

Revisão/Review

Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO

Molecular aspects of ABO Blood Group System

Ana Carla Batissoco¹
Marcia Cristina Zago Novaretti²

O sistema ABO é o mais importante grupo sangüíneo na medicina transfusional. O gene ABO codifica as glicosiltransferases responsáveis pela transferência dos resíduos específicos de açúcar, GalNac1-3 e Gala 1-3, ao substrato H e os convertem ao antígeno A ou B respectivamente. A estrutura do DNA dos três principais alelos do sistema ABO, A¹, B e O foi primeiramente descrita em 1990. Os avanços da genética molecular permitiram o entendimento da base molecular dos genes ABO e o conhecimento do polimorfismo dos alelos comuns a esse locus. Essa revisão tem como objetivo o estudo dos alelos variantes desse sistema, assim como a compreensão das mutações, deleções ou rearranjo de genes responsáveis pela ocorrência de alguns dos subgrupos do sistema ABO. As técnicas mais comumente utilizadas para a genotipagem ABO também são avaliadas, bem como suas vantagens e limitações. Rev.bras.hematol.hemoter. 2003;25(1):47-58.

Palavras-chave: Grupos sangüíneos; sistema ABO; genotipagem ABO; PCR; alelos ABO; subgrupos ABO.

Introdução

O sistema de grupo sangüíneo ABO, descoberto por Karl Landsteiner no começo do século XX, é, até hoje, considerado o mais importante sistema de grupos sangüíneos na medicina clínica transfusional.

Os epítomos do sistema ABO são resíduos terminais encontrados nos hidratos de carbono presentes na superfície das células e nas secreções que são biossintetizadas por glicosiltransferases específicas codificadas no locus

ABO. O locus ABO esta localizado no braço longo do cromossomo 9.^{1,2,3,4}

A heterogeneidade fenotípica do sistema sangüíneo ABO é devido à diferença estrutural do gene das glicosiltransferases, que são responsáveis pela transferência dos resíduos específicos de açúcar, $\alpha 1 \rightarrow 3$ -N-acetil-galactosamina transferase ou $\alpha 1 \rightarrow 3$ -N-galactosil transferase ao substrato H, e os convertem ao antígeno A ou B respectivamente.^{5,6,7,8,9}

As transferases A e B têm estruturas similares entre si, sendo que a sua especificidade

¹ Responsável pelo Depto. de Controle de Qualidade em Imuno-hematologia da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

² Professora Colaboradora da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Chefe da Divisão de Imuno-hematologia e das Agências Transfusionais da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

Correspondência para: Dra. Marcia Cristina Zago Novaretti
Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo – Divisão de Imuno-hematologia
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – 1º andar/ sala 114 – Cerqueira César – CEP: 05403-000 – São Paulo-SP
Fax: (11) 3061-5544 ramal 253 – e-mail: marcianovaretti@ig.com.br

será determinada pelos aminoácidos localizados próximos ao sítio de ligação da enzima com seu respectivo açúcar.¹⁰

O antígeno H é um carboidrato produzido pela ação da enzima α -2-L-fucosiltransferase codificada no locus FUT1 do cromossomo 19, na posição q13.3, sendo, portanto, geneticamente independente do locus ABO.^{11,12}

As glicosiltransferases são enzimas que catalisam as reações de transglicosilação entre o substrato aceptor e o açúcar receptor. A ação das transferases nessas reações dependerá de sua estrutura conformacional, que permitirá ou não sua ligação ao substrato. A atividade das glicosiltransferases dos antígenos A e B varia nos diversos subgrupos do sistema ABO. A sua heterogeneidade tem sido confirmada constantemente e suas diferenças podem ser refletidas na composição bioquímica dos antígenos produzidos.¹³ O grupo sanguíneo AB apresenta a atividade das duas transferases (A e B), enquanto o grupo O não possui as transferases A e B, mas apresenta o antígeno H em grande quantidade na superfície das hemácias.

Os antígenos ABO não estão restritos apenas à membrana dos eritrócitos, podendo ser encontrados também em uma grande variedade de células como linfócitos, plaquetas, endotélio capilar venular e arterial, células sinusoidais do baço, medula óssea, mucosa gástrica, além de secreções e outros fluidos como saliva, urina e leite.¹²

A determinação do fenótipo ABO pode ser feita pela detecção sorológica com o uso de reagentes imuno-hematológicos, que irão identificar os açúcares específicos dos glóbulos vermelhos, pela presença ou ausência das substâncias -A, -B e -H no soro e/ou na saliva e pelas técnicas de adsorção e eluição.^{11,14,15} Diferentes níveis de expressão de antígenos A ou B nos eritrócitos podem ser encontrados, sendo chamados de subgrupos de A ou B, conforme a intensidade de aglutinação dos eritrócitos com os reagentes anti-A, anti-B, anti-AB, anti-A₁ e anti-H.

