

**Estudo Molecular do Gene ABO do Subgrupo
Sangüíneo A₃ e do grupo O de Ameríndios da tribo
Parakanã**

Defesa de Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pós – Graduação em Clínica Médica,
área de Concentração Clínica Médica, da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de
Doutor em Clínica Médica

Orientadora: Prof^a. Dr^a Sara Teresinha Olalla Saad

Campinas

1999

UNIDADE	OC
N.º CHAMADA	
V.	
TOMADO DE	39 100
PROG.	229199
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	21/10/99
N.º CPD	

CM-00136430-6

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

C279e

Castro, Maria de Lourdes Rios Barjas de
Estudo molecular do gene ABO do subgrupo sanguíneo A3 e do grupo O de ameríndios da tribo Parakanã / Maria de Lourdes Rios Barjas de Castro. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

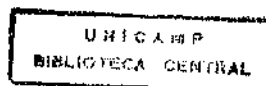
Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biologia molecular. 2. Sangue - análise e química. 3. Hematologia. I. Sara Teresinha Olalla Saad. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Estudo Molecular do Gene ABO do Subgrupo
Sangüíneo A₃ e do grupo O de Ameríndios da tribo
Parakanã**

Orientadora: Prof^a. Dr^a Sara Teresinha Olalla Saad

1999

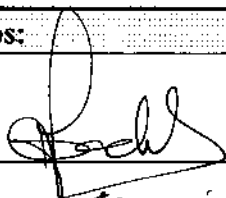


Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

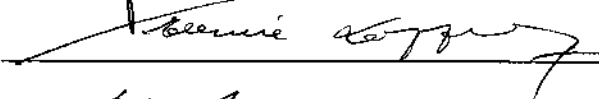
Orientador(a): Profa.Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Membros:

1.



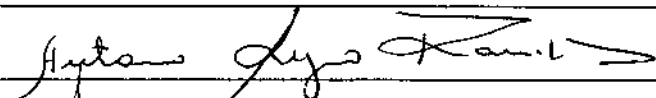
2.



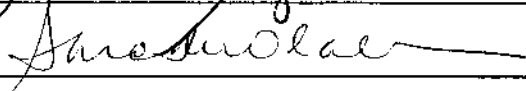
3.



4.



5.



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

Data: 03/09/99

*À mamãe **Zilna Rios Barjas***

Agradecimentos

*À Professora **Sara T. O. Saad**, que além da orientação para execução deste trabalho, me proporcionou muito apoio e incentivo.*

*À Bióloga **Maria Helena**, pela participação constante e a imensa dedicação durante toda fase experimental.*

*Aos funcionários e alunos do **Laboratório de Biologia Molecular**, pela grande ajuda e carinho.*

*A todos os funcionários do **Laboratório de Imunologia Eritrocitária**, pelo apoio na triagem dos doadores, especialmente à **Maria de Fátima** pela incansável colaboração.*

*A **Coordenadoria do Hemocentro Unicamp**, pelas facilidades oferecidas durante a realização desta dissertação.*

*Aos **médicos** e demais **funcionários do Hemocentro Unicamp** que tiveram grande paciência oferecendo ajuda nos momentos difíceis.*

*Aos **doadores de sangue** que participaram deste projeto.*

*Agradecimento especial ao **Vagner** e ao “filhote” **Rodriguinho** pela tolerância aos constantes momentos de ausência.*

	Página
Introdução.....	01
Objetivos.....	15
Casuística e Métodos	17
Resultados.....	32
Discussão	48
Conclusões.....	56
Summary.....	59
Referências Bibliográficas.....	61

Índice de tabelas e figuras

	Página
Figura 1	02
Figura 2	03
Figura 3	04
Tabela 1.....	07
Tabela 2.....	11
Tabela 3.....	24
Tabela 4.....	25
Figura 4	36
Figura 5	37
Figura 6	38
Figura 7	39
Figura 8	40
Figura 9	41
Tabela 5.....	42
Tabela 6.....	42
Figura 10	44
Figura 11	45
Figura 12	46
Figura 13	47

Lista de abreviaturas e siglas

Sigla	Descrição
aa	aminoácido
Ala	alanina
Arg	arginina
As/s	antisense / sense
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
Cys	cisteína
DATP	deoxi adenina trifosfato
DCTP	deoxi citosina trifosfato
DGTP	deoxi guanina trifosfato
DTTP	deoxi tirosina trifosfato
dDATP	dideoxi adenina trifosfato
dDCTP	dideoxi citosina trifosfato
dDGTP	dideoxi guanina trifosfato
dDTTP	dideoxi tirosina trifosfato
Del	deleção
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dnase	DNA polimerase
DO	densidade óptica
EDTA	sal di-sódico do ácido etilenodiaminotetracético
FUNAI	Fundação Nacional do Índio
Glu	ácido glutâmico
Gly	glicina
H	horas
His	histidina
Ile	isoleucina

Sigla	Descrição
IPTG	isopropil-B-D-tiogalactopiranoside
ISBT	Sociedade Internacional Transfusão Sangüínea
Kb	kilobases ou 1000 pares de bases
LBM	meio de cultura Luria Bertani
Leu	leucina
Lys	lisina
M	molar
Met	metionina
Mg	miligrama
µg	micrograma
min	minutos
µl	microlitro
MM	milimolar
µM	micromolar
ng	nanogramas
nm	nanômetro
nt	nucleotídeo
pb	pares de bases
PBS	salina fosfatada (NaCl 16g; KCl 0,4g; posfato de sódio bibásico 5,78g; fosfato de potássio 0,4g, H ₂ O q.s.q. 2000ml)
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
Phe	fenilalanina
pmol	picomol
Pro	prolina
RFLP	estudo do polimorfismo com enzima de restrição
RNA	ácido ribonucleico
RPM	rotação por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
Seg	segundos
Ser	serina

Sigla	Descrição
SSCP	polimorfismo de conformação em hélice simples
Taq	thermus aquaticus
TE	tris 10mM pH 8,0; EDTA 0,1mM pH 7,4
Thr	treonina
Trp	triptofano
U	unidade
UV	radiação ultravioleta
Val	valina
V	voltagem
W	watts
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranoside
5'	extremidade proximal do gene
3'	extremidade distal do gene

Resumo

O sistema ABO é considerado o mais importante grupo de aloantígenos eritrocitários. Os antígenos A e B são glicoproteínas, cujas estruturas antigênicas dependem da atividade de enzimas, glicosiltransferases, que são produtos do gene ABO. Este gene está localizado no cromossomo nove e apresenta sete exons, sendo os dois últimos responsáveis pela maior parte da sequência da proteína codificada.

Foram estudados os exons seis e sete de dez doadores do subgrupo A₃ com estudo familiar em três casos e de 71 Ameríndios da tribo Parakanã. Os doadores A₃ foram pré-selecionados de acordo com critérios sorológicos e posteriormente foi realizada extração do DNA genômico seguido de amplificação dos dois últimos exons através da reação em cadeia da polimerase. O rastreamento das alterações moleculares nos doadores A₃ foi feito através do polimorfismo de conformação de fita simples de DNA e por seqüenciamento direto. Os Índios foram submetidos a amplificação dos exons seis e sete e posterior digestão por enzimas de restrição, com o objetivo de definir a presença da deleção 261G e das mutações: G542A, T646A e C771T.

Os resultados demonstraram que todos doadores são heterozigotos (A₃O) e não apresentam a mutação G871A previamente descrita. O exon sete é polimórfico em indivíduos A₃ e com o estudo familiar foi possível concluir que a deleção 1060C assim como as mutações C467T, T646A e G829A são muito freqüentes neste subgrupo.

O grupo sanguíneo O dos Índios Parakanãs se caracteriza pela presença da deleção 261G. O polimorfismo G542A foi demonstrado em 22% dos alelos O e as mutações T646A e C771T em 65%. Estes resultados são distintos das freqüências descritas em Yanomamis, Araras e Kayapos, o que sugere provável influência dos efeitos Gargalo e Fundador neste grupo Indígena.

1 - Introdução

1.1- Grupos Sangüíneos

Os antígenos eritrocitários são estruturas polimórficas que correspondem a proteínas, glicoproteínas ou glicolípides localizados na membrana eritrocitária, mas que também podem se distribuir em outros tecidos (Watkins, 1980, Clausen Hakomori, 1989, Oriol, 1987). Estes antígenos são identificados por anticorpos obtidos através de aloimunização por transfusões e gestações e também como consequência da imunização natural de antígenos provenientes do meio ambiente (Marcus, 1969).

Aproximadamente 260 antígenos foram definidos sorologicamente e agrupados em 25 sistemas de acordo com as normas da Sociedade Internacional de Transfusão Sangüínea – ISBT (Daniels, 1998).

O sistema ABO, considerado o maior e mais importante grupo de aloantígenos eritrocitários humanos, foi descoberto por Landsteiner em 1901 durante testes de aglutinações de hemácias com soros de diferentes indivíduos.

Os sistemas ABO e Hh que englobam os antígenos A, B e H foram os primeiros definidos bioquimicamente e são caracterizados como estruturas glicídicas ligadas a glicoproteínas ou glicolípides da membrana eritrocitária - figura 1 (Watkins & Morgan, 1952; Morgan, 1960). A estrutura final destes antígenos dependem da ação de enzimas conhecidas como glicosil-transferases que são codificadas pelo gene H no cromossomo 19 e pelo gene ABO no cromossomo 9 (Westerveld et al., 1976; Ailderdice et al, 1986). A fucosiltransferase, produto do gene H, é capaz de transferir um resíduo de fucose para N-acetil-glicosamina-galactose formando o antígeno H - L $\text{Fuc}\alpha 1\text{-2Gal}$ (Watkins, 1980).

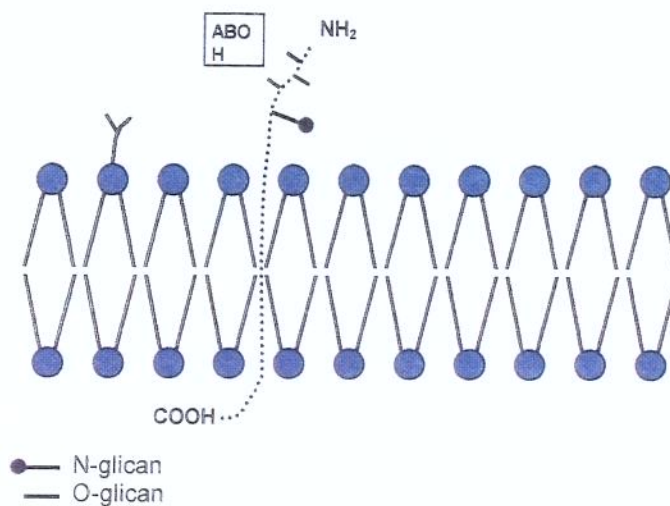


Figura 1: Modelo da membrana eritrocitária com os antígenos dos sistemas ABO e Hh

A glicosil transferase catalisa a transferência específica de um açúcar sob a forma ativada para o antígeno H, que funciona como um substrato receptor (Watkins, 1980). Este resíduo adicional transferido pela enzima pode ser a N-acetil galactosamina ou galactose, originando os grupos sanguíneos A e B respectivamente (figura 2)

Nos indivíduos do grupo sanguíneo O, o antígeno H não modificado, é portanto identificado na membrana eritrocitária e em células epiteliais (Morgan, 1960).

O gene ABO, responsável pela síntese da glicosil transferase, está localizado no braço longo do cromossomo nove - q34.1-q34.2 (Allderice et al., 1986) e possui uma estrutura molecular bem conhecida composta por sete exons (Bennett et al, 1995) - figura 3.

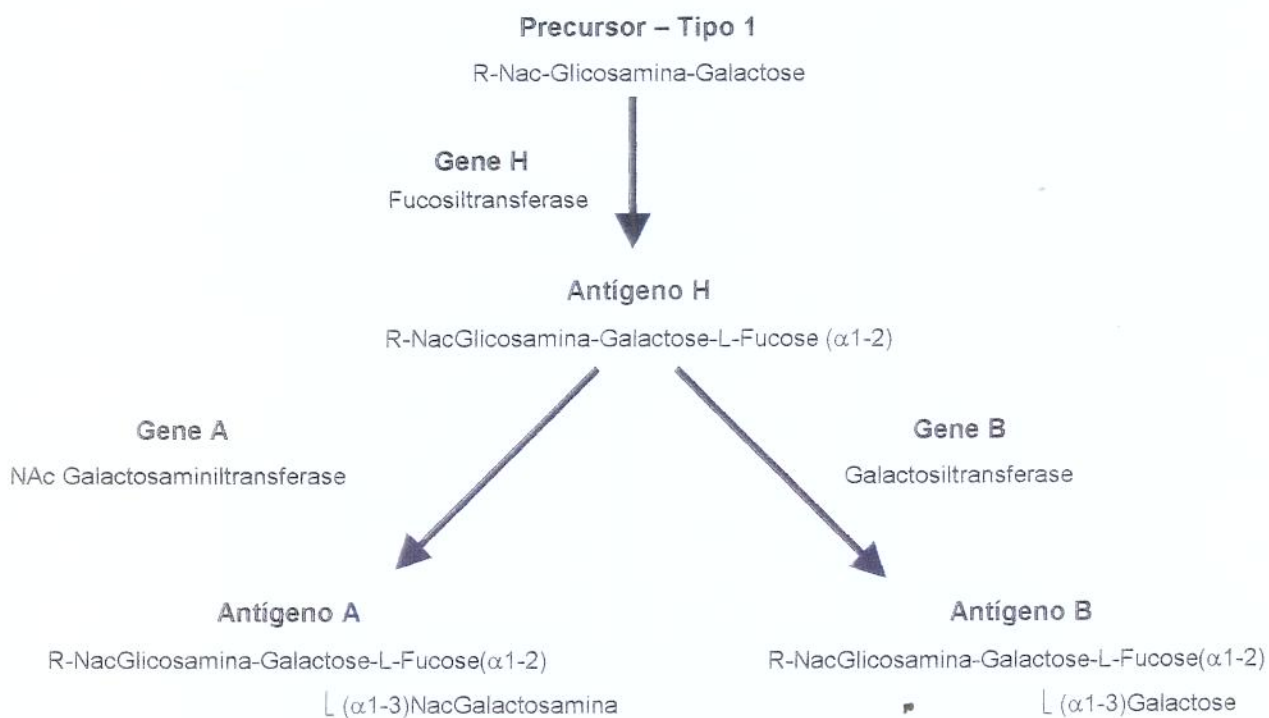


Figura 2: Antígenos H, A e B dos sistemas ABO e Hh; biossíntese e estruturas relacionadas

Clausen et al., no final da década de 1980, purificaram e seqüenciaram a A transferase solúvel, procedente do pulmão de indivíduos do grupo sanguíneo A . Baseado nas informações obtidas do seqüenciamento, Yamamoto et al. (1990a) realizaram a clonagem molecular e a caracterização do DNA complementar. Foi então construída uma livraria de cDNA em lambda gt 10 com poli A e RNA procedente de linhagem celular de câncer gástrico humano (MKN 45). Esta linhagem foi escolhida por apresentar alta expressão do antígeno A e elevada atividade da A transferase. A identidade da seqüência gênica foi posteriormente confirmada pela expressão da transfecção do DNA em células HeLa (Yamamoto et al, 1990b).

