

Luiz Carlos de Mattos

**Correlações dos fenótipos ABO, Lewis,
secretor e polimorfismo molecular
do locus ABO em pacientes
infectados e não infectados
pelo *Helicobacter pylori***

São José do Rio Preto

2000



*

1910000954





Luiz Carlos de Mattos

**Correlações dos fenótipos ABO, Lewis, secretor e
polimorfismo molecular do *locus* ABO em
pacientes infectados e não infectados pelo
*Helicobacter pylori***



954/00

Tese apresentada para obtenção
do Grau de Doutor em Ciências
Biológicas-Genética.

São José do Rio Preto - SP

2000



Este trabalho, que recebeu apoio financeiro da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (bolsa de auxílio à pesquisa, processo nº 04123/98), foi realizado no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, Câmpus de Araraquara e nos Laboratórios de Imunohematologia e Biologia Molecular do Hemocentro de São José do Rio Preto.



Orientador

Doutor Haroldo Wilson Moreira

Professor Titular do Departamento de Análises Clínicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp

Câmpus de Araraquara - Estado de São Paulo



Ofereço este trabalho
à minha esposa Cinara
e às minhas filhas Bianca e Giulia pelo amor, paciência e dedicação.

Dedico este trabalho
a meus pais Eurico e Lydia, pelo amor e ensinamentos recebidos,
e aos meus irmãos Valmor, Dirceu, Cláudio e Maria Aparecida pelo carinho e amizade.

Agradecimentos

Desejo expressar meus agradecimentos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Professor Doutor Haroldo Wilson Moreira, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp - Campus de Araraquara pelo apoio, pela amizade e pela sua incansável orientação durante a execução deste trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Cláudia Regina Bonini Domingos do Departamento de Biologia do Ibilce - Unesp - São José do Rio Preto pelo apoio, amizade e pelas considerações na avaliação da pró-forma desta tese.

Agradeço ao Professor Doutor Ivan de Lucena Angulo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pelo apoio, amizade e pelas considerações na avaliação da pró-forma desta tese.

Agradeço ao Professor Doutor Édimo Garcia de Lima do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pelo apoio, amizade e pelas considerações na avaliação da pró-forma desta tese.

Agradeço à Professora Doutora Rita de Cássia Martins Alves da Silva do Departamento de Medicina Integrada da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pelo apoio, amizade, pelo auxílio na seleção dos pacientes que integraram esse estudo e pelas considerações na avaliação da pró-forma desta tese.

Agradeço à Professora Gislaine Fusco Fares do Departamento de Medicina Integrada da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pelo apoio e pelo auxílio na seleção dos pacientes que integraram esse estudo.



Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp - Câmpus de Araraquara, pelo constante apoio e amizade.

Agradeço ao Professor Doutor José Antonio Cordeiro do Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo auxílio na interpretação estatística dos dados desta tese.

Agradeço à Professora Adília Maria Pires Sciarra pelo auxílio na elaboração do summary.

Agradeço aos doadores e aos pacientes que integraram este estudo.



Índice

I Introdução	1
• I.1 Histórico	2
• I.2 Biossíntese dos antígenos ABH e Lewis	13
• I.3 Regulação da expressão e distribuição diferencial dos antígenos ABH e Lewis ...	20
• I.4 Estrutura molecular do <i>locus</i> e dos genes ABO	24
• I.5 Estratégias para investigação dos genes ABO	32
• I.6 Associações entre grupos sanguíneos e úlceras pépticas	36
• I.7 Fenótipos ABO, Lewis e secretor e infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i>	38
II Objetivos	43
III Resultados	45
• Artigo 1. Genotipagem do <i>locus</i> ABO em doadores de sangue	47
• Artigo 2. Frequências dos fenótipos ABO, Lewis, secretor e não secretor em pacientes com e sem infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i>	70
• Artigo 3. Polimorfismo genotípico do <i>locus</i> ABO em pacientes com e sem infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i>	86
• Artigo 4. Diagnóstico molecular do <i>Helicobacter pylori</i> por PCR	104
IV Conclusões	118
V Resumo	121
VI <i>Summary</i>	124
VII Referências bibliográficas	127

I Introdução



I.1 Histórico

Observações feitas na década de 1890 de que espécies animais podiam ser distinguidas por meio de reações de suas hemácias e proteínas séricas com soros específicos estimularam Karl Landsteiner a investigar se os seres humanos poderiam ser diferenciados do mesmo modo. Usando amostras de soro e eritrócitos de 22 indivíduos, as quais foram misturadas em todas as combinações possíveis, Landsteiner verificou que as hemácias de uns eram aglutinadas pelo soro de outros. A interpretação de seus resultados permitiu a classificação dos indivíduos analisados em três grupos: A, B e O. Dois anos mais tarde, seus discípulos De Castello e Sturli encontraram o quarto grupo denominado AB (Eisen, 1974). Assim, deu-se a descoberta do sistema ABO, o principal sistema de aloantígenos histo-eritrocitários, cujas aplicações na antropologia, na medicina transfusional e na medicina forense estão muito bem documentadas (Mourant *et al.*, 1976; Mollison, 1983; Crouse & Vincek, 1995; Liechti-Gallati & Nesser, 1996).

Os fenótipos que constituem o sistema ABO são facilmente identificados por reações de hemaglutinação com soros específicos e eritrócitos. As diferentes combinações de dois antígenos eritrocitários altamente imunogênicos, A e B, e de dois anticorpos plasmáticos de importância clínica, anti-A e anti-B, são usadas para caracterização sorológica dos quatro fenótipos. O grupo A apresenta o antígeno A e o anticorpo anti-B, enquanto o grupo B tem o antígeno B e o anticorpo anti-A. No grupo AB estão presentes os antígenos A e B, mas não os anticorpos plasmáticos, e o grupo O é definido pela ausência dos antígenos A e B e pela presença dos anticorpos anti-A, anti-B e anti-A,B. Com a elucidação das bases bioquímicas dos antígenos do sistema ABO e com a comprovação de que o antígeno H é o precursor para a síntese dos antígenos A e B, essas moléculas



passaram a ser referidas como antígenos ABH, em decorrência de suas relações bioquímico-estruturais (Daniels, 1995).

Em 1908, Epstein e Ottenberg sugeriram que os grupos sanguíneos ABO fossem caracteres herdados e, em 1910, von Dungern e Hirszfeld demonstraram a hereditariedade dos antígenos A e B. Em 1924, Bernstein propôs um modelo genético para a herança do sistema ABO, com três genes autossômicos *A*, *B* e *O*, sendo *A* e *B* codominantes entre si e dominantes sobre o gene *O*. Pelos princípios mendelianos, seis genótipos foram descritos com base em estudos familiares; contudo, esse número cresceu com a descrição dos subgrupos de A, de B e de AB (Bryant, 1994). Esse modelo de herança, universalmente aceito, foi comprovado com a clonagem do *locus ABO* e o seqüenciamento dos genes *A*, *B* e *O* no início dos anos noventa (Yamamoto *et al.*, 1990).

Por volta de 1910, von Dungern e Hirszfeld revelaram a existência de dois subgrupos nos indivíduos do grupo A. O subgrupo *A*₁, cujos eritrócitos absorvem todos os anticorpos anti-A presentes em soros anti-A, e o subgrupo *A*₂, capaz de absorver apenas parte dos anticorpos anti-A (Eisen, 1974). Atualmente, vários subgrupos de A, de B e de AB são reconhecidos e facilmente identificados em função dos padrões de hemaglutinação dos eritrócitos com lectinas, com os soros anti-A, anti-B e anti-A,B, dos anticorpos plasmáticos e dos antígenos ABH presentes nas secreções (Vengelen-Tyler, 1996).

Diferentes estudos realizados nas várias populações humanas revelaram que o subgrupo *A*₁ corresponde a aproximadamente 80% dos indivíduos A e o subgrupo *A*₂ equivale aos 20% restantes, enquanto os demais subgrupos apresentam baixas frequências (Daniels, 1995). No quadro 1 são mostrados os principais grupos e subgrupos do sistema ABO com os antígenos eritrocitários, os anticorpos plasmáticos e os possíveis genótipos.



QUADRO 1. Principais grupos e subgrupos do sistema ABO com seus antígenos eritrocitários, anticorpos plasmáticos e genótipos.

Grupos	Antígenos eritrocitários	Anticorpos plasmáticos	Genótipos
A ₁	A	Anti-B	A^1A^1, A^1A^2, A^1O
A ₂	A	Anti-B	A^2A^2, A^2O
B	B	Anti-A	BB, BO
A ₁ B	A e B	-	A^1B
A ₂ B	A e B	-	A^2B
O		Anti-A, Anti-B e Anti-A,B	OO

Adaptado de Salmon *et al.*, 1984.

Nos anos vinte, verificou-se que os antígenos A e B eram expressos, de forma solúvel, no líquido seminal e na saliva e, no início dos anos trinta, foi demonstrado que essa característica secretora era herdada pelos princípios mendelianos (Yamakami, 1926; Schiff & Sasaki, 1932). Estudos populacionais realizados posteriormente, revelaram a presença desse fenótipo secretor em cerca de 80% das populações européias (Mourant *et al.*, 1976). Assim, os indivíduos que apresentam os antígenos ABH nos eritrócitos, na saliva e em outros líquidos biológicos passaram a ser referidos como secretores e aqueles que os apresentam apenas nos eritrócitos, como não secretores.

Após o final da Segunda Guerra Mundial, foi descoberto o sistema Lewis a partir da descrição do anticorpo anti-Le^a (Lewis a) e, dois anos mais tarde, foi encontrado o anticorpo anti-Le^b (Lewis b). Esse sistema permitiu a classificação dos indivíduos em três fenótipos, conforme a presença ou ausência dos antígenos Le^a e Le^b (Mourant, 1946; Andersen, 1948).

No final dos anos quarenta, foi demonstrado que as pessoas com o fenótipo eritrocitário Le(a+b-) eram não secretoras dos antígenos ABH e que aquelas com fenótipo Le(a-b+) eram secretoras (Grubb, 1948). Essas observações, aliadas a estudos genético-familiares do caráter secretor em indivíduos Le(a-b-), sugeriram que os fenótipos Lewis resultavam das interações epistáticas entre os *loci FUT3(LE)* com os genes *Le* e *le*, e o *FUT2(SE)*, com os genes *Se* e *se* (Ceppellini & Siniscalco, 1955). No quadro 2 estão representados os fenótipos e os genótipos Lewis, secretor e não secretor.

Na década de cinquenta, tornou-se claro que os antígenos ABH e Lewis eram compostos de carboidratos estruturalmente relacionados e sintetizados a partir de oligossacarídeos precursores comuns (Watkins & Morgan, 1952; Kabat, 1956).



QUADRO 2. Fenótipos eritrocitários, antígenos e genótipos do sistema Lewis e fenótipos e genótipos secretor e não secretor.

Fenótipo Lewis	Antígenos	Genótipos	Fenótipo secretor	Genótipos
Le(a+b-)	Le ^a	LeLe, Lele	Não secretor	sese
Le(a-b+)	Le ^b	LeLe, Lele	Secretor	SeSe, Sese
Le(a-b-)	-	Lele	Secretor ou não secretor	SeSe, Sese, sese

Os antígenos ABH, embora tenham sido descritos inicialmente em eritrócitos, são expressos em grande quantidade em diferentes tecidos e sua síntese é controlada por enzimas do tipo glicosiltransferases, as quais adicionam, sequencialmente, monossacarídeos específicos às extremidades das cadeias oligossacarídicas precursoras, presentes em glicolipídeos e glicoproteínas (Watkins, 1980; Oriol, 1995). Nesse mesmo período, foi descrito na Índia um raro fenótipo denominado Bombaim, caracterizado pela ausência dos antígenos ABH nos eritrócitos e na saliva, porém com anticorpos anti-H, anti-A, anti-B e anti-AB no plasma (Bhende *et al.*, 1952). Em 1981 foram encontrados na ilha de Reunião, situada no oceano Índico, portadores de um fenótipo caracterizado pela deficiência de expressão do antígeno H nos eritócitos mas não na saliva, os quais foram chamados de fenótipo Reunião (Gérard *et al.*, 1982). Essas descobertas permitiram o melhor entendimento das bases bioquímicas, genéticas e da regulação da expressão dos antígenos ABH.

Grande número de pesquisadores verificaram as distribuições percentuais dos grupos sanguíneos ABO e as frequências de seus genes nas populações humanas, sendo observadas altas frequências do gene *O* em indígenas das Américas Central e do Sul e no noroeste da Europa, incluindo Escócia, País de Gales, Irlanda e Islândia (Salmon & Ruffié, 1980). O gene *A* mostrou-se frequente entre os povos escandinavos e em regiões da Europa Central, próximas à Bulgária, e o gene *B*, comum na Ásia Central e no norte da Índia (Salmon *et al.*, 1984). A clássica obra "The distribution of human blood groups and others polymorphisms", de autoria de Arthur Mourant e colaboradores, resume os resultados dos estudos sobre a distribuição dos grupos sanguíneos nos cinco continentes (Mourant *et al.*, 1976).



A distribuição dos grupos sangüíneos ABO e as freqüência de seus genes em populações urbanas e rurais de diferentes regiões do Brasil foram apresentadas por Lima e colaboradores em 1992. O quadro 3 apresenta as freqüências dos grupos sangüíneos ABO descritas em diferentes populações e o quadro 4, a distribuição percentual dos fenótipos Lewis em caucasianos e negros. No quadro 5 estão representadas as freqüências dos fenótipos ABO no Estado de São Paulo e no quadro 6 são mostradas as distribuições dos grupos sangüíneos ABO e as freqüências de seus genes em vários estados brasileiros.



QUADRO 3. Distribuição percentual dos grupos sanguíneos ABO em diferentes populações.

População	Grupos (%)			
	A	B	AB	O
Alasca (esquimós)	43,0	1,5	1,5	54,0
Brasil	39,0	10,0	3,0	48,0
Escócia	32,0	15,0	3,0	50,0
EUA (índios)	12,0	0,0	0,0	88,0
França	45,0	8,0	3,0	44,0
Índia	29,0	28,0	11,0	32,0
Paquistão	33,0	36,0	5,0	25,0
Suécia	48,0	10,0	6,0	37,0
Suíça	47,0	9,0	4,0	40,0

Adaptado de Mourant *et al.*, 1976.

QUADRO 4. Distribuição percentual dos fenótipos Lewis em caucasianos e negros.

Fenótipos eritrocitários	Caucasianos	Negros
Le(a+b-)	22	23
Le(a-b+)	72	55
Le(a-b-)	6	22

Adaptado de Reid & Lomas-Francis, 1997.

QUADRO 5. Distribuição percentual dos grupos sanguíneos e dos genes ABO em caucasóides, negróides e mongolóides no Estado de São Paulo.

Grupo racial	Grupos (%)					Genes (%)		
	N	A	B	AB	O	A	B	O
Caucasóides	2.571	38,9	9,7	3,6	47,8	0,24	0,06	0,70
Negróides	236	30,5	11,9	4,2	53,4	0,19	0,08	0,73
Mongolóides	300	37,0	22,7	13,3	27,0	0,30	0,20	0,50

Adaptado de Beiguelman, 1983.

QUADRO 6. Distribuição percentual dos grupos sanguíneos e dos genes ABO em diferentes estados brasileiros.

Estados	Ano	Grupos					Genes		
		N	A	B	AB	O	A	B	O
Bahia	1973	9391	33,1	13,2	3,4	50,3	26,4	8,7	64,9
RG do Norte	1981	780	34,9	12,2	2,8	50,1	21,0	7,8	71,2
RG do Sul	1981	947	37,7	13,2	3,1	46,0	24,1	8,1	67,8
Amazonas	1982	535	24,3	5,4	0,4	69,9	14,3	2,4	83,3
Pará	1984	1544	30,0	8,0	2,0	60,0	18,0	5,0	77,0
Piauí	1986	516	33,6	12,7	2,2	51,5	19,9	7,8	72,3
São Paulo	1989	4931	36,5	10,9	3,8	48,8	22,7	7,7	69,6

Adaptado de Lima *et al.*, 1992.

1.2 Biossíntese dos antígenos ABH e Lewis

Os oligossacarídeos precursores dos antígenos ABH e Lewis estão ligados covalentemente a proteínas e lipídeos das membranas celulares e as proteínas banda 3, banda 4.5 e os ceramídeos são as principais moléculas que carregam esses antígenos contribuindo, portanto, para a sua natureza glicoproteica e glicolípida (Anstee, 1990).

As glicoproteínas que contêm os antígenos ABH estão ligadas a duas classes de carboidratos: os N-glican, constituídos por cadeias ramificadas ligadas à asparagina e os O-glican, formados por cadeias simples ligadas à serina ou treonina. Os glicolipídeos, que compreendem os tipos lactosilceramídeo, globosídeo e gangliosídeo, resultam da ligação de cadeias lineares de carboidratos aos ceramídeos da membrana (Clausen & Hakomori, 1989; Lowe, 1995).

Com base na ligação dos dissacarídeos terminais, aos quais são incorporados os açúcares imunodominantes que determinam as especificidades antigênicas H, A, B, Le^a e Le^b, os oligossacarídeos precursores são classificadas em tipo I e tipo II. No tipo I, a galactose terminal une-se à N-acetilglicosamina por uma ligação glicosídica $\beta 1 \rightarrow 3$ e no tipo II, pela ligação $\beta 1 \rightarrow 4$ (Watkins, 1980). A figura 1 mostra a estrutura terminal dos dissacarídeos precursores dos antígenos ABH e Lewis dos tipos I e II.

O conhecimento da estrutura dos oligossacarídeos precursores e dos antígenos ABH e Lewis resultou de estudos realizados em fluídos de cistos ovarianos e outros líquidos biológicos nos quais esses antígenos são encontrados na forma solúvel.



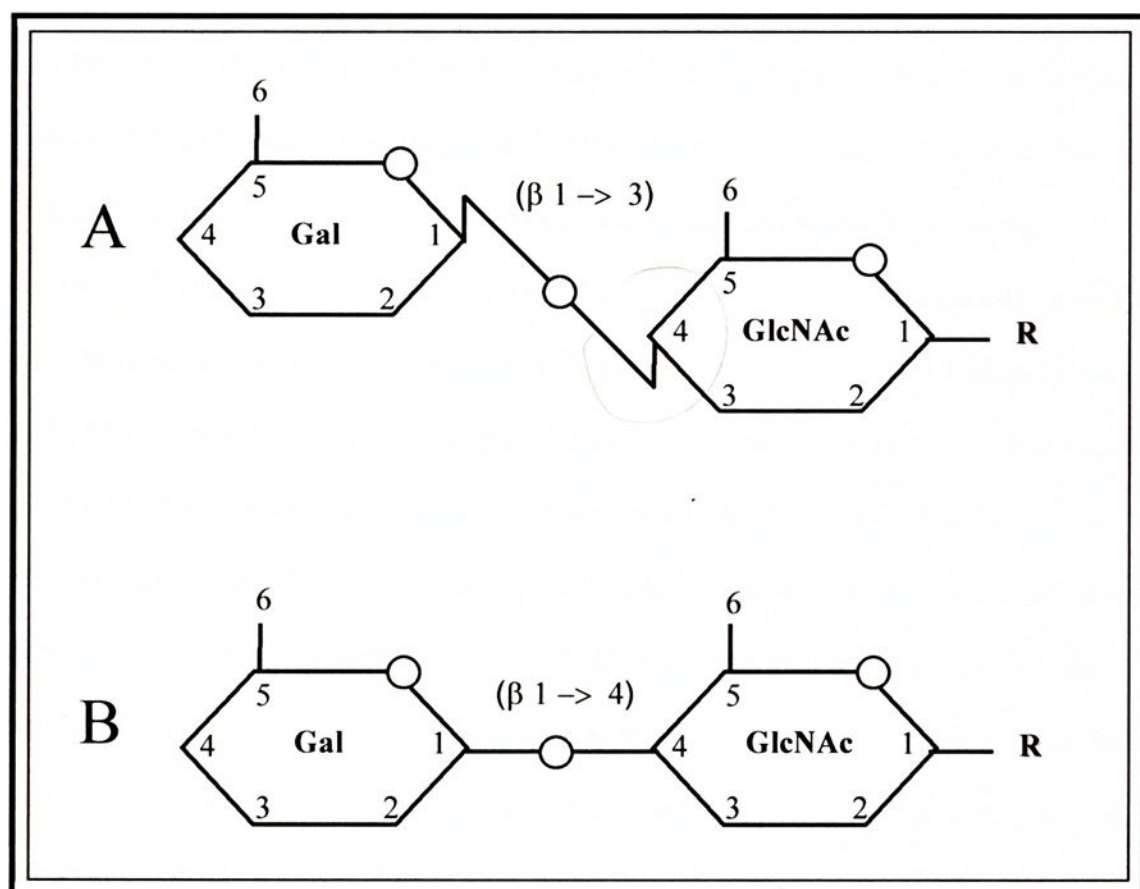


FIGURA 1. Representação dos dissacarídeos terminais dos precursores dos antígenos ABH e Lewis do tipo I em A e do tipo II em B. Gal e GlcNAc correspondem aos monossacarídeos galactose e N-acetilglicosamina, respectivamente.

Nas secreções, os antígenos ABH e Lewis estão presentes em glicoproteínas e no plasma sanguíneo, constituem parte dos glicoesfingolípídeos neutros que podem ser adsorvidos aos eritrócitos, leucócitos e plaquetas (Marcus & Cass, 1969; Watkins, 1980).

Os antígenos ABH e Lewis são sintetizados em reações sequenciais, controladas por glicosiltransferases específicas, a partir de diferentes oligossacarídeos precursores (Oriol, 1986; Clausen & Hakomori, 1989). No quadro 7 estão representados os diferentes oligossacarídeos precursores dos antígenos ABH e Lewis e no quadro 8 são mostradas as glicosiltransferases com relação aos *loci*, aos genes e às localizações cromossômicas.

As células precursoras da série eritróide expressam os oligossacarídeos do tipo II, sobre os quais serão construídos os antígenos H, sendo que a transferase H incorpora uma molécula de L-fucose ao carbono 2 da galactose terminal, utilizando o nucleotídeo GDP (guanidina difosfato) como doador desse monossacarídeo. As transferases A e B catalisam, respectivamente, as reações que adicionam os monossacarídeos N-acetilgalactosamina e D-galactose ao carbono 3 da galactose terminal dos antígenos H. Estas reações utilizam o nucleotídeo UDP (uridina difosfato) como doador da N-acetilgalactosamina e da D-galactose; assim, os antígenos H da membrana eritrocitária poderão ser total ou parcialmente convertidos em antígenos A ou B (Watkins, 1980).

A síntese dos antígenos ABH e Lewis presentes nas secreções e no plasma sanguíneo é controlada pelas interações entre os *loci* *FUT1(H)*, *FUT2(SE)*, *FUT3(LE)* e *ABO*. As glândulas exócrinas das mucosas dos aparelhos respiratório, urinário e digestório expressam os oligossacarídeos precursores dos tipos I e II (Watkins *et al.*, 1988). Nessas, a transferase Lewis incorpora uma molécula de L-fucose ao carbono 4 da N-acetilglicosamina dos precursores do tipo I, sintetizando o antígeno Le^a, e a transferase secretora adiciona a L-fucose ao carbono 2 da D-galactose terminal, produzindo o antígeno



H. O antígeno Le^b é o produto da ação conjunta dessas duas transferases, pois possui os açúcares imunodominantes que determinam Le^a e H (Oriol, 1986).

As células da linhagem eritróide não expressam os oligossacarídeos precursores do tipo I e os antígenos Lewis deles derivados são adsorvidos passivamente aos eritrócitos na circulação sanguínea (Marcus & Cass, 1969). Como o *locus ABO* segrega independentemente dos *loci FUT1(H)* e *FUT2(SE)*, os portadores do fenótipo Bombaim são incapazes de converter os oligossacarídeos precursores em antígeno H e esse em A ou B (Salmon *et al.*, 1984). Na figura 2 estão representadas as vias biossintéticas dos antígenos ABH e Lewis a partir dos oligossacarídeos precursores do tipo I.

QUADRO 7. Oligossacarídeos precursores dos antígenos ABH e Lewis.

Tipos	Estrutura linear
1	DGalβ1 → 3DGlcNAcβ — 1-R
2	DGalβ1 → 4DGlcNAcβ — 1-R
3	DGalβ1 → 3DGalNAcα — 1-R
4	DGalβ1 → 3DGalNAcβ — 1-R
5	DGalβ1 → 3DGlcβ — 1-R
6	DGalβ1 → 4DGlcβ — 1-R

QUADRO 8. Glicosiltransferases responsáveis pela síntese dos antígenos ABH e Lewis, seus *loci*, genes e posição cromossômica.

