor	Não Secretor
11- O.A.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.sub. H	
12- A.M.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.A	
13- M.L.	O	Positivo	Positivo	a-	b-		Não Secr. H
14- W.A.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.A	
15- J.R.A.	B	Positivo	Negativo	a+	b-		Não Secr.B
16- M.A.L.	O	Postivo	Positivo	a+	b-		Não Secr. H
17- M. L.	B	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.B	
18- A.L.C.	B	Postivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.B	
19- A.C.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.B	
20- S.C.	B	Negativo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.B	

QUADRO Nº 03 - Resumo demonstrativo dos Resultados

PACIENTE	SISTEMA ABO	FATOR RH	SORO ANTI-H	SISTEMA LEWIS Le^a	Le^b	SALIVA Secretor	Não Secretor
21- I.N.S	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
22- P.M.T.	B	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.B	
23- D.A.L.	B	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.B	
24- O.J.C.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
25- L.M.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
26- S.M.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
27- G.H.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub.A	
28- L.S.	B	Negativo	Negativo	a-	b-		Não Secr. B
29- E.L.	B	Negativo	Negativo	a-	b-		Não Secr. B
30- F.C.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub. A	

QUADRO Nº 04 - Resumo demonstrativo dos Resultados

PACIENTE	SISTEMA ABO	FATOR RH	SORO ANTI-H	SISTEMA LEWIS Le^a	Le^b	SALIVA Secretor	Não Secretor
31- M.I.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub. A	
32- M.L.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub. A	
33- M.F.	O	Positivo	Positivo	a+	b-		Não Secr. H
34- C.M.R.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
35- A.M.P.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
36- L.H.P.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
37- A.O.P.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
38- P.S.M.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
39- P.R.S.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
40- M.S.	B	Positivo	Negativo	a+	b-		Não Secr. B

QUADRO Nº 05 - Resumo demonstrativo dos Resultados

PACIENTE	SISTEMA ABO	FATOR RH	SORO ANTI-H	SISTEMA LEWIS Le^a	Le^b	SALIVA Secretor	Não Secretor
41- M.M.A.	O	Positivo	Positivo	a-	b-		Não Secr. H
42- R.M.S.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub. A	
43- L.M.S.	AB	Positivo	Negativo	a+	b+	Secr.Sub. A	Não Secr. B
44- M.S.M.	A	Positivo	Negativo	a+	b-		Não Secr. A
45- R.O.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
46- J.S.M.	B	Negativo	Negativo	a+	b-		Não Secr. B
47- L.R.A.	A	Positivo	Negativo	a+	b-		Não Secr. A
48- E.M.S.	AB	Positivo	Negativo	a+	b+	Secr.Sub. A	Não Secr. B
49- A.R.M.	A	Positivo	Negativo	a+	b-		Não Secr. A
50- A.M.V.	A.	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub. A	

QUADRO Nº 06 - Resumo demonstrativo dos Resultados

PACIENTE	SISTEMA ABO	FATOR RH	SORO ANTI-H	SISTEMA LEWIS Le^a	Le^b	SALIVA Secretor	Não Secretor
51- R.M.S.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
52- N.M.A.	O	Positivo	Positivo	a+	b-		Não Secr. H
53- W.A.S.	O	Positivo	Positivo	a-	b+	Secr.Sub. H	
54- M.J.A.	B	Negativo	Negativo	a+	b+	Secr.Sub. B	
55- J.R.S.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub. A	
56- M.R.R.	AB	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub. B	Não Secr. A
57- J.J. M.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub. A	
58- R.G.S.	AB	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub. A Secr.Sub. B	
59- S.M.S.	B	Positivo	Negativo	a+	b-		Não Secr. B
60- J.J.V.	A	Positivo	Negativo	a-	b+	Secr.Sub. A	

ANÁLISE DEMONSTRATIVA DOS RESULTADOS

No sentido de facilitar a análise e interpretação de todos os dados apresentados, anteriormente, nos quadros de resultados de números 01 a 06, elaboramos um resumo demonstrativo de todos esses resultados, apresentado no Quadro nº 07,.onde podemos ter uma visão global da interação existente entre os sistemas examinados.