A reatividade do reagente anti-H com as hemácias dos diferentes grupos sanguíneos ABO tende a ser: O>A₂>B>A₂B>A₁>A₁B. Os dois principais alelos de A, A¹ e A² são dife-

renciados sorologicamente com o uso do reagente lectina anti-A₁.¹⁵

Dependendo da tipagem sanguínea de um indivíduo, a IgM anti-A e/ou o anti-B presentes no soro podem constituir uma barreira para as transfusões de sangue e para o transplante de órgãos ABO incompatíveis.¹

A frequência dos antígenos ABO varia em diferentes populações. Na tabela 1 podemos observar essa variação em relação ao fenótipo dos doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.¹⁶

Tabela 1
Sistema de grupo sanguíneo ABO - Frequência fenotípica relativa (percentual) em 2.462 doadores de sangue caucasóides e negróides da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.¹⁶

População estudada	Caucasóides	Negróides		Total
		Mulatos	Negros	
O	46,52	53,20	47,94	49,23
A	39,45	29,63	31,96	33,71
B	11,51	13,78	16,60	13,39
AB	2,52	3,39	3,50	3,13

Apesar de os anticorpos monoclonais anti-A e/ou anti-B reconhecerem e aglutinarem a maioria dos subgrupos ABO, a determinação daqueles que apresentam baixíssima expressão de antígenos é laboratorialmente trabalhosa.^{1,17} Além de ser uma ferramenta independente no laboratório clínico, a genotipagem ABO pode ser usada para confirmar a presença de um antígeno de fraca expressão, como os dos subgrupos A e/ou B e também para excluir marcadores do alelo de fenótipo B como o antígeno B adquirido, por exemplo.^{1,18,19} Assim, podemos afirmar que a genotipagem ABO é um complemento valioso à determinação correta do grupo sanguíneo do doador e do receptor.^{1,5,13,17,19-25}

Genética ABO

Os genes são codificados por meio de seqüências específicas presentes no DNA, localizadas em pontos estratégicos ao longo do cro-

mossomo. Já os alelos são formas alternativas de genes, que ocupam um único locus em cromossomos homólogos. Os principais alelos do gene ABO são A¹, B e O, que darão origem aos quatro grupos sanguíneos: A, B, AB e O.¹⁵

Noventa anos após a descoberta do grupo sanguíneo ABO, a base genética molecular do sistema foi definida e os polimorfismos dos alelos comuns a esse locus estabelecidos.^{9,26} A clonagem do cDNA da transferase A, realizada por Yamamoto et al, em 1990, foi baseada na sequência parcial do gene dessa enzima, na sua forma solúvel, a partir do tecido do pulmão humano,^{11,26,27} e a construção da biblioteca de cDNA do gene ABO foi feita por meio do poli-A do RNA de células humanas cancerígenas do estômago, as quais expressaram altos níveis de antígeno A.^{11,14}

O locus ABO estende-se por uma região de 18-20 kilobases (kb), na posição 9q34.1-9q34.2, consistindo de 7 exons (cujo tamanho varia entre 26-688 pares de base, sendo que grande parte da sequência codificadora se encontra nos exons 6 e 7) e 6 introns.^{10,28} Desse modo, o gene ABO tem no total 19514 pares de bases (pb), contando desde o codon de iniciação até o terminal (o número exato de nucleotídeos pode variar entre os diferentes alelos).¹⁰

Alguns estudos realizados demonstraram que a proteína transferase apresenta três domínios: um N-terminal, transmembrana hidrofóbica e um C-terminal. A forma solúvel e purificada da enzima é ativa cataliticamente. A ausência dos domínios N-terminal e da transmembrana hidrofóbica demonstrou que, provavelmente, a porção C-terminal da enzima é a responsável pela sua atividade catalítica, sendo os exons 6 e 7, que respondem por aproximadamente 90% da sequência codificadora do gene ABO, responsáveis pela tradução do domínio C-terminal da enzima glicosiltransferase.¹¹

A análise da sequência de nucleotídeos do cDNA da transferase A₁ revelou uma região de código de 1062 pb, produzindo um polipeptídeo de 354 aminoácidos (aa), cuja massa molecular é de 41KDa.^{10,12,26,29}

Pesquisas realizadas com o gene ABO humano e seus homólogos, entre as diferentes espécies de mamíferos, demonstraram grau ele-

vado de conservação durante a sua evolução. O gene ABO apresenta também uma elevada homologia entre os não-primatas para a α 1,3-galactosiltransferase e para os pseudogenes humanos, que estão localizados no mesmo locus.^{30,31}

As substituições de nucleotídeos que ocorrem em um dos sete exons do gene ABO e que conduzem a mudança do aminoácido na proteína podem alterar a atividade catalítica dos antígenos resultantes da enzima. As mutações encontradas nos vários subgrupos dos alelos A ou B têm sido revistas recentemente.^{1,10,14} Teoricamente, a menor reatividade encontrada nos subgrupos do sistema sanguíneo ABO é causada pelas mutações na região de código do gene, ou pela influência inibitória de outros loci no gene ABO.¹⁰ Poucos alelos (A¹, A², B, B^(A), O²), até hoje, tiveram suas transferases expressas em sistemas sintéticos para estudo da causa e efeito entre as mutações e os fenótipos associados.^{10,32}

O conhecimento da estrutura tridimensional da proteína, junto com as propriedades cinéticas das enzimas quanto à especificidade entre o açúcar acceptor e o substrato, pode revelar como a substituição do nucleotídeo e/ou aminoácido afeta a atividade das glicosiltransferases dos subgrupos do sistema sanguíneo ABO.¹⁰

Base estrutural do alelo A

A clonagem e o seqüenciamento do cDNA da célula humana de adenocarcinoma de cólon dos fenótipos A, B e O demonstraram que os dois principais alelos do gene ABO, A¹ e B diferem entre si em sete mutações: A297G, C526G, C657T, G703A, C796A, G803C e G930A, das quais apenas quatro (526, 703, 796 e 803) são responsáveis pelas substituições dos aminoácidos: Arg176Gly, Gly235Ser, Leu266Met e Gly26Ala.^{1,9,11,13,14,20} As duas últimas substituições são consideradas críticas na determinação da especificidade das glicosiltransferases.^{5,11}

É importante lembrar que a sequência do alelo A¹ (A101) é tomada como base de comparação em relação a todos os outros alelos do gene ABO.¹⁰ A sequência desse alelo pode ser visualizada na tabela 2.