As enzimas galactosaminil e galactosil transferase, produtos dos alelos A e B, possuem aproximadamente 354 aminoácidos (Yamamoto et al, 1900b; Bennnett et al, 1995; Ogasawara et al., 1966) .

O domínio catalítico da proteína está localizado na porção C-terminal, sendo que na região inicial existem 21 aminoácidos que representam o domínio transmembrana, pelo qual ocorre a fixação na membrana da hemácia (Paulson et al., 1989; Clausen et al., 1992). No sangue é encontrada uma substância semelhante, solúvel, com ausência da região N terminal (300 aminoácidos) e que conserva a atividade catalítica.

Gene - ABO

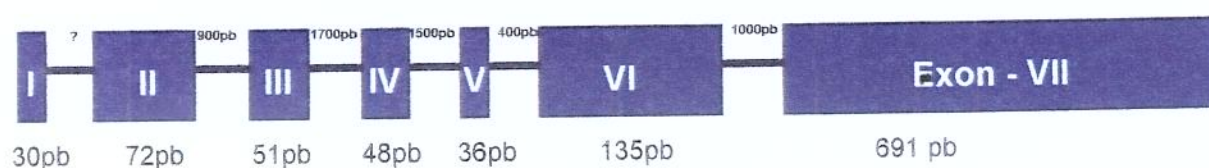


Figura 3: Organização do gene ABO exons e introns (Bennett et al, 1995; Ogasawara et al., 1966)

Os alelos A e B possuem 99% de homologia na sequência de nucleotídeos e diferem apenas por sete bases nos exons seis e sete (posições A297G, C526G, C657T, G703A, C796A, G803C e G930A) que acarretam somente quatro substituições de aminoácidos nas posições Arg176Gly, Gly235Ser, Leu266Met e Gly268Ala (Yamamoto & Hakomori, 1990). Estas duas enzimas diferem em suas especificidades, pois a NAc galactosaminiltransferase (gene A) adiciona um resíduo de N-acetil-galactosamina ao antígeno H, enquanto a galactosiltransferase (gene B) adiciona um resíduo de galactose.

Os aminoácidos nas posições 266 e 268 são importantes na atividade catalítica da enzima enquanto que os aminoácidos nas posições 216, 223, 291 e 352 parecem estar relacionados com a quantidade da enzima produzida (Lowe, 1996; Ogasawara et al, 1996a). As mutações pontuais nas posições descritas definem alguns dos subgrupos de A e B (Yamamoto, 1995).

O grupo sanguíneo A₂ caracteriza-se por hemácias que reagem apenas com anticorpos anti-A. Os anticorpos anti-A₁, obtidos geralmente a partir de lecitinas como a *Dolichos biflorus*, não reconhecem o referido antígeno (Bird, 1952; Lopez et al., 1980) que apresenta além de diferenças bioquímicas, um menor numero de sítios antigênicos distribuídos na membrana eritrocitária (Clausen et al, 1984; 1985; 1986; Heier et al, 1988, Heier et al, 1994). O gene A₂ resulta da associação da mutação T467C/Pro156Leu com a deleção de um nucleotídeo na região 3', que gera desvio de leitura de transcrição ocorrendo, como consequência, uma inserção de 21 aminoácidos na proteína e diminuição da atividade enzimática. As mutações C1054T/Arg352Trp, C1054G/Arg352Gly e G829A/Val277Met também foram descritas em hemácias A₂ (Yamamoto et al, 1992; Ogasawara et al, 1996a).

Os grupos sanguíneos com fraca expressão do antígeno A apresentam padrões de reações sorológicas distintos, que traduzem um menor número de sítios antigênicos e reciprocamente um aumento do antígeno H na membrana eritrocitária. A intensidade das reações das hemácias com soros anti-A, anti-A₁, anti-AB e anti-H; a presença de anti-A₁ no soro e a existência de substâncias A e H na saliva de secretores auxiliam na definição destes subgrupos – Tabela 01 (Daniels, 1995).

O subgrupo A_3 é pouco freqüente e pode ser identificado em 0,001% a 0,01% dos indivíduos do grupo sanguíneo A (Reed, 1964; Garreta et al., 1974). O padrão de aglutinação de hemácias A_3 com soros policlonais anti-A e Anti-AB se caracteriza por pequenos aglutinados circundados por hemácias livres. A ocorrência de anticorpo anti- A_1 é variável neste fenótipo, e a saliva de secretores contém substâncias A e H (Tabela 1). O estudo molecular de indivíduos A_3B demonstrou em dois casos a mutação G871A, resultando na substituição do aminoácido asparagina pelo ácido aspártico na posição 291. Este fato levou Yamamoto et al (1993a) a considerarem esta mutação como a responsável pelo referido subgrupo apesar deles não a terem identificado em outros dois indivíduos A_3 . Posteriormente, Olsson & Chester (1996a) estudaram sete indivíduos A_3 e não constatarem nenhuma alteração na seqüência gênica dos dois últimos exons do gene ABO.

A freqüência do grupo sanguíneo A_x é estimada em 0,003% dos indivíduos do grupo A (Salmon et al., 1965; Garreta et al., 1974). Hemácias A_x com soro policlonal anti-A não aglutinam, ou podem apresentar uma reação de fraca intensidade como a descrita com soro AB de doadores O (Daniels, 1995). A enzima transferase A não é usualmente detectada no soro ou na membrana eritrocitária do subgrupo A_x (Cartron, 1976), Greenwell and Watkins (1978) descreveram uma fraca A transferase com maior atividade em pH oito do que em pH seis. O estudo do DNA demonstrou que a seqüência dos dois últimos exons do gene ABO deste subgrupo é idêntica ao de pessoas do grupo sanguíneo A com exceção da mutação T646A que resulta na mudança do aminoácido Phe216-Ile (Yamamoto et al., 1993c; Olsson & Chester, 1998).

Tabela 1: Padrões de reações sorológicas, características da A tranferase e densidade dos sítios antigenicos nos principais subgrupos de A.

Grupo	Reação de hemácias com soros				Anti-A ₁ soro	Ag saliva	A transferase		AgA/hem X 10 ⁵
	Anti-A	Anti-AB	Anti-A ₁	Anti-H			Soro	Hemácia	
A ₃	CM	CM	-	+	variável	A e H	variável	-	0,07 – 1,0
A _{end}	CM	CM	-	+	variável	H	-	-	0,011 – 0,044
A _x	-/W	w	-	+	usual	H	raro	-	0,014 – 0,10
A _m	-/W	-	-	+	-	A e H	+	-	0,001 – 0,019
A _{el}	-	-	-	+	+	H	-	-	0,001 – 0,014

CM - Campo misto
W – Fracamente positivo
Sítios antigenicos A₁ : 7,95 – 14.56 x 10⁵Ag A/hemácia

Os subgrupos A_m e A_{el} são raros, as freqüências variam de acordo com a população analisada. Na França, em 150.000 doadores de sangue estudados nenhum caso de A_{el} e apenas um A_m foram encontrados; ao passo que na China cinco indivíduos A_{el} e um A_m foram identificados em 400.000 pessoas submetidas a testes para determinação de grupo sangüíneo ABO (Garreta et al., 1974; Lin-Chu et al, 1987). Hemácias A_m e A_{el} não são aglutinadas por soros anti-A e anti-AB, mas os anticorpos podem ser absorvidos e eluídos (Tabela 1). O estudo molecular de indivíduos A_{el} mostrou a inserção de repetidas guaninas nas posições 798-804 resultando em “frame shift” (Olsson et al., 1995).

A distribuição do antígeno A varia nos diferentes subgrupos, em hemácias A₃ aproximadamente um terço das células não apresentam sítios antigenicos A detectáveis por imunomicroscopia eletrônica e nas variantes A_m e A_e em apenas 5% das hemácias o antígeno A pode ser detectado (Reyes et al., 1976).

O grupo sanguíneo O se caracteriza pela ausência de atividade das enzimas glicosil transferases, como consequência o antígeno H persiste na membrana eritrocitária e demais células que o expressam. Várias alterações moleculares do gene ABO podem levar ao fenótipo O. A deleção 261G que caracteriza os indivíduos O¹, leva a um desvio de leitura da transcrição e à produção de uma proteína de 117 aminoácidos, desprovida de atividade catalítica, que é rapidamente degradada (Yamamoto et al., 1990b). Esta mutação ocorre em aproximadamente 95% dos indivíduos O brancos e negros (Olsson & Chester; 1995; Franco et al; 1995; Olsson & Chester; 1996 b, Mifisud et al., 1996). Nove mutações foram descritas associadas à deleção 261G caracterizando, o grupo O^{1v}, G106T, G188A, C189T, C220T, A297G, T646A, G681A, C771T, G829A (Yamamoto et al., 1990b; Olsson & Chester 1996b). Nestes indivíduos, também a molécula completa da proteína não é produzida pois a deleção causa um “frameshift” com a criação de um codon de terminação prematuro. O alelo O^{1v} foi identificado em 31% dos negros brasileiros do grupo O, em torno de 40% dos brancos do Brasil e da Suécia (Ogasawara et al., 1996b; Olsson & Chester, 1996b; Olsson et al., 1998). O alelo O² representa 3.7% a 6% dos indivíduos O brancos e negros; é resultante de uma mutação pontual do nucleotídeo 802 que leva à uma substituição da glicina pela arginina na posição 268, que é o sítio catalítico da enzima (Yamamoto et

al., 1993d; Grunnet et al., 1994; Olsson & Chester, 1996b). As mutações A297G e C526G / Arg176Gly também podem estar presentes em indivíduos O² (Yamamoto et al., 1993d). Recentemente foi descrito um doador de sangue O com a associação das alterações moleculares relatadas previamente no A² (C467T e deleção 1060C) e a inserção de múltiplas guaninas na porção 798-804, descrita previamente em A^{el}. (Olsson & Chester, 1996c).

Os alelos O¹ são facilmente determinados por técnicas de biologia molecular considerando que a deleção 261G abole um sítio de restrição da enzima *BstE II* e cria um sítio para a enzima *Kpn I* (Yamamoto et al., 1990 b, Grunnet et al., 1994).

Os subgrupos de B são muito raros, provavelmente reflexo da baixa frequência do gene B na população. O estudo do DNA de indivíduos B₃ mostrou a mutação C1054T com a substituição do aminoácido Arg 352 Trp, mesma alteração molecular descrita em indivíduos A² (Yamamoto et al., 1993a; Ogasawara et al., 1996). Duas mutações foram descritas em doadores B_{el} a T641G e G669T com as respectivas mudanças dos aminoácidos Met214Arg e Glu223Asp, podendo também estar associada à mutação C467T (Ogasawara et al, 1996a). A tabela 2 resume as principais diferenças moleculares entre os alelos do gene ABO.

As definições das frequências fenotípicas, imunogenicidade dos antígenos, bases moleculares e polimorfismos são fatores relevantes na medicina transfusional, em transplantes de órgãos, gestações e na caracterização de alterações morfológicas e funcionais eritrocitárias relacionadas a deficiências antigênicas (Lowe, 1996; Oriol, 1996).

Os antígenos de grupos sanguíneos possuem bases moleculares definidas, consequência de numerosos estudos bioquímicos e de genética molecular desenvolvidos nos últimos anos. Atualmente, investigações são dirigidas com objetivo de definir os polimorfismos, a expressão dos antígenos em tecidos e suas funções.

A estrutura molecular do gene ABO de subgrupos pouco freqüentes como o A₃ ainda permanece incerta, além dos estudos abrangerem apenas pequenos números de casos. Estes dados enfatizam a importância de um estudo do ponto de vista molecular do gene ABO em indivíduos com fenótipo A₃.

Tabela 2 – Principais mutações descritas nos exons seis e sete do gene ABO e substituições de aminoácidos
(Modificado de Yamamoto et al., 1993a;b;c; Ogasawara et al., 1996a).

		Exon VI		Exon VII																
Alelos	Nt aa	261	297	467 156	526 176	646 216	657	668 223	681	703 235	771	796 266	802	803 268	798-804	829 277	871 291	930	1054 352	1058-81
A ¹		G	A	C Pro	C Arg	T Phe	C	G Glu	G Glu	G Gly	C	C Leu	G Gly	G Gly	GGGGG GG	G Val	G Asp	G	C Arg	CCC
A ²		-	-	T Leu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CC (→)
A ³ (A ³ B)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A Asn	-	-	-
A [*]						A Ile														
A ^{vi}		-	-	-	-		-		-	-	-	-	-	-	GGGGG GGG(→)	-	-	-	-	-
B		-	G	-	G Gly	-	T		-	A Ser	-	A Met	-	C Ala	-	-	-	A	-	-
B ^(A)		-	G	-	G Gly				-		-	A Met	-	C Ala	-	-	-	A	-	-
B ³ (AB ³)		-	G	-	G Gly		T		-	A Ser	-	A Met	-	C Ala	-	-	-	A	T Trp.	-
B [*]			G		G Gly		T			A Ser		A Met		C Ala			A Asn	A		
B ^{vi}			G		G Gly		T	T Asp		A Ser		A Met		C Ala				A		
Cis AB				T Leu										C Ala						
O ¹		Del (→)		-	-	-	-		-	-		-	-	-	-		-	-	-	-
O ^{iv}		Del (→)	G	-	-	A Ile	-		A		T	-	-	-	-	A Met	-	-	-	-
O ²		-	G	-	G Gly	-	-		-		-	-	A Arg		-	-	-		-	-

Nt: nucleotídeos; aa: aminoácidos

1.2 – Índios Parakanãs

Os Índios Parakanãs pertencem ao tronco lingüístico Tupi e vivem em três aldeamentos (Paranatí, Marudjewara e Bom Jardim) situados no norte do estado do Pará. As informações acerca deste grupo indígena são recentes e mais precisas, somente a partir da década de setenta, quando parte deles foram contatados pelas frentes de atuação da FUNAI – Fundação Nacional do Índio (Black et al, 1980). Os Parakanãs possuem hábitos próprios como comportamento menos belicoso que os vizinhos Kayapos e a poligâmia, com casamentos preferencialmente constituídos entre tios e sobrinhas (Black et al., 1980).