Glicosiltransferases	<i>Loci</i>	Genes	Posição
α -2-L-fucosiltransferase (transferase H)	<i>FUT1(H)</i>	<i>H</i>	19q13.3
α -2-L-fucosiltransferase (transferase secretora)	<i>FUT2(SE)</i>	<i>Se</i>	19q13.3
α -3/4-L-fucosiltransferase (transferase Lewis)	<i>FUT3(LE)</i>	<i>Le</i>	19p13.3
α -3-D-N-acetilgalactosaminiltransferase (transferase A)	<i>ABO</i>	<i>A</i>	9q34.1
α -3-D-galactosiltransferase (transferase B)	<i>ABO</i>	<i>B</i>	9q34.1

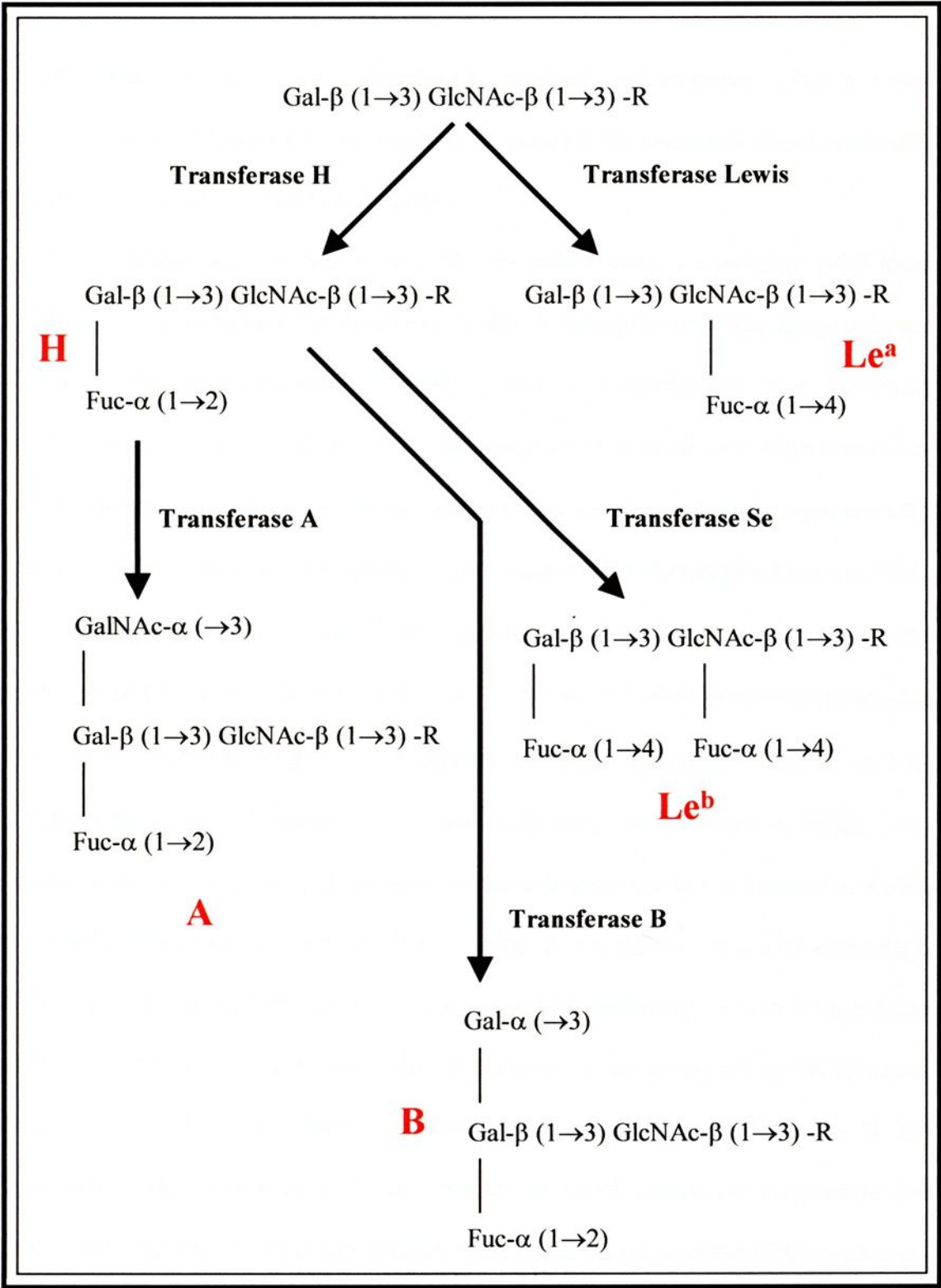


FIGURA 2. Representação da biossíntese dos antígenos ABH e Lewis a partir dos oligossacarídeos precursores do tipo I.

1.3 Regulação da expressão e distribuição diferencial dos antígenos ABH e Lewis

Diferentes estudos sobre a distribuição tecidual dos antígenos ABH e Lewis demonstraram a participação de *loci* distintos no controle da expressão dessas moléculas (Mollicone *et al.*, 1985; Watkins *et al.*, 1988).

Para explicar que os antígenos ABH da saliva eram controlados pelo *locus FUT2(SE)* e independentes da expressão nas células de linhagem eritróide, foi postulada a existência de um *locus* estrutural *FUT1(H)*, e dois *loci* reguladores, *Z* e *FUT2(SE)* (Solomon *et al.*, 1965). Assim, a síntese do antígeno H a partir dos oligossacarídeos precursores dos tipos I e II dependeria da enzima α -2-L-fucosiltransferase, cuja expressão seria regulada pelo *locus Z* nos eritroblastos e pelo *locus FUT2(SE)* nas glândulas mucosas.

A comprovação de que as ligações da galactose terminal à N-acetilglucosamina nos oligossacarídeos precursores dos tipos I ($\beta 1 \rightarrow 3$) e II ($\beta 1 \rightarrow 4$) determinam configurações estereoquímicas distintas sugeriu a existência de duas diferentes enzimas α -2-L-fucosiltransferases como responsáveis pela síntese do antígeno H (Lemieux, 1978). Com base nesses achados e de posse dos dados de 44 famílias com fenótipo de Bombaim, Rafael Oriol e colaboradores propuseram, em 1981, um novo modelo com dois *loci* estruturais, *FUT1(H)* e *FUT2(SE)*, na tentativa de explicar o mesmo mecanismo. Assim, com o *locus FUT1(H)* regulando a expressão a partir dos precursores do tipo II nas células de linhagem eritróide e o *locus FUT2(SE)* fazendo-o a partir dos precursores dos tipos I e II nas mucosas, esse modelo tornou-se aceito por explicar de forma consistente a expressão dos antígenos ABH e Lewis nos diferentes tecidos. Mais tarde, foram descritas duas enzimas α -

2-L-fucosiltransferase com propriedades distintas e codificadas pelos *loci FUT1(H)* e *FUT2(SE)* (Kumazaki & Yoshida, 1984).

Os antígenos ABH e Lewis são expressos em vários tecidos do corpo humano e diante desse fato Clausen e Hakomori propuseram, em 1989, a denominação *antígenos histossangüíneos* como mais apropriada do que *antígenos de grupos sangüíneos*.

A maioria dos genes responsáveis pela síntese e expressão dos antígenos ABH são polimórficos e portanto, cada indivíduo apresenta um fenótipo particular resultante dos efeitos aditivos das enzimas glicosiltransferases codificadas por esses genes (Oriol, 1990). Além disso, cada órgão tem seu padrão particular de maturação, que expressa esses antígenos em diferentes estágios do desenvolvimento (Oriol *et al.*, 1992).

As células da linhagem eritróide produzem as glicosiltransferases ABH, sintetizando, portanto, seus antígenos a partir dos oligossacarídeos precursores do tipo II. Esses antígenos, presentes em glicoproteínas e glicolipídeos, são intrínsecos à membrana eritrocitária e definem os fenótipos ABO durante toda a vida (Clausen *et al.*, 1986).

As análises de tecidos de embriões humanos com cinco semanas de idade revelaram que as células epiteliais e endoteliais expressam as mesmas quantidades de antígenos ABH, independentemente da condição secretora. Os antígenos expressos pelas células endoteliais persistem por toda a vida, enquanto os das células epiteliais atingem a expressão máxima por volta da nona semana de gestação (Szulman, 1964). Em alguns tecidos, a redução na expressão antigênica coincide com o aparecimento de funções órgão-específicas, tais como a secreção de mucina no aparelho digestório e a captação de iodo na tireóide (Szulman, 1965). Mais tarde, sob controle dos *loci FUT1(H)*, *FUT2(SE)*, *FUT3(LE)* e *ABO*, os antígenos ABH e Lewis aparecem em todas as glândulas exócrinas (Oriol, 1990).



Os antígenos Lewis são expressos em quantidades reduzidas em células de cordão umbilical e em eritrócitos de recém-nascidos, sendo sua detecção possível com o uso de potentes soros anti-Le^a e anti-Le^b (Schenkel-Brünner & Halfland, 1981). Após o nascimento, a expressão desses antígenos aumenta de forma progressiva e ordenada em crianças portadoras do gene *Le*. O seguimento da expressão do fenótipo Lewis, realizado em indivíduos com os genes *Le* e *Se* ativos (*LeLe*, *Lele* e *SeSe*, *Sese*), mostrou que o fenótipo Le(a-b-), observado ao nascimento, será alterado para Le(a+b-) após o primeiro mês, depois para Le(a+b+) e por volta do segundo ano de vida para Le(a-b+). Essa sequência de eventos sempre segue a mesma ordem e sugere que a expressão tecidual das glicosiltransferases Lewis e secretora resulta na síntese dos glicoesfingolipídeos séricos com especificidade Lewis, os quais serão posteriormente adsorvidos aos eritrócitos, alterando seu padrão fenotípico (Henry *et al.*, 1993). Esse comportamento não é encontrado em adultos normais portadores dos genes *Le* e *Se* ativos, porém foram relatados em populações polinésias como resultado de um gene secretor variante que reduz a expressão do antígeno H (Yu *et al.*, 1995; Henry *et al.*, 1996).

Foi observado na mucosa oral humana que a expressão dos antígenos ABH varia de acordo com o grau de maturação celular, apresentando sequência temporal com oligossacarídeos precursores na lâmina germinal, com antígenos H na lâmina intermediária e com antígenos A ou B nas áreas superficiais (Mandel *et al.*, 1988). Um fenômeno similar foi observado na epiderme, onde as células do estrato espinoso expressam o antígeno H e a maioria das células maduras do estrato granuloso, próximas ao estrato córneo, expressam os antígenos A ou B como último evento antes da descamação e morte (Mollicone *et al.*, 1988).



A proliferação das células epiteliais das mucosas duodenal e pilórica ocorre nos sítios próximos à base das glândulas exócrinas, migrando para o epitélio ou para as glândulas pilórica e de Brünner, iniciando, ao mesmo tempo, a expressão dos antígenos ABH e Lewis de acordo com a direção de migração (Mollicone *et al.*, 1986). As células que migram para as áreas profundas expressam antígenos H, Le^x (Lewis x) e Le^y (Lewis y), a partir dos precursores do tipo II em indivíduos do grupo sanguíneo O; parte delas produz os antígenos ALe^y ou BLe^y nos indivíduos dos grupos A ou B, respectivamente.

A expressão dos antígenos ABH e Lewis, a partir dos precursores dos tipos I e II nas células que migram para as áreas superficiais, estará sob controle dos *loci* *FUT2(SE)*, *FUT3(LE)* e *ABO*. Entretanto, a expressão desses antígenos a partir dos precursores do tipo II, pelas células que migram para as áreas profundas, é controlada pelos *loci* *FUT1(H)* e *ABO* (Mollicone *et al.*, 1985). Esse comportamento diferencial representa um exemplo complexo de dois controles genéticos na expressão dos antígenos ABH nas áreas superficiais e profundas da mesma mucosa gastroduodenal (Oriol, 1995).



I.4 Estrutura molecular do *locus* e dos genes ABO

O isolamento da transferase A a partir do tecido pulmonar foi decisivo na elucidação da estrutura molecular do *locus ABO* (Clausen *et al.*, 1990). Com base na sequência de aminoácidos dessa enzima, o DNA complementar foi clonado e sua sequência de nucleotídeos deduzida a partir do RNAm poli-A de células de câncer gástrico da linhagem MKN 45 (Yamamoto *et al.*, 1990).

Os resultados dessas investigações revelaram que os genes ABO possuem uma região codificadora com 1.062 pares de bases e como não foram encontradas grandes diferenças entre eles, concluiu-se que apresentam elevada homologia (Lutz & Dzik, 1992). Além disso, experimentos de *Northern blot* com linhagens celulares de diferentes fenótipos ABO identificaram moléculas de RNAm transcritas no grupo O, sugerindo que a inatividade do gene *O* é devida a alterações estruturais (Yamamoto *et al.*, 1990).

O *locus ABO* [9q34.1-34.2] ocupa cerca de 18 *kilobases* do DNA genômico com suas sequências codificantes organizadas em sete exons, cujos números de pares de bases são 28, 70, 57, 48, 36, 135 e 688, respectivamente. Os exons 1, 2 e 7 possuem 9, 23 e 229 códonos com um nucleotídeo extra em cada um e os exons 3, 4, 5 e 6 têm 19, 16, 12 e 45 códonos, respectivamente (Fergusson-Smith *et al.*, 1976; Yamamoto *et al.*, 1995; Bennett *et al.*, 1995). A figura 3 ilustra a organização estrutural do *locus ABO*.

Nos genes *A* e *B* os nucleotídeos de 1 a 93 codificam a sequência aminoterminal das transferases; os de 94 a 156 codificam a porção hidrofóbica que atravessa a membrana e os demais codificam o domínio catalítico dessas enzimas (Yamamoto *et al.*, 1990).

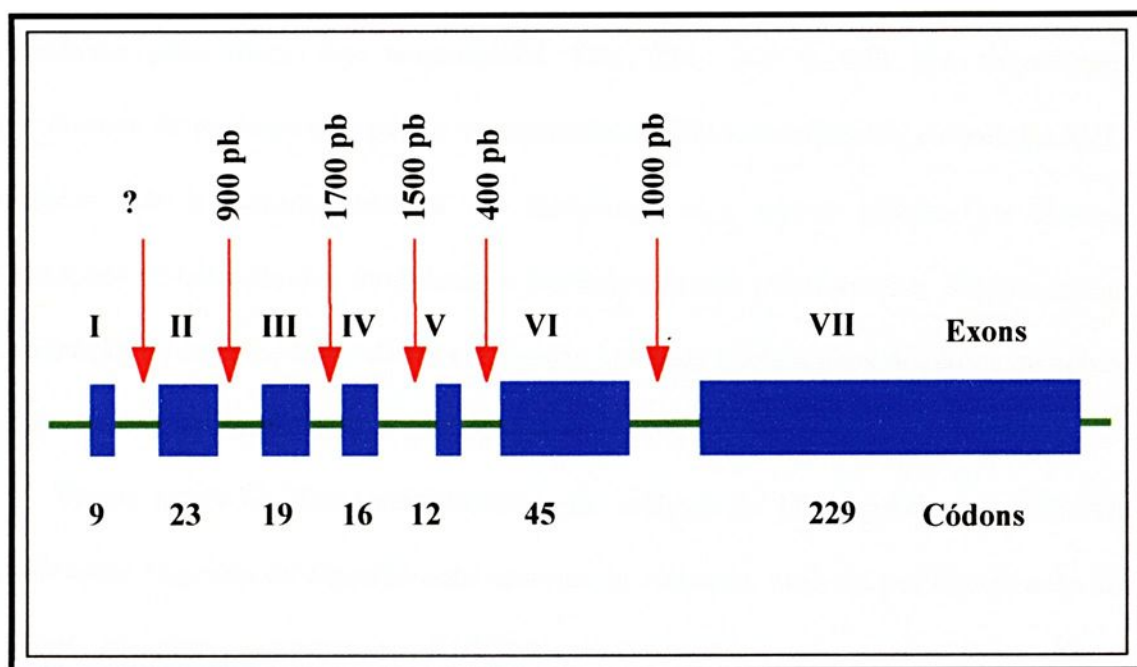


FIGURA 3. Organização estrutural do *locus* ABO no cromossomo 9 (9q34.1-q34.2).

Os números indicam, quando conhecidos, o tamanho dos íntrons em pares de bases e dos *exons*, em códon.

As substituições de nucleotídeos no domínio catalítico região são responsáveis pelas trocas de aminoácidos das transferases A e B e, conseqüentemente, por suas diferenças funcionais (Yamamoto & Hakomori, 1990).

Embora apresentem elevada homologia, os genes *A* e *B* diferem em sete posições de nucleotídeos localizadas nos *exons* 6 e 7, o que implica a troca de quatro aminoácidos nas transferases codificadas. Essas substituições estão localizadas nos nucleotídeos 297, 526, 657, 703, 796, 803 e 930, sendo que apenas quatro delas (526, 703, 796 e 803) são responsáveis pela troca dos aminoácidos 176, 235, 266 e 268 nas transferases. Experimentos de reconstrução gênica e expressão de DNA transfetado em células HeLa mostraram que a terceira (leucina → metionina) e a quarta (glicina → alanina) substituições de aminoácidos modificam a flexibilidade das transferases e são cruciais na determinação de suas especificidades em relação aos seus nucleotídeos doadores de açúcar (Yamamoto & Hakomori, 1990; Yamamoto *et al.*, 1990).

Vários genes *O* foram identificados por análises do DNA genômico, incluindo amplificações seguidas da digestão com enzimas de restrição, análises por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), amplificações com *primers multiplex* e amplificações com *primers* de seqüências alelo-específicas (SSP) (Yamamoto *et al.*, 1990; Johnson & Hopkinson, 1992; Lee & Chang, 1992; Chang *et al.*, 1992; O'Keefe & Dobrovic, 1993; Grunnet *et al.*, 1994; Stroncek *et al.*, 1995; Olsson & Chester, 1995; Gassner *et al.*, 1996).

O gene *O'* difere do gene *A* apenas pela deleção do nucleotídeo guanina na posição 261 do *exon* 6, a qual cria um códon *stop* entre as posições 346 a 348 (Yamamoto *et al.*, 1990). Essa alteração modifica a seqüência do código de leitura, fazendo com que o RNAm



transcrito não possua os códons responsáveis pelos aminoácidos que originalmente constituem o domínio catalítico da transferase (Lutz & Dzik, 1992). Como consequência, ocorre a síntese de uma transferase funcionalmente inativa, contendo apenas 116 aminoácidos (Yamamoto *et al.*, 1990; Clausen *et al.*, 1994). Experimentos realizados com anticorpos policlonais antitransferase A e antitransferase B demonstraram que as proteínas séricas de indivíduos do grupo O reagem com esses anticorpos; esses achados sugeriram que o gene O^I , apesar da deleção, é capaz de codificar uma proteína estruturalmente relacionada às transferases A e B (Yoshida *et al.*, 1979).

O gene O^2 , que não apresenta essa deleção, foi seqüenciado e mostrou-se idêntico ao gene B no nucleotídeo 526 e idêntico ao gene A nos nucleotídeos 703, 796 e 803 (Yamamoto *et al.*, 1993). O primeiro estudo sobre a distribuição populacional desse gene, realizado em doadores de sangue caucasóides da Dinamarca, revelou frequência de 3,7% (Grunnet *et al.*, 1994). Outros estudos relataram a presença desse gene em várias populações, com frequências abaixo de 6% (Franco *et al.*, 1995; Villa *et al.*, 1996; Mattos *et al.*, 1998).

Um outro gene O^{iv} , também descrito inicialmente em dinamarqueses, mostrou frequências de 40%. Os estudos de seqüenciamento nucleotídico demonstraram que esse gene, além da deleção na posição 261, apresenta nove diferenças nucleotídicas em relação ao gene O^I e quatro, em relação ao O^2 (Olsson & Chester, 1996). A característica predominante entre esses genes O é a incapacidade de codificar glicosiltransferases funcionais com atividades semelhantes àsquelas observadas nas transferases A e B.

No Brasil, as frequências dos vários genes O foram avaliadas em índios da região amazônica e em doadores de sangue caucasianos e não-caucasianos das regiões de Araraquara e São José do Rio Preto, no Estado de São Paulo (Franco *et al.*, 1994; Mattos *et*



al., 1998; Mattos *et al.*, 2000). Esses estudos mostraram que as frequências dos genes O^I , O^{Iv} e O^2 eram, em média, 44%, 17% e 4%, respectivamente. As análises realizadas em indígenas brasileiros não evidenciaram a presença do gene O^2 (Zago *et al.*, 1995).

A figura 4 mostra as diferenças na sequência de nucleotídeos entre os genes A , B e O e na figura 5 estão representadas as estruturas propostas para as transferases A , B e O com base na organização do *locus ABO*. Na figura 6 são mostradas as diferenças na sequência de nucleotídeos dos genes A , O^I , O^{Iv} e O^2 .



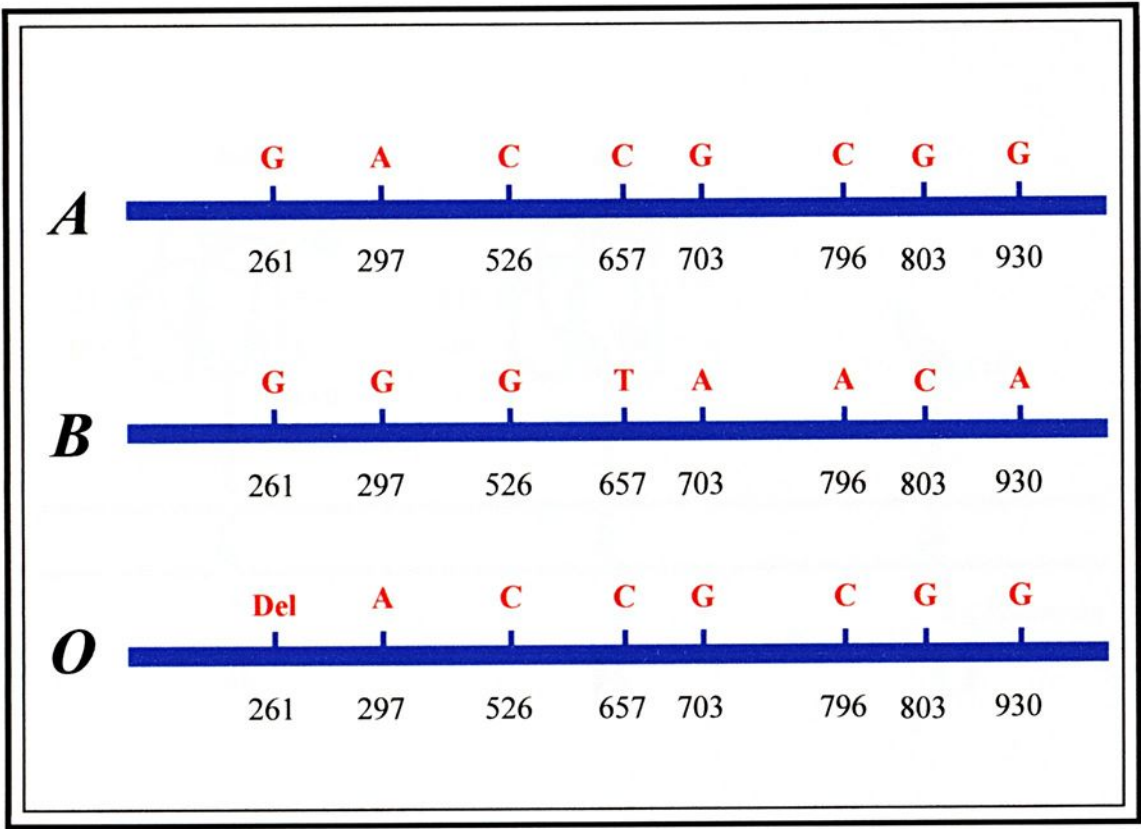


FIGURA 4. Diferenças nucleotídicas entre os genes A, B e O.