QUADRO Nº 07 - Resumo demonstrativo dos Resultados

Sistema ABO	Sitema Rh		Soro Anti-H		Lewis				Saliva	
	Posit. +	Neg. -	Posit. +	Negat. -	a Pos.	a Neg.	b Pos.	b Neg.	Secretor Se	Não Secretor se
A - 18	17	01	0	18	04	14	14	04	14	04
O - 26	25	01	26	0	05	21	18	08	18	08
B - 12	07	05	0	12	06	07	06	06	06	06
AB - 04	04	0	0	04	02	01	05	0	03-A 02-B	02-B 01-A
Totais: 60	57	07	26	34	16	44	41	19	42	22
PERCENTUAIS	83,33	11,67	30,00	70,00	26,67	73,33	68,33	31,67	67,19	32,81

Pela análise do Quadro nº 07, onde demonstramos, de forma global, a interação existente entre os Sistemas ABO, Lewis (Le^a e L^b) e Fatores Grupo-Específicos da Saliva, obtivemos os seguintes resultados:

1- Das 18 amostras pertencentes ao grupo sanguíneo do tipo A, verificamos que todas se apresentaram com reação negativa ao Soro anti-H, demonstrando uma interação direta entre as reações com os Soros Anti-Le(a+b-), com os tipos se(não secretores), sendo que esta mesma interação foi constatada entre as reações com os Soros Anti-Le(a-b+) com os tipos Se(secretores);

2- Das 26 amostras pertencentes ao grupo sanguíneo do tipo O, verificamos que todas se apresentaram com reação positiva ao soro Anti-H, demonstrando, também, uma interação direta entre as reações dos Soros Anti-Le(b+) com os tipos Se(secretores) e dos Soros Anti-Le(b-) com os se(não secretores). Entretanto, não foi observada essa mesma interação entre as reações dos Soros Anti-Le(a+a-) com os tipos Se(secretores) e se(não secretores), obtendo-se 05 Le(a+) para 08 se(não secretores) e 21 Le(a-) para 18 Se(não secretores);

3- Das 12 amostras pertencentes ao grupo sanguíneo B, verificamos, novamente, que todas se apresentaram com reação negativa ao soro Anti-H, e demonstraram uma interação total entre as reações dos Soros Anti Le(b+) com os tipos Se(secretores) e dos Soros Le(b-) com os tipos se(não secretores). Entretanto, verificamos que essa interação não foi total para o Soro Le(a+a-) com os tipos Se(secretores) e se(não secretores), uma vez que 05 se apresentaram Le(a+) e 07 Le(a-);

4- Das 04 amostras pertencentes ao grupo sangúineo AB, verificamos que também todas se apresentaram com reação negativa ao soro Anti-H, e demonstraram uma perfeita interação entre as reações dos Soros Anti-Le(b+) com os tipos Se(secretores), numa relação de 04 Le(b+) para 04 Se(secretores);

5- Na amostra pertencente aos tipos AB, constatamos uma interação entre o Sistema Lewis e os Fatores grupo-específicos da saliva, com desdobramento dos tipos Se(secretores) e se(não secretores) que merecem uma explicação especial, isto é, os indivíduos que nos forneceram essas amostras poderão ser:

a) Se(secretores) para as substâncias A ou B;

b) se(não secretores) para ambas as substâncias;

c) Se(secretores) para a substância A e se(não secretores) para a substância B;

d) Se(secretores) para a substância B e se(não secretores) para a substância A.

Nas amostras estudadas, 03 se apresentaram Se(secretores) da substância A e 02 da substância B e 02 se apresentaram se(não secretores) da substância B e 01 da substância A, demonstrando, assim, a independência deste fenômeno de secreção ou não secreção das substâncias A ou B e, ao mesmo tempo, a interação com as características do Sistema Lewis.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os nossos resultados se aproximam daqueles obtidos por FERRI [14] et al. Estes autores demonstraram a relação entre a susbstância H e o Sistema Lewis, ligados especificamente com os fenotipos Le(a) e Le(b). Afirmaram, também, que os indivíduos Se(secretores) se apresentam com fenotipo Le(b+) e os se(não secretores) com o fenotipo Le(a+), tanto na saliva quanto no sangue. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a interação existente entre o grupo sanguíneo do tipo O, a presença da substância H e do fenotipo Le(b+), ligados aos indivíduos Se(secretores), confirmando os resultados destes autores.