Em 1984, este grupo Indígena era constituído por cerca de 340 indivíduos conhecidos regionalmente como índios brancos, pela característica cor clara de sua pele. Entretanto vários marcadores genéticos como ceruloplasmina, esterase D, fosfoglucomutase e alguns antígenos eritrocitários como Duffy a , Diego a e MNSs, não mostraram evidências de miscigenação com caucasóides (Race & Sanger, 1975; Black et al 1980).

Franco et al. (1994), estudando três tribos da Amazônia, Kayapo, Yanomama e Arara, constatou que o fenótipo O desta população se caracteriza, do ponto de vista molecular, pela presença da deleção 261G (O¹). Esta alteração molecular também predomina no grupo O de negros e caucasóides (Yamamoto et al., 1990b, Franco et al., 1994) . Posteriormente, analisando a mesma amostragem de Ameríndios, Franco et al (1995) confirmou a ausência do alelo O².

A heterogeneidade do exon sete do grupo O foi avaliada em negros, brancos e Índios (Kayapo, Yanomama e Arara) através do estudo da degradação do DNA genômico com enzimas de restrição (RFLP). A digestão com as enzimas *Hinc II*, *Bgl I*, *Kpn I*, *Taq I* e *Hinf I* mostrou a presença de dois a cinco diferentes alelos, sendo maior a heterogeneidade do gene O encontrada nos indivíduos negros quando comparados com os brancos e indígenas. A associação alélica entre os diferentes sítios de restrição permitiu a identificação de sete haplótipos entre os negros comparado com apenas dois nos brancos e Ameríndios. Os resultados deste estudo permitiram concluir que o alelo O é polimórfico entre os Indígenas e os dois haplótipos possuem diferentes frequências daquelas observadas nos caucasóides (Zago et al., 1996).

Olsson et al. (1997;1998) também estudaram polimorfismos do O nos Índios das tribos Kayapo, Yanomama e Arara, realizando inicialmente a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com múltiplos iniciadores associada ao RFLP e posteriormente, PCR com iniciadores alelos específicos e reações de sequenciamento direto. Nesta avaliação foi constatado uma frequência superior a 90% do alelo O^{1v} nos Índios, resultado distinto do encontrado em negros e brancos brasileiros que apresentaram a frequência do alelo de 30 e 40% respectivamente. O polimorfismo G542A foi identificado em 43% dos alelos O deste grupo Indígena e apenas em 3% dos negros e 4% dos brancos. Estes resultados levaram Olsson a concluir que esta mutação está fortemente associada ao alelo O^{1v}.

A substituição G542 A foi considerada um marcador polimórfico em uma população homogênea, com relação ao gene ABO, pelo fato dela ter sido identificada em aproximadamente 50% dos Ameríndios O^{1v} (Olsson et al., 1998)

Vários estudos sobre grupos sangüíneos em Indígenas e descendentes demonstraram a presença exclusiva do grupo sangüíneo O (Mourant, 1970; Roychoudhuri & Ney, 1988), desta forma os polimorfismos ligados a este grupo apresentam um especial interesse em Ameríndios (Mourant et al, 1970;1976; Roychoudhuri & Ney, 1988).

2 - *Objetivos*

Objetivos:

- Estudo do polimorfismo gênico do subgrupo sanguíneo A₃
- Estudo do polimorfismo gênico do grupo sanguíneo O de Índios da tribo "Parakanã"

3 - Casuística e Métodos

3.1 – Casuística

3.1.1 - Doadores do subgrupo sangüíneo A₃

Foram estudados 10 doadores de sangue do grupo sangüíneo A₃ e em três casos foi possível realizar o estudo familiar. Os doadores foram pré selecionados de acordo com critérios sorológicos de definição do referido subgrupo (Daniels, 1995).

3.1.2 – Índios Parakanãs

Foram estudados 71 Ameríndios Parakanãs das aldeias Paranatí e Marudjewara.

3.1.3- Grupos Controles

Os grupos controles foram constituídos por 50 doadores de sangue, do grupo sangüíneo O e três doadores A heterozigotos (AO), procedentes da região de Campinas.

3.2 – Métodos Sorológicos

3.2.1 – Redeterminação do grupo sangüíneo ABO dos doadores previamente tipados com A₃

Foram realizadas provas, eritrocitárias com hemácias A₁ e B (*Biotest S/A, São Paulo*) e séricas pelas técnicas de hemaglutinação em tubo (Vengelen-Tyler, 1996), placa opalina (Rouger & Salmon, 1981) e gel centrifugação (Lapierre et al., 1990). Os

antisoros anti-A, anti-B e anti-AB, policlonais, monoclonais e mistura, de quatro diferentes procedências foram utilizados de acordo com os critérios dos fabricantes (*DiaMed-ID Micro Typing System, Cressier sur Morat, Switzerland; Sanofi Diagnostics Pasteur S.A. Marnes la Coquette, France; Ortho Diagnostic Systems, Raritan NJ, Lorne Laboratories Ltd, England*). As amostras foram analisadas também com lecitina anti-A₁ - *Dolichos biflorus* (*Ortho Diagnostic Systems, Raritan NJ; DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland*) e anti-H - *Ulex europeus* (*DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland*). Os indivíduos A₃ foram submetidos a determinação de grupo sanguíneo nos diferentes soros e métodos (tubo, gel e placa opalina) e por dois técnicos diferentes que não conheciam o doador (estudo cego). Membros das famílias dos doadores A₃, tipados como O, foram investigados pela técnica de absorção e eluição (Vengelen-Tyler, 1996) com os diferentes soros anti-A, com objetivo de avaliar a presença do referido antígeno com fraca expressão.

As reações das hemácias dos dez doadores considerados A₃ com soros anti-A e anti-AB dos quatro diferentes fabricantes e nas diferentes técnicas mostraram padrões compatíveis ao subgrupo A₃ e com soro anti-H houve aglutinação de forte intensidade (Daniels, 1995, Oriol, 1996).

3.2.2 – Determinação do grupo sanguíneo ABO dos Índios Parakanãs e grupos controles

Os 71 Índios e grupos controles foram submetidos a determinação do grupo sanguíneo ABO e Rh pela técnica de gel centrifugação (Cartão ABD - *DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland*) e em tubo (Vengelen-Tyler, 1996). Foram realizadas provas eritrocitárias

com soros anti-A, anti-B, anti-AB e anti-D (*Biotest S/A, São Paulo*) e provas séricas com hemácias A e B (*Biotest S/A*). As amostras foram analisadas também com lecitina anti-H - *Ulex europeus* (*DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland*).

3.3 – Métodos moleculares

3.3.1- Extração do DNA genômico

O DNA foi isolado de células nucleadas a partir de 20 ml de sangue venoso coletado em EDTA 10% - sal dissódico do ácido etilenodinitrotetracético (Sambroock et al., 1989). O sangue inicialmente foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos. Para lise de hemácias foi adicionado solução de NH_4Cl 0,144 (cloreto de amônia) na proporção de 5 vezes o volume de células e solução de NH_4HCO_3 0,01M (bicarbonato de amônia) na proporção de 0,5 vezes o volume de células. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos e seguida de centrifugação por 15 minutos a 2.500 rpm a 4°C. Esta etapa foi repetida até a obtenção de um precipitado de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram dissolvidos em 10ml de tampão contendo NaCl 0,3 M, EDTA 10mM, Tris/HCL pH 7,5 10mM, Uréia 7M, dodecil sulfato de sódio 20% (SDS) e incubado a 37°C por aproximadamente 16 h. Após a incubação foram realizadas três extrações com igual volume de mistura contendo fenol (redesilado e saturado em Tris/HCl pH 8,0 - 0,2mM com 0,1% de hidroxiquinolona) clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Cada extração foi seguida por centrifugação a 2500 rpm

durante 20 minutos. No final, a camada superior, contendo o DNA, foi transferida para um novo tubo e realizada nova extração apenas com clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1. A precipitação do DNA foi feita com etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume) e acetato de sódio 3M pH 5,3(10% do volume). O DNA precipitado foi lavado em etanol a 70% para eliminar resíduos de fenol e sal e posteriormente diluído em água estéril ou em TE (Tris pH 8,0 10mM; EDTA 0,1mM pH 7,4). A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria pela leitura das densidades ópticas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm em luz ultravioleta (Sambroock et al., 1989).

3.3.2 - Amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e digestão com enzimas de restrição

Os exons seis e sete do gene ABO dos Ameríndios e doadores A₃ foram amplificados para posterior análise, utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR (Saiki et al.,1985). Este método baseia-se na utilização de iniciadores (primers) que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada, onde se hibridizam devido a complementaridade da seqüência. Os repetitivos ciclos de desnaturação térmica, anelamento e extensão dos iniciadores, promovidos pela enzima *taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase levam a um acúmulo exponencial do fragmento.

As reações foram realizadas num volume final de 50µl contendo 500ng de DNA genômico; 10mM Tris-HCl pH 8,5; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂, 10mM de cada deoxi-nucleotídeo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 0,25µM de cada iniciador e 1U de *taq* DNA polimerase. Foram utilizados sete pares de iniciadores, visando a

amplificação de fragmentos pequenos de 120 a 320 pb sendo cinco deles para garantir a amplificação do exon sete (tabela 3).

As amostras foram desnaturadas inicialmente por 5 minutos a 94°C e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C (1min), anelamento 54 a 61°C (1min) e extensão a 72°C (30seg). O último ciclo teve um período de extensão prolongado por sete minutos. A reação foi realizada em ciclador automático de temperatura (*Perkin Elmer-Cetus, cetus corp, Boston, MA; PTC100-MJ Research Inc, Watertown Mass, USA*).

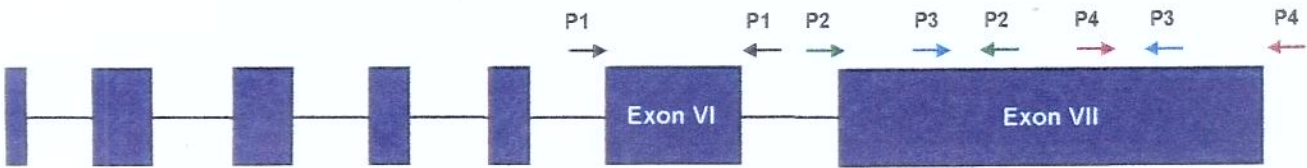
O material amplificado foi separado em gel de agarose a 2% e então visualizado sob luz ultravioleta (UV) após coloração com brometo de etídio.

Para análise dos polimorfismos descritos, foram amplificadas as regiões comprometidas e digeridas com enzimas de restrição. Nos doadores A₃ foi investigado a mutação a G871A, descrita por Yamamoto et al. (1993a) em indivíduos A₃B. O fragmento amplificado com os iniciadores P4a (s/as) foi submetido a digestão com a enzima de restrição *Sal I* (Yamamoto et al., 1993a).

A determinação do grupo sangüíneo dos Ameríndios mostrou que todos pertencem ao grupo sangüíneo O. O exon seis do gene ABO, dos 71 Índios, foi amplificado e submetido a digestão pelas enzimas de restrição *Kpn I* e *BstE II* (Yamamoto et al., 1990 b; 1995), com o objetivo de definir a presença da deleção 261G, descrita previamente em Índios da floresta Amazônica (Franco et al., 1994). Posteriormente os polimorfismos descritos, G542A, T646A (Phe216Ile), C771T, foram estudados em 52 Índios com as enzimas *NheI* (Olsson et al, 1998.), *Mbo I* (Clausen et al., 1994; Fukumori et al, 1996; Olsson & Chester 1996b) e *Dde I* (Olsson & Chester, 1996b) respectivamente.

As mutações T646A e C771T também foram investigadas no grupo controle de 50 doadores de sangue do grupo sanguíneo O.

Tabela 3: Iniciadores utilizados para estudo dos exons seis e sete do gene ABO



Exon	Iniciadores	Produtos do PCR
Exon-6 (P1a)	s- 5' TGCCAGCTCCATGTGACCGCAC3' as- 5' TCGCCACTGCCTGGGTCTCTAC3'	220pb
Exon-6 (P1b)	s- 5' ACGCCTCTCTCCATGTGCAG 3' as- 5' TGGTGGTGTTCCTGGAGCCTG 3'	127pb
Exon-7 (P2a)	s- 5' CCGTCCGCCTGCCTTGCAG 3' as- 5' CACACCAGGTAATCCACCTC 3'	270pb
Exon-7(P2b)	s- 5' TGCAGATACGTGGCTTTCCTG 3' as- 5' CACGCACACCAGGTAATCCAC 3'	261pb
Exon-7(P3)	s- 5' CGCATGGAGATGATCAGTGA CTTC 3' as- 5' TTGGCCTGGTCGACCATCATG 3'	320pb
Exon-7 (P4a)	s- 5' TGCAAGAGGTGCAGCGGCTC 3' as- 5' TGCCGGCAGCCCTCCCAGAG 3'	279pb
Exon 7 (P4b)	s- 5'CCAGGCCAACGGCATCGAG 3' as-- 5' CCGGCAGCCCTCCCAGAG 3'	225pb

As digestões, com enzimas de restrições, foram realizadas sob as seguintes condições: 10µl de reação PCR; 3µl de tampão (específico de cada enzima), 5U de enzima, em um volume final de 30µl. Nas digestões que exigiam temperaturas mais elevadas (60°C) utilizou-se uma gota de óleo mineral sobre a mistura evitando a evaporação da água. As enzimas de restrição utilizadas, assim como os referidos sítios, tempos e temperaturas de digestão estão representadas na tabela 4.

Tabela 4: Enzimas de restrição utilizadas no estudo dos polimorfismos dos exons seis e sete do gene ABO

Enzimas	Sítios de restrição 5'→3'	T°C	Exons	Substituições / Deleções
<i>Kpn I (Gibco BRL Products)</i>	5' GGTAC↓C 3'	37°C	6	Del G261
<i>BstE II (Pharmacia Biotech)</i>	5' G↓GTNACC 3'	60°C	6	Del G261
<i>Nhe I (Gibco BRL Products)</i>	5' G↓CTAGC 3'	37°C	7	G542A
<i>MboI (Amersham Life Science)</i>	5' ↓GATC 3'	37°C	7	T646A / Phe216Ile
<i>Dde I (Amersham Life Science)</i>	5' C↓TNAG 3'	37°C	7	C771T
<i>Sal I (Gibco BRL Products)</i>	5' G↓TCGAC 3'	37°C	7	G871A / Asp291Asn

3.3.3- PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism – polimorfismo de conformação de hélice simples) para o rastreamento dos polimorfismos dos exons seis e sete dos doadores A₃

O rastreamento de alterações moleculares dos exons seis e sete dos doadores A₃ foi realizado pelo método automatizado do polimorfismo de conformação de fita simples - SSCP (Orita et al., 1989) com a utilização do equipamento "PhastSystem" (*Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*).