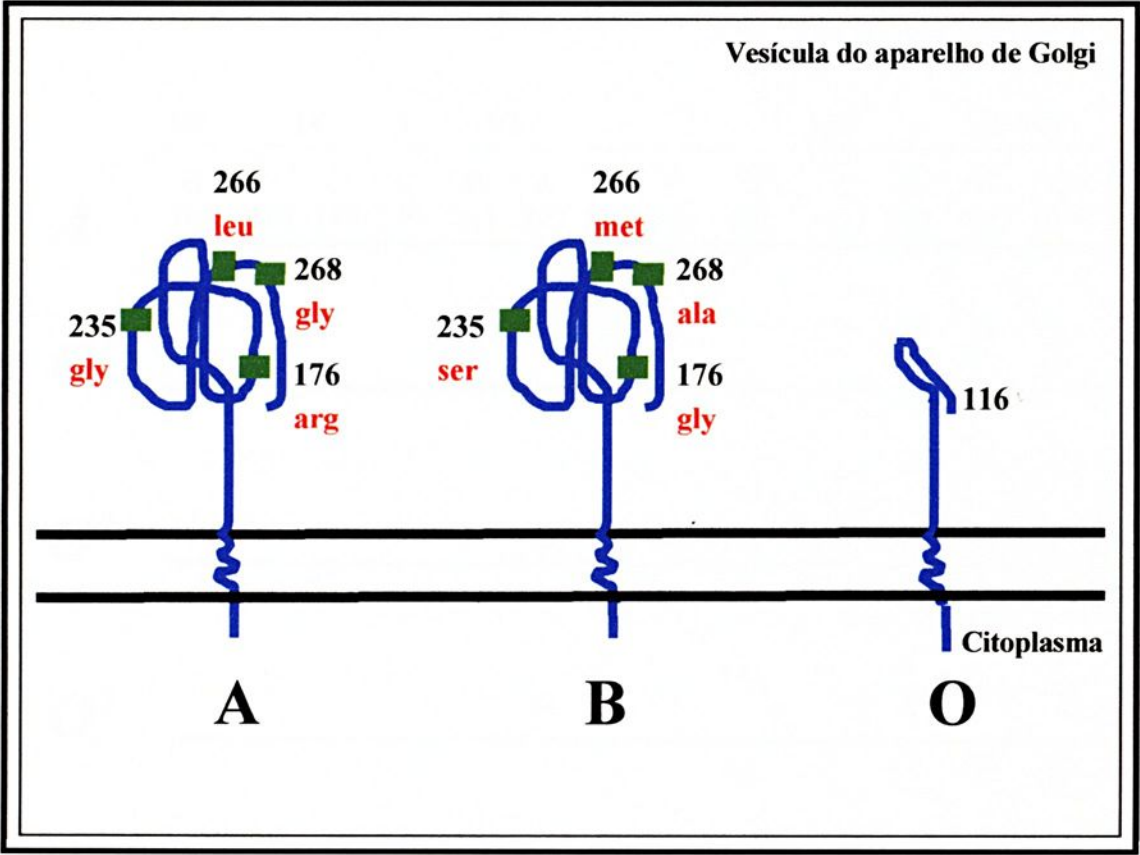


FIGURA 5. Estruturas propostas para as transferases A, B e O com base na organização do locus ABO. Os aminoácidos que diferem as transferases A e B estão indicados.

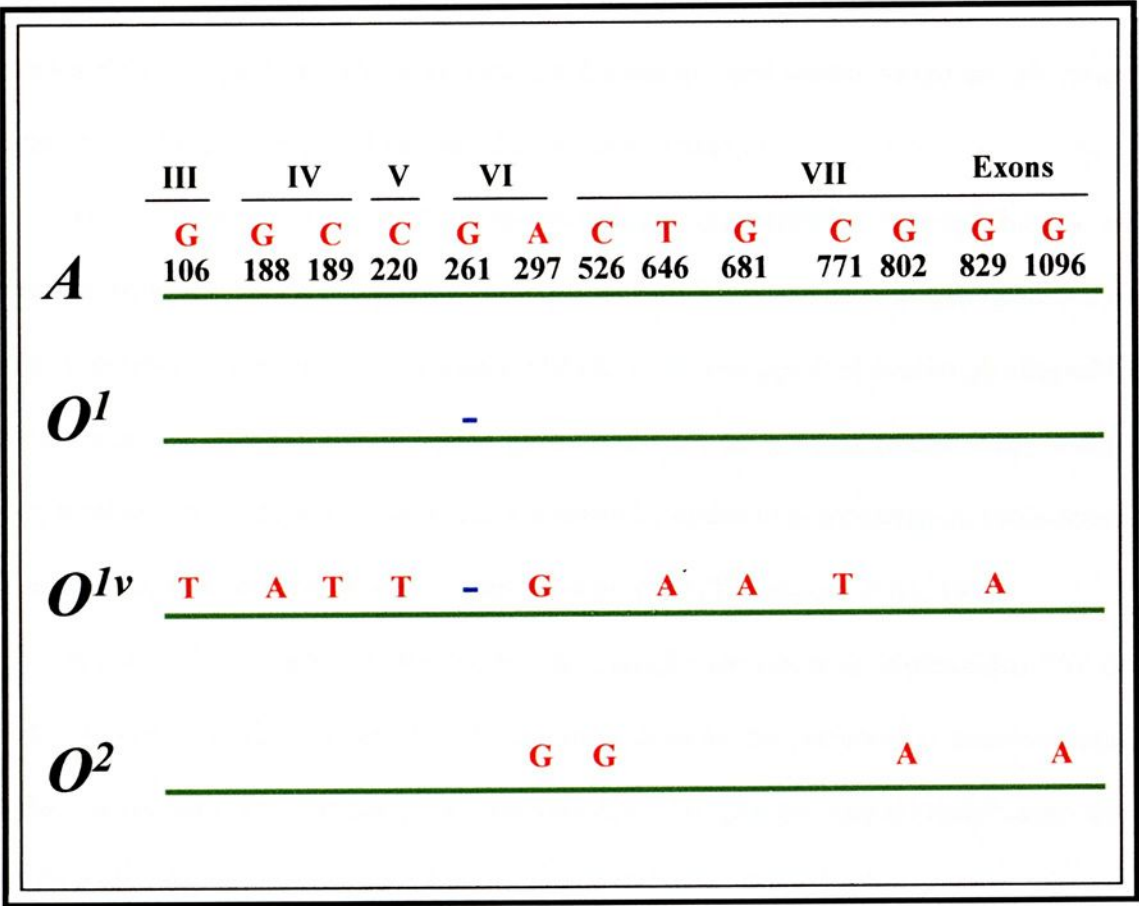


FIGURA 6. Diferenças nucleotídicas entre os genes *A*, *O^I*, *O^{Iv}* e *O²* do locus *ABO*.

1.5 Estratégias para investigação dos genes ABO

Os métodos sorológicos empregados na investigação dos antígenos ABH permitem apenas a identificação dos fenótipos eritrocitários e salivares; a precisa definição dos genótipos de cada grupo necessita de estudos familiares, que muitas vezes são de difícil realização e inconclusivos devido a presença de vários genes *O*.

Com o desenvolvimento de uma tecnologia que permite a amplificação de segmentos gênicos e com a comprovação de que as endonucleases de restrição reconhecem e cortam seqüências específicas de bases no DNA, tornou-se possível avaliar as alterações nas seqüências de nucleotídeos de vários genes presentes no genoma (Saiki *et al.*, 1985). Assim, a reação em cadeia da polimerase e a digestão enzimática tornaram-se ferramentas úteis na investigação dos genes que ocupam o *locus* *ABO* (Yamamoto *et al.*, 1990).

Os genes *A* e *B* apresentam um sítio de restrição em torno do nucleotídeo 261 do exon 6 reconhecido pela enzima *BstE* II, porém a deleção do nucleotídeo guanina nessa posição cria um sítio de restrição para a enzima *Kpn* I, o qual permite a identificação dos genes *O*^I e *O*^{IV}. Assim, os dois mais freqüentes genes *O* são diferenciados do gene *O*² e dos genes *A* e *B* (Yamamoto *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1993).

O gene *O*² pode ser diferenciado do gene *A* por um sítio de restrição reconhecido pela enzima *Nar* I em torno do nucleotídeo 526 e do gene *B* pelo sítio de restrição para a enzima *Hpa* II em torno da posição 703 do exon 7 (Grunnet *et al.*, 1994). Além disso, sítios de restrição adicionais para as enzimas *BssH* II e *Alu* I permitem diferenciar o gene *A* do gene *B* nas posições 526 e 703, respectivamente (Yamamoto *et al.*, 1990).



A identificação do gene O^{lv} pode ser feita pelos sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas *Kpn* I e *Dde* I em torno das posições 261 do *exon* 6 e 771 do *exon* 7 (Olsson & Chester, 1996).

Os seis genótipos mais comuns que ocupam o *locus* ABO (*AA*, *AO*, *BB*, *BO* e *OO*) foram facilmente identificados no DNA amplificado por PCR e digerido pelas enzimas de restrição *Bst*E II, *Asp*718, *Bss*H II, *Kas* I, *Kpn* I, *Alu* I e *Msp* I (Chang *et al.*, 1992; Lee & Chang, 1992; O'Keefe & Dobrovic, 1993; Stroncek *et al.*, 1995). Da mesma forma, os genes *A*, *B*, O^I e O^2 foram identificados numa amostra da população dinamarquesa com o uso das enzimas *Bst*E II, *Bss*H II e *Hpa* I (Grunnet *et al.*, 1994). Usando um sistema PCR *multiplex* com quatro *primers* que amplificam os *exons* 6 e 7, seguido da digestão com as enzimas de restrição *Hpa* II e *Kpn* I, Olsson e Chester diferenciaram os genes A^I e A^2 de *B* e O^2 com maior rapidez, simplicidade de execução e menor custo (Olsson & Chester, 1995).

A técnica PCR para amplificação de seqüências gênicas de interesse com *primers* específicos, aliada a enzimas de restrição, mostrou-se de grande utilidade na definição dos genótipos que não podem ser detectados pelos métodos sorológicos (Chang *et al.*, 1992; Lee & Chang, 1992; Grunnet *et al.*, 1994). Além disso, alterações na seqüência de nucleotídeos localizados nos *introns* podem ser observadas quando se associa a esta metodologia a técnica DGGE (Johnson & Hopkinson, 1992). A figura 7 mostra os locais de reconhecimento de algumas enzimas de restrição úteis na diferenciação dos segmentos dos genes ABO. A figura 8 apresenta os pares de *primers* que amplificam segmentos que diferenciam os genes ABO.

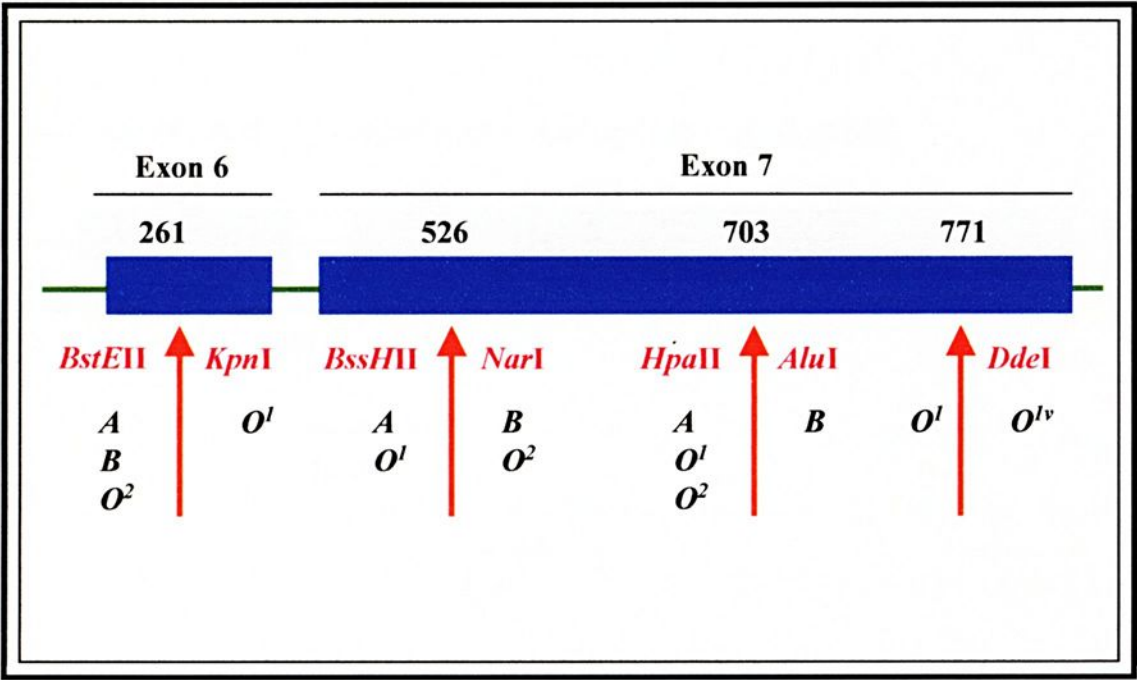


FIGURA 7. Locais de reconhecimento das enzimas de restrição que diferenciam os genes *A*, *B*, *O¹*, *O^{1v}* e *O²* do locus *ABO*.

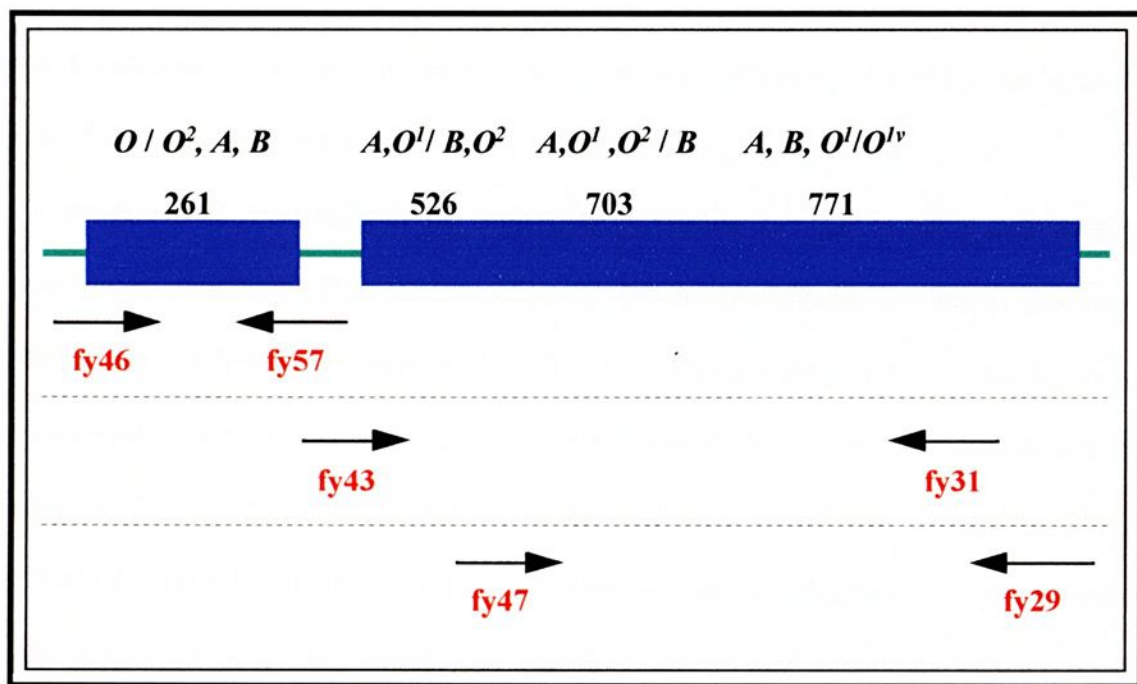


FIGURA 8. Representação dos pares de *primers* que amplificam os segmentos que concentram as diferenças de nucleotídeos entre os principais genes do locus ABO.

1.6 Associações entre grupos sanguíneos e úlceras pépticas

O polimorfismo fenotípico dos grupos sanguíneos ABO sempre chamou a atenção dos pesquisadores e vários dentre eles procuraram demonstrar, ao longo de décadas, associações entre esses marcadores genéticos e doenças (Mourant *et al.*, 1978), porém o tema ainda é motivo de grandes controvérsias.

Estudos preliminares realizados nas primeiras décadas deste século demonstraram que a frequência de úlceras pépticas era maior em indivíduos do grupo O, quando comparados aos demais grupos (Buchanan & Higley, 1921; Ugelli, 1936).

As primeiras investigações que obtiveram resultados conclusivos sobre a associação entre o grupo sanguíneo O e úlceras pépticas foram apresentadas no início dos anos cinquenta. Os resultados das análises de 3.011 pacientes portadores de úlceras pépticas, rigorosamente selecionados, quando comparados aos obtidos com um grupo-controle constituído de indivíduos provenientes da mesma área geográfica, revelaram que a frequência do grupo O era maior entre os pacientes, seguida da redução nas frequências dos demais grupos (Aird *et al.*, 1954). Em estudo posterior realizado com 184 pacientes portadores de úlceras pépticas também foi verificada a maior frequência do grupo O (Wallace, 1954), e outros estudos subseqüentes confirmaram essas observações (Maltoni & Canali, 1956; Brown, 1956).

Relatos posteriores comprovaram, ainda, que quando as úlceras eram classificadas separadamente, a duodenal estava muito mais associada ao grupo O do que a gástrica. Em pacientes com úlceras duodenais, as relações inicialmente observadas entre os grupos A/O e B/O foram de 0,73 e 0,80 respectivamente (Clark *et al.*, 1956; Clark *et al.*, 1959).



Diferentes estudos realizados nos últimos anos reconfirmaram a associação do grupo O com úlceras pépticas e demonstraram que o risco relativo para a úlcera duodenal em pacientes do grupo O é maior entre os não secretores dos antígenos ABH (Mentis *et al.*, 1991; Hallstone *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1997; Shahid *et al.*, 1997; Suadicani *et al.*, 1999).

As primeiras discordâncias sobre a associação entre o grupo sanguíneo O e úlceras pépticas surgiram ainda nos anos cinquenta e aqueceram o debate em torno do tema. Os resultados dos estudos de 165 pacientes com úlceras pépticas não detectaram diferenças significativas na distribuição dos quatro grupos sanguíneos do sistema ABO entre os pacientes, quando comparados àqueles da população normal (Mayo & Ferguson, 1953). Outro estudo realizado alguns anos mais tarde também não encontrou aumento significativo na frequência do grupo O entre 1.080 pacientes com úlceras pépticas (Grahame, 1961).

A primeira avaliação dessas associações feita no Brasil não demonstrou diferenças significantes na distribuição dos grupos sanguíneos ABO entre 124 pacientes com úlceras pépticas (Leite & Goffi, 1958).

Ainda na década de cinquenta, foram estabelecidas associações entre úlceras pépticas e fenótipo secretor, tendo sido demonstrado que a úlcera duodenal era mais freqüente entre os indivíduos secretores que entre os não secretores dos antígenos ABH (Clarke *et al.*, 1956).

Na década seguinte, foi demonstrado que entre os pacientes com úlceras pépticas submetidos a cirurgia ocorria elevada proporção de não secretores (Langman & Doll, 1965; Langman & Doll, 1967). Além disso, tornou-se claro que indivíduos do grupo O não secretores apresentavam chance 2,5 vezes maior de desenvolverem úlceras duodenais que os secretores (Langman & Doll, 1965).

I.7 Fenótipos ABO, Lewis e secretor e infecção pelo *Helicobacter pylori*

Nos últimos anos tornou-se evidente que o bacilo *H. pylori* é o agente etiológico responsável por mais de 80% dos casos de úlceras pépticas e que as populações infectadas apresentam maior risco de desenvolver outras complicações em comparação às não infectadas (NIH Consensus Conference, 1994; Nedrud & Steven, 1996).

Há evidências de que esse bacilo gram-negativo, encontrado somente na mucosa gástrica dos humanos e de outros primatas superiores, seja transmitido de um indivíduo a outro de forma direta ainda na infância e que a prevalência da infecção aumenta com a idade (Banatvala *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1994). Análises moleculares têm confirmado a presença da mesma cepa de *H. pylori* em membros infectados da mesma família, sugerindo que a convivência doméstica constitui-se num importante fator de transmissão (Bamford *et al.*, 1993). Recentemente foi comprovado que o ambiente escolar representa outro fator de risco para a infecção pelo *H. pylori* (Patel *et al.*, 1994). Esses autores acreditam que a disseminação para a comunidade pode ser favorecida nesse caso, pois indivíduos provenientes de famílias com membros infectados, além de portarem esse bacilo, o transmitem àqueles com os quais convivem.

O conhecimento da implicação do *H. pylori* na patogênese da úlcera péptica resultou da observação de que a cura dessa infecção conduz à cura das úlceras gástricas e duodenais sem necessidade de terapia de redução da secreção gástrica (Hosking *et al.*, 1994; Logan *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 1995). Os mecanismos pelos quais esse bacilo causa a ulceração péptica permanecem desconhecidos, porém tem se observado que seu parasitismo resulta em aumento na produção de gastrina, hipersecreção gástrica, produção da citotoxina *cagA* e da toxina vacuolizante *vacA* (Nedrud *et al.*, 1996). O processo inflamatório



resultante caracteriza-se por um infiltrado leucocitário e a presença da enzima urease secretada cria um nicho ideal que propicia sua sobrevivência e proliferação. A gastrite resultante decorre da ação da toxina *vacA*, que determina a vacuolização das células epiteliais (Graham, 1997).

Nas doenças infecciosas, a colonização bacteriana é dependente de vários fatores e incluem a expressão de adesinas bacterianas que reconhecem receptores proteicos, glicoproteicos e glicolipídicos presentes nas células do hospedeiro, os quais facilitam a aderência de microrganismos às mucosas (Sharon & Lis, 1993). Portanto, fatores genéticos de cada indivíduo podem contribuir separadamente para a maior ou menor suscetibilidade às doenças infecciosas (Go, 1997; Nguyen *et al.*, 1999).

Na última década observou-se um crescimento marcante de pesquisas visando determinar quais fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar a suscetibilidade à infecção pelo *H. pylori* (Sakagami *et al.*, 1996; Go, 1997; Graham, 1997; Nguyen *et al.*, 1999). Borén e colaboradores demonstraram, em 1993, que a aderência *in vitro* do *H. pylori* às mucosas gástrica e duodenal era dependente de glicoconjugados fucosilados reconhecidos por adesinas bacterianas. Além disso, verificaram que a deglicosilação de superfícies celulares altamente glicosiladas pela enzima α -2-L-fucosidase, reduzia sensivelmente a aderência do *H. pylori* àquelas superfícies. Essas observações sugeriram a presença de moléculas de fucose nos receptores para *H. pylori* expressos nas mucosas gástrica e duodenal.

Os antígenos H e Le^b ricos em fucose são expressos em grande quantidade nas mucosas gástrica e duodenal dos indivíduos do grupo O secretores e como suas terminações fucosiladas são modificadas pela adição de N-acetilgalactosamina e D-galactose, durante a



síntese dos antígenos A e B respectivamente, os indivíduos dos grupos A, B e AB parecem apresentar menor suscetibilidade à aderência e infecção pelo *H. pylori*, quando comparados aos do grupo O (Mollicone *et al.*, 1985; Falk *et al.*, 1993; Bóren *et al.*, 1994). Essas conclusões explicam, em parte, os resultados obtidos em vários estudos epidemiológicos que verificaram a maior frequência de indivíduos do grupo O entre os pacientes com úlceras pépticas.

Três anos antes de serem divulgadas as observações de Borén e colaboradores, alguns pesquisadores avaliaram o efeito dos grupos sanguíneos ABO e do fenótipo secretor na infecção pelo *H. pylori* em doadores de sangue com sorologia positiva para esse bacilo (Hook-Nikanne *et al.*, 1990; Loffeld *et al.*, 1991) e em pacientes com sintomas de dispepsia e indicação de endoscopia digestiva alta (Dickey *et al.*, 1993). Os resultados das análises de 271 doadores de sangue de ambos os sexos, selecionados da região urbana de Helsink, na Finlândia, não revelaram diferenças significantes na prevalência dos anticorpos IgM, IgG e IgA entre os grupos sanguíneos ABO e os fenótipos secretor e não secretor (Hook-Nikanne *et al.*, 1990). Outro estudo envolvendo 402 doadores de sangue holandeses também não revelou diferenças significantes na prevalência dos grupos sanguíneos ABO e anticorpos IgG anti-*H. pylori* (Loffeld *et al.*, 1991). Esses autores concluíram que os grupos sanguíneos ABO e o fenótipo secretor não representam fatores de risco para a infecção pelo *H. pylori*.

Em 1993, Dickey e colaboradores apresentaram seus resultados do estudo da prevalência dos grupos sanguíneos ABO e dos fenótipos secretor e não secretor em pacientes com sintomas de dispepsia: foram analisados 101 pacientes de ambos os sexos com idade entre 19 e 70 anos, sendo que 69 apresentavam o fenótipo secretor e 32 eram não secretores dos antígenos ABH. Os resultados da endoscopia revelaram que 36%

apresentavam algumas combinações de gastrite antral, duodenite erosiva, úlcera gástrica e úlcera duodenal, sendo a presença do *H. pylori* confirmada em fragmentos de biópsia antral em 58%. Dentre os pacientes não secretores, 53% apresentavam doença gastroduodenal visível em endoscopia e entre os secretores, apenas 28%. Utilizando análises de regressão logística concluíram que não havia associação entre a presença do *H. pylori* e o fenótipo secretor, porém confirmaram que essas doenças gastroduodenais apresentam associação significativa com o fenótipo não secretor.

Com o propósito de avaliar as implicações clínicas das conclusões de Borén e colaboradores apresentadas em 1993, Niv e colaboradores analisaram prospectivamente a distribuição dos grupos sanguíneos ABO em 123 pacientes infectados e 64 não infectados pelo *H. pylori* (Niv *et al.*, 1996). Seus resultados demonstraram maior prevalência do grupo O entre os pacientes não infectados (48,4%) que nos infectados (37,4%), porém essa diferença não foi significativa. Essas observações não sustentam a hipótese de que o grupo O seja mais suscetível à infecção pelo *H. pylori* e também não demonstram que o antígeno Le^b, presente em maior concentração nesse fenótipo, atue como receptor para esse bacilo.