utilizada como um dos marcadores para pesquisa em genotipagem desse alelo.¹⁰

O fenótipo A_2 , comum em caucasianos, é detectado, sorologicamente, por meio da capacidade desses eritrócitos aglutinarem com o soro anti-A e de não aglutinarem com o soro lectina anti- A_1 , ao contrário do fenótipo A_1 , cujas hemácias são aglutinadas na presença desse reagente.^{10,15,36} O alelo A^2 (A_{201}) é caracterizado pela substituição de uma única base no nt 467 e uma deleção no nt 1060.^{11,14,21,37} Essa deleção ocorre em um dos três resíduos consecutivos de citosina (C), próximo à carboxila terminal. Em consequência disso, são adicionados à transferase A 21 aminoácidos, o que diminui a sua atividade e leva a um espectro limitado de substrato aceptor.^{8,11,14} A mutação no nt 467, C→T, leva à troca do aminoácido prolina pela leucina, não apresentando nenhuma relação quanto à atividade da transferase.^{8,11,12,14}

Recentemente, alguns estudos demonstraram a presença de outros três variantes em indivíduos detectados sorologicamente como A_2 , A_{106} , A_{107} e R_{101} . Os alelos A_{106} e A_{107} são caracterizados pela alteração do nt 1054, (C→T e C→G, respectivamente), resultando na permuta do aminoácido 352 (Arg→Trp e Arg→Gly). Essa substituição Arg352Trp é encontrada também no alelo B^3 .^{12,38} O terceiro alelo R_{101} , o mais raro dos três, tem seis mutações quando comparado ao alelo A^1 , sendo três silenciosas, A_{297G} , C_{657T} e C_{771T} , e três missenses, C_{526G} , G_{703A} e G_{829A} , que resultam nas seguintes substituições de aminoácidos: Arg176Gly, Gly235Ser e Val277Met. Acredita-se que esse alelo (R_{101}) tenha sua origem devido a uma recombinação gênica entre os alelos B (B_{101}) e O^{1v} (O_{102}) na região dos nt703-771.^{12,38}

Um outro exemplo do alelo A^2 onde não se detecta a mutação C467T foi descrito recentemente.²¹

– subgrupo A_3

Os diversos estudos realizados sobre o alelo A^3 (A_{301}) têm demonstrado que esse subgrupo possui um alto grau de heterogeneidade, uma vez que diversas mutações já foram associadas a ele.

Yamamoto et al, em suas investigações no cDNA de indivíduos A_3 , encontraram em dois exemplos de amostras A_3B a mutação G871A, nas quais há substituição do aminoácido 291 (Ácido Aspártico→Asparagina); nas outras amostras pesquisadas, as seqüências dos exons 6 e 7 mostraram-se idênticas à da transferase A^1 .^{13,18,22,37}

Barjas e Castro, em um estudo com três famílias brasileiras sobre a heterogeneidade molecular do alelo A^3 , não encontrou a mutação 871, mas durante a análise da seqüência dos nucleotídeos dessas amostras identificou outras substituições.

Em duas amostras da mesma família (A^3B e A^3O^1) foi encontrada a substituição C467T associada à del 1060C, essa última responsável pela redução da atividade da transferase, sendo característica do alelo A^2 . Na segunda família, em outras duas amostras (A^3O^1 e A^3O^1) analisadas, somente a del1060C estava presente, enquanto nos dois membros da terceira família (A^3O^{1v} e A^3O^1) foram encontradas a del1060C e a mutação do nucleotídeo G829A associadas.^{13,22}

– outros subgrupos de A

Se comparado com o consenso A^1 , o alelo A^x (A_{108}) possui uma única mutação T646A, que resulta na substituição do aminoácido 216, onde a fenilalanina é substituída pela isoleucina.³⁹

Nas pesquisas realizadas por Olsson et al, para identificação do alelo A^{el} (A_{109}), em vinte indivíduos pertencentes a 14 famílias suecas, foi encontrada, em todas as amostras analisadas, a inserção de uma base G (guanina) no nucleotídeo 798-804 do gene da transferase A, que irá produzir uma fita de oito G e não sete, tendo como consequência a alteração do "frame" de leitura a partir do codon 268, estendendo a proteína traduzida em 37 aminoácidos.^{40,41}

Vários estudos sobre outros subgrupos do alelo A, como, por exemplo, A_{en} , A_{finn} , A_m , A_{bantu} , etc., têm sido realizados, porém, devido às diferenças na morfologia desses variantes, a base genética dos mesmos permanece desconhecida.¹²

Base estrutural do alelo B

O tamanho do DNA traduzido nas transferases A e B (B101) é idêntico, diferindo apenas em sete substituições de nucleotídeos (A297G, C526G, C657T, G703A, C79A, G803C e G930A). Essas mutações resultam em apenas quatro mudanças de aminoácidos que serão expressas nas proteínas traduzidas (nt 526, 703, 796 e 803).^{5,11}

Yamamoto, em 2001, em um estudo detalhado sobre as diferenças moleculares e seus significados, adicionou a essas sete mutações, que diferenciam os alelos A¹ e B, uma oitava substituição G109A, localizada além do codon terminal, que é útil para a triagem do genótipo ABO.⁴¹

Outros três variantes do alelo B têm sido pesquisados na população japonesa, sendo caracterizados pela perda de um dos pontos das mutações que os diferenciam da transferase A. Essa mutação resulta na alteração do aminoácido que será expresso na proteína em um desses variantes, na qual a primeira das quatro substituições de aminoácidos (nt 526) está ausente, não alterando a expressão da atividade da transferase B. Esses três alelos raros, previsivelmente, devem ser formas intermediárias entre os alelos A e B, tendo sua origem provável nos eventos de conversão gênica.^{7,10,42,43}

– subgrupos de B

Os subgrupos de B são mais raros do que os de A. Eles são caracterizados pela fraca aglutinação dos eritrócitos com o soro anti-B e/ou anti-AB, bem como pela baixa absorção dessas células na presença de anti-B. A saliva dos indivíduos desses secretores exibem altas concentrações do antígeno H.^{12,15} Em geral e, ao contrário dos subgrupos de A, a classificação dos subgrupos de B é bastante controversa.