Comparando os nossos resultados com aqueles obtidos por BOETTCHER e KENNY [6], verificamos, também, uma perfeita coincidência entre ambos. Estes autores, demonstraram a existência da maior expressão do antígeno H nos indivíduos Se(secretores) pertencentes ao grupo sanguíneo do tipo O, bem como a relação direta entre os indivíduos Se(secretores) e o Sistema Lewis com fenotipo Le(b+).

Neste mesmo sentido, são as afirmações feitas por GRUBB[17], que concluiu que todo indivíduo portador do fenotipo Le(b+) é do tipo Se(secretor) das substâncias ABH, enquanto que os indivíduos Le(a+) são do tipo se(não secretores). Estes resultados coincidem, de forma absoluta, com aqueles obtidos em nosso experimento.

Por outro lado, os resultados obtidos em nosso trabalho coincidem, parcialmente, com aqueles obtidos por BRENDEMOEN [8]. Embora em seus resultados este autor afirme que os se(não secretores) correspondem aos fenotipos Le(a+b-), indica, apenas, um caso de se(não secretor) com fenotipos Le(a-b-). Em nosso experimento, dos 60 indivíduos de nossa amostra, foram identificados 21 se(não secretores) e 42 Se(secretores). A primeira vista, nos parece impossível a somatória de 21 com 42 totalizar 63, sendo que a nossa amostra foi de apenas 60 indivíduos. Entretanto, um fato interessante, que deve ser ressaltado, é que dos 4 indivíduos portadores de sangue tipo AB, 2 são Se(secretores) da substância A e se(não secretores da substância B), 1 é Se(secretor) de ambas as substâncias A e B, e o outro é Se(secretor) da substância B e se(não secretor) da substância A. Estas características dos grupos sanguíneos AB, demonstram que a função secretora ou não secretora constitui uma especificidade dos fenotipos A e B, de forma totalmente independente.

No presente trabalho, dos 42 indivíduos que se apresentaram Se(secretores) das substância ABH, temos: 39 com fenotipos Le(a-b+) e 3 com fenotipos Le(a+b+). Dos 39 com fenotipos Le(a-b+), 18 são portadores de sangue tipo O, todos secretores da substância H, 14 pertencentes ao grupo sanguíneo A e 7 pertencentes ao grupo sanguíneo B. Dos 3 portadores dos fenotipos Le(a+b+), 2 são do tipo AB e 1 pertencente ao grupo sanguíneo B.

Dos 21 se(não secretores), temos: 5 com fenotipos Le(a-b-), sendo 3 pertencentes ao grupo sanguíneo O e 2 do grupo sanguíneo B; 2 com fenotipos Le(a+b+) pertencentes ao grupo sanguíneo AB; 13 com fenotipos Le(a+b-), sendo 5 pertencentes ao grupo sanguíneo O, 4 pertencentes ao grupo sanguíneo B e 4 pertencentes ao grupo sanguíneo A e 1 com fenotipo Le(a+b+) do tipo sanguíneo AB.

Os nossos resultados confirmaram as conclusões de PLATO e GERSHOWITZ [24], somente no que se refere as maiores concentrações de substância H, nos indivíduos secretores pertencentes ao grupo sanguíneo do tipo O. Estes autores não realizaram testes com os soros Le(a) e Le(b), razão pela qual não tivemos condições de comparar com os nossos resultados.

Quanto ao trabalho realizado por PLATINIK, BENEVIDES e SALZANO [23], não nos foi possível estabelecer uma comparação com

os nossos resultados, tendo-se em vista que estes autores realizaram um experimento analisando, somente, as porcentagens de Se(secretores) e se(não secretores) em indivíduos brancos e negros, não estabelecendo uma análise comparativa com o Sistema Lewis.

SATO e OTTENSOOSER[28] demonstraram maiores concentrações de substâncias grupo-especificas no esperma que na saliva, salientando a importância pericial dessas substâncias; porém, não relacionaram os fatores secretores ou não secretores com o Sistema Lewis.