Estudo realizado em Taiwan envolvendo 776 pacientes com doenças gastroduodenais mostrou uma associação significativa entre o grupo O e a infecção pelo *H. pylori* (Lin *et al.*, 1998). Além de observarem que 90,3% dos indivíduos do grupo O, 41% do grupo A, 27% do grupo B e 62% do grupo AB estavam infectados, os autores também revelaram que as cepas portadoras do gene *cagA* eram prevalentes entre os pacientes com úlceras pépticas. Outro estudo avaliou o efeito da expressão dos antígenos ABO e Lewis do hospedeiro na colonização pelo *H. pylori* e na conseqüente resposta inflamatória em 207 pacientes submetidos a endoscopia digestiva alta (Heneghan *et al.*, 1998). Os autores não encontraram associação entre a expressão dos antígenos Le^a e Le^b e a infecção pelo *H.*



pylori e nem entre a colonização bacteriana nos pacientes secretores e não secretores. Por outro lado, observaram uma diferença significativa na infiltração linfocitária da mucosa gástrica em pacientes do grupo O não secretores em comparação aos não O e não secretores. Embora esses autores não tenham verificado adesão preferencial do *H. pylori* aos antígenos receptores Le^b *in vivo*, concluíram que a colonização bacteriana e a resposta inflamatória resultantes podem ser influenciadas, pelo menos em parte, pela expressão dos antígenos ABH do hospedeiro.

A maioria dos estudos sobre as associações dos fenótipos ABO e úlceras pépticas confirmam que o grupo O é mais freqüente entre os pacientes e que pode, portanto, atuar como um fator permissivo para a aquisição dessas doenças.

Os estudos enfocando as associações entre os fenótipos ABO, Lewis, secretor e não secretor com a infecção pelo *H. pylori* geraram inúmeras controvérsias e esse tema ainda permanece aberto a novas pesquisas. Todavia, em nenhum momento fazem referência ao possível papel dos polimorfismos genotípicos presentes nos *loci* que controlam a expressão dos antígenos ABH e Lewis. Portanto, análises do polimorfismo desses *loci* utilizando metodologia molecular poderão, além de confirmar as associações já estabelecidas, revelar a importância dos genótipos ABO, Lewis e secretor como marcadores genéticos que favoreçam a aquisição da infecção pelo *H. pylori* e das doenças decorrentes de sua presença.

II Objetivos



Considerando as associações entre os fenótipos ABO, Lewis, secretor e não secretor com a infecção pelo *H. pylori*, bem como a inexistência de resultados para nossa população, foi nosso propósito:

1. estabelecer uma metodologia molecular na verificação do polimorfismo do *locus ABO* em uma amostra populacional de doadores de sangue;
2. verificar a distribuição dos fenótipos ABO, Lewis, secretor e não secretor em pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*;
3. verificar a distribuição do polimorfismo molecular do *locus ABO* em pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*;
4. aplicar a metodologia na detecção molecular do *H. pylori* em amostras de biópsias gástricas;
5. com os conhecimentos acima, verificar a aplicabilidade do rastreamento contínuo populacional entre portadores dessa infecção.



III Resultados



A coleta das amostras do material biológico dos doadores de sangue e dos pacientes que integraram esse estudo foi realizada após consentimento informado e em conformidade com as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Os critérios de exclusão adotados para os pacientes foram: menores de 18 anos, hemorragia digestiva, gastrite aguda, mulheres grávidas, uso de inibidor de bomba protônica na última semana e uso de bloqueador de receptores H2 nas últimas 24 horas.

Os resultados do presente trabalho estão representados pelos quatro artigos completos relacionados a abaixo.

- Artigo 1 – Mattos, LC; Moreira, HW. Genotipagem do *locus ABO* em doadores de sangue.
- Artigo 2 – Mattos, LC; Moreira, HW. Frequências dos fenótipos ABO, Lewis, Secretor e não secretor em pacientes com e sem infecção pelo *Helicobacter pylori*.
- Artigo 3 – Mattos, LC; Moreira, HW. Polimorfismo genotípico do *locus ABO* em pacientes com e sem infecção pelo *Helicobacter pylori*.
- Artigo 4 – Mattos, LC; Moreira, HW. Diagnóstico molecular do *Helicobacter pylori* por PCR.

GENOTIPAGEM DO *LOCUS* ABO EM DOADORES DE SANGUE

¹Luiz Carlos de Mattos; ²Haroldo Wilson Moreira

1 Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP

2 Departamento de Análises Clínicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, SP

Endereço para correspondência

Luiz Carlos de Mattos

Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – Famerp

Avenida Brigadeiro Faria Lima 5416

15090-000 São José do Rio Preto SP

E-mail: lumattos@famerp.br



Resumo

Os avanços da genética molecular permitiram o entendimento das bases moleculares do *locus ABO*. Diante de sua importância como marcador genético e suas aplicações, o objetivo deste estudo foi investigar a distribuição do polimorfismo genotípico do *locus ABO* numa amostra normal da população brasileira. O DNA genômico foi extraído de 324 doadores de sangue da região de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, amplificado por PCR e analisado por digestão enzimática em posições estratégicas que permitem a definição dos genótipos. Quatorze genótipos foram determinados; em cada indivíduo dos grupos A, B e AB constatou-se a presença de pelo menos um gene compatível com o fenótipo eritrocitário. Nossos resultados demonstram que o *locus ABO* apresenta elevado polimorfismo quando analisado por métodos moleculares e reforçam sua importância como marcador genético.

Palavras-chaves: Genótipos ABO; PCR; análises por enzimas de restrição

Abstract

The ABO blood groups phenotypes are traditionally based on immunoreactivity with the carbohydrate determinants A, B and H antigens. The advances at the DNA level of the ABO genes have provided a molecular genetic model for the ABO polymorphism. The present study was developed to verify the distribution of the ABO genotypes in a Brazilian blood donor population from the Northwestern region of the São Paulo State. The genomic DNA was extracted from 324 healthy Brazilian blood donor (O: 150, A: 118, B: 32, AB: 24) and analysed by PCR amplification followed by diagnostic restriction enzyme. Fourteen genotypes were identified and in all A, B, and AB phenotypes we observed at least one allele correctly predicted but on the O phenotypes we found a polymorphic diversity of *O* genes (O^I , O^{Iv} and O^2) not showed by serology. We conclude that the molecular polymorphism ABO blood group system revealed by this study can be used as a biological marker for different proposal.

Key words: ABO genotyping; PCR; restriction enzyme analysis

Introdução

O maior sistema de aloantígenos expressos nos eritrócitos e em outros tecidos humanos constitui-se de quatro fenótipos definidos pelas combinações de dois antígenos carboidratos A e B e de dois anticorpos plasmáticos anti-A e anti-B. Os indivíduos com os fenótipos A, B e AB expressam glicosiltransferases específicas que convertem o antígeno H em A ou B, porém aqueles com fenótipo O são incapazes de modificar a estrutura desse antígeno¹.

As glicosiltransferases que sintetizam os antígenos A e B são codificadas pelos genes que ocupam o *locus ABO*, os quais são herdados pelos princípios mendelianos². O modelo com três genes *A*, *B* e *O* proposto para explicar seu modo de herança foi confirmado com a clonagem e o seqüenciamento do *locus ABO* no início dos anos noventa; portanto, as diferenças na seqüência de nucleotídeos dos genes tornaram-se conhecidas e passíveis de serem utilizadas na genotipagem de populações^{3,4}.

Os genes *A* e *B* diferem em sete substituições de nucleotídeos nas posições 297, 526, 657, 703, 796, 803 e 930 e o gene *O*¹ é idêntico ao gene *A*, exceto pela deleção da base guanina na posição 261 do exon 6⁴. Essas diferenças contribuem para a troca de quatro aminoácidos nas posições 176, 235, 266 e 268 das transferases A e B⁵.

As mutações criam ou abolem sítios de restrição e portanto, diferentes enzimas podem ser usadas na identificação desses genes e na definição dos vários genótipos do *locus ABO*. A deleção G261 cria um sítio de restrição para a enzima *Kpn* I, que permite diferenciar o gene *O*¹ dos genes *A* e *B*; a substituição G703A cria outro sítio de clivagem para a enzima *Alu* I, diferenciando o gene *B* dos genes *O*¹ e *A*^{3, 4}. O gene *A* pode ser

identificado pelos sítios de restrição para as enzimas *BssH* II e *Hpa* II em torno das posições 526 e 703, respectivamente⁴.

Diferentes estudos identificaram, com base nessas alterações nucleotídicas, os genótipos ABO em materiais biológicos de interesse médico-legal e em sangue periférico, sendo possível a classificação das amostras analisadas em *AA*, *AO*, *BB*, *BO*, *AB* e *OO*^{6,7,8,9,10}.

A descrição de outros genes *O* revelou que o polimorfismo genotípico do *locus* *ABO* não era restrito apenas aos genes *A*, *B* e *O*. O gene *O*², sem a deleção G261 mas com as mesmas seqüências de nucleotídeos do gene *B* na posição 526 e do gene *A* nas posições 703, 796 e 803, foi encontrado na população dinamarquesa, com frequência de 3,7%^{11,12}. O gene *O*^{iv}, compreendendo 40% dos genes *O*, embora apresente a deleção G261, difere do gene *O*ⁱ em sete nucleotídeos localizados nos exon 3, 4, 5, 6 e 7 e pode ser facilmente diferenciado com as enzimas *BstU* I, *Kpn* I, *Mbo* I e *Dde* I que reconhecem sítios de restrição nas posições 188, 261, 646 e 771¹³.

Diante da falta de informações sobre esse polimorfismo molecular na população brasileira, o objetivo deste trabalho foi determinar a distribuição dos genótipos ABO e as frequências dos genes *O*ⁱ, *O*^{iv}, *O*², *A* e *B* em doadores de sangue brasileiros, oriundos da região noroeste do Estado de São Paulo.

Material e métodos

Após consentimento informado, foram coletados 5 ml de sangue com EDTA de 324 doadores de ambos os sexos, caucasóides e não-caucasóides, com idade variando de 18 a 60 anos, oriundos sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. Os fenótipos eritrocitários foram identificados pelos métodos de hemaglutinação estandardizados em tubos¹⁴, e o DNA genômico foi isolado dos leucócitos do sangue periférico por método salino¹⁵.

Nosso protocolo de genotipagem do *locus ABO* consistiu de quatro reações de PCR, sendo que para a identificação dos genes *A*, *B*, *O*^I e *O*² foram realizadas três amplificações com os pares de *primers* *fy*-46/*fy*-57 para a PCR 1, *fy*-43/*fy*-31 para a PCR 2 e *fy*-47/*fy*-29 para a PCR 3, enquanto os genes *O*^I e *O*^{Iv} foram diferenciados com os pares de *primers* *fy*-47/*fy*-31 na PCR 4. A tabela 1 contém a seqüência dos *primers* utilizados nas quatro reações de PCR, realizadas num volume final de 25 µL e preparadas nas seguintes condições: TRIS-HCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 50 mM; 20 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 20 pm de cada *primer*; 0,5 U de Taq polimerase; 5 ng de DNA genômico. Os segmentos que diferenciam os genes *A*, *B*, *O*^I e *O*² foram amplificados em 35 ciclos, sendo desnaturação a 94⁰ C por 2 minutos, hibridização a 53⁰ C por 1 minuto e extensão a 72⁰ C por 1 minuto. Para os genes *O*^I e *O*^{Iv} foram realizados 35 ciclos, sendo desnaturação a 94⁰ C por 1 minuto, hibridização a 52⁰ C por 30 segundos e extensão a 72⁰ C por 1 minuto.

Os produtos da amplificação foram submetidos à digestão com as seguintes enzimas: PCR 1 com *Kpn* I, PCR 2 com *Nar* I, PCR 3 com *Alu* I e PCR 4 com *Dde* I; os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose a 2%. Na tabela 2 apresentamos

nossa estratégia de identificação dos genótipos ABO válidas para nosso laboratório em nossas condições de trabalho.



Resultados

O objetivo deste estudo foi investigar a distribuição do polimorfismo genotípico do locus *ABO* e as frequências dos genes O^I , O^{Iv} , O^2 , A e B numa amostra normal da população brasileira, constituída por doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. Os fenótipos eritrocitários dos 324 doadores analisados foram determinadas pelos métodos sorológicos de rotina e nenhum subgrupo raro foi encontrado, sendo que a distribuição fenotípica observada foi semelhante àquelas verificadas em outras amostras analisadas no Estado de São Paulo¹⁶. A tabela 3 mostra a distribuição percentual dos fenótipos e genótipos detectados, enquanto a tabela 4 apresenta as frequências relativas dos genes identificados nesse estudo.

A reação de PCR com os *primers* *fy-46/fy57* amplifica um segmento de DNA de 248 ou 249 pares de bases em torno do nucleotídeo 261. A deleção G261, presente nos genes O^I e O^{Iv} , cria um sítio de restrição para a enzima *Kpn* I a qual, após a digestão, gera dois fragmentos com 84 e 164 pares de bases. O fragmento original não digerido, contendo 249 pares de bases, corresponde a um dos genes A , B ou O^2 . A segunda reação de amplificação produz um fragmento com 467 pares de bases que, após digestão com a enzima *Nar* I, fornece dois fragmentos menores com 205 e 262 pares de base correspondentes a um dos genes O^2 ou B . O fragmento não digerido corresponde aos genes O^I , O^{Iv} e A . O gene B é diferenciado do gene O^2 na terceira reação de amplificação, pois a enzima *Alu* I digere o fragmento original de 621 pares de base em três fragmentos menores com 152, 189 e 280 pares de bases que definem o gene B e em apenas dois fragmentos com 152 e 489 pares de base que identificam o gene O^2 . A quarta reação de amplificação produz um fragmento com 278 pares de bases que, quando digerido pela enzima *Dde* I, diferencia o gene O^{Iv} do gene O^I . As figuras 1, 2, 3 e 4 ilustram os padrões de digestão

enzimática dos genes ABO amplificados nas quatro reações de PCR e as estratégias para a definição dos diferentes genótipos ABO.

Os resultados da genotipagem de 324 doadores de sangue revelaram o elevado polimorfismo genotípico do *locus ABO*, não evidenciado pelos métodos sorológicos convencionais e todos os genótipos identificados foram concordantes com os fenótipos eritrocitários previamente definidos.



Discussão e conclusões

Tradicionalmente, os grupos sanguíneos ABO são definidos por testes de hemaglutinação com soros específicos, mas a identificação precisa dos genótipos com essa metodologia requer estudos familiares, que podem ser de difícil realização e, muitas vezes, são inconclusivos². Com o advento dos métodos moleculares, tornou-se possível analisar os genes que ocupam esse *locus* e determinar os genótipos a partir de amostras do DNA genômico⁴.

As técnicas de clonagem e seqüenciamento foram de grande utilidade na elucidação das bases moleculares do *locus* ABO e revelaram que os genes *A*, *B* e *O* são similares e diferem em poucas substituições de nucleotídeos que alteram a seqüência de aminoácidos das transferases codificadas^{3, 4, 5}. Assim, diferentes estudos determinaram os genótipos ABO em amostras de sangue periférico, manchas de sangue, gotas de saliva, sêmem, lágrima, *swabs* vaginais e outras amostras biológicas^{6, 7, 8, 9, 10}.

Neste estudo utilizamos a PCR e a restrição enzimática para determinar os genótipos do *locus* ABO e as freqüência dos genes O^I , O^{Iv} , O^2 , *A* e *B* em 324 doadores de sangue de ambos os sexos, caucasóides e não-caucasóides. As quatro reações de amplificação e as subseqüentes digestões com as enzimas *Kpn* I, *Nar* I, *Alu* I e *Dde* I permitiram a caracterização dos genótipos com base nas alterações de nucleotídeos nas posições 261, 526, 703 e 771.

Entre 150 indivíduos do tipo O, apenas dois não apresentaram a deleção G261 típica dos genes O^I , sendo que seus genótipos foram definidos como O^2O^2 ; onze doadores comportaram-se como heterozigotos pois apresentavam sempre um gene O^I e outro O^2 . Sessenta e três indivíduos apresentaram-se como homozigotos quando genotipados apenas pela deleção G261, mas puderam ser diferenciados em homozigotos e heterozigotos para o

gene O^{lv} , quando analisado o sítio de restrição para a enzima *Dde* I; oito comportaram-se como heterozigotos $O^{lv}O^2$. Esses resultados demonstram claramente o polimorfismo presente nos genes *O* do *locus ABO* e estão em concordância com os dados obtidos por outros estudos realizados em diferentes grupos étnicos^{17, 18, 19, 20}. A variabilidade dos genes *O* foi relatada anteriormente pela análise de uma região em torno do nucleotídeo 261, por eletroforese em gel com gradiente desnaturante, porém as diferenças nucleotídicas não foram identificadas²¹.

A inatividade dos genes O^l parece depender exclusivamente da deleção G261 no exon 6, visto que essa alteração cria um códon *stop* por volta do nucleotídeo 347 e o RNAm transcrito é traduzido numa proteína destituída do domínio catalítico²². Por outro lado, a substituição G802A no exon 7 do gene O^2 parece ser o principal fator que compromete o efeito funcional da transferase codificada por esse gene^{5, 11}.

Nos 118 indivíduos fenotipados como A foram detectados pelo menos um gene *A* pela análise da substituição na posição 526 do exon 7, mas o fator determinante do polimorfismo genotípico dentro desse fenótipo foram as combinações heterozigóticas com os genes O^l , O^{lv} e O^2 , as quais puderam ser facilmente diferenciadas dos genótipos homozigotos *AA*.

O conhecimento prévio dos fenótipos eritrocitários facilita a definição dos genótipos presentes no tipo A. Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados na análise do polimorfismo do gene *A* na posição 526, especialmente quando se utiliza DNA extraído de outras fontes que não o sangue e das quais não se têm informações sobre o fenótipo eritrocitário. A identificação do gene *A* não pode ser direta, haja vista que em sua sequência de nucleotídeos não foram descritos, até o momento, sítios de restrição exclusivos, estando, portanto, sua determinação sempre ligada à exclusão de outros genes conhecidos^{10, 22}. Recentemente foi descrito num indivíduo de fenótipo A, um gene *A*

idêntico ao gene *B* na posição 526, mas com os nucleotídeos 703 e 706 próprios do gene *A*²³. Essa alteração, quando presente, pode levar à falsa interpretação dos genótipos, principalmente nas situações em que falta a informação sobre o fenótipo eritrocitário.

Dos 32 indivíduos com fenótipo B analisados, verificamos maior frequência de indivíduos heterozigotos com o gene *O*^l. Não foi encontrado nenhum indivíduo com genótipo *BO*², o que pode ser explicado pela baixa ocorrência desse genótipo na população, pois apenas um caso foi relatado²⁴. Outros estudos realizados em diferentes grupos raciais também não demonstraram a presença desse genótipo^{18, 19}.

Entre os indivíduos fenotipados como AB foi possível detectar sempre um gene B com base no padrão de digestão da enzima *Alu* I. Essas observações são reforçadas pelos resultados obtidos em outros estudos^{4, 6, 7, 25}.

Os resultados deste trabalho permitem ainda estimar as frequências relativas dos genes mais comuns que ocupam o *locus ABO*. Na análise de 648 cromossomos, verifica-se que a distribuição dos genes ABO apresenta valores percentuais de 44,6% (*O*^l), 16,9% (*O*^{lv}), 4,1 (*O*²), 25,3% (*A*) e 9,1% (*B*) e as frequências dos genes *O*^l, *O*^{lv} e *O*² não evidenciaram diferenças significantes em relação às encontradas em outros estudos conduzidos em outras populações^{12, 13, 17, 18, 19, 24}.

As análises do *locus ABO* pela metodologia molecular mostra um elevado polimorfismo genotípico, reforçando, portanto, a validade e sua utilidade como marcador genético para estudos populacionais, filogenéticos e evolutivos, bem como para o seguimento de pacientes submetidos a transplante de medula óssea^{26, 27}.

Referências Bibliográficas

- 1 - Watkins, WM. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems. *Adv Hum Genet*, 1980; 10:1-136.
- 2 - Daniels, G. *Human Blood Groups*, Cambridge, 1995, 737 p.
- 3 - Yamamoto, F; Marken, J; Tsuji, T; White, T; Clausen, H; Hakomori, S. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc-alfa 1-2-alfa 1-3 GalNAc transferase (Histo-blood group A transferase) mRNA. *J Biol Chem*, 1990; 265(2):1146-1151.
- 4 - 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.
- 5 - Yamamoto, F; Hakomori, S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J Biol Chem*; 1990; 265(31):19257-19262.
- 6 - Chang, JG; Lee, LS; Chen, PH. Rapid genotyping of the ABO blood group. *Blood*, 1992; 79(8):2176-2177.
- 7 - Lee, JCI; Chang, JG. ABO genotyping by polymerase chain reaction. *J Foren Sci*, 1992; 37(5):1269-1275.
- 8 - Crouse, C; Vincek, V. Identification of ABO alleles on forensic type specimens using rapid ABO genotyping. *BioTechnics*, 1995; 18(3):478-482.
- 9 - Liechti-Gallati, S; Neeser, D. Efficient and reliable PCR based detection of the ABO blood group alleles: genotyping on stamps and other biological evidence samples. *J Forens Sci*, 1996; 41(4):653-657.

- 10 - Gassner, C; Schmarda, A; Nussbaumer, W; Schonitzer, D. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primer. *Blood*, 1996; 88(5):1852-1856.
- 11 - Yamamoto, F; McNeill, PD; Yamamoto, M; Hakomori, S; Bromilow, IM; Duguid, JKM. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. Another type of O allele. *Vox Sang*, 1993; 64:175-178.
- 12 - Grunnett, N; Steffelson, R; Bennett, EP; Clausen, H. Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a danish population: frequency of a novel O allele defined as O². *Vox Sang*, 1994; 67:210-215.
- 13 - Olsson, ML; Chester, MA. Frequent occurrence af a variant O1 gene at the blood group ABO locus. *Vox Sang*, 1996; 70:26-30.
- 14 - Vengelen-Tyler, V. *Technical manual*, 12th edition, AABB, 1996.
- 15 - Abdel-Rahman, SZ. Isolation of DNA using salting-out procedure. *J Biochem Toxicol*, 1994; 9:191-198.
- 16 - Lima, LMA; Callado, MRM; Santos, JA. Curso de Imunoematologia, Divisão Hemocentro, Faculdade de Medicina, *Campus de Botucatu*, Unesp, 1992.
- 17 - Franco, RF; Simões, BP; Zago, MA. Relative frequencies of the two O alleles of the histo-blood group ABH system in different racial groups. *Vox Sang*, 1995; 69:50-52.
- 18 - Yip, SP; Yow, CMN; Lewis, WHP. DNA polymorphism at the ABO locus in the chinese population of Hong Kong. *Hum Hered*, 1995; 45:266-271.
- 19 - Villa, A; Drago, F; Mistò, R; Morelati, F; Poli, F; Sirchia, G. ABO genotyping in italian blood donors. *Haematologica*, 1996; 81:492-496.
- 20 - Olsson, ML; Santos, SEB; Guerreiro, JF; Zago, MA; Chester, MA. Heterogeneity of the O alleles at the ABO blood group locus in amerindians. *Vox Sang*, 1998; 74:46-50.



- 21 - Johnson, PH; Hopkinson, DA. Detection of ABO blood group polymorphism by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mol Genet*, 1992; 1(5):341-344.
- 22 - Lutz, P; Dzik, WH. Molecular biology of the red blood group genes. *Transfusion*, 1992; 32(5):467-486.
- 23 - Stroncek, DF; Konz, R; Clay, ME; Houchins, JP; McCullouch, J. Determination of ABO glycosyltransferase genotypes by use of polymerase chain reaction and restriction enzymes. *Transfusion*, 1995; 35:231-240.
- 24 - Olsson, ML; Chester, MA. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O^2 versus A/O^2 discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox Sang*, 1995; 69:242-247.
- 25 - O'Keefe, DS; Dobrovic, A. A rapid and realible PCR method for genotyping the ABO blood group. *Human Mutation*, 1993; 2:67-70.
- 26 - Zago, MA; Tavella, MH; Simões, BP; Franco, RF; Guerreiro, JF; Santos, SB. Racial heterogeneity of DNA polymorphisms linked to the A and O alleles of the ABO blood group gene. *Ann Hum Genet*, 1996; 60:67-72.
- 27 - Mattos, LC; Sanches, FE; Carvalho-Salles, AB; Ricci Jr, O; Ruiz, MA. Genotipagem do locus ABO aplicada ao seguimento de transplante de medula óssea alogênico. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia. Rio de Janeiro, 23 a 26 de maio de 2000.

TABELA 2. Estratégia para identificação dos genes do *locus ABO*.