Este método caracteriza-se pela análise de polimorfismos de conformação de fitas simples de DNA após a amplificação do DNA genômico pela técnica de PCR. O princípio do método SSCP baseia-se na observação de que as fitas simples de DNA, obtidas pela desnaturação do DNA dupla hélice, formam estruturas ou configurações secundárias variáveis, em função da seqüência de nucleotídeos. Essas fitas simples podem ser separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. A migração das fitas simples e o padrão das bandas observadas em gel depende da constituição das bases e da temperatura durante a eletroforese. A comparação dos padrões de migração do DNA controle e do DNA em estudo pode permitir a identificação da região do exon com alteração molecular.

A análise do PCR-SSP foi realizada utilizando-se géis pré moldados *Phastsystem* (*Pharmacia*) e subseqüentemente corado com nitrato de prata. O sistema dispensa o uso de isótopos radioativos e o equipamento permite a leitura dos resultados em menos de duas horas após a aplicação das amostras, além de manter a temperatura estável durante a corrida. As amostras do produto do PCR dos exons seis e sete foram diluídas em uma solução contendo formamida 95%, EDTA 10mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,1% e xilenocianol 0,1% na proporção 1:4 e posteriormente desnaturadas a 94°C por 5 minutos e mantidas em gelo até o momento da aplicação. Desta solução 0,3µl foram submetidos a eletroforese em géis de poliacrilamida pré - moldados 12,5%

e 20% em tampão acetato 0,112M e Tris 0,112M - pH6,4. As condições de eletroforese foram 25V por 2 horas a 4°C e 16°C

A coloração dos géis foi realizada no equipamento PhastSystem seguindo as seguintes etapas:

1. Ácido tricloroacético 20% por 5 minutos a 26°C;
2. Glutaraldeído 5% por 5 minutos a 50°C;
3. Água deionizada por 2 minutos a 50°C;
4. Nitrato de prata 0,4% por 8 minutos a 40°C;
5. Água deionizada por 30 minutos a 30°C;
6. Carbonato de sódio 2,5%, contendo formaldeído 0,01% por 30 segundos a 30°C; seguida por outra incubação por 5 minutos a 30°C;
7. Ácido acético 5% por 2 minutos a 50°C;
8. Glicerol 13% por 3 minutos a 50°C.

3.3.4- Subclonagem do DNA genômico do exon seis, amplificado por PCR

As amostras cujos os produtos do PCR do exon seis apresentaram bandas com migração anômala no gel de SSCP e três amostras com padrão homogêneo de migração foram amplificadas em uma segunda reação e purificadas. Estes fragmentos foram subclonados dentro do vetor pMOSBlue (pMOSBlue blunt ended cloning kit - Amersham Life Science). A ligação do plasmídeo com o cDNA foi realizada com enzima T4 DNA ligase durante 16 horas a 22°C e o produto desta reação foi utilizado na transformação de bactérias competentes *E.Coli*, através do choque térmico. As

bactérias transformadas foram semeadas em placas contendo agar, meio de cultura de Luria-Bertani (LBM) , ampicilina, tetraciclina, 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranoside (X-gal) e isopropil-B-D-tiogalactopiranoside (IPTG). Estas duas ultimas substâncias foram utilizadas para propiciar a distinção através de α -complementação entre as colônias de bactérias contendo o plasmídio recombinante (colônias brancas) e as colônias de bactérias contendo apenas o plasmídio recircularizado sem o cDNA (colônias azuis) (Sambrook et al., 1989). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas, com posterior semeadura de cinco colônias brancas em tubos contendo o meio de LBM com ampicilina e tetraciclina. Estes tubos foram incubados a 37°C , sob agitação contínua por 16 horas, e os plasmídios recombinantes de cada colônia foram lisados e purificados em pequena escala utilizando *Plasmid mini preps* (Amersham Life Science). Plasmídios purificados foram submetidos a PCR (primers - P1a s/as) e posterior digestão com as enzimas *Kpn I* (Gibco BRL Products) e *BstE II* (Pharmacia Biotech) para identificação dos alelos A³. As amostras selecionadas A³ (totalizando seis) foram seqüenciadas utilizando kit *Thermo Sequenase PCR product* (Amersham Life Science, Cleveland, Ohio)

3.3.5 - Seqüenciamento de DNA

As amostras que apresentaram no SSCP do exon seis bandas de migração anômala e três com padrões de corrida “homogêneos” foram submetidas a subclonagem e posteriormente seqüenciadas. Foram utilizados para o seqüenciamento os mesmos iniciadores descritos na tabela 2 (P1a s/as e P1b s/as). Os exons seis das quatro amostras residuais foram seqüenciados diretamente.

Foram submetidas a seqüenciamento direto do exon sete, todas amostras de doadores A₃, independente dos padrões do SSCP, e os familiares de três doadores. (Sanger et al., 1977). As reações de seqüenciamento foram repetidas duas vezes para cada amostra e em algumas situações foram utilizados os iniciadores internos alternativos para uma determinada região, conforme descritos na tabela 3.

Método 1

O seqüenciamento dos produtos do PCR obtidos na amplificação simétrica do DNA foi realizado utilizando *Thermo Sequenase cycle sequencing Kit* (Amersham Life Science Inc, Cleveland, Ohio). Inicialmente, 5µl do produto da reação de PCR foi tratado com 10 U de exonuclease I e 2U de fosfatase alcalina de camarão, com o objetivo de remover os iniciadores residuais e dNTPs remanescentes da mistura do PCR. A mistura foi incubada a 37°C; por 15 minutos, seguida de 15 minutos a 80°C para inativação das enzimas. Ao produto do PCR tratado (0,5µg) foram adicionados 10 pmol de iniciadores marcados (γ -³² P-ATP 10mCi/ml), 1,0µl de DNA polimerase *Thermo sequenase* (10U/µl), 2,0µl tampão da reação. Uma alíquota de 4,0µl foi então transferida para tubos contendo quantidades limitadas de dideoxinucleotídeos - ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP). A adição dos dideoxinucleotídeos trifosfatos provoca a terminação das cadeias sintetizadas enquanto que o excesso de dNTP produzirá a polimerização das cadeias sintetizadas em que nenhum ddNTP foi incorporado. As amostras foram desnaturadas por três minutos a 94°C e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação de 30 segundos a 94°C, anelamento de 30 segundos a 55°C e alongamento a 72°C por 40 segundos. As

reações foram realizadas em cicladores automáticos de temperatura (*Perkin Elmer-Cetus, Cetus corp, Boston, MA, USA; PTC100-MJ Research, Inc., Watertown MASS, USA*). A adição de 4µl de uma solução de formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05% interromperam as reações. Os produtos dos PCRs (4µl) foram desnaturados a 94°C por 3 minutos e aplicados no gel de poliacrilamida 6% com tampão de Tris-Taurina-EDTA 0,8X e uréia 7M em placas de 33x38 e 33 x 40cm com espessura de 0,25 a 0,75mm. A eletroforese foi realizada com tampão Taurina 1X, a 75W por quatro a seis horas a temperatura ambiente. O gel foi seco a 80°C , colocado em um cassete com filme de raio-X e a auto radiografia revelada após 16 a 24 horas de exposição à temperatura ambiente (Sombrook et al, 1989).

Método 2

Neste método o fósforo 33 vem incorporado às terminações ddGTP, ddATP, ddTTP e ddCTP não sendo necessário marcar os iniciadores. As terminações radiativas (5µl) são colocadas em tubos contendo deoxinucleotídeos G, A, T e C. Pode-se substituir o dGTP por dITP em seqüenciamentos que apresentam compressões. A seguir foram adicionados aos tubos, 4,5µl da mistura contendo: tampão (2µl), produto de PCR, iniciadores (1pmol), água deionizada e enzima thermo sequenase DNA polimerase - 2µl. A reação foi colocada no termociclador com o seguinte programa: desnaturação de 30seg a 94°C, anelamento de 30 seg a 55°C, extensão de 30 seg a 72°C seguida por extensão final de 7-10min a 72°C. O gel de seqüenciamento utilizado foi o mesmo

descrito no protocolo anterior. As amostras foram desnaturadas a 94°C por 5 minutos antes da aplicação no gel.

4 - Resultados

4.1 – Doadores A₃

4.1.1 – Resultados sorológicos

As reações das hemácias dos dez doadores com soros anti-A e anti-AB, policlonais, monoclonais e mistura, com as técnicas em tubo e placa opalina (*Lorne Laboratories Ltd, England; Ortho Diagnostic Systems, Raritan NJ*), mostraram múltiplas aglutinações com presença de “campos mistos” (pequenos aglutinados de células ao redor de uma massa de hemácias não aglutinadas). Todos os doadores também apresentaram na técnica de gel centrifugação com cartões policlonais (*DiaMed-ID Micro Typing System*), reações com padrão de dupla população de hemácias ou seja, aglutinações de moderada intensidade associadas a hemácias não aglutinadas. As provas com soros anti-A e anti-AB monoclonal murino – transclone (*Sanofi Diagnostics Pasteur S.A. Marnes la Coquette*) mostraram reações de fraca intensidade com algumas hemácias livres. Todas as amostras apresentaram forte reação de aglutinação com anti-H - *Ulex europeus* (*DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland*) e não aglutinaram com anti-A₁ *Dolichos biflorus* (*Ortho Diagnostic Systems, Raritan NJ; DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland*). No soro dos dez doadores analisados não foi encontrado anti-A₁, o referido anticorpo apenas foi identificado na mãe de um dos doadores A₃ estudados que foi tipada como A₃B (Figura 9: 1ª família I -2). Familiares de doadores A₃, portadores do grupo sanguíneo O, que foram submetidos a reação de absorção e eluição não demonstraram a presença de antígenos A.

4.1.2 - Polimorfismos do Subgrupo A₃

O estudo molecular dos exons seis dos 10 doadores demonstrou heterozigose para o alelo A₃ (A₃O) e a presença da deleção 261G, o que permitiu classifica-los como O¹.

Todos os doadores definidos sorologicamente como A₃ não apresentaram a mutação G871A descrita inicialmente por Yamamoto et al. (1993). A referida mutação foi identificada através da digestão do produto do PCR do exon sete (iniciadores P4a) pela enzima de restrição *Sal* I (figura 4).

Os exons seis e sete foram submetidos a triagem molecular pelo SSCP. No exon seis, três amostras apresentaram uma banda com migração anômala (figura 5). Posteriormente, as amostras com padrão eletroforético diferente e outras três sem desvio de bandas, foram subclonadas e seqüenciadas. Apesar dos resultados do SSCP, nenhuma mutação foi encontrada no referido exon no alelo A³.

O exon sete foi estudado com cinco pares de iniciadores diferentes e subdividido em três regiões conforme descrito na Tabela 3. Na primeira região amplificada pelos iniciadores P2a, o SSCP não apresentou padrão de corrida discrepante em diferentes condições da técnica, quando comparados com três controles do grupo sanguíneo AO¹.

O seqüenciamento direto foi realizado, apesar dos resultados do SSCP, e sete amostras apresentaram a mutação T467C/Pro156Leu em heterozigose (figura 6).

Os resultados do SSCP da segunda e terceira região do exon 7 (iniciadores P3 e P4a) foram realizados, repetidos e comparados com os controles AO¹ e mostraram padrões de corrida com discretas e duvidosas diferenças. Todas as amostras foram então submetidas a seqüenciamento direto com o objetivo de investigarmos mutações que pudessem ter alguma relação com os resultados pouco claros do SSCP. Os dados

obtidos dos seqüenciamentos diretos das referidas amostras, não tiveram nenhuma relação com os resultados das análises dos polimorfismos de conformação em hélice simples, mas algumas mutações foram identificadas. A mutação T646A / Phe216Ile descrita em indivíduos A_x foi encontrada em três doadores sendo duas em heterozigose e uma em homozigose (figura 6). As mutação G681A / substituição neutra e C771T / substituição neutra também foram encontradas em três amostras sendo duas heterozigotas e uma homozigota (figura 7). Na amostragem estudada, a mutação G829A foi encontrada em quatro doadores, sendo três heterozigotos e um homozigoto, e a deleção 1060C foi identificada em nove indivíduos (figura 8). Um dos doadores estudados não apresentou nenhuma outra alteração molecular nos exons seis e sete, além da deleção 261G do alelo O (tabela 5). Em quatro casos houve definição dos alelos que se encontravam as mutações (figura 9; tabela 5 e 6). Na primeira família foi identificado, no doador fenótipo A₃, a mutação C467T e a deleção 1060C no alelo A₃. Na segunda família, apenas a deleção 1060C foi encontrada no referido alelo. Na terceira família foi constatada a presença da associação G829A e deleção 1060C no alelo A₃. No quarto indivíduo a presença das mutações T646A, G681A, C771T e G829A em homozigose, nos permitem concluir que o alelo A³ se encontra ligado a estas mutações. A tabela seis mostra os resultados do estudo molecular dos exons seis e sete dos três doadores fenotipados como A₃ com estudo familiar.