Os fenótipos B, que possuem a atividade da transferase mais fraca que o normal, designados como B₃, B_x e B_{el}, são de grande importância uma vez que permitem a caracterização das suas glicosiltransferases, pelo estudo das mutações presentes nesses alelos.³⁷

Yamamoto et al, em um estudo realizado com uma amostra A¹B³, sobre o subgrupo B₃

(B301), atribuíram a ele uma única mutação na posição do nucleotídeo 1054(C→T), resultando na troca do aminoácido 352 (arginina → triptofano).³⁷

Recentemente foram analisadas as seqüências dos sete exons e dos sítios adicionais de "splice" do gene ABO de 14 amostras de indivíduos com o fenótipo B₃. Em uma das amostras foi encontrada a mutação missense G247T, localizada no exon 6 e responsável pela substituição Asp83Tyr, enquanto as outras 13 amostras apresentaram a mutação G→A no nucleotídeo +5 do intron 3 (IVS3 + 5G→A), que irá destruir a seqüência da região de splice levando à perda do exon 3 durante o processo do RNA mensageiro, com conseqüente diminuição de 19 aminoácidos no segmento N-terminal na proteína expressa, a transferase B.⁴⁴

Investigações realizadas com o subgrupo B_x revelaram a mutação no nucleotídeo G871A, causando a substituição do aminoácido 291 (Ácido Aspártico→Asparagina), que, por sua vez, é encontrada nas amostras de indivíduos A₃.^{12,37}

Quanto ao subgrupo B_{el}, foram atribuídos a ele as mutações: T641G, que dará origem à substituição da metionina pela arginina na posição 214 (B105), e G669T, que irá alterar o ácido glutâmico pelo ácido aspártico na posição 223 (B106), encontradas isoladamente nas duas amostras analisadas.^{12,38}

– Subgrupos B^(A) e cis-AB

Em relação ao alelo B, o alelo B^(A) possui duas mutações, T657C e A703G, que irão resultar na alteração do aminoácido Ser235Gli.

A primeira substituição, T657C, torna o alelo idêntico ao alelo A, enquanto a segunda, A703G, comum ao alelo B, está localizada no segundo dos quatro sítios que discriminam as transferases humanas A e B, possuindo uma influência significativa no reconhecimento e/ou ligação entre o substrato H e seus respectivos resíduos de açúcares.^{11,12,45}

Para o fenótipo raro, cis-AB, dois mecanismos genéticos são propostos para explicá-lo. O primeiro é baseado em um crossing-over desigual, resultando em um gene que irá apresentar partes tanto do alelo A quanto do B, enquanto o segundo tem como base uma muta-

ção estrutural do gene da glicosiltransferase A ou B, tendo como consequência a atividade bifuncional da mesma. A análise molecular mostrou que o alelo cis-AB é idêntico ao A¹ à exceção de duas substituições de nucleotídeos: C467T (Pro156Leu) e G803C (Gli268Ala). Acredita-se que essas mutações na transferase A do alelo cis-AB fizeram parte da evolução do gene ABO, ocorrendo antes da combinação entre os alelos A e B.^{11,45} Embora o fenótipo B(A) seja herdado em uma posição cis, ele é classificado separadamente do cis-AB devido às diferenças sorológicas entre esses dois alelos.³⁹

Com a substituição da glicina pela alanina (aa 268) no alelo cis-AB da transferase A, podemos dizer que ele tem a transferase B, porém com a estrutura principal da transferase A. Similarmente, a substituição da serina pela glicina na posição 235 no alelo B^(A) da transferase B faz com que o mesmo tenha a transferase A, mas com a estrutura principal da transferase B. Esses resultados implicam que ambos os alelos cis-AB e B^(A) codificam proteínas que possuem em sua estrutura quimeras das transferases A e B.¹⁴

Base estrutural do alelo O

Estudos realizados por Yamamoto et al demonstraram que as seqüências dos alelos do gene ABO possuem diferenças mínimas entre si; desse modo, a inabilidade do gene O em codificar as transferases A ou B é devido a uma diferença estrutural em relação aos nucleotídeos e não à falha da expressão das transferases A ou B.⁹

Nos testes sorológicos de rotina, o grupo sanguíneo O é caracterizado por não apresentar os antígenos A e B na membrana das hemácias; assim, os seus eritrócitos não aglutinam na presença do soros anti-A, anti-B e anti-AB.¹⁵

– Subgrupos de O

O primeiro alelo O descrito, nomeado originalmente como O¹ (O01), possui uma estrutura idêntica ao gene A¹, com exceção de uma única deleção (G) no nt261 do exon 6, próximo à região N-terminal da proteína. Essa deleção irá causar uma alteração na leitura da proteína e com isso provocar um stop codon nos

nucleotídeos 352-354 e conduzindo à tradução de uma proteína de 117 aminoácidos enzimaticamente inativa.^{9,11-13,17,21-24,46}

Estudos posteriores revelaram um segundo alelo O, denominado de O^{1v} variante ou O^{1v} (O02), que, além de apresentar a deleção de uma única base no nt261, tem também outras nove substituições de nucleotídeos (G106T, G188A, C189T, C220T, A297G, T646A, G681A, C771T e G829A) que o diferem da seqüência do consenso A¹.^{5,9,11,14,23,24,46}