PCR	Exon	Mutação	Primers	Enzima	Genes	Fragmentos resultantes
1	VI	G261-	fy-46 fy-57	<i>Kpn</i> I	$O^I / O^2, A, B$	84 + 164 / 249
2	VII	C526G	fy-43 fy-31	<i>Nar</i> I	$O^2, B / O^I, A$	262 + 205 / 467
3	VII	G703A	fy-47 fy-29	<i>Alu</i> I	$B / O^I, O^2,$ A	280 + 189 + 152 / 469 + 152
4	VII	C771T	fy-47 fy-31	<i>Dde</i> I	O^{Iv} / O^I	169 + 87 + 22 / 191 + 87

TABELA 3. Distribuição percentual dos fenótipos e genótipos ABO em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo.

Fenótipos	N	%	Genótipos	N	%
O	150	46,3	$O^I O^I$	66	20,3
			$O^I O^{Iv}$	51	15,8
			$O^{Iv} O^{Iv}$	12	3,8
			$O^I O^2$	11	3,4
			$O^{Iv} O^2$	8	2,4
			$O^2 O^2$	2	0,6
A	118	36,4	AA	22	6,8
			AO^I	67	20,6
			AO^{Iv}	25	7,8
			AO^2	4	1,2
B	32	9,8	BB	3	0,9
			BO^I	28	8,6
			BO^{Iv}	1	0,3
AB	24	7,5	AB	24	7,5
Total	324	100		324	100

TABELA 4. Frequências relativas dos genes O^I , O^{Iv} , O^2 , A e B .

Genes	N	%
O^I	289	44,6
O^{Iv}	109	16,9
O^2	27	4,1
A	164	25,3
B	59	9,1
Total	648	100

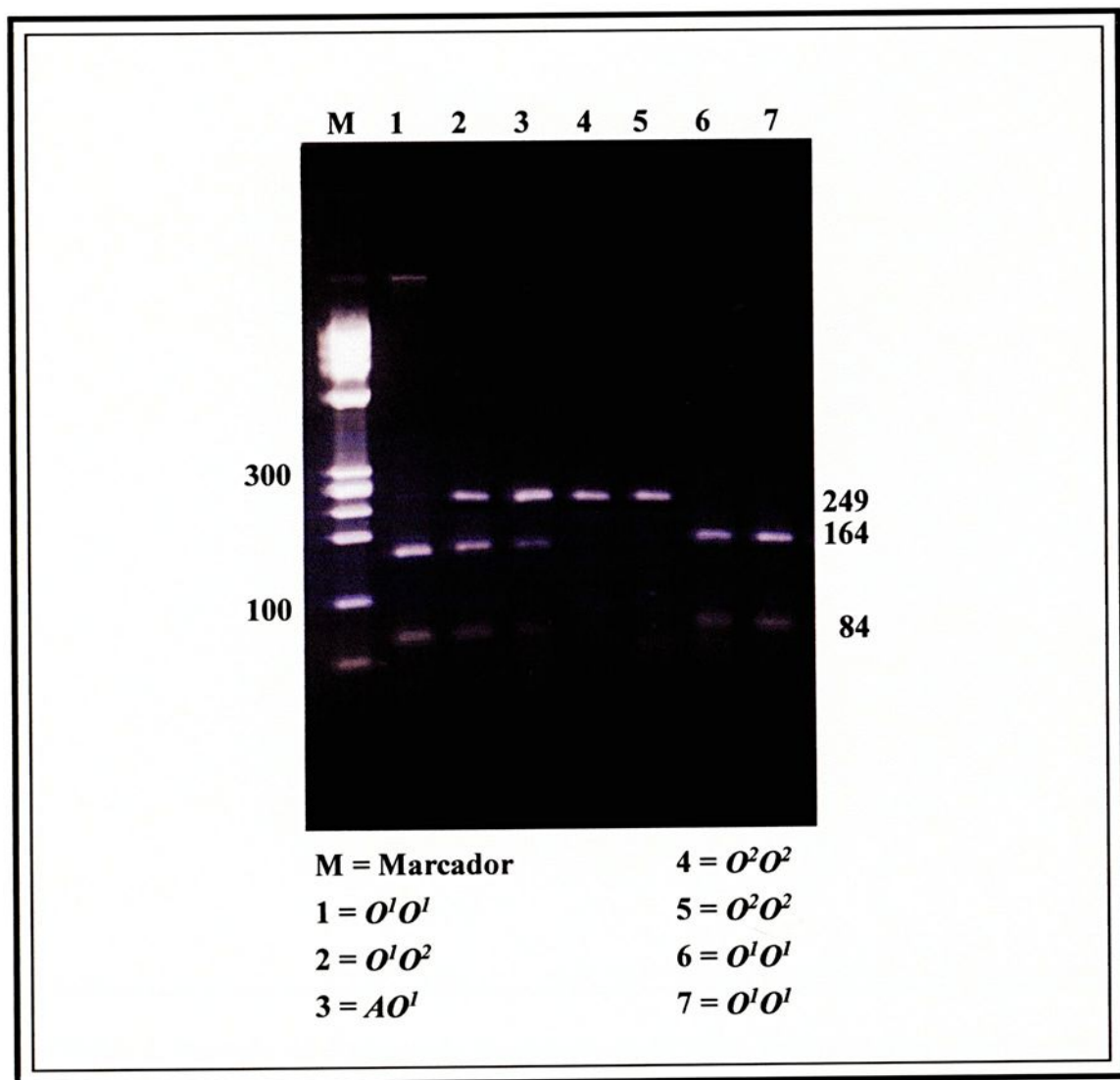


FIGURA 1. Produto da digestão do fragmento de 248/249 pares de base com a enzima

Kpn I evidenciando os genótipos O^1O^1 , O^1O^2 , O^2O^2 e AO^1 .

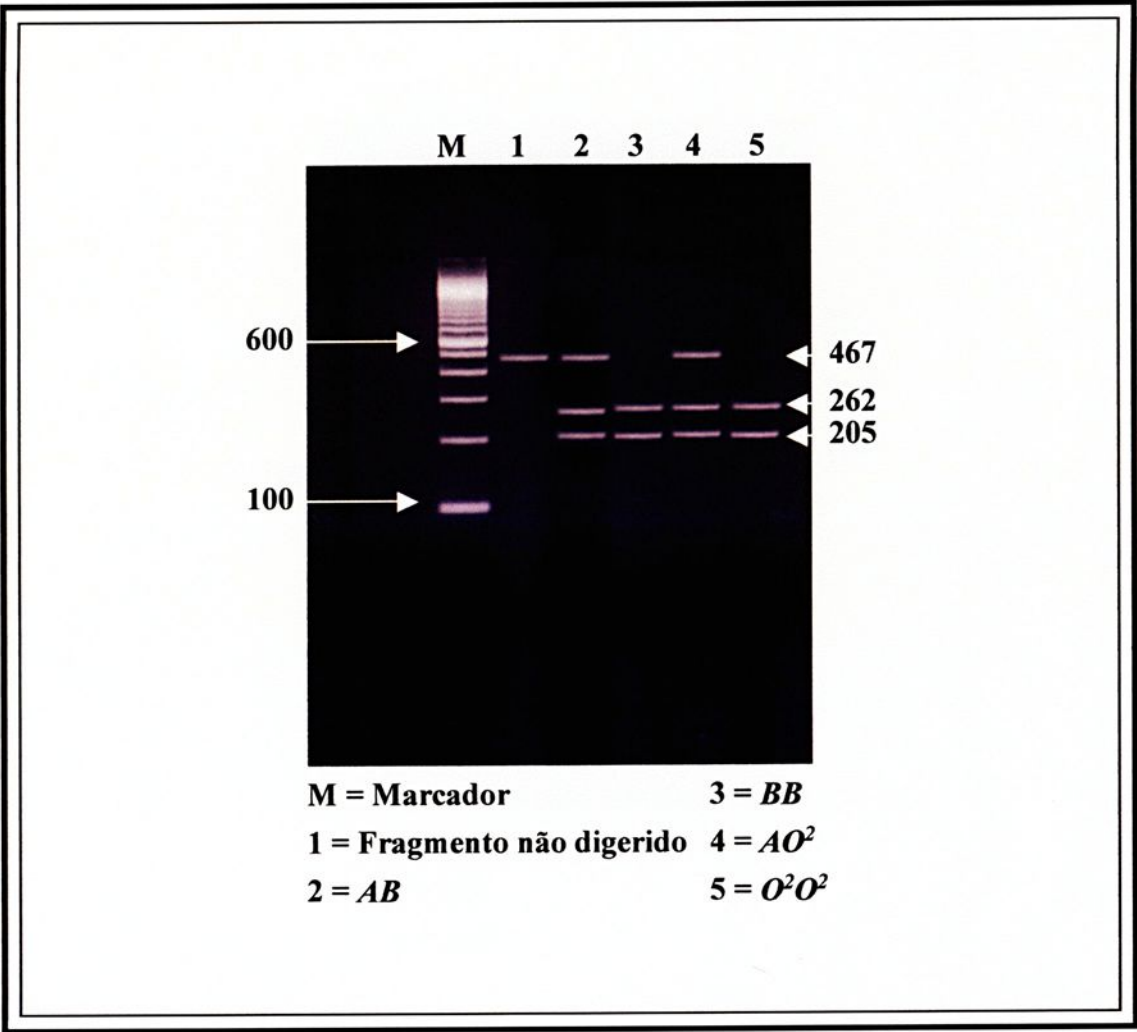


FIGURA 2. Produto da digestão do fragmento de 467 pares de base com a enzima *Nar I* evidenciando os genótipos AB, BB, AO¹ e O²O².

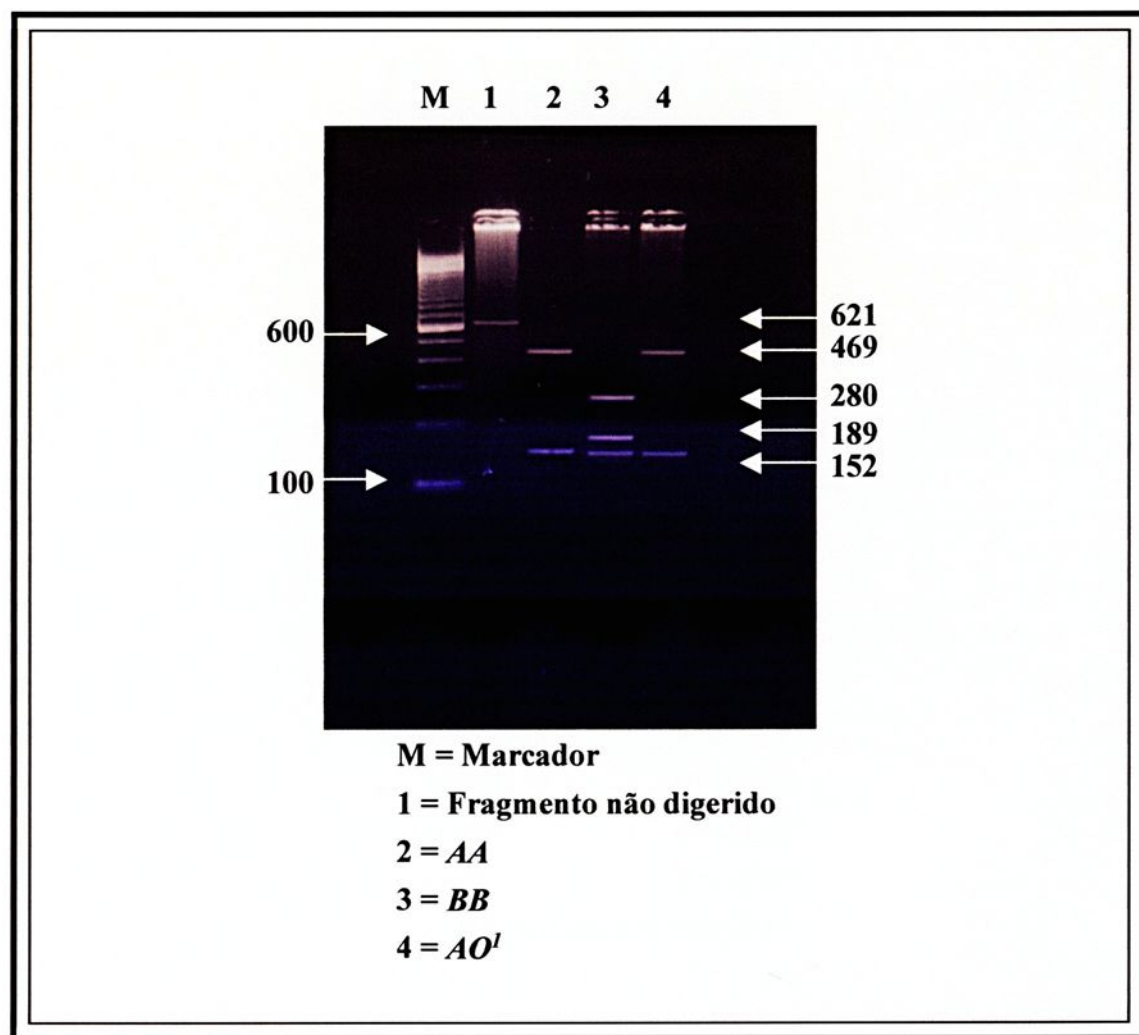


FIGURA 3. Produto da digestão do fragmento de 621 pares de base com a enzima *Alu I* evidenciando os genótipos *AA*, *BB* e *AO^I*.

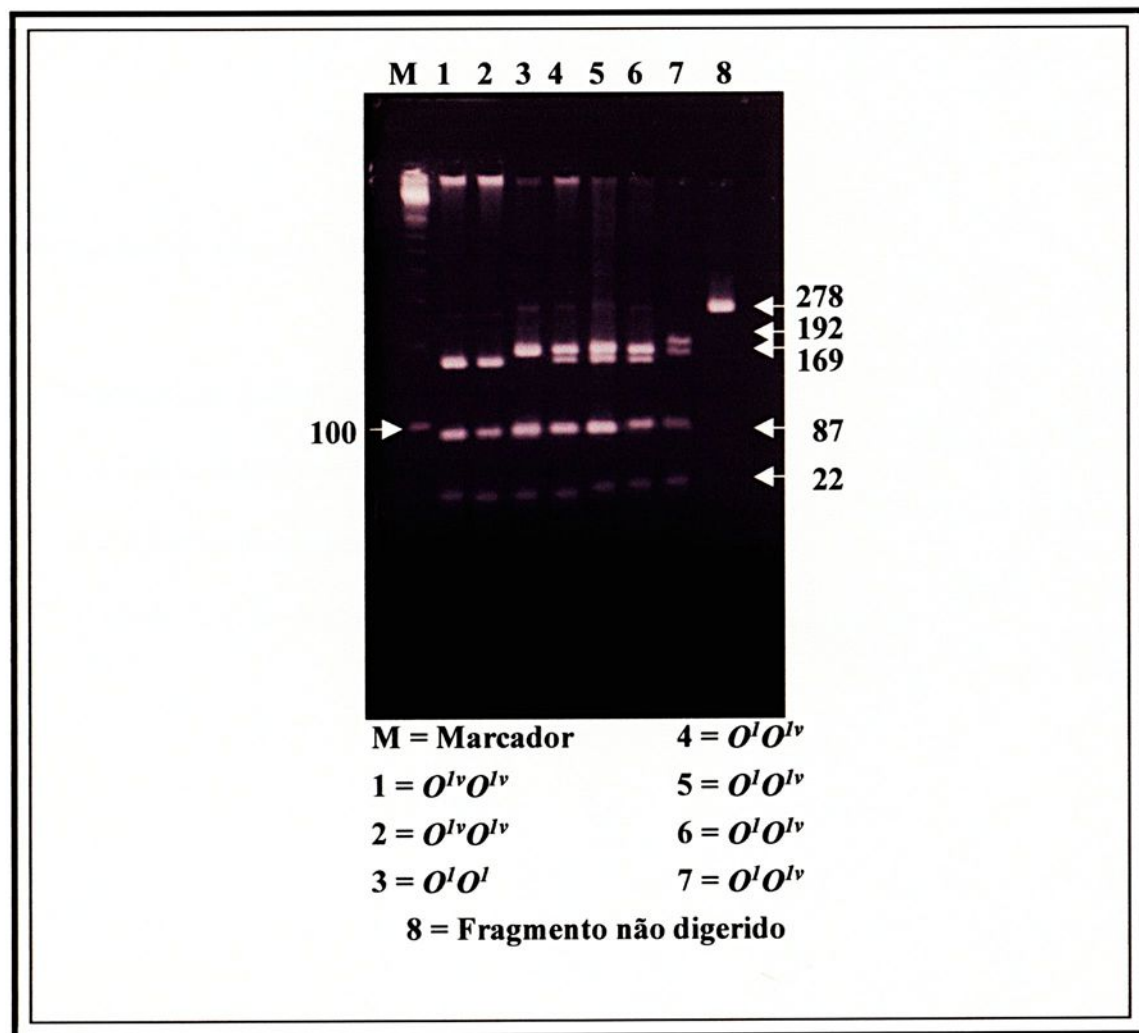


FIGURA 4. Produto da digestão do fragmento de 278 pares de base com a enzima *Dde* I evidenciando os genótipos O^lO^l , O^lO^{lv} e $O^{lv}O^{lv}$.

FREQÜÊNCIAS DOS FENÓTIPOS ABO, LEWIS, SECRETOR E NÃO SECRETOR EM PACIENTES COM E SEM INFECÇÃO PELO *Helicobacter pylori*

¹Luiz Carlos de Mattos; ²Haroldo Wilson Moreira

1 Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP

2 Departamento de Análises Clínicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF, Unesp, Araraquara, SP

Endereço para correspondência

Luiz Carlos de Mattos

Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – Famerp

Avenida Brigadeiro Faria Lima 5416

15090-000 São José do Rio Preto SP

E-mail: lumattos@famerp.br

Resumo

Estudos epidemiológicos evidenciaram alta frequência do tipo O e do fenótipo não secretor entre pacientes com úlceras pépticas. Desde que o *Helicobacter pylori* foi estabelecido como o agente causal dessas doenças, várias controvérsias surgiram quanto à participação dos grupos sanguíneos ABO, Lewis e do fenótipo secretor na suscetibilidade à infecção por esse bacilo. O propósito deste estudo foi verificar as frequências dos fenótipos ABO, Lewis, secretor e não secretor em pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*. Foram avaliados 120 pacientes com sintomas de dispepsia e indicação de endoscopia digestiva alta, sendo os fenótipos eritrocitários ABO e Lewis determinados pelos métodos de rotina e os fenótipos secretor e não secretor avaliados na saliva pelo método de inibição da hemaglutinação. As diferenças observadas nas frequências dos grupos sanguíneos ABO foram significantes entre os pacientes infectados (61,7%) e não infectados (38,3%) pelo *H. pylori*, ficando, entretanto, evidenciado que não foi significativa a distribuição percentual dos fenótipos Lewis, secretor e não secretor. Esses resultados sugerem que a infecção por esse bacilo parece ser influenciada pelos fenótipos ABO, mas não pelos fenótipos Lewis, secretor e não secretor.

Palavras-chaves: ABO; Lewis; fenótipo secretor; fenótipo não secretor; *Helicobacter pylori*

Abstract

Individuals of blood group O and non-secretor phenotype of ABH antigens are more susceptible to peptic ulcers. Since *Helicobacter pylori* was established as the causal agent for this disease, some controversies on the association of infection by this pathogen and ABO, Lewis, secretor and non-secretor phenotypes were presented. The aim of this study was to verify the frequencies of ABO, Lewis and secretor and non-secretor phenotypes in patients infected and non infected with *H. pylori*. A hundred twenty patients with dyspeptic symptoms and who were undergoing endoscopy were evaluated; the ABO and Lewis Lewis blood group were determined with standart hemagglutination tests and the secretor phenotype was evaluated in saliva samples. 61,7% of the patients were infected with *H. pylori* and 38,3% were non infected. The differences observed on the frequencies of the ABO blood group phenotypes in patients infected and non infected were significant. Our results shown that the infection of *H. pylori* can be related to ABO blood groups but not to Lewis and secretor phenotypes.

Key words: ABO; Lewis; secretor phenotypes; non secretor phenotypes; *Helicobacter pylori*



Introdução

Estudos epidemiológicos realizados na década de cinquenta evidenciaram alta frequência do grupo sanguíneo O e do fenótipo não secretor dos antígenos ABH entre pacientes com úlceras pépticas^{1,2}. No início dos anos oitenta, foi demonstrado que o *Helicobacter pylori* estava associado a mais de 80% dos casos de úlcera gástrica^{3,4}. Recentemente, Borén e colaboradores relataram que esse bacilo adere preferencialmente ao antígeno Lewis b (Le^b), rico em fucose e expresso na superfície das células epiteliais da mucosa gástrica⁵.

Os antígenos ABH e Lewis são sintetizados por glicosiltransferases específicas, que incorporam moléculas de fucose em oligossacarídeos precursores comuns⁶. Os tipos O e Le(a-b+) expressam maior quantidade desses antígenos fucosilados em relação aos demais grupos e acredita-se que essa diferença predisponha seus portadores à infecção^{6,7,8}.

Diferentes estudos têm demonstrado associações entre os grupos sanguíneos ABO, Lewis e o fenótipo secretor com úlceras pépticas⁹, hemorragias gástricas¹⁰ e infecção pelo *H. pylori*¹². Entretanto, foram relatadas discordâncias entre as observações clínicas e laboratoriais^{9,10,11,12}. Alkout e colaboradores demonstraram maior suscetibilidade do grupo O para úlcera e o favorecimento dos antígenos H e Le^b na infecção pelo *H. pylori*¹². Por outro lado, Hooke-Nikanne e colaboradores não encontraram associação entre o fenótipo secretor e sorologia positiva para esse bacilo entre 271 doadores de sangue¹¹ e Clyne e Drum observaram que a expressão do antígeno Le^b não influencia a aderência desse patógeno ao epitélio gástrico¹³.

O objetivo deste trabalho foi verificar as frequências dos fenótipos ABO, Lewis, secretor e não secretor em pacientes com sintomas de dispepsia e indicação de endoscopia digestiva alta, infectados e não infectados pelo *H. pylori*.



Pacientes e métodos

Avaliamos 120 pacientes adultos com sintomas de dispepsia, que tiveram indicação de realizar endoscopia digestiva alta (EDA), incluindo os portadores de úlcera gástrica e/ou duodenal, atendidos no serviço de Endoscopia e/ou no Ambulatório de Gastroenterologia Clínica da Famerp e no Centro de Endoscopia Rio Preto. Foram adotados os seguintes critérios de exclusão: menores de 18 anos, hemorragia digestiva, gastrite aguda, mulheres grávidas, uso de inibidor de bomba protônica na última semana e uso de bloqueador de receptores H2 nas últimas 24 horas. Após consentimento informado, foram colhidos 5 ml de sangue total com EDTA, para as tipagens dos grupos ABO e Lewis e 2 ml de saliva, para determinação dos fenótipos secretor e não secretor.

Os grupos sanguíneos ABO foram definidos por métodos de hemaglutinação estandardizados em tubos e os fenótipos Lewis foram determinados pelo método em gel¹⁴. Os fenótipos secretor e não secretor foram identificados por reações de inibição da hemaglutinação¹⁵. A investigação do *H. pylori* foi realizada de forma rotineira pelo Laboratório Especializado de Gastroenterologia pelos testes respiratório e da urease. Em todos os casos, incluindo aqueles com os resultados discordantes pelos testes anteriormente citados, a infecção foi confirmada por PCR. O teste χ^2 e a análise de dependência foram usados para estabelecer as possíveis associações entre os resultados²⁴.

Resultados

Foram analisados 120 pacientes de ambos os sexos, incluindo caucasianos e não-caucasianos com idade média de 42 anos (18 a 74 anos), divididos em dois grupos, quanto à infecção pelo *H. pylori*: grupo I (infectados) e grupo II (não infectados) (tabela 1).

Dos 120 pacientes analisados, 61,7% mostraram-se infectados, enquanto que 38,3% eram não infectados. No grupo I, 67,4% dos pacientes infectados eram do sexo masculino e 57,7% eram femininos; entre os não infectados, 32,6% eram masculinos e 42,3% eram femininos. As frequências dos grupos sanguíneos ABO, Lewis e dos fenótipos secretor e não secretor estão mostradas nas tabelas 2, 3 e 4.

A tabela 2 evidencia que a distribuição dos grupos ABO entre os pacientes, independente da presença ou não de infecção pelo *H. pylori*, obedece as mesmas proporções dos tipos sanguíneos encontrados na população brasileira^{16, 17}. Por outro lado, as frequências dos tipos sanguíneos O e A entre os grupos I e II são distintas pois, dos 74 pacientes infectados, 42 (56,8%) eram do tipo O e 20 (27%) do tipo A. Dos 46 pacientes não infectados, apenas 11 (24%) eram do tipo O e 27 (58,7%), do tipo A. A aplicação do teste χ^2 ($p = 0,003$) mostrou que a diferença na maior prevalência do grupo O entre os pacientes infectados e do grupo A entre os não infectados é significativa. A análise de dependência aplicada a esses resultados demonstrou que há associação entre o grupo tipo sanguíneo e infecção pelo *H. pylori* sendo que o tipo O apresenta maior tendência a infecção e o tipo A à não infecção ($p = 0,003$). Além disso, a probabilidade do grupo O infectar-se é de pelo menos 0,45 com base no teste por aproximação normal ($p = 0,021$).