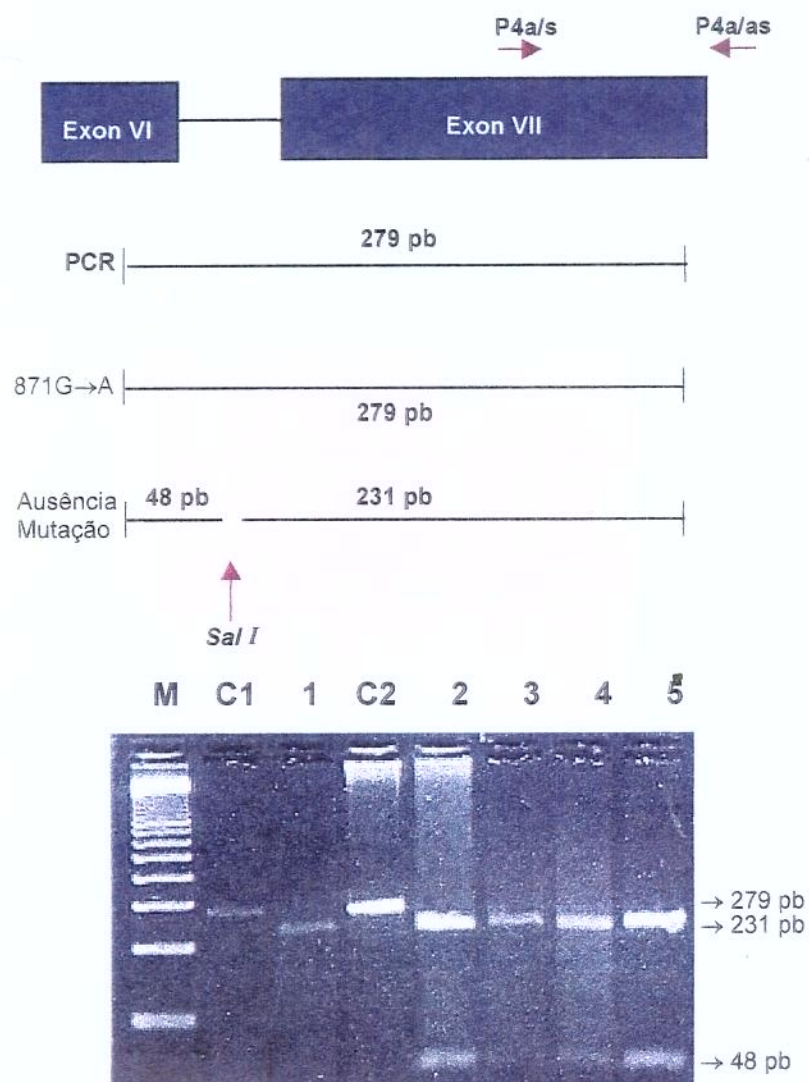


Figura 4: Produtos de PCR do exon sete (iniciadores P4a) digeridos pela enzima *Sal I* para identificação da mutação G871A no gene ABO. A referida mutação aboli o sítio de restrição da enzima

M - Ladder – 100pb (*Gibco BRL Products*)

C1 e C2 (controles) - Produtos de PCR de amostras A₃ não digeridas (fragmento: 279pb)

Amostras 1 a 5 - Produtos de PCR de indivíduos A₃ digeridos pela enzima *Sal I* indicando a ausência da mutação G871A (Fragmentos: 231pb e 48pb)

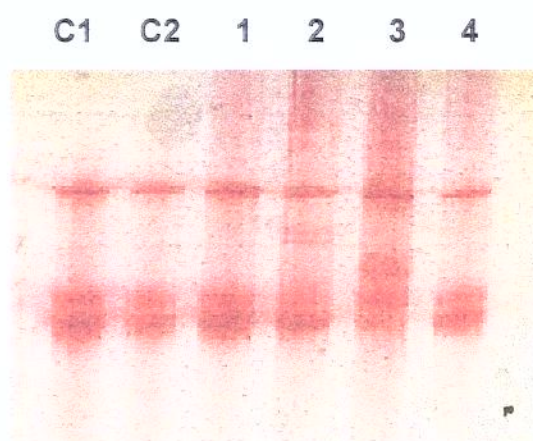


Figura 5: SSCP de produtos de PCR do exon 6 do gene ABO (iniciadores P1a) de indivíduos A_3 .

C1 e C2 – controles AO^1

Amostras 1 e 4 – Doadores A_3 sem desvio de bandas

Amostra 3 - Padrão eletroforético distinto dos controles

Amostra 2 – Repetido o PCR e SSCP; não confirmou padrão eletroforético com banda superior

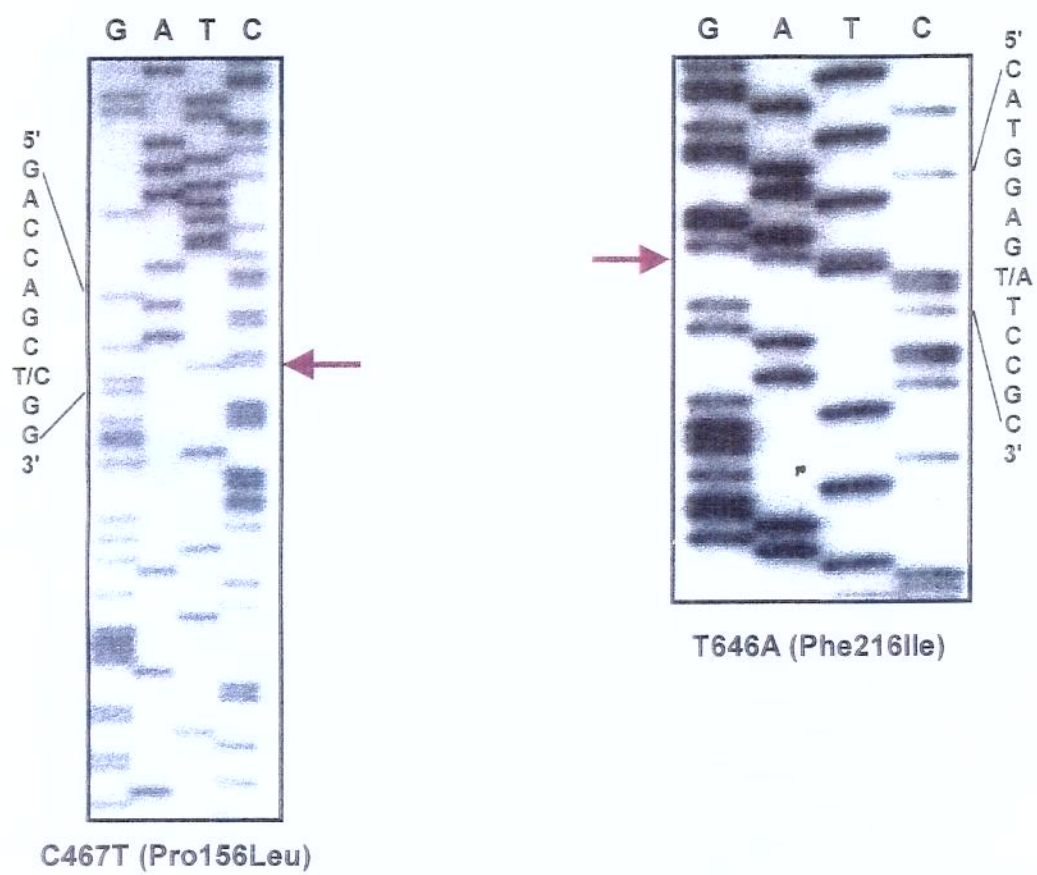


Figura 6: Seqüenciamento direto do exon sete dos doadores A₃
 Mutações: C467T (Pro156Leu) e T646A (Phe216Ile)

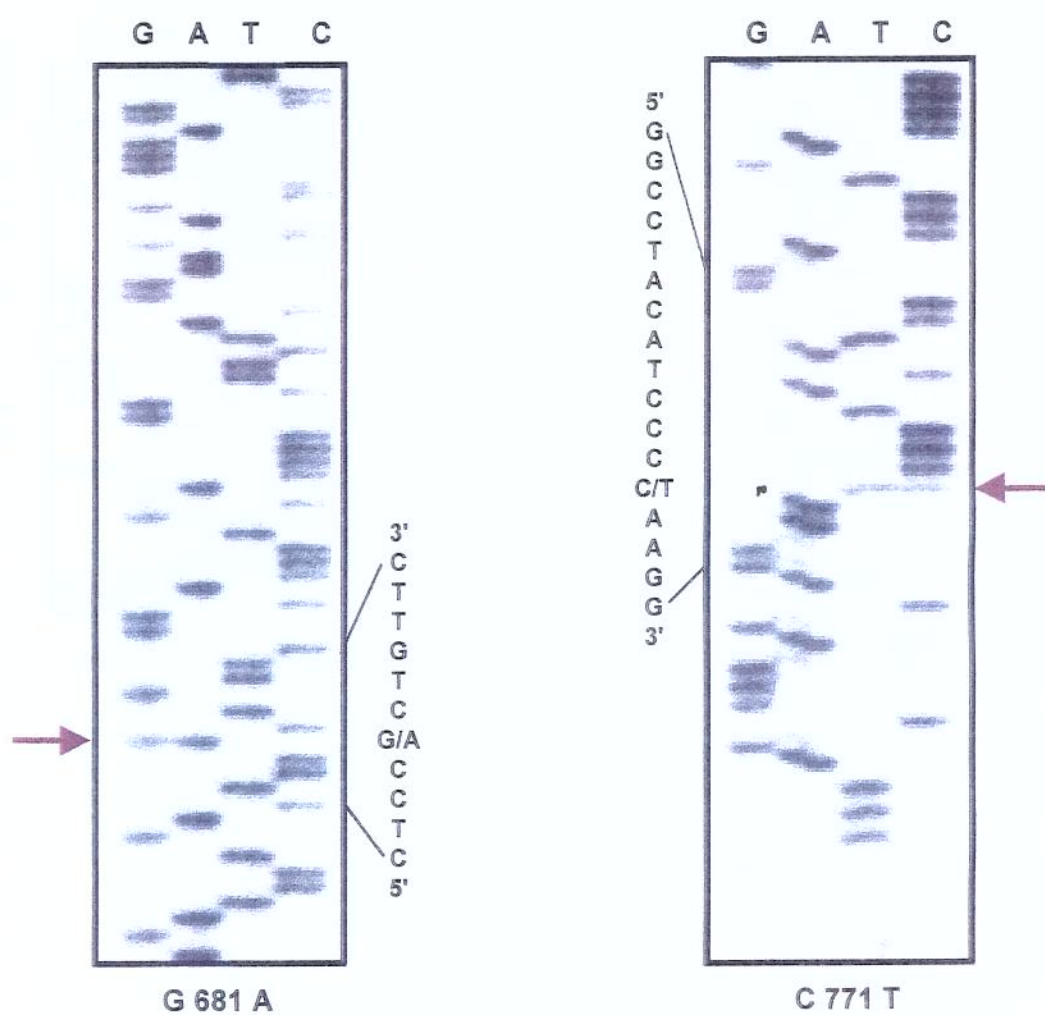


Figura 7: Seqüenciamento direto do exon sete dos doadores A₃.
Polimorfismos C771T e G681A, substituições neutras

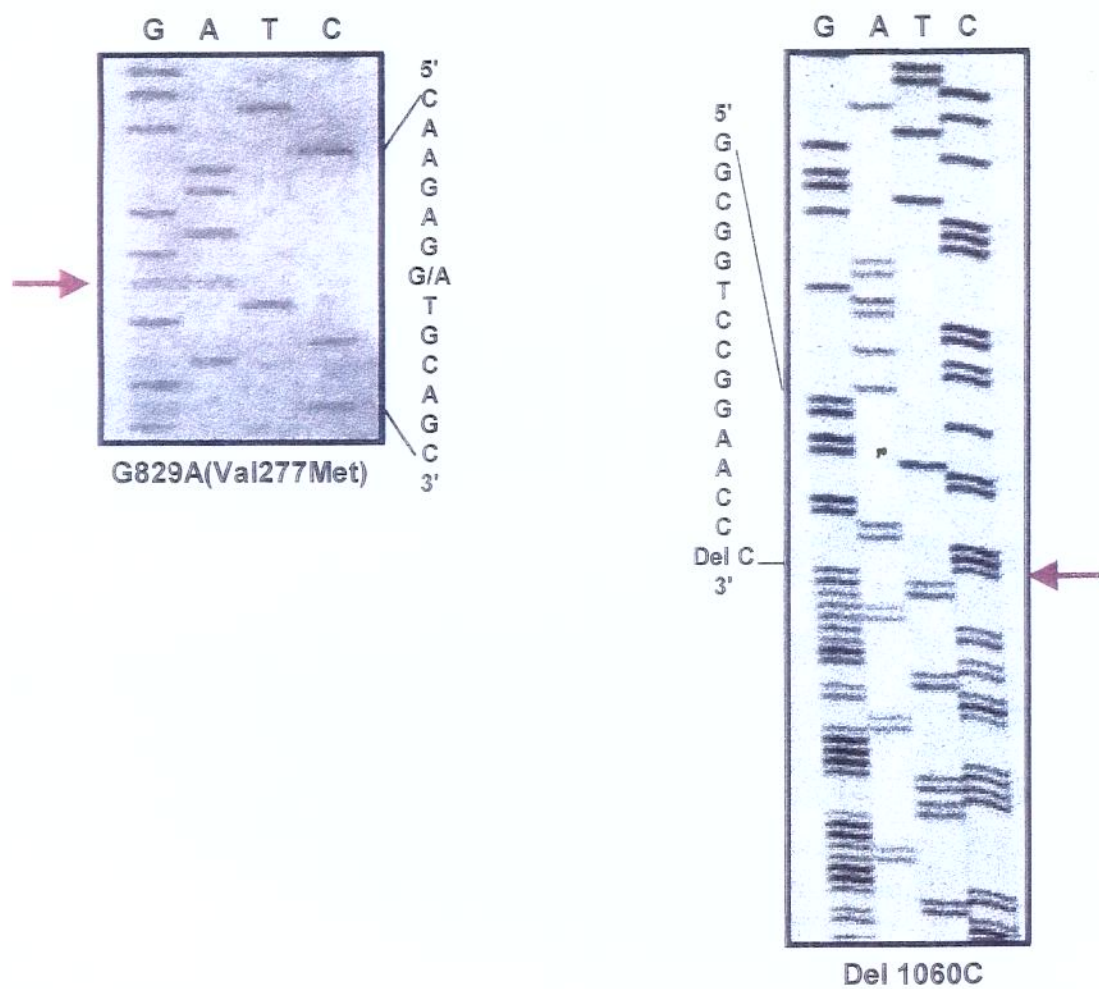
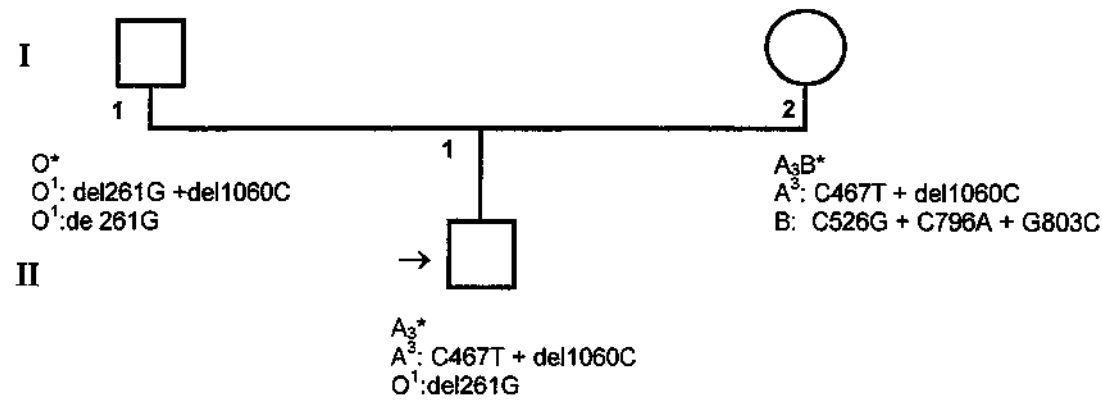
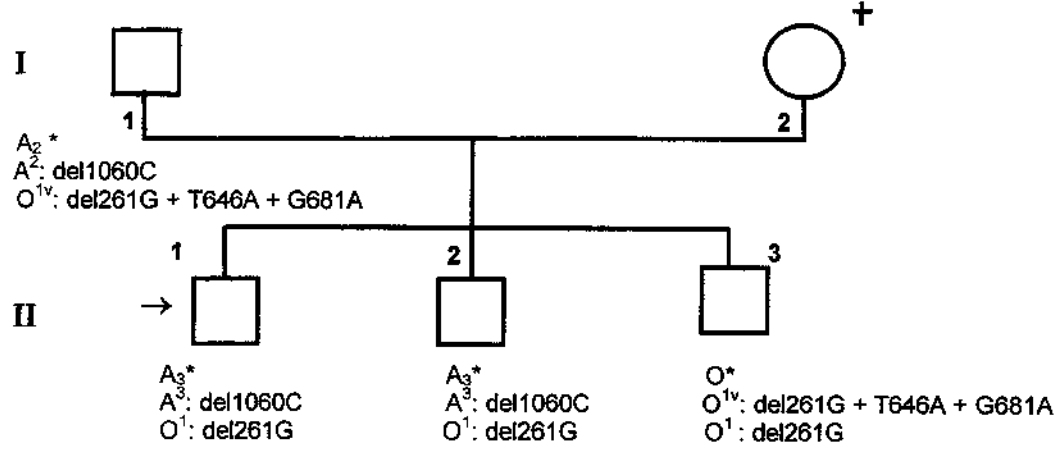