Os nossos resultados não coincidiram, em parte, com aqueles apresentados por RANDERIA e BHATIA [25]. Apesar destes autores indicarem a interação existente entre os grupos sanguíneos do Sistema ABO, nos tipos secretores e não secretores das substâncias ABH, relacionadas com o Sistema Lewis, concluem, estes autores, que o antígeno Le(a) é supostamente o produto de interação entre Le(a) e H. Além disso, os autores apresentam vários casos de secretores de Le(a) e substância H, sem a presença do antígeno Le(b).

Os nossos resultados demonstram, exatamente, o contrário, isto é, o antígeno Le(a) nem sempre está relacionado com a substância H. Além do mais, a quase totalidade dos indivíduos secretores, identificados em nossa amostra, apresentam o antígeno Le(b+) e, com

raras exceções, o antígeno Le(a+) exclusivamente nos indivíduos pertencentes aos grupos sanguíneos tipo AB, sendo que, nos não secretores, predominou a presença do antígeno Le(a). Entretanto, outros estudos poderão dirimir estas divergências.

STURGEON e ARCILLA [32], realizaram um trabalho isolado, com oito pessoas de duas famílias, razão pela qual não nos foi possível discutir os nossos resultados com os destes autores. Demonstraram, nos casos examinados, que com a influência dos genes Se(secretor) e H (substância H), a susbstância Le(a) é convertida para substância Le(b), mas o antígeno Le(x) permanece imutável. Finalmente, aconselham a realização de outros estudos, no sentido de se abrir maior ou menor gradação contínua de variantes de Se(secretores), além dos dois tipos sugeridos por eles.

Os autores GIUSTI, PANARI e FIORIS [16], realizaram estudos apenas para demonstrar o grau de capacidade de inibição da hemoaglutinação das substâncias grupo-específicas ABO e H existentes ou não na saliva. Entretanto, estes autores não relacionaram os seus resultados com o Sistema Lewis. Entre suas conclusões, sugerem a possibilidade de um controle genético das substâncias ABH secretadas na saliva.

Os estudos de STUGEON, MAcQUISTON e CAMP [33], demonstram uma clara e quantitativa divisão da população estudada em secretores e não secretores. Estes autores, separaram os indivíduos em três grupos: Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-), e afirmaram que não há influência dos tipos do Sistema ABO na concentração das substâncias dos Sistema Lewis para Le(a). Em nossos resultados, também constatamos que não há nenhuma relação entre o Sistema ABO e o Sistema Lewis, mas existe uma interação marcante entre os fenotipos do Sistema Lewis e as substâncias grupo-específicas secretadas ou não na saliva humana.

Os resultados apresentados por BARRANTES E SALZANO[1], demonstram as relações entre enzimas gene-específicas do Sistema ABO e o Sistema Lewis. Os autores, estudaram as diferentes concentrações do antígeno A em indivíduos Le(b+) e Le(d-), bem como, em indivíduos A1 e A2. Embora, neste trabalho, os autores indiquem essa interação, não nos foi possível estabelecer uma comparação com os nossos resultados.

Em outro trabalho realizado por PLATINIK, BENEVIDES e SALZANO[23], os autores explicaram o polimorfismo da secreção salivar das substâncias ABH, em populações de brancos, mulatos-claros, mulatos-escuros e negros, de Porto Alegre, ressaltando que importantes

aspectos deste assunto ainda não se encontram completamente claros, como o caso dos secretores aberrantes. Como neste trabalho os autores verificaram, apenas, as incidências dos tipos secretores ou não secretores das substâncias ABH, nestas populações, não nos foi possível estabelecer uma análise comparativa com os nossos resultados.

O trabalho de BOETTCHER[5], demonstra a maior concentração de inibição de aglutinação dos indivíduos secretores A1, em relação aos indivíduos pertencentes ao grupo sanguíneo A2. Como o autor não estabeleceu uma comparação dos resultados com o Sistema Lewis, não nos foi possível discutir com os nossos resultados.