Em 1994, Grunnet et al identificaram e seqüenciaram um alelo O mutante, denominado posteriormente de O² (O03), no qual a deleção na posição 261 estava ausente, mas diferindo do gene A¹ em quatro substituições de nucleotídeos: 297 526, 802, e 1.096, das quais apenas duas resultam em alterações de aminoácidos (C526G: Arg176Gly e G802A: Gly268Arg).^{5,9,11,13,23,24,25,46,47} Dessas quatro mutações, duas, nt297 e 526, são específicas do alelo B, enquanto a terceira, G802A, é utilizada para explicar a perda da atividade da transferase A e B, uma vez que a alteração do aminoácido glicina pela arginina, na posição 268, está localizada na região da glicosiltransferase envolvida com a atividade enzimática.^{5,9,11,13,23,24,25,46,47}

Um alelo O inicialmente denominado de O³, encontrado em uma família sueca, mostrou as mutações C467T e de I1060C, sendo que ambas são características do alelo A². A esse variante foi adicionada também uma outra substituição passível de ser encontrada, que seria a inserção do nucleotídeo G (guanina) na posição 798-804, semelhante ao que ocorre no alelo A^{el}.^{12,48}

Como outros exemplos de variantes do grupo sanguíneo O, podemos citar o alelo O⁴, que é caracterizado por uma inserção G no nt87-88, tendo por resultado a alteração na leitura da proteína e conseqüente stop codon no aa 56, e o alelo O⁵ com a mutação C322T que irá criar um stop codon direto.¹⁰

Recentemente, uma série de outros alelos O tem sido pesquisada e acredita-se que eles são formados provavelmente devido a um crossing-over ou uma conversão gênica, eventos esses que ocorrem entre os alelos conhecidos do sistema ABO, como por exemplo: O^{1v}-B, B- O^{1v}, O¹-A², O¹- O^{1v} e O^{1v}-O¹.¹²

Sistema H

O sistema H tem dois genes, H e h e um antígeno ou substrato H, sobre o qual ocorre a ação das glicosiltransferases para a formação dos antígenos A e B, podendo ser expresso tanto no estado homocigoto (H/H) como no heterocigoto (H/h). O alelo h é considerado amorfo e nenhum produto antigênico é associado a ele, enquanto o gene hh é extremamente raro, e nessa situação nenhuma substância H é produzida.^{12,15}

O seqüenciamento do gene humano H, que codifica a enzima α 1,2-L fucosiltransferase, identificou uma proteína de 365 aminoácidos com uma massa molecular de 41,249Da, que é codificada no locus FUT1 no braço longo do cromossomo 19. Esse gene é formado por quatro exons, sendo que a região de código da proteína está localizada no exon 4.^{12,49}

O primeiro variante deficiente do gene H foi detectado em 1952 e chamado de fenótipo Bombay ou O_h . Esse fenótipo é caracterizado sorologicamente pela perda total da atividade das transferases ABH nos eritrócitos e nas secreções corpóreas e pelas grandes quantidades de anti-H que fazem com que os eritrócitos O_h sejam incompatíveis com aqueles do tipo O , uma vez que esses últimos apresentam antígeno H na superfície dos seus eritrócitos.^{12,15}

Outro variante deficiente do gene H é caracterizado como para-Bombay (A_h , B_h , e AB_h). Portadores desse fenótipo são identificados por apresentarem quantidades mínimas dos antígenos A e B nos eritrócitos e pouco ou nenhum antígeno H. Nesse fenótipo, ao contrário do Bombay, a transferase H esta presente com atividade muito fraca, sendo que as poucas quantidades de substância H produzidas são convertidas aos antígenos A e B pelas suas respectivas transferases.^{12,15}

Investigações moleculares em amostras Bombay e para-Bombay identificaram um número grande de mutações, sendo que a maioria dessas produz alelos silenciosos que, quando transcritos, codificam uma fucosiltransferase inativa. Alguns alelos, entretanto, codificam a fucosiltransferase, porém com baixa atividade, as quais são responsáveis pela expressão fraca

Tabela 3
Mutações possíveis de serem encontradas em indivíduos portadores do gene H deficiente^{11,12}

Nucleotídeo	Mutação	Aminoácido	Substituição
35	C→T	12	Ala→Val
349	C→T	117	His→Tyr
442	G→T	148	Asp→Tyr
460	T→C	154	Tyr→His
461	A→G	154	Tyr→Cys
491	T→A	164	Leu→His
513	G→C	171	Trp→Cys
547-552	deleção dos nt AG		
658	C→T	220	Arg→Cys
695	G→A	232	Trp→Ter
721	T→C	241	Tyr→His
725	T→G	242	Leu→Arg
776	T→A	259	Val→glu
826	C→T	276	Gln→Ter
880-882	deleção dos nt TT		
944	C→T	315	Ala→Val
948	C→G	316	Tyr→Ter
969-970	deleção dos nt CT		
980	A→C	327	Asn→Thr
990	deleção do nt G		
1042	G→A	348	Glu→Lys
1047	G→C	349	Trp→Cys

do gene H. Algumas das mutações do gene H podem ser observadas na tabela 3.^{11,12}

Técnicas para Genotipagem ABO

Os avanços na biologia molecular na última década têm providenciado aos bancos de sangue o conhecimento de diferentes alelos ABO, assim como diversas técnicas para sua detecção. Ao longo de todo esse tempo, mais de trinta diferentes métodos para a genotipagem do gene ABO têm sido descritos em diversas publicações científicas.¹⁰