A distribuição dos fenótipos Lewis mostrada na tabela 3 não apresenta diferenças significantes entre os grupos I e II ($p = 0,16$), e as frequências dos fenótipos secretor e não secretor mostradas na tabela 4 não evidenciam diferenças significantes entre os grupos I e

II ($p = 0,66$). No grupo I foram encontrados 80,3% de secretores e 19,7% de não secretores e no grupo II, 78,3% de secretores e 21,7% de não secretores.



Discussão e conclusões

Os estudos de associações de grupos sanguíneos e doenças têm chamado a atenção dos pesquisadores desde os anos cinquenta, quando foram publicados os primeiros resultados mostrando a alta frequência do grupo O entre pacientes com úlceras pépticas¹. Nessa mesma década foram encontradas relações entre os grupos A/O, para os casos de úlcera duodenal, com valores entre 0,73 e 0,80². Essas associações permaneceram desconhecidas até que Borén e colaboradores propusessem que o antígeno Le^b atua como receptor para o *H. pylori* e que, devido à presença de moléculas de fucose nesse antígeno, o grupo O tem maior suscetibilidade a infecção por esse bacilo⁵. Com a demonstração de que o *H. pylori* é o agente causal da maioria dos casos de úlceras pépticas, vários estudos têm procurado estabelecer relações entre os grupos sanguíneos ABO, Lewis e os fenótipos secretor e não secretor e a presença desse bacilo^{3, 8, 11, 12, 13}.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que existe uma forte associação entre grupo sanguíneo e infecção e não infecção pelo bacilo *H. pylori* e são reforçados pelos dados obtidos em outros estudos^{12, 18}. As diferenças significantes observadas na distribuição das frequências desse grupo entre os pacientes infectados, quando comparadas àquelas verificadas entre os não infectados, reforçam a proposta de maior tendência do grupo O à infecção em relação ao grupo A.

Essas observações epidemiológicas sustentam as conclusões de Alkout e colaboradores, que demonstraram que o antígeno H representa um importante receptor expresso nas células das mucosas gastroduodenais ao qual adere o *H. pylori*¹². É fato conhecido que o locus *FUT1(H)* controla, na mucosa duodenal, a expressão dos antígenos H a partir dos oligossacarídeos precursores do tipo II nos indivíduos secretores e não secretores¹⁹. Portanto, a maior expressão potencial desse antígeno pode explicar a



tendência aumentada dos indivíduos do grupo O à infecção e às doenças decorrentes da presença do *H. pylori*.

Algumas das observações previamente publicadas atestando que o grupo O não representa um fator de risco para a infecção pelo *H. pylori* discordam das nossas conclusões^{11,20,21,22}. Nesses estudos, os autores utilizaram outros métodos para detectar a infecção pelo *H. pylori*, incluindo os testes ELISA^{11, 21, 22}, urease^{20, 22} e histológico^{20, 22}. Em nosso estudo, a confirmação da infecção por esse patógeno foi baseada nos testes respiratório, urease e PCR. Os outros testes empregados diferem em sensibilidade quando comparados à PCR²³ e portanto, essa característica pode influenciar as diferenças observadas entre os nossos resultados e aqueles obtidos por outros pesquisadores. Além disso, é possível que a tendência do grupo O à infecção dependa de outros fatores que diferem entre as populações analisadas.

Os valores percentuais obtidos para os sexos, fenótipos Lewis, secretor e não secretor entre os pacientes infectados e não infectados não mostraram diferenças significantes evidenciando portanto, a distribuição homogênea dessas características entre os grupos analisados. Essas observações não sustentam a hipótese de que os pacientes com fenótipo Le(a-b+) apresentam suscetibilidade aumentada à infecção pelo *H. pylori*⁵.

Nossos resultados sugerem que a infecção pelo *H. pylori* está associada ao grupo O e é concordante com outros dados da literatura que também demonstraram a mesma associação^{12, 18}, mas é independente dos fenótipos Lewis, secretor e não secretor. Todavia, a alta frequência do grupo sanguíneo O entre pacientes infectados por esse bacilo e com doenças gastroduodenais decorrentes de sua presença, ainda permanece inexplicada.

Referências Bibliográficas

- 1 - Clarke, CA; Edwards, JW; Haddock, DRW; Howel-Evans, AW; McConnell, RB; Sheppard, PM. ABO blood groups and secretor character in duodenal ulcer. *Brit M J*, 1956; 2:725-731.
- 2 - Clark, CA; Evand, DAP; McConnell, RB; Sheppard, PM. Secretion of blood groups antigens and peptic ulcer. *Brit Med J*, 1959; 1:603-607.
- 3 - Warren, JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1983; 4:1273-1275.
- 4 - NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer. *JAMA*, 1994; 272(1):65-69.
- 5 - Borén,T; Falk, P; Roth, KA. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, 1993; 262:1892-1895.
- 6 - Watkins, WM. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems. *Adv Hum Genet*, 1980; 10:1-136.
- 7 - Mollicone, R; Bara, J; Le Pendu, J. Immunohistologic pattern of type 1 (Le^a, Le^b) and type 2 (X, Y, H) blood group-related antigens in the human pyloric and duodenal mucosae. *Lab Invest*, 1985; 53:219-227.
- 8 - Borén,T; Normark, S; Falk, P. *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. *Trends in Microbiol*, 1994; 2(7):221-228.
- 9 - Hallstone, AE; Perez, EA. Blood type and the risk of gastric disease. *Science*, 1994; 264:1386-1387.
- 10 - Anderson, RP; Street, A; Gibson, PR. Blood group O predicts risk and severity for bleeding peptic ulcers and von Willebrand disease. *J Gastrol Hepatol*, 1997; 12(suppl):26.

- 11 - Hook-Nikanne, J; Sistonen, P; Kosunen, TU. Effect of ABO blood group and secretor status on the frequency of *Helicobacter pylori* antibodies. *Scan J Gastroenterol*, 1990; 25:815-818.
- 12 - Alkout, AM; Blackwell, CC; Weir, DM; Poxton, IR; Elton, RA; Luman, W; Palmer, K. Isolation of cell surface component of *Helicobacter pylori* that binds H type 2, Lewis a and Lewis B antigens. *Gastroenterology*, 1997; 112:1179-1187.
- 13 - Clyne, M; Drum, B. Absence of effect of Le^a and Le^b expression on adherence of *Helicobacter pylori* to human gastric cell. *Gastroenterology*, 1997; 113:72-80.
- 14 - Vengelen-Tyler, V. *Technical manual*, 12th edition, American Association of Blood Banks, 1996.
- 15 - Oliveira, MCVC. *Práticas em imunologia eritrocitária*, 1^a edição, Editora Médica e Científica, Rio de Janeiro, 1999.
- 16 - Lima, LMA; Callado, MRM; Santos, JÁ. Curso de Imunoematologia, Divisão Hemocentro, Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Unesp, 1992.
- 17 - Mattos, LC; Sanchez, FE; Carvalho-Salles, AB; Moreira, HW. Genotipagem do locus ABO em população caucasóide e não caucasóide brasileira. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia (HEMO 2000), Rio de Janeiro, RJ, 22 a 26 de maio de 2000.
- 18 - Lin, CW; Chang, YS; Wu, SC; Cheng, KS. *Helicobacter pylori* in gastric biopsies of taiwanese patients with gastroduodenal diseases. *Jpn J Med Sci Biol*, 1998; 51(1):13-23
- 19 - Mollicone, R; Bara, J; Le Pendu, J; Oroil, R. Immunohistologic pattern of type 1 (Lea, Leb) and type 2 (X, Y, H) blood group-related antigens in the human pyloric and duodenal mucosae. *Lab Invest*, 1985; 53:219-227.



- 20 - Dickey, W; Collins, JSA; Watson, RGP; Sloan, JM; Porter, KG. Secretor status and *Helicobacter pylori* infection are independent risk factors for gastroduodenal disease. *Gut*, 1993; 34:351-353.
- 21 - Loffeld, RJF; Stobberingh, E. *Helicobacter pylori* and ABO blood groups. *J Clin Pathol*, 1991; 44:516-517.
- 22 - Niv, Y; Fraser, G; Delpre, G; Neeman, A; Leiser, Samra, A; Scapa, E; Gilon, E; Bar-Shany, S. *Helicobacter pylori* infection and blood groups. *Am J Gastroenterol*, 1996; 91(1):101-104.
- 23 - Fabre, R; Sobhani, I; Laurent-Puig, P; Hedef, N; Yazigi, N; Vissuzaine, Rodde, I; Potet, F; Mignon, M; Etienne, JP. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test and histopathological tests. *Gut*, 1994; 35(7):905-908.
- 24 - Bussab, W. O., Morettin, P. A. *Estatística básica*. São Paulo: Atual Editora, 1986. 321p.



TABELA 1. Distribuição por sexo dos pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*.

Pacientes	Infectados		Não infectados		Total	
	N	%	N	%	N	%
Masculinos	33	67,3	16	32,7	49	100
Femininos	41	57,8	30	42,2	71	100
Total	74	61,7	46	38,3	120	100

TABELA 2. Frequências dos grupos sanguíneos ABO entre os pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*.

Fenótipos	Infectados		Não infectados		Total	
	N	%	N	%	N	%
O	42	56,8	11	24,0	53	44,1
A	20	27,0	27	58,7	47	39,2
B	9	12,2	6	13,0	15	12,5
AB	3	4,0	2	4,3	5	4,2
Total	74	100	46	100	120	100

TABELA 3. Frequências dos grupos sanguíneos Lewis entre os pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*.

Fenótipos	Infectados		Não infectados	
	N	%	N	%
Le(a-b-)	18	24,3	6	13,0
Le(a+b-)	11	14,9	12	26,1
Le(a-b+)	45	60,8	28	60,9
Total	74	100	46	100

TABELA 4. Frequências dos fenótipos secretor e não secretor entre os pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*.

Fenótipos	Infectados		Não infectados	
	N	%	N	%
Secretor	60	81,1	35	76,1
Não secretor	14	18,9	11	23,9
Total	74	100	46	100

POLIMORFISMO GENOTÍPICO DO *LOCUS* ABO EM PACIENTES COM E SEM INFECÇÃO PELO *Helicobacter pylori*

¹Luiz Carlos de Mattos; ²Haroldo Wilson Moreira

1 Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP

2 Departamento de Análises Clínicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, SP

Endereço para correspondência

Luiz Carlos de Mattos

Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – Famerp

Avenida Brigadeiro Faria Lima 5416

15090-000 São José do Rio Preto SP

E-mail: lumattos@famerp.br

Resumo

A clonagem do *locus ABO* e a descrição de vários genes *O* forneceram condições para a investigação das associações dos grupos sanguíneos ABO e a suscetibilidade à infecção pelo *Helicobacter pylori*. O objetivo desse trabalho foi determinar a distribuição do polimorfismo genotípico do *locus ABO* em pacientes infectados e não infectados por esse bacilo. Foram analisados 120 pacientes adultos de ambos os sexos, caucasianos e não caucasianos, com sintomas de dispepsia e indicação de endoscopia digestiva alta. Os genótipos do *locus ABO* foram identificados por reações de amplificação gênica seguida da digestão enzimática. Nossos resultados revelaram diferença significativa nas frequências dos grupos sanguíneos ABO e a infecção pelo *H. pylori*. A distribuição dos genótipos ABO entre os 74 pacientes infectados foi: 32,5% O^1O^1 ; 13,5% O^1O^v ; 8,1% $O^{1v}O^{1v}$; 2,7% O^1O^2 ; 6,7% AA ; 17,6% AO^1 ; 2,7% AO^{1v} ; 4,1% BO^1 ; 8,1% BO^{1v} ; 4,1% AB . Entre os 46 pacientes não infectados foram encontrados os seguintes valores: 8,7% O^1O^1 ; 8,7% O^1O^{1v} ; 6,5% $O^{1v}O^{1v}$; 23,9% AA ; 30,4% AO^1 ; 2,2% AO^{1v} ; 2,2% AO^2 ; 2,2% BB ; 8,7% BO^1 ; 2,2% BO^{1v} ; 4,3% AB . A comparação entre os grupos analisados demonstra que há diferença significativa na distribuição do genótipo O^1O^1 dos pacientes infectados e nos genótipos AA e AO^1 dos pacientes não infectados ($p < 0,05$). Por outro lado não foram evidenciadas diferenças significantes na predominância de um genótipo *O* específico entre os pacientes infectados. Esses resultados sugerem que o grupo O apresenta maior tendência a infecção pelo *H. pylori*, mas isso parece depender muito mais do efeito exercido pelo fenótipo O do que por um genótipo particular.

Palavras chaves: *locus ABO*; genotipagem molecular; *Helicobacter pylori*

Abstract

The ABO *locus* cloning and the consequent description of several O alleles give us conditions to investigate the ABO blood group associations with the susceptibility to *Helicobacter pylori* infection. The aim of this study was to determine the distribution of the genotypic polymorphism at the ABO blood group *locus* in patients infected and non infected with this pathogen. A hundred twenty patients with dyspeptic symptoms and who underwent endoscopy were evaluated. The ABO genotyping was conducted with four PCR amplification reactions and enzyme digestion. The frequencies of ABO genotypes in infected patients were: 32,5% $O^I O^I$; 13,5% $O^I O^v$; 8,1% $O^{Iv} O^{Iv}$; 2,7% $O^I O^2$; 6,7% AA ; 17,6% AO^I ; 2,7% AO^{Iv} ; 4,1% BO^I ; 8,1% BO^{Iv} ; 4,1% AB . On the other hand, the frequencies observed in non infected patients were: 8,7% $O^I O^I$; 8,7% $O^I O^{Iv}$; 6,5% $O^{Iv} O^{Iv}$; 23,9% AA ; 30,4% AO^I ; 2,2% AO^{Iv} ; 2,2% AO^2 ; 2,2% BB ; 8,7% BO^I ; 2,2% BO^{Iv} ; 4,3% AB . The $O^I O^I$ genotype showed an association with infection of *H. pylori* when compared with AA and AO^I genotypes from non infected patients. The distribution of O genotypes between infected patients not show association with a particular O genotype. These results suggest that the O phenotype present susceptibility to *H. pylori* infection but this tendency can be dependent of the phenotype effect more than a particular genotype.

Key words: ABO *locus*; molecular genotyping; *Helicobacter pylori* infection.

Introdução

Embora os estudos epidemiológicos tenham demonstrado que o grupo sanguíneo O apresenta maior suscetibilidade à infecção pelo *Helicobacter pylori*^{1,2,3,4,5}, várias discordâncias foram relatadas^{6,7,8,9}.

Alguns autores propuseram que a expressão dos antígenos H na mucosa gástrica dos indivíduos do grupo O representa um dos fatores que favorecem a aderência desse patógeno^{1,2,3,4}. Esse fato foi recentemente evidenciado pelas observações de que pacientes do grupo O apresentam maior risco relativo para a infecção, quando comparados aos demais grupos⁵. Outros estudos não encontraram associação entre o grupo O e sorologia positiva para o *H. pylori* em doadores de sangue e em indivíduos normais^{6,7}, bem como não demonstraram maior suscetibilidade desse grupo à infecção em pacientes com sintomas de dispepsia^{8,9}.

Com a clonagem do *locus ABO*¹⁰, vários genes *O* foram identificados por análises do DNA genômico, tendo sido estabelecidas suas diferenças na sequência de nucleotídeos^{11, 12, 13}. Os genes *O^I* e *O^{Iv}* diferem do gene *A* pela deleção do nucleotídeo guanina na posição 261 do *exon* 6, a qual cria um sítio de restrição para a enzima *Kpn* I¹⁰, mas o gene *O^{Iv}* apresenta outra substituição C771T no *exon* 7, reconhecida pela enzima *Dde* I¹³. O gene *O²* não possui essas alterações e, além disso, pode ser diferenciado dos genes *A* e *B* por substituições nas posições 526 e 703, que podem ser reconhecidas pelas enzimas *Nar* I e *Alu* I, respectivamente¹². Estudos populacionais revelaram que as frequências dos genes *O^I*, *O^{Iv}* e *O²* apresentam valores próximos de 58%, 40,% e 2%, respectivamente^{12, 13, 14, 15, 16, 17}.

Os estudos que concordam ou discordam da maior suscetibilidade do grupo O a infecção pelo *H. pylori* até então apresentados se basearam apenas em análises dos

fenótipos eritrocitários. Diante da inexistência de dados com enfoque molecular, o objetivo deste trabalho foi investigar a distribuição do polimorfismo genotípico do *locus ABO* em pacientes com sintomas de dispepsia e indicação de endoscopia digestiva alta, com e sem infecção pelo *H. pylori*.



Material e métodos

Foram analisados 120 pacientes adultos de ambos os sexos, caucasianos e não-caucasianos, com idade média de 42 anos (18 a 74 anos), com sintomas de dispepsia e indicação de endoscopia digestiva alta, atendidos no serviço de Endoscopia e/ou Ambulatório de Gastroenterologia Clínica da Famerp e no Centro de Endoscopia Rio Preto. Os critérios de exclusão adotados foram: menores de 18 anos, hemorragia digestiva, gastrite aguda, mulheres grávidas, uso de inibidor de bomba protônica na última semana e uso de bloqueador de receptores H₂ nas últimas 24 horas. Os pacientes foram divididos em dois grupos quanto à infecção (grupo I) e não infecção (grupo II) pelo *H. pylori*.

Após consentimento informado e em conformidade com o Comitê de Ética em Pesquisa da Famerp, foram colhidos 5 ml de sangue total com EDTA. Nesse material identificamos os fenótipos eritrocitários ABO pelo método de hemaglutinação estandardizado em tubo¹⁹, sendo que o DNA genômico foi extraído dos leucócitos por um método salino²⁰.

A estratégia para a genotipagem do *locus ABO* foi baseada em quatro reações de amplificação gênica (PCR). Para os genes *A*, *B*, *O*^I e *O*² utilizamos os *primers* fy-46 e fy-57 na PCR 1; fy-43 e fy-31 na PCR 2 e fy-47 e fy-29 na PCR 3. Os genes *O*^I e *O*^{Iv} foram identificados com os *primers* fy-47 e fy-31 na PCR 4. As seqüências dos *primers* estão mostradas na tabela 1.

As reações de PCR com volume final de 25 µL foram preparadas nas seguintes condições: TRIS-HCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 50 mM; 20 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 20 pm de cada *primer*; 0,5 U de Taq polimerase; 5 ng de DNA genômico.

Os segmentos que diferenciam os genes *A*, *B*, *O^I* e *O²* foram amplificados em 35 ciclos com desnaturação a 94⁰ C por 2 minutos, hibridização a 53⁰ C por 1 minuto e extensão a 72⁰ C por 1 minuto. Para os genes *O^I* e *O^{Iv}* foram realizados 35 ciclos com desnaturação a 94⁰ C por 1 minuto, hibridização a 52⁰ C por 30 segundos e extensão a 72⁰ C por 1 minuto.

Os produtos das amplificações da PCR 1 foram digeridos com a enzima *Kpn* I; da PCR 2 com a enzima *Nar* I e da PCR 3 com a enzima *Alu* I. O segmento amplificado pela PCR 4 foi digerido com a enzima *Dde* I. Os produtos da digestão enzimática foram analisados em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 1x. Na tabela 2 mostramos a estratégia de análise e interpretação dos genótipos ABO, destacando as reação de PCR, os exons dos locais de amplificação, as mutações pesquisadas, os pares de *primers* para cada reação, as enzimas de restrição utilizadas, os genes identificados e os correspondentes fragmentos resultantes da digestão. O teste do χ^2 e a análise de dependência foram usados para verificar as possíveis associações entre os resultados³⁰.

Resultados

A distribuição percentual das frequências dos fenótipos eritrocitários e dos genótipos ABO em ambos os grupos estão apresentadas na tabela 3 e as frequências relativas dos genes O^I , O^{Iv} , O^2 , A e B estão na tabela 4.

A tabela 3 apresenta as frequências dos genótipos ABO entre os pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*. No grupo dos pacientes infectados verifica-se maior frequência do genótipo $O^I O^I$ (32,4%), seguida do AO^I (17,6%) e do $O^I O^{Iv}$ (13,5%). Os demais genótipos apresentam frequências muito próximas. Entre os pacientes não infectados há prevalência do genótipo AO^I (30,4%), seguida do genótipo AA (23,9%) e dos demais genótipos com frequências menores que 10%. A aplicação do teste χ^2 demonstrou que há diferença significativa na distribuição do genótipo $O^I O^I$ dos pacientes infectados em relação aos genótipos AA e AO^I dos não infectados ($p = 0,003$). As análises de dependência aplicadas a esses resultados sugerem que o genótipo $O^I O^I$ tem maior tendência à infecção pelo *H. pylori*. Por outro lado, não se verifica diferenças significantes nas frequências dos quatro genótipos O detectados entre os pacientes infectados ($p > 0,05$). Essas observações sugerem que a tendência do grupo O à infecção pelo *H. pylori* resulte muito mais do efeito exercido pelo fenótipo O do que de um genótipo particular.

Os diferentes genes ABO analisados nesse estudo mostraram distribuição percentual diferenciada. Entre os pacientes infectados, o gene O^I apresentou frequência de 50,7%, seguido do gene O^{Iv} com 20,3% e do gene A com 19,6%. No grupo constituído pelos pacientes não infectados, as frequências relativas dos genes A , O^I e O^{Iv} foram 43,5%, 32,6% e 13,0%, respectivamente. Esses dados revelam uma diferença altamente significativa na distribuição percentual dos genes O^I e A ($p = 0,0002$).

Discussão e conclusões

Vários estudos demonstraram que indivíduos com o fenótipo eritrocitário O apresentam maior suscetibilidade à infecção pelo *H. pylori*, conseqüentemente, a doenças decorrentes da presença desse bacilo^{1,4,5}. Paralelamente, diferentes pesquisadores procuraram identificar fatores genéticos do hospedeiro envolvidos na suscetibilidade à infecção, mas essa questão ainda permanece obscura^{21,22,23}.

Este é o primeiro trabalho que utiliza metodologia molecular para avaliar a distribuição dos genótipos do *locus ABO* como marcador genético em pacientes infectados e não infectados por esse patógeno, já que o grupo O tem mostrado maior tendência à infecção.

No grupo dos pacientes infectados, o genótipo O^1O^1 apresentou maior frequência em relação aos demais genótipos O e isso sugere que esse genótipo possa apresentar maior tendência à infecção. Essas observações nos conduzem a planejar análises futuras envolvendo maior número de pacientes, onde será possível verificar se esse genótipo está associado à infecção pelo *H. pylori*, em relação aos demais genótipos do grupo O.

Os nossos resultados permitem-nos sugerir ainda que a maior tendência do grupo O à infecção pelo *H. pylori* parece não depender apenas de um genótipo particular mas, muito provavelmente, também do efeito exercido pelo fenótipo. Pode-se supor que a interação desse fenótipo com outros fatores genéticos ou mesmo ambientais acentue essa tendência.

Com relação aos genótipos do grupo A, verificamos uma distribuição semelhante, mas com predomínio do genótipo AO^1 seguido do AA nos pacientes infectados. Constatase, ainda, que os pacientes não infectados apresentam porcentagens maiores do genótipo AA do que os infectados, mas essas diferenças não foram significantes.



Alguns estudos têm revelado maior incidência de úlceras pépticas em indivíduos do grupo O não secretor em comparação aos do grupo O secretor dos antígenos ABH^{23, 24, 25, 26, 27}. Essas observações tem levado alguns pesquisadores a admitir um possível efeito aditivo desses dois fenótipos na determinação da predisposição para essas doenças^{23, 24}. Como o *H. pylori* está associado a mais de 80% dos casos de úlceras gástricas e à maioria dos casos de úlceras pépticas e essas doenças apresentam maior incidência em indivíduos do grupo O, é possível que esse fenótipo exerça um papel que favoreça a infecção. Porém, o elo de ligação entre a infecção, a doença, o fenótipo O e os genótipos O ainda não foi estabelecido.

A possível influência do fenótipo O na propensão à infecção pelo *H. pylori* pode ainda ser reforçada pela diferença significativa observada na distribuição percentual dos genes *O* entre os pacientes infectados e não infectados ($p = 0,0002$). Metade dos genes entre os pacientes infectados (50,7%) é representada pelo gene *O^I*, enquanto que o valor restante se distribui entre os demais genes. Por outro lado, o gene *A* parece exercer um efeito protetor contra a infecção visto que representa 43,5% dos genes presentes nos pacientes não infectados.