Embora o trabalho de BLACKWEEL[4] e colaboradores, estabeleçam uma relação entre os indivíduos não secretores, da cidade de Stonehouse, com uma infecão meningocócica, estes autores confirmam a interação entre o Sistema Lewis e os fatores grupo-específicos secretados ou não na saliva humana. Demonstraram que os indivíduos que se apresentaram Le (a+) eram não secretores e os indivíduos Le(b+) eram secretores, coincidindo totalmente com os nossos resultados.

O trabalho de MOORES e BRAIN[21], demonstra a freqüência dos fenótipos de Lewis nos indivíduos sul-africanos, secretores e não secretores. Verificaram que 27% eram não secretores das substâncias

ABH e 25% não secretores da substância Le(a). Verificaram, também, que 54% eram portadores dos fenotipos Le(a-b+), 23% eram portadores dos fenotipos Le(a+b-) e 23% eram portadores dos fenotipos Le(a-b-). Embora os autores não afirmem que os 54% portadores dos fenotipos Le(a-b+) são do tipo secretor, estes resultados coincidem, de forma aproximada, com os nossos resultados, para os indivíduos secretores.

O trabalho de ERIKSSON [11], et al. procura associar o tipo não secretor com certas condições patológicas das membranas mucosas dos sistemas digestivo e respiratorio, não sendo possível comparar com os nossos resultados.

Os nossos resultados coincidem com os apresentados por DUBE [10] et al. que classificaram os indivíduos portadores dos fenótipos Le(a+b-) como não secretores e os Le(a-b+) como secretores.

Os resultados apresentados por DOUGLAS [9] et al. demonstram as freqüências do Sistema Lewis, sendo 27,27% com fenótipo Le(a+b-), 58,33% com o fenótipo Le(a-b+) e 4,49% com o fenotipo Le(a-b-). Estes resultados também confirmam as nossas conclusões, pois todos os indivíduos portadores dos fenótipos Le(a-b+), com a maior porcentagem, são do tipo secretor de substâncias grupo-específicas na saliva.

MOTTA [22], afirma que o desenvolvimento dos antígenos Lewis inicia-se na lactância, sendo que as hemácias dos recém-nascidos não são aglutinadas pelos soros anti-Le(a) e Le(b), mas estão presentes, ao nascimento, na saliva e no soro das pessoas com genótipos específicos. O autor explica a interação existente entre os sistemas ABO, H e secretores ou não secretores, admitindo que existe uma hipotética substância precursora, convertida na presença do gene Lewis (Le) em substância Le(a) nas secreções do organismo. Segundo

este autor, quando o gene H e o gene Se estão presentes, parte da substância H solúvel é convertida pelo gene Le para o antígeno Le(b). Nos não secretores, essa conversão de Le(a) em H em H nos tecidos não ocorre, daí a ausência das substâncias A ou B nas secreções. Ressaltamos que esta explicação científica do mecanismo biológico dos indivíduos que se apresentam secretores ou não secretores foi feita, basicamente, por este autor e por ERSKINE e SOCHA [12], entre os trabalhos que tivemos oportunidade de consultar.

SCHIFF [27], BOYD e SHAPLEIGH [7], e SOUZA[30], estudaram basicamente, as freqüências dos indivíduos secretores e não secretores, da substâncias grupo-específicas na saliva, em populações diferentes, razão pela qual deixamos de fazer uma análise comparativa com os nossos resultados.

Acreditamos que, com a realização do presente trabalho, contribuimos com mais uma parcela da fundamentação científica sobre a interação existente entre os aglutinógenos do Sistema ABO, o Sistema Lewis e os fatores grupo-específicos, secretados ou não na saliva humana, e sua importância no contexto pericial.