Entre os mais freqüentes métodos descritos para a genotipagem do locus ABO destacam-se a reação de polimerase em cadeia (PCR) juntamente com o estudo do polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism), a amplificação do DNA por meio dos primers alelos específicos (ASP), a detecção de alterações de conformação das cadeias simples do DNA

Tabela 4
Correlação entre as enzimas de restrição e seus respectivos alelos.^{9,14,22,24,50}

Alelo	Exon	Mutação	Enzima de restrição
O ^{1v}	4	188G>A, 189C>T	BstUI
O1, O ^{1v}	6	261Gdel	KpnI
A ² , O ³ , cis-AB	7	467C>T	HpaII
B, O ²	7	526C>T	NarI/BssHII
A ^x , O ^{1v}	7	646T>A	MboI
B	7	703G>A	AluI/HapII
A ^x , O ^{1 var}	7	771C>T	DdeI
A ³	7	871G>A	SalI
B, O ²	7	1096G>A	HpaII

(SSCP-Single Strand Conformation Polymorphism) e outras diversas técnicas como o seqüenciamento automático.³

O polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA (RFLP), obtido pelo tratamento do DNA com enzima de restrição, consiste na digestão do produto amplificado com uma ou mais endonucleases, seguido de eletroforese para separação dos fragmentos de acordo com o seu comprimento. O número de fragmentos obtidos corresponde ao número de sítios de restrição reconhecidos pela(s) enzima(s). Por exemplo, a deleção G261- encontrada no alelo O¹ pode ser convenientemente detectada pelo uso de duas endonucleases, a KpnI, que é apta para clivar o alelo O¹, mas não o é para o consenso A¹ no nt261, e a enzima BstEII, que tem ação inversa.^{1,5,9,11,23,24,25}

Olsson e Chester, em 1995, pesquisaram um método de triagem para genotipagem do gene ABO, por meio de uma reação "multiplex" de amplificação utilizando vários primers simultaneamente: mo46, mo57, mo71 e mo101 e as enzimas de restrição KpnI e HpaII para identificação dos alelos A¹, A², B, O¹ e O². Esse método utiliza a observação prévia da existência de um sítio de clivagem para a enzima HpaII na região 3' UTR (untranslated region) dos alelos A¹ e O¹, sendo que os alelos B e O² não possuem esse sítio. Assim, a mutação G1096A presente nesses dois últimos alelos (B e O²) é utilizada como um marcador genético, uma vez que ela irá abolir o sítio de clivagem com a enzima HpaII. A presença das mutações associadas aos alelos A² (C467T), B (G703A e G1096A) e O² (G1096A) também removem os sítios da HpaII presentes na seqüência do consenso do gene ABO.^{10,24}

Na tabela 4 é apresentada uma relação de enzimas de restrição comumente usadas para identificação dos alelos do gene ABO, bem como seus respectivos sítios de restrição.⁵⁰ Essa técnica, PCR-RFLP, tem como vantagem o fato de ser de execução fácil e rápida, mas oferece muitos dados para serem analisados em um único fragmento amplificado.¹⁰

Outra técnica amplamente empregada é o PCR alelo específico, onde cada amostra de DNA é submetida a duas amplificações com o intuito de que o polimorfismo do gene ABO seja detectado por meio de primers específicos para a seqüência pesquisada, sendo consi-

Tabela 5
Primers alelo específicos para amplificação multiplex do gene ABO⁵⁰

Alelo	Primer sense 5'→3'	Primer anti sense 5'→3'
O ¹ Não-O ¹	TTAAGTGGGAAGGATGTCTCGTCGTA TAAGTGGGAAGGATGTCTCGTCGTG	ATATATATGGCAAACACAGTTAACCCAATG
O ² Não-O ² B Não-B	AGTGGACGTGGACATGGAGTTC	TCGACCCCCCGAAGAAGCT CGACCCCCCGAAGAAGCC ATCGACCCCCCGAAGAGCG CCGACCCCCCGAAGAAGCC
A ² Não-A ²	GAGGCGGTCCGGAAGCG GAGGCGGTCCGGAACACG	GGGTGTGATTTGAGGTGGGGAC
Controle	TGCCTTCCAACCATTCCCTTA	CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTT

derada "positiva" a reação que apresentar o alelo pesquisado e "negativa" a reação que não apresentar o alelo em questão. Esses primers são formulados de maneira que permitam a amplificação de uma região predeterminada do gene onde se encontra a mutação do nucleotídeo que se deseja detectar, devendo ter entre 19 e 21 pb, e permitir uma hibridização diferencial baseada em uma única mudança de base, fornecendo uma especificidade elevada com o locus a ser estudado. Os fragmentos obtidos após amplificação deverão ser separados e identificados por meio de eletroforese.⁵⁰ Esse tipo de técnica pode ser utilizada em conjunto com o RFLP, uma vez que é possível criar sítios de clivagem para determinadas enzimas, com uso de primers durante as reações de amplificação.^{20,50} Na tabela 5 podemos verificar alguns primers utilizados para identificação dos alelos A², B, O¹ e O².^{50,51}

Para análise do polimorfismo do gene podemos citar a técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), que permite identificar variações de seqüência (mutações ou polimorfismos) através da detecção de alterações da conformação de cadeias simples de DNA. A técnica de SSCP é considerada uma das melhores para detecção das mutações inesperadas no gene, pois é capaz de identificar substituições, deleções e/ou inserções de nucleotídeos baseada na diferença de mobilidade eletroforética dos fragmentos de DNA com seqüências diferentes. O fator limitante dessa técnica é a dificuldade operacional na prática clínica.^{10,21,52}

Outras técnicas, como PCR-SSP (seqüência de primers específicos) ou PCR seguido por denaturação em gel gradiente para eletroforese, também podem ser empregadas, porém, devido ao elevado polimorfismo do gene ABO, principalmente na detecção de seus subgrupos, o seqüenciamento direto das bases dos alelos tem sido uma das técnicas mais amplamente utilizadas para confirmação dessas mutações.