Alguns pesquisadores têm sugerido o envolvimento do fenótipo O na maior suscetibilidade à infecção pelo *H. pylori*, mas a idade de aquisição do bacilo, a resposta imune do hospedeiro, o sítio de infecção e a secreção ácida também contribuem como fatores adicionais^{22, 23}. Além disso, interações desse fenótipo com fatores do parasita parecem desempenhar um papel determinante na infecção por esse patógeno²⁷.

Recentemente foi demonstrada uma significativa correlação *in vivo* entre infecção por cepas de *H. pylori cagA* positivas e pacientes do grupo O⁵. Observou-se também que a expressão de adesinas bacterianas capazes de ligarem antígenos fucosilados tais como H e Le^b estava associada à presença de genes *cag* nos isolados clínicos²⁷. Portanto, a



suscetibilidade aumentada à infecção por esse patógeno parece resultar de interações complexas entre o hospedeiro, o parasita e o meio ambiente. Todavia, ainda não foram identificados os fatores adicionais que elevam a suscetibilidade do hospedeiro e que possam estar associados ao grupo O ainda não foram identificados.

O envolvimento de outros fatores genéticos na determinação da suscetibilidade à infecção pelo *H. pylori* ainda aguarda esclarecimentos, mas é possível que interações entre o fenótipo O e o comportamento de cada indivíduo possam influenciar a infecção e o curso das doenças causadas por esse bacilo.

Os nossos resultados sugerem a necessidade de novos estudos com enfoque em outras características inerentes aos hábitos e ao comportamento do hospedeiro, a fatores de virulência do parasita e a doenças decorrentes de sua presença.



Referências Bibliográficas

- 1 - Borén,T; Falk, P; Roth, KA. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, 1993; 262:1892-1895.
- 2 - Falk, P; Roth, KA; Boren, T. An *in vitro* adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993;90:2035-2039.
- 3 - Boren,T; Normark, S; Falk, P. *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. *Trends in Microbiol*, 1994; 2(7):221-228.
- 4 - Alkout, AM; Blackwell, CC; Weir, DM. Isolation of cell surface component of *Helicobacter pylori* that binds H type 2, Lewis and Lewis B antigens. *Gastroenterology*, 1997; 112:1179-1187.
- 5 - Lin, CW; Chang, YS; Wu, SC; Cheng, KS. *Helicobacter pylori* in gastric biopsies of taiwanese patients with gastroduodenal diseases. *Jpn J Med Sci Biol*, 1998; 51(1):13-23.
- 6 - Hook-Nikanne, J; Sistonen, P; Kosunen, TU. Effect of ABO blood group and secretor status on the frequency of *Helicobacter pylori* antibodies. *Scan J Gastroenterol*, 1990; 25:815-818.
- 7 - Dickey, W; Collins, JSA; Watson, RGP; Sloan, JM; Porter, KG. Secretor status and *Helicobacter pylori* infection are independent risk factors for gastroduodenal disease. *Gut*, 1993; 34:351-353.
- 8 - Loffeld, RJF; Stobberingh, E. *Helicobacter pylori* and ABO blood groups. *J Clin Pathol*, 1991; 44:516-517.
- 9 - Niv, Y; Fraser, G; Delpre, G; Neeman, A; Leiser, A; Samra, A; Scapa, E; Gilon, E; Bar-Shany, S. *Helicobacter pylori* infection and blood groups. *Am J Gastroenterol*, 1996; 91(1):101-104.

- 10 - Yamamoto, F; Clausen, H; White, T; Marken, J; Hakomori, S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system, *Nature*, 1990; 345(6272):229-233.
- 11 - Yamamoto, F; McNeill, PD; Yamamoto, M; Hakomori, S; Bromilow, IM; Duguidi, JKM. Molecular genetic analyses of ABO Blood Group System: 4. another type of O allele. *Vox Sang*, 1993; 64:175-178.
- 12 - Grunnet, N; Steffelson, R; Bennett, EP; Clausen, H. Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a danish population: frequency of a novel O allele defined as O². *Vox Sang*, 1994; 67:210-215.
- 13 - Olsson, ML; Chester, MA. Frequent occurrence of a variant O1 gene at the blood group ABO locus. *Vox Sang*, 1996; 70:26-30.
- 14 - Franco, RF; Simões, BP; Zago, MA. Relative frequencies of the two O alleles of the histo-blood group ABH system in different racial groups. *Vox Sang*, 1995; 69:50-52.
- 15 - Yip, SP; Yow, CMN; Lewis, WHP. DNA polymorphism at the ABO locus in the chinese population of Hong Kong. *Hum Hered*, 1995; 45:226-231.
- 16 - Villa, A; Drago, F; Mistò, R; Morelati, F; Poli, F; Sirchia, G. ABO genotyping in italian blood donors. *Haematologica*, 1996; 81:492-496.
- 17 - Mattos, LC; Sanchez, FE; Carvalho-Salles, AB; Moreira, HW. Genotipagem do locus ABO em população caucasóide e não caucasóide brasileira. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia (HEMO 2000), Rio de Janeiro, RJ, 22 a 26 de maio de 2000.
- 18 - Vengelen-Tyler, V. *Technical manual*, 12th edition, American Association of Blood Banks, 1996.
- 19 - Abdel-Rahman, SZ. Isolation of DNA using salting-out procedure. *J Biochem Toxicol*, 1994; 9:191-198.



- 20 - Sakagami, T; Dixon, M; O'Rourke, J; Howlett, R; Alderuccio, F; Vella, J; Shimoyama, T. Lee, A. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut*, 1996; 39:639-648.
- 21 - Nguyen, TN; Barkun, AN; Fallone, CA. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter*, 1999; 4(3):185-197.
- 22 - Go, F. What are the host factors that place na individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease ? *Gastroenterology*, 1997; 113; 6(suppl):S15-20.
- 23 - Clark, CA; Edwards, J; Win. ABO blood groups and secretor character in duodenal ulcer. *Brit Med J*, 1956; 2:725-731.
- 24 - Clark, CA; Evans, DAP; McCornell, RB. Secretion of blood groups antigens and peptic ulcer. *Brit Med J*, 1959; 1:603-607.
- 25 - Hallstone, AE; Perez, EA. Blood type and the risk of gastric disease. *Science*, 1994; 264:1386-1387.
- 26 - Anderson, RP; Street, A; Gibson, PR. Blood group O predicts risk and severity for bleeding peptic ulcers and von Willebrand disease. *J Gastrol Hepatol*, 1997; 12(suppl):26.
- 27 - Ilver, D; Arnqvist, A; Ogren, J. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 1998; 279(5349):373-377.
- 30 - Bussab, W. O., Morettin, P. A. *Estatística básica*. São Paulo: Atual Editora, 1986. 321p.



TABELA 1. Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR.

Primers	Sequência de nucleotídeos
fy-46	5'-GAATTCACTCGCC ACTGCCTGGGTCTC-3'
fy-57	5'-GAATTCATGTGGGTGGCACCCTGCCA-3'
fy-43	5'-GGATCCAGGGGTGCACGGCCGGCGGC-3'
fy-31	5'-GAAATCGCCCTCGTCCTT-3'
fy-47	5'-TGCTGGAGGTGCGCGCCTAC-3'
fy-29	5'-CGTTCTGCTAAAACCAAG-3'



954/00

TABELA 2. Estratégias de análise e interpretação para genotipagem do locus ABO.

PCR	Exon	Mutação	Primers	Enzimas	Genes	Fragmentos da digestão
1	VI	G261-	fy-46 fy-57	Kpn I	$O^I / O^2, A,$ B	84 + 164 / 249
2	VII	C526G	fy-43 fy-31	Nar I	$O^2, B / O^I,$ A	205 + 262 / 467
3	VII	G703A	fy-47 fy-29	Alu I	$B / O^I, O^2,$ A	189 + 280 + 152 / 489 + 152
4	VII	C771T	fy-47 fy-31	Dde I	O^{lv} / O^I	169 + 87 + 22 / 191 + 87

TABELA 3. Distribuição percentual das frequências dos fenótipos e dos genótipos ABO em pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*.

Fenótipos	Genótipos	Infectados		Não infectados	
		N	%	N	%
O	$O^I O^I$	23	32,4	4	8,7
	$O^I O^{Iv}$	10	13,5	4	8,7
	$O^{Iv} O^{Iv}$	6	8,1	3	6,5
	$O^I O^2$	2	2,7	0	0
A	AA	5	6,7	11	23,9
	AO^I	14	18,9	14	30,4
	AO^{Iv}	2	2,7	1	2,2
	AO^2	0	0	1	2,2
B	BB	0	0	1	2,2
	BO^I	3	4,1	4	8,7
	BO^{Iv}	6	8,1	1	2,2
AB	AB	3	4,1	2	4,3
Total		74	100	46	100

TABELA 4. Distribuição percentual dos genes O^I , O^{Iv} , O^2 , A e B entre os pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*.

Genes	Infectados		Não infectados	
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
O^I	75	50,7	30	32,6
O^{Iv}	30	20,3	12	13,0
O^2	2	1,3	1	1,1
A	29	19,6	40	43,5
B	12	8,1	9	9,8
Total	148	100	92	100

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO *Helicobacter pylori* POR PCR

¹Luiz Carlos de Mattos; ²Haroldo Wilson Moreira

1 Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP

2 Departamento de Análises Clínicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, SP

Endereço para correspondência

Luiz Carlos de Mattos

Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Avenida Brigadeiro Faria Lima 5416

15090-000 São José do Rio Preto SP

E-mail: lumattos@famerp.br



Resumo

A infecção pelo bacilo gram-negativo *Helicobacter pylori* está associada a maior risco de gastrite crônica ativa, úlceras pépticas e câncer gástrico. Diferentes métodos têm sido usados para diagnosticar a infecção por esse bacilo, porém como a PCR apresenta elevada sensibilidade e especificidade, tem sido de grande utilidade no diagnóstico dessa infecção. Nosso objetivo foi avaliar a eficiência do método PCR na identificação do *H. pylori* em biópsias de antro gástrico. Foram avaliados 120 pacientes adultos com sintomas de dispepsias e indicação de endoscopia digestiva alta. O DNA genômico foi extraído por um método salino e amplificado em posições específicas, sendo os fragmentos resultantes da amplificação e compatíveis com a presença de infecção revelados em gel de agarose a 2%. A infecção mostrou-se presente em 61,7% (74/120) pacientes e ausente em 38,3% (46/120). Esses resultados confirmam a elevada prevalência da infecção pelo *H. pylori* observada em outras populações adultas e reforçam a utilidade da PCR como método diagnóstico dessa infecção.

Palavras-chaves: PCR; *Helicobacter pylori*



Abstract

Helicobacter pylori is a Gram negative bacterium that has been implicated in the pathogenesis of active chronic gastritis, peptic ulcers and gastric cancer and PCR technique is the most sensitive and specific diagnostic method to detect this pathogen. The aim of this study was test PCR method to detect infection of *H. pylori* in antral fragment biopsy. We studied 120 patients referred for endoscopy as part of an investigation of dyspeptic symptoms. The genomic DNA was extracted with a salting out method and amplified by PCR using specific primers and the amplification product, when present, was visualized in agarose gel 2%, stainign with ethidium bromide under UV light. The infection was present in 61,7% (74/120) of the patients and no present in 38,3% (46/120) patients. Our results reveal the high prevalence of *H. pylori* infection in adult patients and confirm the utility of the PCR technique as a diagnostic method for infection by this pathogen.

Key words: PCR; *Helicobacter pylori*

about
or
backing

Introdução

O *Helicobacter pylori* é um bacilo espiralado gram-negativo com envolvimento bem estabelecido na etiologia da gastrite crônica ativa, da úlcera duodenal e em mais de 80% dos casos de úlcera gástrica^{1,2,3}. Estudos epidemiológicos sugeriram que a infecção por esse bacilo seja um fator de risco para o câncer gástrico^{4, 5, 6}, enquanto as análises sorológicas têm demonstrado que a prevalência de infecção pelo *H. pylori* é alta na população adulta normal atingindo valores entre 42% e 76%^{5,6,7,8}.

Diferentes métodos invasivos e não invasivos incluindo o histológico^{9, 13}, o teste da urease^{10, 13}, testes sorológicos¹², cultura¹³, teste respiratório¹⁴ e amplificação gênica por PCR^{15, 16, 17, 18}, têm sido utilizados na detecção da infecção por esse bacilo em amostras biológicas com relativa eficiência.

A reação de amplificação por PCR *semi-nested* aplicada na detecção do *H. pylori* em amostras de suco gástrico com *primers* específicos para o gene da urease A atingiu níveis de sensibilidade de 97,4%¹⁷. Além disso, a PCR revelou a elevada prevalência do *H. pylori* em amostras de saliva, fezes e biópsias gástricas¹⁸.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a validade do método PCR na detecção de parte do genoma do *H. pylori* em biópsias de antro gástrico e sua aplicabilidade rotineira no auxílio diagnóstico dessa infecção.

Pacientes e métodos

Nossa amostra constituiu-se de 120 pacientes adultos, atendidos no serviço de Endoscopia e/ou Ambulatório de Gastroenterologia Clínica da Famerp e no Centro de Endoscopia Rio Preto, que apresentavam sintomas de dispepsia, e que tiveram indicação de realizar endoscopia digestiva alta. Os seguintes critérios de exclusão foram adotados: menores de 18 anos, hemorragia digestiva, gastrite aguda, mulheres grávidas, uso de inibidor de bomba protônica na última semana e uso de bloqueador de receptores H2 nas últimas 24 horas. Após consentimento informado, e de conformidade com o Comitê de Ética em Pesquisa da Famerp, foi colhido um fragmento de biópsia de antro gástrico para a detecção do genoma do *H. pylori*.

O DNA genômico foi extraído conforme protocolo de Abdel-Rahman¹⁹. Resumidamente, os fragmentos de biópsia de antro gástrico foram incubados numa mistura contendo tampão de lise (Tris-HCl [pH 8.0] 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 400 mM; Tween 20 0,5%) e proteinase K (50 µg/mL) a 37⁰ C por 12 horas. Em seguida, todo o material foi incluído a 100⁰ C por 10 minutos para inativação da proteinase K.

A detecção de parte do genoma do *H. pylori* foi realizada numa reação de PCR com os *primers* CAM-2 (5'-TTACAAACCGATAATGGCGC-3') e CAM-4 (5'-CATCTTGTT AGAGGGATTGG-3'), de acordo com o protocolo de Valentine e colaboradores¹⁵. A reação de PCR com volume final de 50 µL foi preparada nas seguintes condições: TRIS-HCl 10 mM [pH 8.3]; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 50 mM; 5 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,5 mM de cada *primer*; 0,5 U de Taq polimerase; 10 ng de DNA genômico. A amplificação compreendeu 35 ciclos, sendo desnaturação a 94⁰ C por 2 minutos, anelamento dos *primers* a 42⁰ C por 1 minuto e extensão das cadeias a 72⁰ C por



1 minuto. Os segmentos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2% em TBE 1X, corado com brometo de etídio, sob luz UV e fotografado com filme Polaroid 667.



Resultados

Na tabela 1 apresentamos a distribuição dos pacientes analisados com relação ao sexo, faixa etária e diagnóstico endoscópico. Das amostras analisadas, 61,7% (74/120) mostraram-se positivas e 38,3% (46/120) negativas quanto à infecção. Ao diagnóstico endoscópico, 57 pacientes infectados apresentaram crônica, 10 portavam úlcera duodenal e 7 úlcera péptica. Entre os pacientes não infectados, 43 portavam gastrite, 1 apresentava úlcera duodenal e 2 sem alterações visíveis das mucosas gástrica e duodenal. Esses resultados evidenciaram uma associação significativa entre a infecção pelo *H. pylori* e úlceras pépticas ($p = 0,008$).

A figura 1 ilustra o resultado representativo das análises dos fragmentos de biópias por PCR. A presença de um fragmento de 203 pares de base específico da bactéria, amplificado pelos *primers* CAM-1 e CAM-2, foi visualizada em gel de agarose a 2%, demonstrando, assim, o *status* positivo quanto à infecção. As linhas 1, 2 e 3 indicam os fragmentos amplificados a partir das amostras oriundas de pacientes infectados, enquanto C+ e C- correspondem aos controles positivo e negativo, respectivamente. Em cada caso foi realizada uma reação de controle interno de amplificação utilizando-se *primers* específicos e DNA do fago lambda.

Discussão e conclusões

Desde que a infecção pelo *H. pylori* foi associada à maioria dos casos de úlceras duodenais e gástricas^{1, 2, 3, 4}, têm sido crescentes as evidências que sugerem que a presença desse bacilo também eleva o risco de câncer gástrico²⁰. Diante de sua importância epidemiológica, a utilização de métodos diagnósticos que apresentam elevada sensibilidade e especificidade pode favorecer a correta identificação desse microrganismo em diferentes amostras biológicas^{13,15,17,18}.

Os resultados da aplicação da amplificação gênica por PCR, para detecção de parte do genoma do *H. pylori* em amostras de biópsias gástricas analisadas neste trabalho, mostraram-se de acordo com aqueles obtidos em outros estudos epidemiológicos que encontraram percentuais de infecção na população de indivíduos adultos variando de 42% a 67%^{4,5,6,7}. Além disso, nossas observações confirmaram a elevada prevalência desse microrganismo em pacientes adultos com diagnóstico endoscópico de úlceras pépticas.

Este estudo também revelou que, com um simples método de extração do DNA genômico, é possível identificar o *H. pylori* em biópsias gástricas. A frequência de positividade pelo método PCR reflete sua alta sensibilidade e mesmo que as amostras apresentem pequeno número de células bacterianas viáveis ou não viáveis, podem ser facilmente identificadas nas rotinas laboratoriais¹⁶. Todavia, deve-se ter em mente que devido a alta sensibilidade da PCR, podem ocorrer reações falso-positivas como resultado de contaminação com DNA de amostras positivas já processadas, sendo, portanto, recomendável a realização em paralelo de reações de controle positivas e negativas²¹.

Como a amplificação de seqüências específicas do DNA de *H. pylori* por PCR tem o potencial de ser um método rápido, específico e altamente sensível para o diagnóstico laboratorial, também pode ser usada no monitoramento de pacientes com infecção



submetidos ao tratamento com antibióticos, bem como na confirmação de cura completa, como tem sido relatado para outros patógenos de interesse clínico²².



Referências Bibliográficas

- 1 - Warren, JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1983; 4:1273-1275.
 - 2 - Buck, GE. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Clin Microbiol*, 1990; 3:1-12.
 - 3 - NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer. *JAMA*, 1994; 272(1):65-69.
 - 4 - Graham, DY. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. *Gastroenterology*, 1997; 113:1983-1991.
 - 5 - Niv, Y; Fraser, G; Delpre, G; Neeman, A; Leiser, A; Samra, A; Scapa, E; Gilon, E; Bar-Shany, S. *Helicobacter pylori* infection and blood groups. *Am J Gastroenterol*, 1996; 91(1):101-104.
 - 6 - Forman, D; Newell, DG; Fullerton, F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Brit Med J*, 1991; 302:1302-1305.
 - 7 - Parsonnet, J; Friedman, GD; Vandersteen, DP. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*, 1991; 325:1127-1131.
 - 8 - Nomura, A; Stemmermann, GN; Chyou, PH; Kato, I; Perez-Perez, GI; Blaser, MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese, Americans in Hawaii. *N Engl J Med*, 1991; 325:1132-1136.
 - 9 - Craanen, ME; Blok, P; Dekker, W; Tytgat, GNJ. *Helicobacter pylori* early gastric cancer. *Gut*, 1994; 35: 1372-1374.
 - 10 - Brown, KE; Peura, DA. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*, 1993; 22(1):105-115.
-



- 11 - Das, SS; Bain, LA; Karim, QN; Coelho, LG; Baron, JH. Rapid diagnosis of *Campilobacter pylori* infection. *J Clin Pathol*, 1987; 40:701-702.
- 12 - Loffeld, RJLF; Stobberingh, E; Flendrig, JÁ; van Spreeuwel, JP; Arends, JW. Diagnostic value of an immunoassay to detect anti-Campilobacter pylori antibodies in non-ulcer dyspepsia. *Lancet*, 1989; i:1182-1185.
- 13 - Fabre, R; Sobhani, I; Laurent-Puig, P; Hedef, N; Yazigi, N; Vissuzaine, Rodde, I; Potet, F; Mignon, M; Etienne, JP. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test and histopathological tests. *Gut*, 1994; 35(7):905-908.
- 14 - Bell, GD; Weil, J; Harrison, G; Morden, A; Jones, PH; Gant, PW; Trowell, JE. Yoong, AK; Daneshmend, TK; Logan, RFA. 14C-Urea breath analysis, a non-invasive test for the *Campilobacter pylori* in the stomach. *Lancet*, 1987; 13:1367-1368.
- 15 - Valentine, JL; Arthur, RR; Mobley, HLT; Dick, JD. Detection of *Helicobacter pylori* by using polimerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1991; 29:689-695.
- 16 - Clayton, CL; Kleanthous, H; Coates, PJ; Morgan, DD; Tabaqchali, S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polimerase chain reaction. *J Clin Micorbiol*, 1992; 30:192-200.
- 17 - Kawamata, O; Yoshida, H; Hirota, K; Yoshida, A; Kawaguchi, R; Shiratori, Y; Omata, M. Nested-polymerase chain reaction for the detection of *Helicobacter pylori* infection with novel primers designed by sequence anaslysis of urease A gene in clinically isolated bacterial strains. *Bioch Biophys Res Commun*, 1996; 219:266-272.
- 18 - Li, C; Há, T; Fergusson Jr, DA; Chi, DS; Zhao, R; Patel, NR; Krishnaswamy, G; Thomas, E. A newly developed PCR assay of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. *Dig Dis Sci*, 1996; 41(11):2142-2149.



-
- 19 - Abdel-Rahman, SZ. Isolation of DNA using salting-out procedure. *J Biochem Toxicol*, 1994; 9:191-198.
- 20 - The Eurogast Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet*, 1993; 341:1359-1362.
- 21 - Kwok, S; Higuchi, R. Avoid false positives with PCR. *Nature*, 1989; 339:237-238.
- 22 - Class, HCJ; Wagenwoort, JHT; Niesters, HGM; Tio, TT; Van Rijsoort-Vos, JH; Quint, WGV. Diagnostic value of the polymerase chain reaction for the chlamydia detection as determined in a follow-up study. *J Clin Microbiol*, 1991; 29:42-45.
-

TABELA 1. Dados básicos e diagnóstico endoscópico dos pacientes quanto à infecção e não infecção pelo bacilo *H. pylori*.

Características	Infectados	Não infectados
Sexo (M/F)	33/41	16/30
Idade média em anos	42,1	41,7
Diagnóstico endoscópico		
Normal	1	2
Úlcera duodenal	10	1
Úlcera gástrica	7	0
Gastrite	54	43
Total	74	46

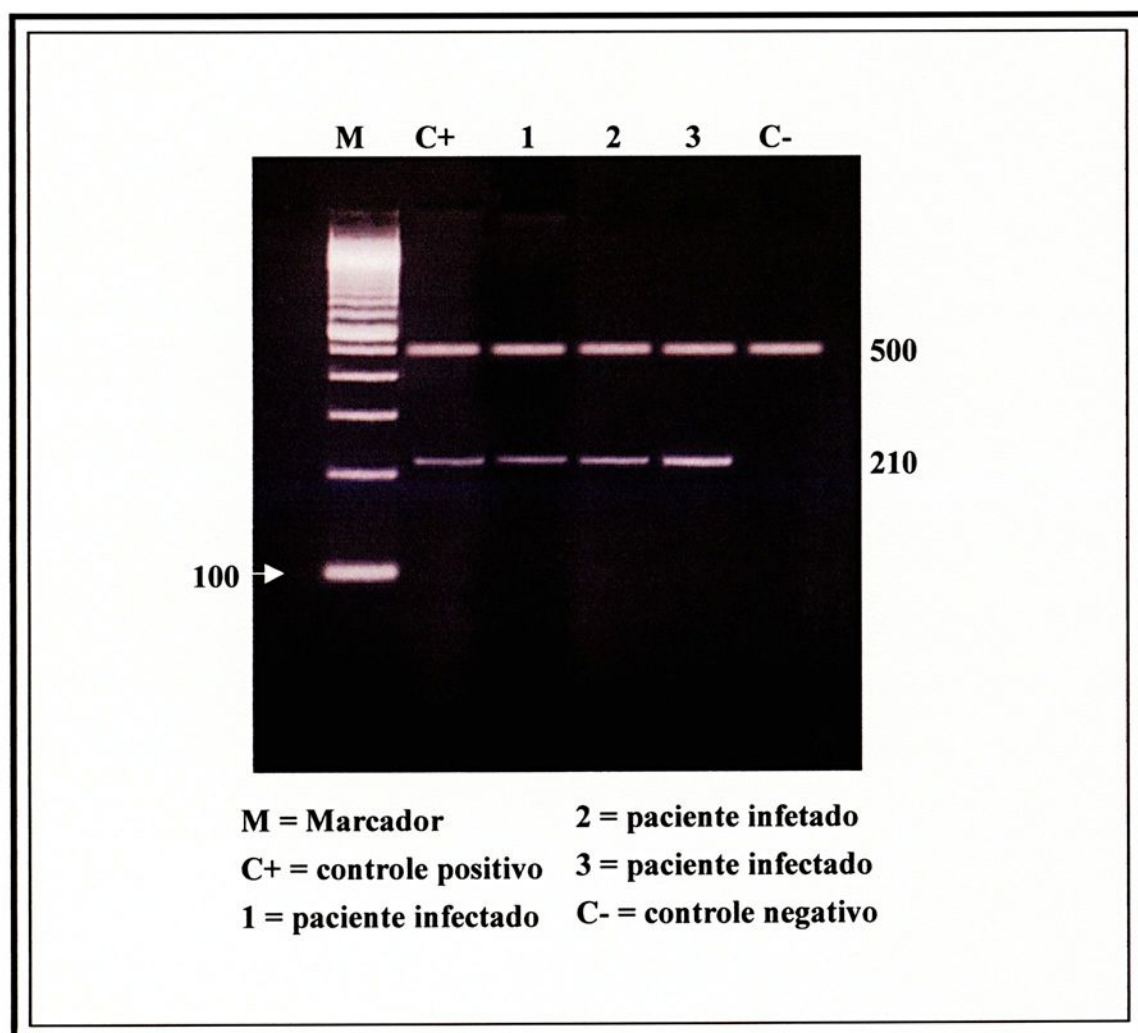


FIGURA 1. Perfil eletroforético dos produtos da PCR amplificados a partir do DNA extraído de biópsias gástricas, em pares de bases. A linha M indica o marcador de 100 pares de bases, as linhas 1, 2 e 3 correspondem aos fragmentos do genoma do *H. pylori* e C+ e C- representam amostras controle. O fragmento de 500 pares de bases é resultante da reação de controle interno de amplificação.