***

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Pela análise geral de todos os resultados obtidos no presente trabalho, podemos apresentar as seguintes conclusões:

1- Todos os indivíduos pertencentes aos grupos sanguíneos A, B e AB apresentaram reação negativa ao anti-soro H;

2- Dos 26 indivíduos pertencentes ao grupo sanguíneo O, 18 se apresentaram com reação positiva ao anti-soro H e 8 com reação negativa a este soro, demonstrando, assim, uma interação direta, na maioria dos casos, entre o grupo sanguíneo O e a substância H;

3- Dos 4 indivíduos pertencentes ao grupo sanguíneo AB, todos apresentaram reação negativa ao anti-soro H;

4- Não constatamos nenhuma relação entre os grupos sanguíneos do Sistema ABO e os fenótipos do Sistema Lewis;

5- Verificamos uma interação direta entre os fenótipos Le(b+) e os indivíduos secretores, portadores dos fenótipos SeSe ou Sese, e o fenotipo Le(a+) e os indivíduos não-secretores, portadores dos fenótipos sese, das substâncias ABH;

6- Nos indivíduos pertencentes ao grupo sanguíneo AB, verificamos que a função secretora ou não secretora constitui uma especificidade dos fenótipos A e B, de forma totalmente independente.

SUMMARY

SUMMARY

Up to now, many studies have been carried out aiming to find out whether there is an interaction among blood types (ABO system), Lewis system phenotype and group-specific factors (either produced by human saliva or not).

In this study we utilized blood and saliva samples from sixty persons who came to this faculty to do paternity investigation exams under judicial determination. After using the sample for this purpose, the surplus of the sample was used for this research.

From red blood cells suspension samples we determined the antigens of AB0 system, i.e., blood types (A, B, AB or 0), Rh (positive) and rh (negative) factors, Lewis system phenotypes (Le^a e Le^b), and the H substance, using Anti-A, Anti-B, Anti-Le^a and Anti-Le^b serum, and Anti-H Lecithin serum, all of them acquired from Biotest S/A. All the tests were done according to the manufacturer's instructions. The control was done with blood red cells suspensions given by Biotest S/A, so that we avoided result interpretation errors.

The determination of secretory or non-secretory function of substances ABH was achieved through isoagglutination technique as described by FERREIRA[13] and by BEIGUELMAN [3].

The results have confirmed the interaction between phenotypes Le^b and the secretory functions of substances ABH, because no cases were found of secretory function with phenotype Le^{a+}.

The non-secretory function of these substances, from saliva, was mainly related to phenotypes Le^a although we verified a few cases of non-secretory individuals with Le^{a-b-} phenotypes.

In AB blood type individuals we verified that the secretory or non-secretory function from group-specific factors from saliva is specific of phenotypes A and B, in a totally independent way.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas[3]

1.BARRANTES, R., SALZANO, F.M. Genetic and nongenetic influences on the ABH and Le^a antigen levels of saliva and milk. Hum. Hered., v.29, n.23, p.235, 1979.

2.BEÇAK, W., FROTA-PESSOA, O. Genética Médica. 2ed. São Paulo: Sarvier, Brasilia: INL, 1973, p.256-272.

3. BEIGUELMAN, B. O sistema secretor e o sistema Lewis. In:_____. Genética médica: farmacogenética dos sistemas sanguíneos eritrocitários em genética e na prática médica., São Paulo: Edart, 1979, v.3, cap. 5, p.129-135.

4.BLACKWELL, C.C. et al. The stonehouse study: secretor status and carriage of Neisseria species. Epidem. Inf., v.102, p.1-10, 1989.

5.BOETTCHER, B. Correlations between inhibition titres of blood group substances in salivas from A_1, A_2 and B secretors. Aust. J. exp. Biol. med. Sci., v.45, p.495-506, 1967.

[3] De acordo com a NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura

6._____ R. KENNY, A. Quantitative study of Le^a, A and H antigens in salivas of Australian caucasians and aborigines. Human Heredity , p.334-345, 1971.

7.BOYD, W.C., SHAPLEIGH, E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). Blood, New York, v.9, p.1195-1198, 1954.

8.BRENDEMOEN, O. J. Further studies of agglutination and inhibition in the Le(a) - Le(b) system. Clin. Med., v.36, n.3, p. 335-341, Sept., 1950.

9.DOUGLAS, R. et al. Blood group, serum genetic factors, and hemoglobins in Cook Islanders. Transfusion, v.6, p.324-326, 1966.

10.DUBE, E. et al. Effeet of ABO group, secretor status and sex on gold hemagglutinins in normal adults. Vox Sang. V.46, p.75-79, 1984.