Assim concluindo, essa revisão possibilita ao leitor um maior entendimento das bases moleculares do sistema sangüíneo ABO, dos seus subgrupos e das principais técnicas atualmente empregadas, assim como suas aplicações e limitações.

Abstract

The ABO blood group is the most important blood group system in transfusion medicine. Antigens of the ABO system consist of A or B carbohydrate structure carried on the substrate H antigen. The ABO gene is responsible for encoding for glycosyltransferases A or B that defines which specific carbohydrate is added to the end of H substance oligosaccharide chains, GalNac α 1-3 and Gal α 1-3, respectively. The DNA structure of the three major alleles of the human blood group ABO system, A¹ and B, was first described in 1990. Advances of molecular genetics have allowed understanding of the molecular basis of the ABO blood group system and the knowledge of the common alleles polymorphisms of this locus. This review article has the purpose of describing the variants of these alleles and the underlying mutations, deletions or rearrangement of the genes responsible for the occurrence of ABO subgroups and O transferases inactivation. Finally, various methods available for ABO genotyping are also evaluated, as well as its advantages and limitations. Rev.bras.hematol.hemoter. 2003;25(1):47-58.

Key words: Blood group; ABO system; ABO genotyping; PCR; ABO alleles; ABO subgroups.

Referências Bibliográficas

1. Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, Helberg A, Moulds MK, Sareneva H, Chesser A. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001;98(5):1.585-1.593.
2. Watkins WM. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems. Ed. *Advances in Human Genetics*. Vol. 10. New York: Plenum Press; 1980:1-136.
3. Ferguson-Smith MA, Aitken DA, Turleau C, Grouchy J. Localization of the human ABO:Np-1:AK-1 linkage group by regional assignment of AK-1 to 9q34. *Hum Genet* 1976;34:35-43.
4. Bennett EP, Steffensen R, Clausen H, Weghuis DO, Van Kessel AG. Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206:318-325.
5. Zago MA, Tavella MH, Simões BP, Franco RF, Guerreiro JF, Santos SB. Racial heterogeneity of DNA polymorphisms linked to the A and the O alleles of the ABO blood group gene. *Ann Hum Genet* 1996;60:67-72.
6. Yoshida A, Yamaguchi YD, Dave V. Immunologic homology of human blood group glycosyltransferases

- and genetic background of blood group (ABO) determination. *Blood* 1979;59:344-350.
7. Yamamoto F, Hakomori S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferase is based on amino acid substitutions. *J Biol Chem* 1990; 265:19.257-19.262.
 8. Yamamoto F, McNeill PD, Hakomori S. Human histo-blood group A² transferase coded by A² allele, one of the A subtypes, is characterized by a results in an additional domain at the carboxyl terminal. *Biochem. Biophys Res Commun* 1992;187:366-374.
 9. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990;345:229-233.
 10. Olsson ML, Chester MA. Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfusion Medicine* 2001;11(4):295-313.
 11. Lee AH, Reid ME. ABO blood group system: a review of molecular aspects. *Immunohematology* 2000;16(1): 01-06.
 12. Schenbel-Brunner H. *Human Blood Groups. Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity*. 2th ed. Springer Wien New York, 2000.
 13. Barjas-Castro ML, Carvalho MH, Locatelli MF, Bordin S, Saad STO. Molecular heterogeneity of the A₃ subgroup. *Clin Lab Haem* 2000;22:73-78.
 14. Yamamoto F. Molecular Genetics of ABO. *Vox Sang* 2000;78(suppl):91-103.
 15. Vengelen-Tyler V. ed. *AABB: Technical Manual*, 12th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1999.
 16. Novaretti MCZ. *Estudo de Grupos Sangüíneos em Doadores de Sangue Caucásios e Negróides na Cidade de São Paulo*. Faculdade de Medicina da USP. 1995.
 17. Novaretti MC, Batissoco AC, Bueno VJ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Solving na ABO complex discrepancy by rapid genotyping using PCR-RFLP. *Transfusion* 2000;40(suppl.:113S.)
 18. Olsson ML, Chesser MA. Polymorphisms at the ABO locus in subgroup A individuals. *Transfusion* 1996; 36: 309-313.
 19. Fischer GF, Fae I, Dub E, Pickl WF. Analysis of the gene polymorphism of ABO blood group specific transferases helps diagnosis of acquired b status. *Vox Sang* 1992;62:113-116.
 20. Pearson SL, Hessner MJ. A^{1,2} BO^{1,2} genotyping by multiplexed allele-specific PCR. *British Journal of Haematology* 1998;100:229-234.
 21. Yip SP. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood* 2000;95(4):1.487-1.492.
 22. Barjas-Castro MLR, Saad STO. Absence of the G871A mutation in A₃ blood donors from Brazil. *Transfusion* 1997;37:564.
 23. Olsson ML, Chester MA. Frequent occurrence of a variant O¹ gene at the blood ABO locus. *Vox Sang* 1996;70:26-30.
 24. Olsson ML, Chester MA. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O² versus A/O² discriminating nucleotide at the ABO locus. *Vox Sang* 1995;69:242-247.
 25. Batissoco AC, Novaretti MC, Bueno VJ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Easy method for determining the frequency of O¹ and O² alleles in Brazilian blood donors by PCR-RFLP. *Immunohematology* 2001;17(4):111-116.
 26. Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, White T, Clausen H, Hakomori S. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc:fuc-alpha1-2Gal alpha1-3GalNAc transferase (histo-blood group a transferase) mRNA. *J Biol Chem* 1990;265:1.146-1.151.
 27. Clausen H, Whitw T, Takio K, et al. Isolation to homogeneity and partial characterization of a histo-blood group A defined Fuca1→2Gala1→3-N-acetylgalactosaminyltransferase from human lung tissue. *J BiolChem* 1990;265:1.139-45.
 28. Yamamoto F, McNeil PD, Hakomori S. Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology* 1995;5:51.
 29. Clausen H, White T, Takio K, Titani K, Stroud M, Holmes E, Karkov J, Thim L, Hakomori SI. Isolation to homogeneity and partial characterization f a histo-blood group A defined Fuc a1→2gala1→3-N-acetyl-galactosaminyltransferase from human lung tissue. *J Biol Chem* 1990;265:1.139-1.145.
 30. Martinko JM, Vincek V, Klein D, Klein J. Primate ABO glycosyltransferases: evidence for transpecies evolution. *Immunogenetics* 1993;37:274-278.
 31. Yamamoto F. Cloning and regulation of the ABO genes. *Transfusion Medicine* 2001;11:281-294.
 32. Yamamoto F, MacNeill PD. Amino acid residue at codon 268 determines both activity and nucleotide-sugar donor substrate specificity of human histo-blood group a and B transferases. In vitro mutagenesis study. *J Biol Chem* 1996;271:10.515-10.520.
 33. Fukumori Y, Ohnoki S, Shibata H, Nishimukai H. Suballeles of the ABO blood group system in a Japanese population. *Human Heredity* 1996;46:85-91.
 34. Kang SH, Fukumori Y, Ohnoki S, Shibata H, Han KS, Nishimukai H, Okubo Y. Distribution of ABO genotypes and allele frequencies in a Korean population. *Japanese. J Hum Genetics* 1997;42:331-335.
 35. Ogasawara K, Bannai M, Saitou N, Yabe R, Nakata K, Takenaka M, Fujisawa K, Uchikawa M, Ishikawa Y, Juji T, Tokunaga K. Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *J Human Genetics* 1996; 97:777-783.
 36. Mourant AE, Kopec Ac, Domaniewska K. *The distribution of human blood groups and others polymorphisms*. Oxford Univrsity Press.1976.