Figura 8: Seqüenciamento direto do exon sete dos doadores A₃
 Mutações G829A e deleção 1060C

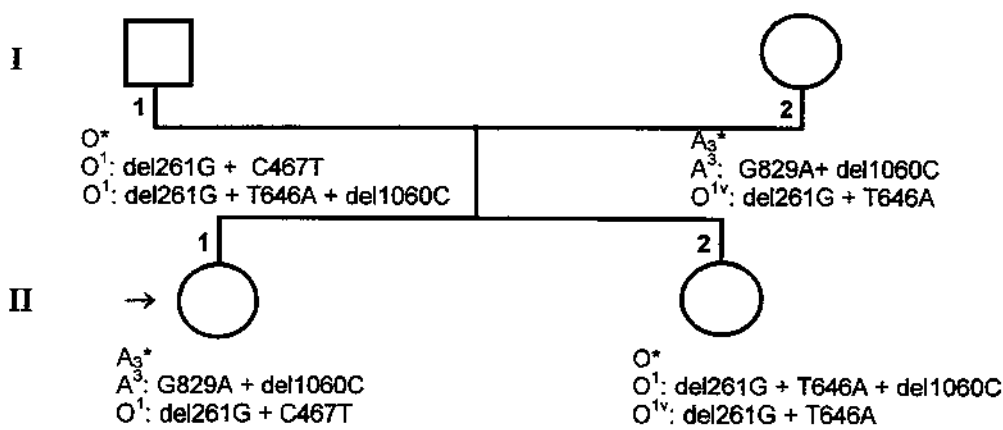
1ª família:



2ª família:



3ª família:



* fenotipagem

Figure 9: Estudo familiar de três doadores A₃. Os fenótipos e genótipos estão descritos abaixo de cada símbolo. As setas indicam os doadores

Tabela 5: Resultados do estudo molecular dos exons seis e sete dos sete doadores não relacionados do subgrupo A₃

Mutações - Gene ABO	Doadores A ₃						
	1	2	3	4	5	6	7
Del 261G	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -
C467T (Pro156Leu)	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	
T646A (Phe216Ile)	+ / +	+ / -	+ / -				
G681A	+ / +	+ / -	+ / -				
C771T	+ / +	+ / -	+ / -				
G829A (Val277Met)	+ / +	+ / -	+ / -				
Del1060C	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	

+ / - : heterozigoto
+ / + : homozigoto

Tabela 6: Resultados do estudo molecular dos exons seis e sete dos três doadores do subgrupo A₃ com estudo familiar.

Doadores A ₃	1		2		3	
Alelos	A ₃	O	A ₃	O	A ₃	O
Del 261G	-	+	-	+	-	+
C467T (Pro156Leu)	+	-	-	-	-	+
T646A (Phe216Ile)	-	-	-	-	-	-
G681A	-	-	-	-	-	-
C771T	-	-	-	-	-	-
G829A (Val277Met)	-	-	-	-	+	-
Del1060C	+	-	+	-	+	-

4.2 – Polimorfismo do grupo O - Índios Parakanãs

A determinação do grupo sanguíneo dos 71 Índios procedentes da tribo Parakanã, através do estudo sorológico e eritrocitário, demonstrou que todos são do grupo O. O estudo molecular, realizado no mesmo grupo, através da digestão do produto do PCR do exon seis pelas enzimas *Kpn I* e *BstE II*, mostrou que todos são homozigotos para deleção 261G (figura 10).

O polimorfismo G542A foi estudado em 52 Índios através da digestão do produto de PCR (iniciadores P2b) com a enzima *Nhe I*. A mutação foi demonstrada em 23 dos 104 alelos examinados (22,11%) sendo 17 Índios heterozigotos e 3 homozigotos (figura 11).

As substituições T646A e C771T também foram estudadas nos 52 Índios, através da digestão do produto do PCR do exon sete (iniciadores P3) com as enzimas *Mbo I* e *Dde I*. As mutações foram identificadas em 68 dos 104 alelos (65,38%), 26 Índios heterozigotos e 21 homozigotos (figuras 12 e 13).

As mutações T646A e C771T foram investigadas em um grupo controle de doadores de sangue através de PCR da região comprometida (exon sete) e posterior digestão com as enzimas *Mbo I* e *Dde I* respectivamente. Foram estudados 50 doadores do grupo sanguíneo O e os resultados demonstraram 19 heterozigotos e 6 homozigotos.

Portanto, 31% dos alelos O apresentaram as referidas mutações o que caracteriza prováveis O^{1v}.

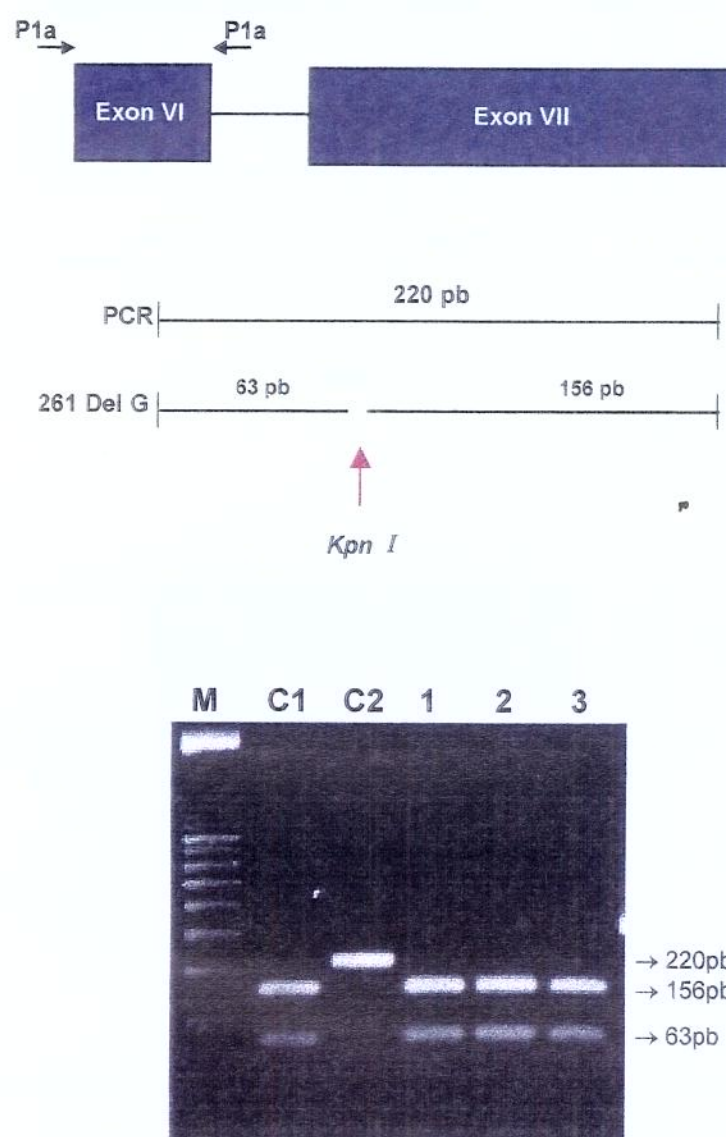


Figura 10 : Produtos de PCR digeridos pela enzima *Kpn I* para identificação da deleção 261G
M- Ladder – 100pb (*Gibco BRL Products*)

C1 (controle) e amostras 1, 2 e 3 apresentaram digestão total do fragmento indicando homozigose para a deleção (fragmentos: 156 e 63pb).

C2 - Amostra controle do grupo sanguíneo AB – ausência da del 261G (fragmento: 220pb)

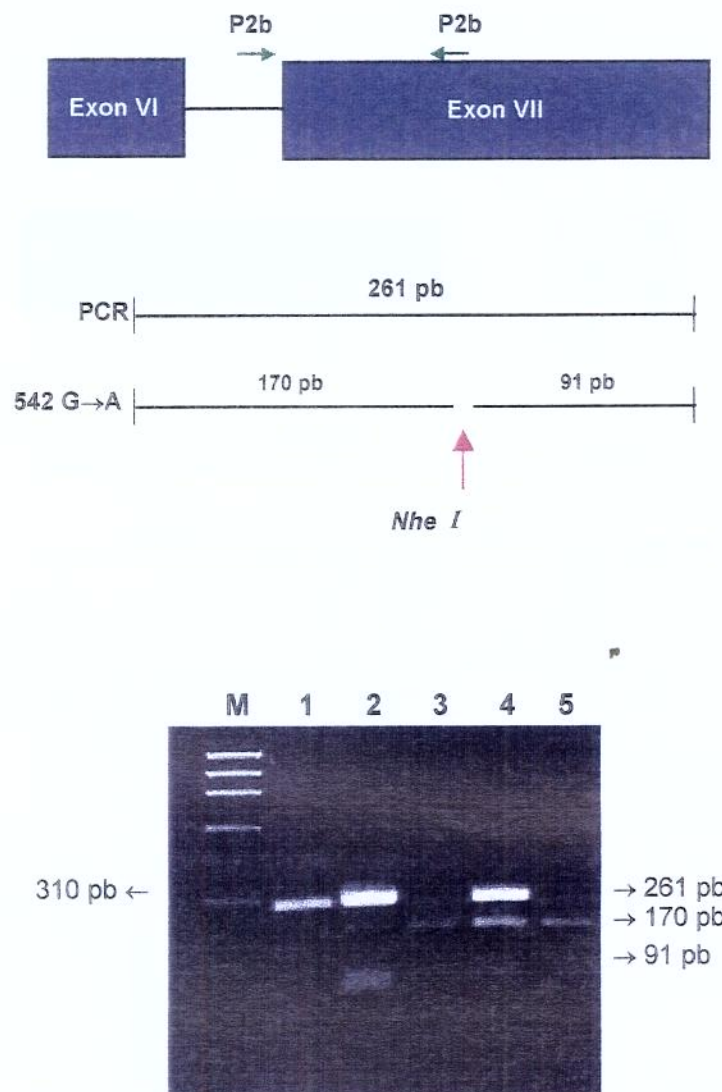


Figura 11: PCR e digestão com enzima *Nhe I* para identificação da mutação G542A.

M – marcador ϕ 174RF DNA/Hae III fragmentos (*Gibco BRL Products*)

Amostra 1 – Controle com ausência da mutação G542A (fragmento 261pb)

Amostras 2 e 4 – heterozigotas (fragmentos: 261, 170 e 91 pb)

Amostras 3 e 5 – homozigotas (fragmentos: 170pb e 91pb)

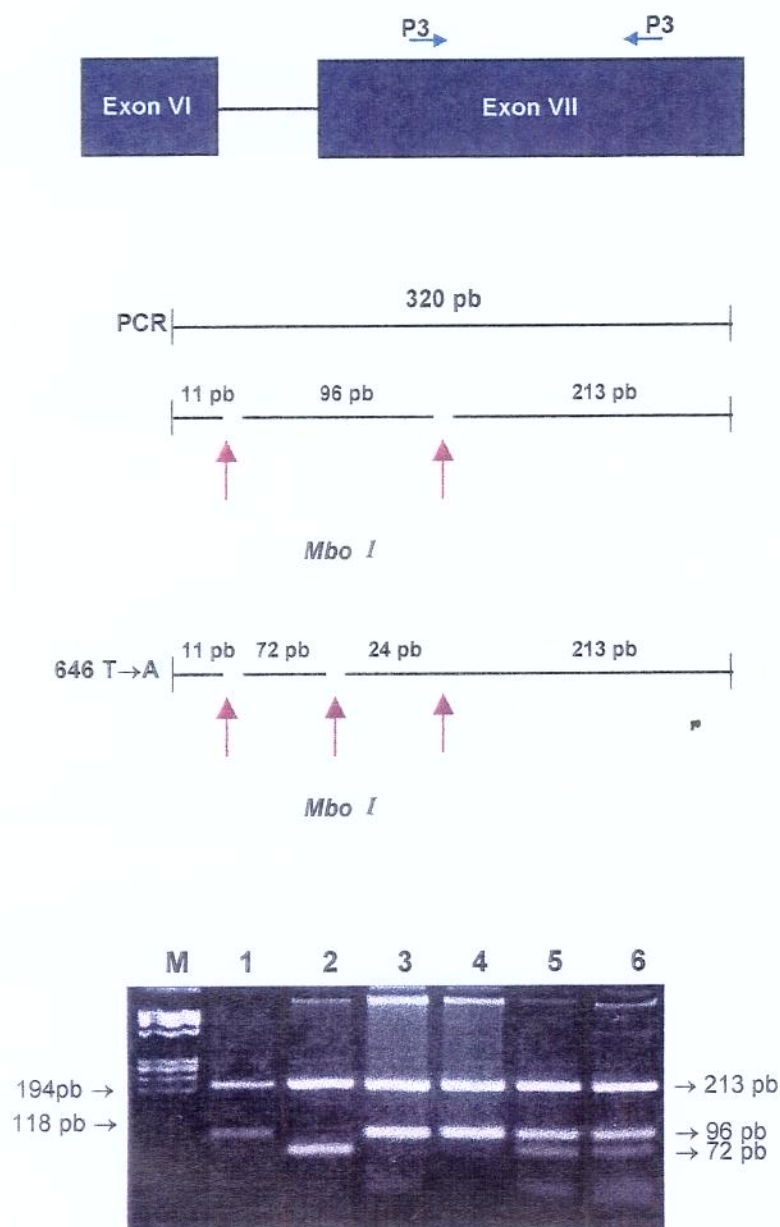


Figura 12: PCR e digestão com enzima *Mbo I* para identificação da mutação T646A

M – marcador ϕ 174RF DNA/Hae III fragmentos (*Gibco BRL Products*)