11.ERIKSSON, A.W. et al. ABH secretion polymorphism in icelanders, Áland Islanders, Finns, Finnish Lapps, Komi and Greenland Eskimos: a review and new data. Ann of Huma biol., v.13, n.3, p. 273-285, 1986.

12.ERSKINE, A.G., SOCHA, W. W. The principles, and pratice of blood grouping. 2.ed., Saint Louis, C.V. Mosby, pg. 55-81, 1978.

13. FERREIRA, A.A. Perícia das manchas de saliva e da mucosidade vaginal. In:_____. Da técnica médico-legal na investigação forense, São Paulo: Revista dos Tribunais, 1962, v.2, cap.25, p.290-326.

14.FERRI, R., CALICH, V.L.G., VAZ, C.A.C. Imunologia 2.ed., São Paulo, v.1, p. 173-175, 1922.

15.GERARD, G. et al. H- deficient blood groups (Bombay) of reunion island. Am. J. hum. Genet., Chicago, v.34, n.6, p.937-947, Nov. 1982.

16.GIUSTI, G.V., PANARI, G., FIORI, M.T. Population and family studies on the amount of salivary ABH blood group substances. Vox Sang, v.22, p. 54-63, 1972.

17.GRUBB, R. Correlation between Lewis blood group and secretor character in man. Nature, London, v.162, n.4128, dec., 1948.

18._____. Observations on the human group system Lewis. Acta path. microbiol. scand., Kjobenhavn, v.68, p.61-81, 1951.

19.HENRY, S.M., SIMPSON,L.A., WOODFIELD, D.G. The Le(a+b+) phenotype in polynesians. Hum. Hered., Auckland,V.38, p.111-116, 1988.

20.Le PENDU[a], J., et al. Competition between ABO and Le gene specified enzymes. Vox Sang, v.45, p.349-358, 1983.

21.MOORES, P., BRAIN, P. Lewis groups and secretor status in Natal Bantu. Transfusion, v.8, n.5, p283-289, sept., 1968.

22.MOTTA, P. A . Genética humana. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. p.191-197.

23.PLATNIK, B.Y. M., BENEVIDES, J.F. S., SALZANO, F.M. ABH salivary secretion and white/negro gene flaw in a brasilian population. Hum Biol., v.41, p.83-96, 1969.

24.PLATO, C. C., GERSHOWITZ, H. Specific differences int the inhibition titers of the Anti-H lectins from cytisus sessilifolius and Ulex europaeus. Vox Sang, v.6, p.336-347, 1961.

25.PROKOP, O . Grupos sangüineos humanos, Editorial Científico Médica, Madrid-Espanha, 1970.

26.RANDERIA, K.J., BHATIA, H.J. Quantitative inhibition studies on the ABH and lewis antigens in saliva. Indian J. Med. Res., v.59, n.11, p. 1737-1753, Nov., 1971.

27.SAGISAKA, K., YAMASHITA, H., IWASA, M., YOKOI, T. Serological distinction of H antigen between saliva and Red Cell in Forensic Practices, Tohoku J. exp. Med., 1983, 141, 211-15.

28.SATO, M.V.M., OTTENSOOSER, F. Blood group substances in body fluids. J. forensi Med., v.14, n.1, p.30-38, Jan./Mar:, 1967.

29.SCHIFF, F. Racial differences in frequency of the secreting factor. Am. J. Phys. Anthrop., v.27, p.255-262, 1940.

30.SOUZA, F. L. & DARUGE, E. Determinação dos Fatores Grupo-específicos na saliva humana através de testes de inibição da Hemaglutinação, Revista da F.O. Alfenas, Alfenas, nº 17, jan/dez/1995.

31.STEPLEWSKI, Z., et al. A simple procedure for determining lewis phenotypes in human saliva. Immun. Met., v.62, p.73-78, 1983.

32.STURGEON, P., ARCILLA, M.B. Studies on the secretion of blood grup substances I. Observation on the red cell phenotype Le(a+b+x+)[1]. Vox Sang. v.18, p.301-322, 1970.

33._____, MAcQUISTON, D. and CAMP, S.V. Quantitative studies on salivary blood group sustances. Vox Sang, v.24, p.114-125, 1973.