37. Yamamoto F, McNeil PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T, Judd WJ, Davenport RD. Molecular genetic analysis of the ABO blood system: 1. Weak subgroups: A₃ and B₃ alleles. *Vox Sang* 1993;64:116-117.
38. Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, Saitou N, Bannai M, Nakata K, Takenaka M, Fujisawa K, Ishikawa Y, Yuji T, Takunaga K. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood* 1996;88:2:732-2:737.
39. Yamamoto F, McNeil PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T. Molecular genetic analysis of the ABO blood system: 3. A^x and B^(A) alleles. *Vox Sang* 1993;64:171-174.
40. Hansen T, Namork E, Olsson ML, Chesser MA, Heier HE. Different genotypes causing indiscernible patterns of A expression on A₀ red blood cells as visualized by scanning immunogold electron microscopy. *Vox Sang* 1998.
41. Olsson ML, Thureson B, Chesser MA. An Ael allele-specific nucleotide insertion at the blood group ABO locus and its detection using a sequence-specific polymerase chain reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Nov 13;216(2):642-7.
42. Ogasawara K, Bannai M, Saitou N, Yabe R, Nakata K, Takenaka M, Fujisawa K, Uchikawa M, Ishikawa Y, Yuji T, Takunaga K. Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Human Genetics* 1996;97:777-783.
43. Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, Bannai M, Nakata K, Takenaka M, Takahashi Y, Yuji T, Takunaga K. Different alleles cause an imbalance in A₂ and A₂B phenotypes of the ABO blood group. *Vox Sang* 1998;74:242-247.
44. Yu LC, Twu YC, Chou ML, Chang CY, Wu CY, Lin M. Molecular genetic analysis for the B³ allele. *Blood* 2002;100(4):1.490-1.492.
45. Yamamoto F, McNeil PD, Kominato Y, et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood system: II. Cis AB alleles. *Vox Sang* 1993;64:120-3.
46. Yamamoto F, McNeill P, Yamamoto M, Hakomori S, Bromilow I, Duguid JKM. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. Another type of O allele. *Vox Sang* 1993;64:175-178.
47. Grunnet N, Steffensen R, Bennet EP, Clausen H. Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a Danish population: frequency of a novel allele defined as O². *Vox Sang* 1997;67:210-215.
48. Olsson ML, Chesser MA. Evidence for a new type of O allele at the ABO locus, due to a combination of the A² nucleotide deletion and the A^{el} nucleotide insertion. *Vox Sang* 1996;71:113-117.
49. Koda, Y, Soejima M, Kimura H. Structure and expression of H-type GDP-L fucose:b-D-galactoside 2-a-L-fucosyltransferase gene (FUT1) – Two transcription start sites and alternative splicing generate several forms of FUT1 mRNA. *J Biol Chem* 1997;272:7501-7505.
50. Denomme GA, Rios M, Reid ME. *Molecular Protocols in Transfusion Medicine*. Academic Press. 2000.
51. Gassner C, SchmarDA A, Nussbaumer W. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 1996;88:1852-1856.
52. Tsai L, Kao L, Chang J, Lee H, Linacre A, Lee JC. Rapid identification of the ABO genotypes by their single-strand conformation polymorphism. *Electrophoresis* 2000; 21:537-540.

Recebido: 20/08/2

Aceito: 18/12/02