Amostras 1; 3 e 4 - Ausência da mutação T646A (fragmentos: 213, 96 e 11pb)

Amostra 2 – Homozigota (fragmentos: 213, 72 e 11pb)

Amostras 5 e 6 – heterozigotas (Fragmentos: 213, 96, 72 e 11pb)

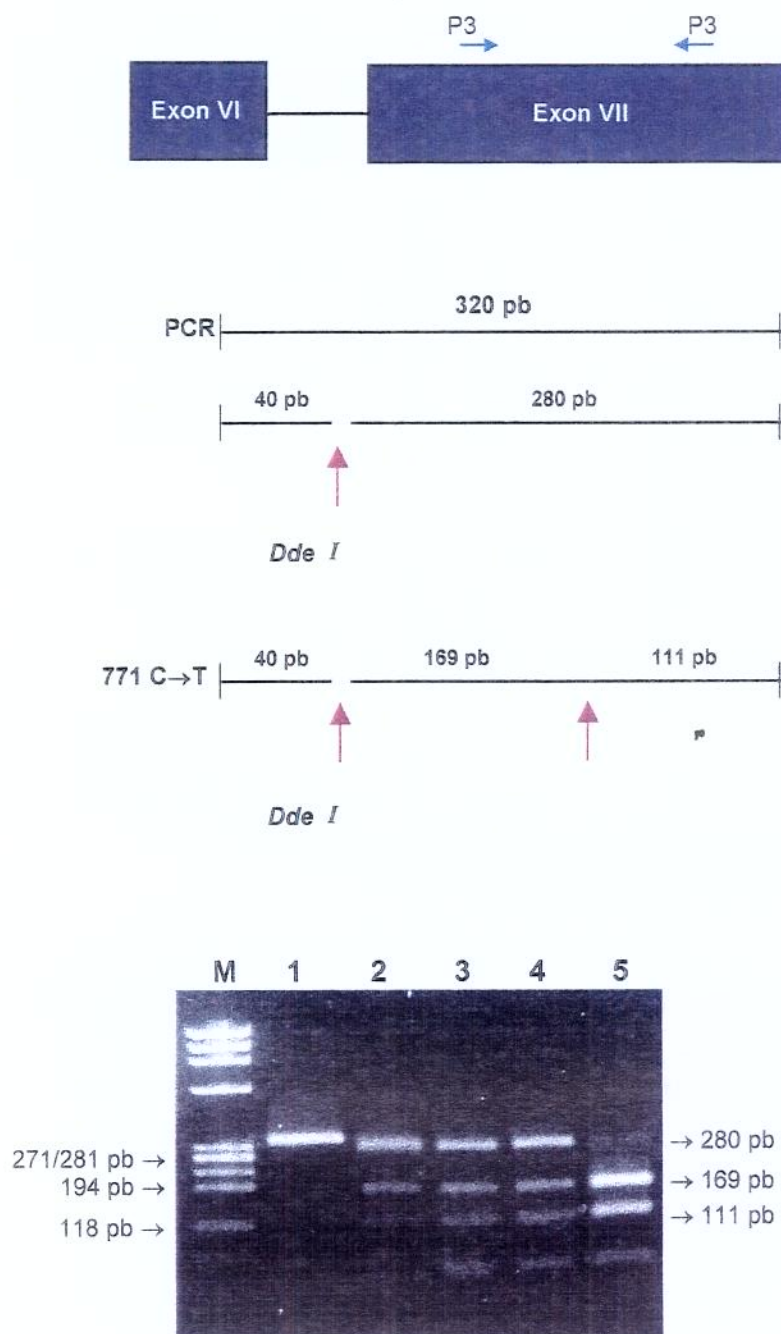


Figura 13: PCR e digestão com enzima *Dde I* para identificação do polimorfismo C771T

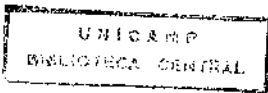
M – marcador ϕ 174RF DNA/Hae III fragmentos (*Gibco BRL Products*)

Amostra 1 – Ausência da mutação (fragmento: 280 e 40pb)

Amostras 2; 3 e 4 – Heterozigotas (fragmentos: 280, 169, 111 e 40pb)

Amostra 5 – Homozigota (fragmentos: 169; 111 e 40pb)

5 - *Discussão*



5.1 – Polimorfismo do grupo sanguíneo A₃

A literatura mostra alguns estudos de polimorfismos da enzima glicosiltransferase analisando apenas pequeno número de casos, principalmente com relação a subgrupos pouco freqüentes. Aparentemente nunca foi realizada uma investigação completa dos exons seis e sete, região responsável por 90% da atividade enzimática, de 10 indivíduos do subgrupo A₃ (Yamamoto et al., 1992; Bennett et al, 1995). Os doadores foram exaustivamente estudados do ponto de vista sorológico, com soros de quatro diferentes procedências, em três técnicas distintas realizadas por dois profissionais da área que desconheciam o doador. Além disso em três casos foi possível o estudo familiar, que permitiu a caracterização da herança.

Yamamoto et al (1993a) constataram em dois indivíduos A₃B a substituição G871A embora, em outros dois do subgrupo A₃ nenhuma mutação tenha sido identificada nos últimos dois exons do gene ABO. Olsson & Chester estudaram sete doadores A₃ e também não encontraram mutações nos referidos exons.

Em nossa casuística a substituição G871A não foi identificada (Barjas-Castro & Saad, 1997) e um doador apresentou a seqüência dos exons seis e sete idêntica ao A¹, com exceção da deleção 261G no alelo O. Na família 1, a mãe do doador A₃ - II 1 (figura - 9), sorologicamente classificada como A₃B, também não apresentou a referida mutação.

A triagem molecular foi realizada inicialmente por SSCP, que se caracteriza pela análise da estrutura secundária de uma fita simples de DNA quando submetido a eletroforese em gel não desnaturante (Orita et al., 1989). O método é bastante simples mas não apresenta a sensibilidade esperada de um teste de rastreamento de alterações moleculares (Cotton, 1993). A efetividade da triagem do SSCP pode variar de 85 a 95% dependendo do tamanho do fragmento de DNA, sendo maior a sensibilidade para fragmentos menores que 400pb (Hayashi, 1991). Sarkar et al. (1992) constaram que o método pode apresentar 1% de resultados falso positivos, dados obtidos durante a triagem de mutações do gene do fator IX.

Neste estudo, o rastreamento de alterações moleculares pelo SSCP não foi compatível com os resultados obtidos pelos seqüenciamentos diretos. No exon seis, o SSCP mostrou bandas anômalas em três amostras sendo que os resultados dos seqüenciamentos não demonstraram mutações no alelo A. Provavelmente a mutação esteja presente no alelo O que não foi seqüenciado.

Ogasawara et al. (1996a, b) estudaram os exons seis e sete do gene ABO por SSCP manual, através de géis contendo 12,5 e 15% de poliacrilamida e eletroforeses realizadas a 12 e 30°C. Os resultados mostraram, em alguns casos, padrões típicos de corrida para os grupos sanguíneos A², A^x, A^{el} entre outros. Entretanto não há na literatura relatos de triagem molecular pelo SSCP de amostras do subgrupo A₃.

As dez amostras A₃ estudadas em nosso trabalho foram submetidas ao SSCP automatizado, com géis de poliacrilamida a 12,5 e 20% e eletroforeses realizadas a 4 e 16°C ; nestas condições o método demonstrou baixa sensibilidade.

As reações de seqüenciamento direto permitiram a identificação de várias mutações no exon sete dos doadores estudados, sendo que todas foram previamente descritas na literatura em outros grupos sanguíneos tais como O, A₂ e A_x, mas não em indivíduos A₃. (Yamamoto et al., 1992; Ogasawara et al, 1996a; Olsson & Chester, 1996a; 1996b). A deleção 1060C identificada em indivíduos A² é responsável por diminuição na atividade enzimática da glicosil transferase (Yamamoto et al., 1992). Esta deleção foi encontrada em nove doadores A₃ não relacionados e também em três familiares do grupo sanguíneo O. A presença da del 1060C em indivíduos do grupo O foi descrita previamente por Gassner et al. (1996), mas é considerada uma associação pouco freqüente.

Dois indivíduos A₃ relacionados apresentaram a deleção 1060C e a mutação G829A, que são alterações moleculares não descritas, juntas anteriormente (Barjas et al, 1998).

A associação da G829A com a substituição T646A, identificada em indivíduos A^x e O^{iv}, foi encontrada em homozigose em um doador não relacionado (Yamamoto et al., 1993c, Ogasawara et al., 1996a). O significado desta associação, até então não descrita no alelo A, permanece ainda desconhecido.

Na terceira família foi identificado um indivíduo O com a deleção 261G e a substituição C467T (Olsson et al., 1997). Estas alterações moleculares juntas não são freqüentes e a literatura não classifica como O^{iv}.

Com o estudo familiar pudemos concluir que a deleção 1060C assim como as mutações C467T, T646A e G829A são muito freqüentes no alelo A₃.

Recentemente, Suzuki et al. (1997) e Olsson & Chester (1998) descreveram casos em que a recombinação gênica foi parcialmente responsável pela gênese das diversidades encontradas no gene ABO, inclusive no caso do subgrupo A_x. Em nosso estudo, alguns doadores A₃ estudados mostraram mutações inicialmente descritas no alelo O. Provavelmente estas alterações moleculares sejam consequência de recombinações e que quando presentes no alelo A³ possam alterar estruturalmente a molécula definindo o referido fenótipo.

O estudo familiar também permitiu analisar algumas discrepâncias entre fenótipos e genótipos como, padrões de reações idênticos com diferentes alterações moleculares nos últimos dois exons do gene ABO. Na primeira família o doador A₃ tinha nos exons seis e sete apenas as alterações moleculares descritas em indivíduos A² (C467T e del1060C). Na segunda família, o pai com grupo sanguíneo A₂ apresentou o mesmo genótipo encontrado em dois filhos com fenótipo A₃. Hansen et al (1998) descreveu diferentes genótipos causando indistinguíveis padrões de expressão do antígeno A em hemácias A_{el}, através de “ scanning immunogold” por microscopia eletrônica.

Nossos resultados permitiram concluir que o subgrupo A₃ é heterogêneo em nível molecular como demonstrado nos estudos de atividade enzimática da glicosiltransferase e de distribuição do antígeno A na membrana eritrocitária (Heir et al, 1988, Heir et al 1994, Nakamura et al 1989).

Para melhor compreensão das bases moleculares dos subgrupos de A será necessário o estudo molecular dos sete exons do gene ABO e a definição da estrutura tridimensional da glicosil transferase.

5. 2 - Polimorfismos do grupo sanguíneo O nos Índios Parakanãs

- Os Ameríndias da tribo Parakanã apresentaram a deleção 261G no gene ABO em 100% dos alelos estudados. Este resultado é compatível com estudos semelhantes realizados em outras tribos da floresta Amazônica como Kayapo, Yanomama e Arara (Franco et al,1994).

- O polimorfismo G542A foi encontrado em 22,11% dos alelos O dos índios Parakanãs. Nos grupos Kayapo, Yanomama e Arara esta alteração molecular foi demonstrada em 43% dos alelos O e em 47,9% dos O^{1v}(Olsson et al., 1998). Olsson et al. sugeriram que esta substituição fosse um marcador polimórfico para o gene ABO que é considerado homogêneo na população Ameríndia. Porém, nossos resultados mostraram uma frequência 50% menor, o que não nos permite tal consideração neste grupo Indígena.

- As mutações T646A e C771T foram identificadas em 65% dos alelos O dos Índios Parakanãs. A existência das duas mutações, associadas a deleção 261G, sugere o alelo O^{1v} que é descrito em aproximadamente 30% da população brasileira e em 91% dos alelos O dos Índios Araras, Kayapos e Yanomamas (Olsson et al., 1998). A frequência do referido gene, neste grupo Indígena é significativamente maior que a identificada nos Parakanãs ($p= 0,000045$).

- Nossos resultados são compatíveis com relatos de outros autores que demonstraram diferenças genéticas entre os Parakanãs e outras tribos, com relação a enzimas

eritrocitárias, alguns grupos sangüíneos, antígenos leucocitários e plaquetários humanos. (Black et al., 1980, Covas et al 1997; Castro et al, 1999).

Provavelmente, estas diferenças genéticas dos Índios Parakanãs sejam conseqüências de hábitos próprios relacionados ao acasalamento e ao comportamento mais amistoso, associados aos efeitos Gargalo e Fundador descritos em populações Indígenas.

6 - Conclusões

6.1 - Polimorfismos do subgrupo A₃

- Os dez doadores A₃ estudados não apresentaram a mutação G871A descrita por Yamamoto et al (1993).
- A triagem de mutações do exon sete do gene ABO de doadores A₃, realizada através do SSCP automatizado com géis pré moldados à 12,5 e 20%, demonstrou baixa sensibilidade nas condições estudadas.
- Os resultados dos seqüenciamentos diretos permitiram a identificação de varias mutações no exon sete, sendo todas previamente descritas na literatura em outros grupos sanguíneos como O, A₂ e A_x.
- O estudo familiar permitiu concluir que a deleção 1060C e as mutações C467T, T646A e G829A são muito freqüentes em indivíduos A₃.
- Provavelmente o subgrupo A₃ seja resultante da associação de mutações descritas nos grupos A², A^x e O^{1v} como conseqüência de fenômenos de recombinação gênica. Estas alterações moleculares conjuntamente no alelo A poderiam alterar estruturalmente a molécula definindo o referido subgrupo.
- Os resultados permitiram concluir que o subgrupo A₃ é heterogêneo em nível molecular.

6. 2 - Polimorfismos do grupo sanguíneo O nos Índios Parakanã

- Os Ameríndias da tribo Parakanã apresentaram a deleção 261G no gene ABO em 100% dos alelos estudados o que caracteriza o grupo sanguíneo O¹.
- As mutações T646A e C771T , descritas no O1^v , foram encontradas em aproximadamente 65% dos alelos O analisados e o polimorfismo G542A foi identificado em 22%.
- Provavelmente os efeitos Gargalo e Fundador descritos em populações Indígenas, associados a hábitos característicos dos Índios Parakanãs como a poligamia e o comportamento menos belicoso, sejam os responsáveis pelas diferenças genéticas identificadas neste grupo.

Summary

The ABO blood group is the most clinically important human alloantigen system in transfusion medicine and includes many variant phenotypes. Phenotypic heterogeneity is due structural differences of the glycosyltransferase gene on chromosome nine, which controls the synthesis of transferase capable of transferring one immunodominant sugar residue to the substrate H.

We have studied the last two coding exons of ABO gene, which occupy 91% of the soluble form of A₁ transferase, from ten unrelated A₃ donors and 71 Parakanã Amerindians. The A₃ subgroup was defined according to immunohematological evaluation. Exons six and seven of the ABO gene were amplified and submitted to single strand conformation polymorphism and direct sequencing. The Amerindians were studied by PCR-RFLP for determination the 261G deletion, the T646A and C771T mutations described in O^{1variant} and the G542A substitution.

All A₃ donors have showed heterozygosity for the 261G deletion (A₃O) and have not presented the G871A mutation, previously described in this blood subgroup. The exon seven were heterogeneous at the molecular level and with family studies were possible to conclude that the 1060C deletion and the C467T, T646A and G829A mutations were frequently in this subgroup

All Amerindians studied were O¹ as described in other Indians group. Otherwise, the Parakanã presented lower frequencies of the G542A (22%), T646A and C771T mutation (65%) than other tribes. We concluded that the G542A and probably the O^{1v} allele are not distributed homogeneously among all Amazonian Amerindians. The distinct result found in Parakanã Indians suggests a consequence of random genetic drift.

•

Referências Bibliográficas

- Allderdice P., Kaita H., Lewis M., McAlpine P., Wong P., Anderson J., Gilbert E. (1986) Segregation of marker loci in families with an inherited paracentric insertion of chromosome 9. *Am. J. Hum. Genet.* 39:612-617.
- Anstee D J (1998) Antigens on red cells. *Vox Sang* 74 (suppl. 2):255-257
- Barjas-Castro ML, Saad STO (1997) Absence of the G871A mutation in A₃ blood donors from Brazil. *Transfusion* 37:564.
- Barjas-Castro ML, Carvalho MH, Bordin S, Locatelli MF, Saad STO (1998) Molecular characterization of A₃ subgroup. *Blood* 92 (suppl. 1):2311
- Beilguelman B (1994) In: Dinamica dos genes nas famílias e nas populações. 2ª edição, Revista Brasileira de genética.
- Bennett EP, Steffensen R, Clausen H, Weghuis DO, van Kessel AG (1995) Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus. *Biochem Biophys Res Commun* 206:318-325.
- Bird GW (1952) Relationship of the blood sub-groups A₁, A₂ and A₁B, A₂B to haemagglutinins present in the seeds of *Dichos biflorus*. *Nature* 170:674-676.
- Black FL, Salzano FM, Layrisse Z, Franco MHLP, Harris NS, Weimer TA (1980) Restriction and persistence of polymorphisms of HLA and other blood genetic traits in the Parakanã Indians of Brazil. *Am. J.Phys Anthropol.*52:119-32.
- Cartron JP (1976) Étude des propriétés N-acetylgalactosaminyltransférases des sérums de subjects A et A faible. *Rev. Franc. Transf. Immuno-Hémat.* 19:67-88.

- Cartron JP, Badet J, Mulet C, Salmon CH (1978) Study of the α -N-acetylgalactosaminyltransferase in sera and red cell membranes of human A subgroups. *J Immunogenet* 5:107-116.
- Castro V, Origa AF, Soares M, Menezes R, Gonçalves M, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Arruda VR (1999) Human platelet antigen systems 1 to 5 in three distinct ethnic groups from Brazil. *Eur. J. Immunogenetics* (in press).
- Clausen H, Watanabe K, Kannagari R, Lavery SB, Nudelman E, Arao-Tomono Y, Hakamori S (1984) Blood group A glycolipid (Ax) with globo-series structure which is specific for blood group A₁ erythrocytes: one of the chemical bases for A₁ and A₂ distinction. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 124:523-529
- Clausen H, Lavery SB, Nudelman E, Tsuchiya AS, Hakamori S (1985) Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A₁ - specific monoclonal antibody TH - 1: chemical basis of qualitative A₁ and A₂ distinction. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 82:1199-1203
- Clausen H, Lavery SB, Nudelman E, Baldwin M, Hakamori S (1986) Further characterization of type 2 and 3 chain blood group glycosphingolipids from human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 25:7075-7085.
- Clausen H, Hakomori S (1989) ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* 56:1-20.

- Clausen H, White T, Takio K, Titani K, Stroud M, Holmes E, Karkov J, Thim L, Hakomori S (1990) Isolation to homogeneity and partial characterization of a histo-blood group A defined fuc α 1 $\rightarrow$ 2Gal α 1 $\rightarrow$ 3-N-acetylgalactosaminyl-transferase from human lung tissue. *J Biol Chem* 265:1139-1145.
- Clausen H, Bennett EP, Dabelsteen E (1992) Carbohydrates of the cell surface: Molecular aspects of glycosyltransferases and their genes. *APMIS* 100 (suppl 27):9-17.
- Clausen H, Bennett EP, Grunnet N (1994) Molecular genetics of ABO histo-blood groups. *Transfus Clin. Biol.* 2:79-89.
- Cotton RGH (1993) Current methods of mutation detection. *Mutation Research* 285:125-144.
- Covas DT, Delgado M, Zeitune MM, Guerreiro JF, Santos SEB, Zago MA (1997) Gene frequencies of the HPA-1 and HPA-2 platelet antigen alleles among the Amerindians. *Vox Sang.* 73:182-184.
- Daniels G et al. (1998) Blood group terminology. *Transfusion Today* 37:10-12.
- Daniels G. (1995) Human blood groups, 1th edn. Blackwell Scientific Ltd, Oxford.
- Franco RF, Simões BP, Guerreiro JF, Santos EBS, Zago MA (1994). Molecular bases of the ABO blood group of Indians from the Brazilian Amazon Region. *Vox Sang* 67:299-301.

- Franco RF, Simões BP, Zago MA (1995) Relative frequencies of the two O alleles of the histo-blood group ABH system in different racial groups. *Vox Sang* 69:50-52.
- Fukumori Y, Ohnki S, Shibata H, Nishimukai H (1996) Suballeles of the ABO blood group system in a japanese population. *Hum. Herd.* 46:85-91.
- Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, Schönitzer D (1996) ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 88(5): 1852-1856.
- Garretta M, Muller A, Gener J, Mitte C, Moullec J, (1974) Reliability in automatic determination of the ABO blood by the groupamatic system. *Vox Sang.*27:141-155.
- Greenwell P, Watkins W (1978) Unpublished observation cited by Watkins, *Rev. Franc. Transf. Immuno-Hémat* 21:201-228.
- Grunnet N, Steffensen R, Bennett EP, Clausen H (1994) Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a Danish population: Frequency of a novel O allele defined as O². *Vox Sang* 67: 210-215.
- Hansen T, Namork E, Olsson M, Chester MA, Heier HE (1998) Different genotypes causing indiscernible patterns of A expression on A_{el} red blood cells as visualized by scanning immunogold electron microscopy. *Vox Sang* 75: 47-51.
- Hayashi K (1991) PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA, *PCR* 1: 34-39.

- Heier HE, Namork E, Falleth E (1988) A study of immunogold labeled blood group A erythrocytes in the scanning electron microscope. *Eur J Haematol* 41:17-24.
- Heier HE, Namork E, Calkovska Z, Sandin R, Kornstad L (1994). Expression of A antigens of erythrocytes of weak blood group A subgroups. *Vox Sang* 66:231-236.
- Landsteiner K (1901) Über agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Bluts, *Wien. Klin. Wochenschr.* 14:1132-1134.
- Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, Drot C (1990) The gel test: A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 30:109-113.
- Lin-Chu M, Broadberry R, Tsai S (1987) Incidence of ABO subgroups in Chinese in Twain. *Transfusion* 27:114-115.
- Lopez M, Benali J, Cartron JP Salmon C (1980) Some notes on the specificity of anti-A₁ reagents. *Vox Sang* 39:271-276.
- Lowe JB (1996) Biochemistry and biosynthesis of ABH and Lewis antigen In: *Blood Cell Biochemistry* (Carton J. P. & Rouge P., eds), pp.73-115, Plenum Press, New York.
- Marcus DM (1969) The ABO and Lewis blood group system. Immunochemistry, genetics and relation to human disease. *N Engl J Med* 280:994-999.
- Mifsud NA, Haddad AP, Condon JA, Sparrow RL (1996) ABO genotyping - identification of O¹, O^{1*}, and O² alleles using the polymerase chain reaction - sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) technique. *Immunohematol* 12(4):149-153.

- Morgan WTJ (1960) A contribution to human biochemical genetics; the chemical basis of blood group specificity. *Proc Roy Soc B* 151:308-347.
- Mourant AE (1970) The use of blood groups in the study of populations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 169(1):194-198
- Mourant AE, Kopec K, Domaniewska-Sobczak K (1976) The distribution of the human blood groups and other polymorphisms, ed.2. Oxford, oxford University Press, pp117-122.
- Nakamura I, Takizawa H, Nishino K. (1989) A3 phenotype with A¹ gene-specified enzyme character in serum. *Exp Clin Immunogenet* 6:143-149.
- Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, Saitou N, Bannai M, Nakata K, Takenaka M, Fujisawa K, Ishikawa Y, Juji T, Tokunaga K (1996a) Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood* 88: 2732-2737.
- Ogasawara K, Bannai M, Saitou N, Yabe R, Nakata K, Takenaka M, Fujisawa K, Uchikawa M, Ishikawa Y, Juji T, Tokunaga K (1996b) Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Human. Genet.* 97:777-783.
- Olsson M, Thuresson B, Chester M (1995) An A^{el} allele- specific nucleotide insertion at the blood group ABO locus and its detection using a sequence-specific polymerase chain reaction. *Biophy Res Commun.* 216:642-647.

- Olsson ML, Chester MA (1995) A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O² versus A/O¹ discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox Sang*. 69:242-247.
- Olsson ML, Chester MA (1996a) Polymorphisms at the ABO locus in subgroup A individuals. *Transfusion* 36: 309-313.
- Olsson M, Chester M (1996b) Frequent occurrence of a variant O₁ gene at the blood group ABO locus. *Vox Sang* 70:26:30.
- Olsson M, Chester M (1996c) Evidence for a new type of allele at the ABO locus, due to a combination of the A² nucleotide deletion and the A^{el} nucleotide insertion. *Vox Sang* 71:113:117.
- Olsson, M.L., Guerreiro, J.F., Zago, M. & Chester M.A. (1997) Molecular analysis of the O alleles at the blood group ABO locus in populations of different ethnic origin reveals novel crossing-over events and point mutations. *Biochemical et Biophysical Research Communications*, 234, 779-782.
- Olsson ML, Chester M (1998) Heterogeneity of the blood group A^x allele: genetic recombination of common alleles can result in the A_x phenotype. *Transfus Med* 8:231-238.
- Olsson, M.L., Santos SEB; Guerreiro, J.F., Zago, M. & Chester M.A. (1998) Heterogeneity of the O alleles at the blood group ABO locus in Amerindians. *Vox Sang*. 74:46-50.

- Oriol R (1987) ABH and related tissue antigens, *Biochem. Soc. Trans.* 15:596-599.
- Oriol R (1996) ABO, Hh, Lewis, and secretion. In: *Blood Cell Biochemistry* (Carton J P & Rouge P, eds), pp.37-73, Plenum Press, New York.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci* 86:2766-2770.
- Paulson JC, Weinstein J, Schauer A (1989) Tissue-specific expression of sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 264:10931-10934.
- Reed T (1964) The frequency and nature of blood group A₃. *Transfusion* 4:457-460
- Reyes F, Lejome JL, Gordin MF, Lejone JL, Cartron JP, Gorius JB, Dreyfus B (1976) The heterogeneity of erythrocyte antigens distribution on human normal phenotypes: An immunoelectron microscopy study. *Brit. J. Haematol* 34:613-621.
- Rouger P, Salmon C (1981) Le group sanguin ABO et le groupage ABO. In: __ La pratique des groupes et groupages érythrocytaires. Masson, Paris, pp37-57.
- Roychoudhuri AK, Nei M (1988) Human polymorphic Genes world distribution, Oxford, Oxford University Press.
- Saiki R, Scharf S, Fallona F, Mullis K, Hornig T, Erlich H, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4.

- Salmon C, Salmon D, Reviron J (1965) Étude immunologique et génétique de la variabilité du phénotype A_x. *Nouv. Rev. Fran.Hémat.* 5:275-290.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T (1989) Isolation of DNA from mammalian cells In: *Molecular cloning - A Laboratory Manual -2 ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Sarkar GH, Yoon S, Sommer SS (1992) Screening for mutation by RNA single strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP, *Nucl Acids Res.*, 20:871-878.
- Suzuki K, Iwata M, Tsuji H, Takagi T, Tamura A, Ishimoto G, Shigenori I, Matsui K, Miyazaki T (1997) A de novo recombination in the ABO blood group gene and evidence for the occurrence of recombination products. *Hum Genet* 99:454-461.
- Vengelen-Tyler V. (1996) *Technical Manual AABB*, 12th ed. American Association of Blood Banks. Bethesda, Maryland.
- Watkins WM, Morgan WTJ (1952) Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature* 169:825-826.
- Watkins WM (1980) Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood groups systems. *Adv. Human. Genet.* 10:1-136.

- Westerveld A, Jongsma AP, Meera Khan P, Van Someren H (1976) Assignment of the AK1:NP:ABO linkage group to human chromosome 9. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(3):895-9.
- Yamamoto F, Hakomori S (1990) Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on aminoacid substitutions. *J Biol Chem* 265:19257-62.
- Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, White T, Clausen H, Hakomori S (1990a) Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fucalpha1-2Galalpha1-3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J. Biol. Chem.* 265:1146-1151
- Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S (1990b) Molecular genetics basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 345:229-233.
- Yamamoto F, McNeill PD, Hakomori S (1992) Human histo-blood group A₂ transferase coded by A₂ allele, one of the A subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal. *Biochem Biophys Res Commun* 187:366-374.
- Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T, Judd WJ, Davenport RD (1993a) Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 1. Weak subgroups: A₃ and B₃ alleles. *Vox Sang* 64:116-119.

- Yamamoto F, McNeil PD, Kominato Y, Yamamoto M, Hakomori S, Ishimoto S, Nishida S, Shima M, Fujimura Y (1993b) Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 2. *cis*-AB alleles. *Vox Sang* 64, 120-123.
- Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T. (1993c) Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3. A^x and B^(A) alleles. *Vox Sang* 64:171-174.
- Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Bromilow IM, Duguid JKM (1993d) Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. Another type of O allele. *Vox sang* 64:175-178.
- Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S (1995) Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology* 5:51-58.
- Yamamoto F (1995) Molecular genetics of the ABO histo-blood system. *Vox Sang.* 69: 1-7.
- Zago MA, Tavella MH, Simões BP, Franco RF, Guerreiro JF, Santos B (1996) Racial heterogeneity of DNA polymorphisms linked to the A and the O alleles of the ABO blood group gene. *Ann Hum Genet* 60:67-72.