IV Conclusões



A metodologia aplicada na verificação do polimorfismo molecular do *locus ABO* mostrou-se de fácil execução e permitiu o estabelecimento de um protocolo de investigação passível de ser aplicado rotineiramente em estudos populacionais. Além disso, demonstrou a diversidade dos genes *O* na população analisada e confirmou a enorme variabilidade genotípica desse *locus* verificada em outros estudos, reforçando assim sua utilidade como marcador genético.

A distribuição dos fenótipos ABO entre os pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori* demonstrou diferenças significantes somente nas frequências dos grupos O e A, sugerindo assim associação entre infecção e grupo O e não infecção com o grupo A. Por outro lado, nenhuma diferença significativa foi verificada em relação à distribuição dos fenótipos Lewis, secretor, não secretor e sexo com infecção e não infecção por esse bacilo.

A distribuição do polimorfismo genotípico do *locus ABO* entre os pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori* demonstrou diferenças significantes somente na distribuição dos genótipos $O^I O^I$, AA e AO^I , sugerindo associação entre infecção e o genótipo $O^I O^I$ e não infecção entre os genótipos AA e AO^I . Entretanto, nenhum dos genótipos O encontrados entre os pacientes infectados se mostra predominante com diferença significativa. Essas observações permitem-nos supor que a infecção por esse patógeno também seja dependente de outros fatores, além dos marcadores genéticos investigados neste estudo.

O gene O^I mostrou-se associado à infecção e o gene A , à não infecção. A diferença altamente significativa observada na distribuição desses genes entre os grupos analisados sugere, de alguma forma ainda não determinada, que o gene O^I favoreça a infecção pelo *H. pylori*.

A amplificação gênica por PCR, seguida da análise direta do produto amplificado em gel de agarose, demonstrou ser um método simples e rápido para a identificação do *H.*



pylori e passível de ser aplicado ao diagnóstico laboratorial desse patógeno. Além disso, confirmou que a infecção por esse bacilo está associada a úlceras pépticas.

Nossa estratégia de análise e interpretação com as seqüências dos nucleotídeos previamente escolhidas, permitiu a identificação dos genótipos do *locus ABO* em doadores de sangue e em pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*. Torna-se evidente que a utilização dessa estratégia em pesquisas, nas quais pretende-se analisar as correlações entre os genótipos desse *locus* e doenças, é válida e de fácil execução.



V Resumo



Estudos epidemiológicos realizados na década de 50 evidenciaram uma alta frequência do tipo O e do fenótipo não secretor dos antígenos ABH entre pacientes com úlceras pépticas. Desde que o *Helicobacter pylori* foi estabelecido como o agente causal destas doenças, várias controvérsias surgiram quanto a contribuição dos fenótipos ABO, Lewis, secretor e não secretor na suscetibilidade a infecção por este bacilo.

Os objetivos deste trabalho foram: aplicar a metodologia molecular na verificação do polimorfismo genotípico do *locus ABO* em doadores de sangue; investigar a distribuição dos fenótipos ABO, Lewis, secretor e não secretor em pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori*; verificar a variabilidade genotípica do *locus ABO* nestes pacientes; detectar por amplificação gênica a presença deste bacilo em amostras de biópsias gástricas e analisar a aplicabilidade deste procedimento no rastreamento contínuo populacional.

Um protocolo inicialmente desenvolvido para a investigação do polimorfismo genotípico do *locus ABO*, a partir das análises de uma amostra de doadores de sangue da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, foi posteriormente aplicado ao estudo de pacientes com sintomas de dispepsias e submetidos a endoscopia digestiva alta, infectados e não infectados pelo *H. pylori*.

As análises do *locus ABO* a partir do DNA genômico de 324 doadores de sangue, amplificado por PCR e digerido com enzimas de restrição, permitiram a identificação de quatorze genótipos, todos concordantes com os fenótipos eritrocitários previamente definidos por sorologia. Diante da variabilidade genotípica verificada nos grupos A, B e O, esses resultados demonstram o elevado polimorfismo do *locus ABO* e reforçam sua importância como marcador genético.

Uma amostra constituída de 120 pacientes com sintomas de dispepsia e indicação de endoscopia digestiva alta foi analisada quanto aos fenótipos ABO, Lewis, secretor e não

secretor. As diferenças verificadas com relação ao sistema ABO foram significantes entre os pacientes infectados (61,7%) e não infectados (38,3%) pelo *H. pylori*. Entre os pacientes infectados, 56,8% eram do grupo O e 27% do grupo A, enquanto que entre os pacientes não infectados, 24% pertenciam ao grupo O e 58,7% ao grupo A. Os fenótipos Lewis, secretor e não secretor apresentaram frequências semelhantes entre os grupos analisados. Estes resultados sugerem que suscetibilidade à infecção pelo *H. pylori* pode ser influenciada pelos fenótipos O e A, mas não pelos fenótipos Lewis, secretor e não secretor. As análises do polimorfismo genotípico do *locus ABO* entre os pacientes infectados revelaram a seguinte distribuição de genótipos: $O^I O^I$ 32,4%; $O^I O^{Iv}$ 13,5%; $O^{Iv} O^{Iv}$ 8,1%; $O^I O^2$ 2,7%; AA 6,7%; AO^I 17,6%; AO^{Iv} 2,7%; BO^I 4,1%; BO^{Iv} 8,1%; AB 4,1%. Por sua vez, entre os pacientes não infectados foram verificadas as distribuições: $O^I O^I$ 8,7%; $O^I O^{Iv}$ 8,7%; $O^{Iv} O^{Iv}$ 6,5%; AA 23,9%; AO^I 30,4%; AO^{Iv} 2,2%; AO^2 2,2%; BB 2,2%; BO^I 8,7%; BO^{Iv} 2,2%; AB 4,3%. Estes resultados evidenciaram diferenças significantes na prevalência do genótipo $O^I O^I$ entre os pacientes infectados quando comparados aos genótipos AA e AO^I dos não infectados. Por outro lado, a maior suscetibilidade do grupo O à infecção não parece depender de um genótipo particular, mas muito mais do efeito exercido pelo fenótipo O.

Dentre os diferentes métodos usados na detecção do *H. pylori* a amplificação gênica por PCR tem apresentado elevada sensibilidade e especificidade. Esta característica foi constatada no presente trabalho, como método auxiliar no diagnóstico dessa infecção. Entre os 120 pacientes analisados, a infecção mostrou-se presente em 61,7% (74/120) e ausente em 38,3% (46/120). Estes resultados demonstram a elevada prevalência da infecção em pacientes adultos e confirmam a associação entre a infecção e a presença de úlceras pépticas.

VI Summary



Epidemiologic studies in 50th decade showed high frequencies of the O group and non secretor phenotype of ABH antigens in patients with peptic ulcers. Since *Helicobacter pylori* has been reported to be as a causal agent for those diseases, there are some controversies in relation to the susceptibility of ABO, Lewis, secretor and non secretor phenotypes to that pathogen infection.

The purposes of this study were: to use a molecular approach to verify the genotypic polymorphism at the ABO locus in blood donors; to investigate the ABO, Lewis, secretor and non secretor phenotypes distribution in patients infected and non infected by *H. pylori*; to observe the genotypic variability of ABO locus in those patients; to detect *H. pylori* by PCR technique in gastric biopsy and analyse that procedure in further patient's investigation.

A protocol initially developed to investigate the genotypic polymorphism of the ABO locus in blood donor from northwestern region of São Paulo state, Brazil was used in patients with dyspeptic symptom and who were undergoing endoscopy, infected and non infected by *H. pylori*.

The effective protocol was based on 324 genomic DNA samples from blood donors, amplified by PCR and analysed by restriction enzyme digestion in strategic sites to define ABO alleles. By that procedure, fourteen genotypes were defined and all of them were according to the serologic phenotypes.

The great variability was observed in the O blood group in which 6 different genotypes were identified. Those results have reinforced the high polymorphism of ABO locus and its effectiveness as a genetic marker.

The ABO, Lewis, secretor and non secretor phenotypes were analysed in a hundred twenty patients with dyspeptic symptoms who underwent endoscopy. The differences observed in ABO blood group phenotypes distribution among infected (61,7%) and non



infected patients (38,3%) patients by *H. pylori* were significant. Among the infected patients, 56,8% were from the O group and 27% from A group; whereas the non infected patients, 24% from the O group and 58,7%, A group. Lewis, secretor and non secretor phenotypes showed no significant differences among those analysed groups. Those results suggest that susceptibility to *H. pylori* infection might be by ABO blood group system but not by Lewis, secretor and non secretor phenotypes.

Genotypic polymorphism of ABO locus analysis among infected patients showed the following genotypic distribution: $O^I O^I$ 32,4%; $O^I O^{Iv}$ 13,5%; $O^{Iv} O^{Iv}$ 8,1%; $O^I O^2$ 2,7%; AA 6,7%; AO^I 17,6%; AO^{Iv} 2,7%; BO^I 4,1%; BO^{Iv} 8,1%; AB 4,1%. On the other hand, non infected patients showed this distribution: $O^I O^I$ 8,7%; $O^I O^{Iv}$ 8,7%; $O^{Iv} O^{Iv}$ 6,5%; AA 23,9%; AO^I 30,4%; AO^{Iv} 2,2%; AO^2 2,2%; BB 2,2%; BO^I 8,7%; BO^{Iv} 2,2%; AB 4,3%. Those results showed significant differences on the prevalence of $O^I O^I$ genotype among infected patients when compared to AA and AO^I genotypes of non infected. Whereas, the susceptibility of O phenotype to infection might not depend on a particular genotype but mostly by the O phenotype effect.

Different diagnostic approaches have been used to detect *H. pylori*; the PCR amplification has showed high sensibility and specificity. That characteristic was observed in this study as a diagnostic procedure to detect this pathogen. Among those analysed patients, 61.7% (74/20) were infected and 38,3% (46/120) non infected. Those results showed a high prevalence of the infection in adult patients and a relationship between the infection and peptic ulcers.

VII Referências bibliográficas



- ABDEL-RAHMAN, S. Z. Isolation of DNA using salting-out procedure. *J Biochem Toxicol*, v.9, p.191-8, 1994.
- AIRD, I. *et al.* A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups *BMJ*, v.1, p.799-801, 1953.
- AIRD, I. *et al.* The blood groups in relation to peptic ulceration and carcinoma of colon, rectum, breast, and bronchus: an association between the ABO blood group and peptic ulceration. *BMJ*, v.2, p.315-21, 1954.
- ALKOUT, A. M. *et al.* Isolation of cell surface component of *Helicobacter pylori* that binds H type 2, Lewis a and Lewis B antigens. *Gastroenterology*, v.112, p.1179-87, 1997.
- ANDERSEN, P. H. The blood group L system. A new blood group L₂. A case of epistasy within the blood groups. *APMIS*, v.25, p.728-31, 1948.
- ANDERSON, R. P., STREET, A., GIBSON, P. R. Blood group O predicts risk and severity for bleeding peptic ulcers and von Willebrand disease. *J Gastroenterol Hepatol*, v.12, suppl.1, p.26, 1997.
- ANSTEE, D. J. Blood group-active surface molecules of the human red blood cell. *Vox Sang*, v.58, p.1-20, 1990.

- BAMFORD, R.B., BICKLEY, J., COLLINS, J. S. A. *Helicobacter pylori*. Comparison of DNA fingerprints provides evidence of intrafamilial infections. *Gut*, v.34, p.1548-50, 1993.
- BANATVALA, N; MAYO, K; MEGRAUDE, F. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infec Dis*, v.168, p.219-21, 1993.
- BEIGUELMAN, B. *Farmacogenética e sistemas sanguíneos eritrocitários*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1983. 192p.
- BENDHE, Y. M. *et al.* A new blood-group character related to the ABO system. *Lancet*, v.1, p.903-4, 1952.
- BENNETT, E. P. Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus. *Biochem Biophys Res Comm*, v.206, n.1, p.318-25, 1995.
- BORÉN, T., FALK, P., ROTH, K. A. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, v.262, p.1892-5, 1993.
- BORÉN, T., NORMARK, S., FALK, P. *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. *Trends Microbiol*, v.2, n.7, p.221-8, 1994.
- BROWN, D. A. P. The blood group in peptic ulceration. *BMJ*, v.2, p.135-8, 1956.

- BRYANT, N. J. *An introduction to immunohematology*. Philadelphia: Saunders, 1994. 530p.
- BUCHANAN, J. Á., HIGLEY, E. T. The relationship of blood group and disease. *Brit J Exper Pathol*, v.1, p.247-55, 1921.
- BUSSAB, W. O., MORETTIN, P. A. *Estatística básica*. São Paulo: Atual Editora, 1986. 321p.
- CEPPELLINI, R., SINISCALCO, M. Una nuova ipotesi genetica per il sistema Lewis secretore e suoi riflessi con particolare evidenza di linkage com altri loci. *Rev. Instit Sieroter Ital*, v.30, p.431-45, 1955.
- CHANG, J. G., LEE, L. S., CHEN, P. H. Rapid genotyping of the ABO blood group. *Blood*, v.79,n.8, p.2176-7, 1992.
- CLARKE, C. A. *et al.* ABO blood groups and secretor character in duodenal ulcer. *BMJ*, v.2, p.725-31, 1956.
- CLARK, C. A. *et al.* Secretion of blood groups antigens and peptic ulcer. *BMJ*, v.1, p.603-7, 1959.
- CLAUSEN, H., HOLMES, E., HAKOMORI, S. Novel blood group H glycolipid antigens exclusively expressed in blood group A and AB erythrocytes (type 3 chain H). II.



Differential conversion of different H substrates by A1 and A2 enzymes, and type 3 chain H expression in relation to secretor status. *J Biol Chem*, v.261, p.1388-92, 1986

CLAUSEN, H; HAKOMORI, S. ABH and related histo-blood group antigens; Immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang*, v.56, p.1-20, 1989.

CLAUSEN, H. *et al.* Isolation to homogeneity and partial characterization of a histo-blood group A defined fuc- α 1 $\rightarrow$ 2-Gal- α 1 $\rightarrow$ 3N-acetylgalactosaminyl-transferase from human lung tissue. *J Biol Chem*, v.265, p.1139-45, 1990.

CLAUSEN, H., BENNETT, E. P., GRUNNET, N. Molecular genetics of ABO histo-blood groups. *Transfus Clin Biol*, v.2, p.79-89, 1994.

CLYNE, M., DRUM, B. Absence of effect of Lewis A and Lewis B expression on adherence of *Helicobacter pylori* to human gastric cell. *Gastroenterology*, v.113, p.72-80, 1997.

CROUSE, C., VINCEK, V. Identification of ABO alleles on forensic type specimens using rapid ABO genotyping. *BioTechnics*, v.18, n.3, p.478-82, 1995.

DANIELS, G. *Human Blood Groups*. Cambridge: Blackwell, 1995. 737p.

DICKEY, W. *et al.* Secretor status and *Helicobacter pylori* infection are independent risk factors for gastroduodenal disease. *Gut*, v.34, p.351-3, 1993.



EISEN, H. N. Alloantigens on cell surfaces: blood group substances and histocompatibility antigens. In: Davis, B.D. Microbiology. 2nd edition. New York: Harper, 1974, cap.21, p.598-624.

FALK, P., ROTH, K.A., BOREN, T. An *in vitro* adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.90, p.2035-9, 1993.

FERGUSON-SMITH, M. A. *et al.* Localisation of the ABO : Np-1 : AK-1 linkage group by regional assignment of AK:1 to 9q34. *Hum Genet*, v.34, p.35-43, 1976.

FINNE, J. Identification of the blood-group ABH-active glycoprotein components of human erythrocyte membrane. *Eur J Biochem*, v.104, p.181-9, 1980.

FRANCO, R. F., SIMÕES, B. P., ZAGO, M. A. Relative frequencies of the two O alleles of the histo-blood group ABH system in different racial groups. *Vox Sang*, v.69, p.50-2, 1995.

GASSNER, C. *et al.* ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primer. *Blood*, v.88, n.5, p.1852-6, 1996.

GÉRARD, G., VITRAC, D., LE PENDU, J. H deficient blood group (Bombay) of Réunion island. *Am J Hum Genet*, v.34, p.937-47, 1982.

- GO, F. What are the host factors that place na individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease ? *Gastroenterology*, v.113, suppl.6, p.20, 1997.
- GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. *Gastroenterology*, v.113, p.1983-91, 1997.
- GRAHAME, E. W. The ABO blood groups and peptic ulceration. *BMJ*, v.14, p.95-6, 1961.
- GRUBB, R. Correlation between Lewis blood group and secretor character in man. *Nature*, v.162, p.933, 1948.
- GRUNETT, N. *et al.* Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a danish population: frequency of a novel O allele defined as O². *Vox Sang*, v.67, p.210-5, 1994.
- HALLSTONE, A. E., PEREZ, E. A. Blood type and the risk of gastric disease. *Science*, v.264, p.1386-7, 1994.
- HAKOMORI, S. Histo-blood group antigens as tumor-associated carbohydrate antigens and ligands for cell adhesion. In: CARTRON, J. P., ROUGER, P. Blood Cell Biochemistry: molecular basis of human blood group antigens. New York: Plenum, 1995. v.6, cap.16, p.421-443.
- HENEGHAN, M. A., MORAN, A. P., FEELEY, K. M. Effect of host Lewis and ABO blood group antigen expression on *Helicobacter pylori* colonisation density and the

consequent inflammatory response. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1998, v.20, n.4, p.257-66, 1998.

HENRY, S. *et al.* Plasma and red-cell glycolipid patterns of Le(a+b+) and Le(a+b-) polynesians as further evidence of the weak secretor gene *Se^w*. *Vox Sang*, v.65, p.62-9, 1993.

HENRY, S., ORIOL, R., SAMUELSSON, B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang*, v.69, p.166-82, 1995.

HENRY, S., MOLLICONE, R., LOWE, J. B. A second nonsecretor allele of the blood group $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase gene (FUT2). *Vox Sang*, v.70, p.21-5, 1996.

HOOK-NIKANNE, J., SISTONEN, P., KOSUNEN, T. U. Effect of ABO blood group and secretor status on the frequency of *Helicobacter pylori* antibodies. *Scan J Gastroenterol*, v.25, p.815-8, 1990.

HOSKING, S. E., LING, T. K. W., CHUNG, S. C. S. Duodenal ulcer healing by eradication of *Helicobacter pylori* without anti-acid treatment: randomised controlled trial. *Lancet*, v.343, p.508-10, 1994.

JOHNSON, P. H., HOPKINSON, D. A. Detection of ABO blood group polymorphism by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mol Genet*, v.1, n.5, p.341-4, 1992.

- KABAT, E. A. Specific polysaccharides of blood. In: KABAT, E. A. *Blood Group Substances*. New York: Academic Press, 1956. v.1, cap.2, p.15-34.
- KELLEY, R. J. *et al.* Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group a(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). *J Biol Chem*, v.270, n.9, p.4640-9, 1995.
- KUMAZAKI, T., YOSHIDA, A. Biochemical evidence that secretor gene, Se, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.81, p.4193-7, 1984.
- LANGMAN, M. J. S., DOLL, R. ABO blood group and secretor status in relation to clinical characteristics of peptic ulcers. *Gut*, v.6, p.270-1, 1965.
- LANGMAN, M. J. S., DOLL, R. ABO blood group and secretor status in stomacal ulcer. *Gut*, v.8, p.128-9, 1967.
- LARSEN, RD. *et al.* Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.87, p.6674-8, 1990.
- LEE, J. C. I., CHANG, J. G. ABO genotyping by polymerase chain reaction. *J Foren Sci*, v.37, n.5, p.1269-75, 1992.

LIECHTI-GALLATI, S., NEESER, D. Efficient and reliable PCR based detection of the ABO blood group alleles: genotyping on stamps and other biological evidence samples. *J Forens Sci*, v.41, n.4, p.653-7, 1996.

LEITE, G. M.; GOFFI, F. S. A distribuição dos grupos sanguíneos ABO em doentes de úlcera gastroduodenal e de carcinoma gástrico. *Rev Paul Med*, v.52, n.1, p.31-6, 1958.

LEMIEUX, R. U. Human blood groups and carbohydrate chemistry. *Chem Soc Rev*, v.7, p.423-52, 1978.

LIMA, L. M. A., CALLADO, M. R. M., SANTOS, J. A. Curso de Imunohematologia, Divisão Hemocentro. Botucatu, Faculdade de Medicina, Unesp, 1992.

LIN, C. W. *et al.* *Helicobacter pylori* in gastric biopsies of taiwanese patients with gastroduodenal diseases. *Jpn J Med Sci Biol*, v.51, n.1, p.13-23, 1998.

LOFFELD, R. J. F., STOBBERINGH, E. *Helicobacter pylori* and ABO blood groups. *J Clin Pathol*, v.44, p.516-517, 1991.

LOGAN, R. P. H., GUMMETT, P. A., MISIEWICZ, J. J. One week's anti-*Helicobacter pylori* treatment for duodenal ulcer. *Gut*, v.35, p.15-8, 1994.

LOWE, JB. Biochemistry and biosynthesis of ABH and Lewis antigens: characterization of blood group-specific glycosyltransferases. In: CARTRON, J. P., ROUGER, P. Blood

- Cell Biochemistry: molecular basis of human blood group antigens. New York: Plenum, 1995. v.6, cap.3, p.75-115.
- LUTZ, P., DZIK, W. H. Molecular biology of the red blood group genes. *Transfusion*, v.32, n.5, p.467-86, 1992.
- MALTONI, G., CANALI, E. I gruppi sanguini in relazione al cancro gastrico e all'ulcera gastro duodenale. *Ann Hal Chir*, v.33, p.371-82, 1956.
- MANDELL, U. *et al.* Sequential expression of carbohydrate antigens with precursor-product relation characterizes cellular maturation in stratified squamous epithelium. *J Oral Pathol*, v.17, p.506-11, 1988.
- MARCUS, D. M., CASS, L. Glycosphingolipids with Lewis blood group activity: an uptake by human erythrocytes. *Science*, v.164, p.553-5, 1969.
- MATTOS, L.C. *et al.* Frequência do alelo O² do locus ABO (ISBT 001) em doadores de sangue do grupo O. *Genet Mol Biol*, v.21, suppl.1, p.303, 1998.
- MATTOS, L. C. *et al.* Genotipagem do locus ABO em população caucasóide e não caucasóide brasileira. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 2000, Rio de Janeiro. *Anais ... São Paulo*, 2000. p.185.
- MATTOS, L. C. *Et al.* Genotipagem do locus ABO aplicada ao seguimento de transplante de medula óssea alogênico. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE

HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 2000, Rio de Janeiro. *Anais ...* São Paulo, 2000. p.186.

MAYO, C. W., FERGUSON S. O. Are certain diseases associated with specific blood groups, or Rh antigens ? *Arch Surg*, v.66, p.406-9, 1953.

MENTIS, A., BLACKWELL, C. C., WEIER, D. M. ABO blood group, secretor status and detection of *Helicobacter pylori* among patients with gastric or duodenal ulcers. *Epidemiol Infect*, v.106, p.221-9, 1991.

MOLLICONE, R. *et al.* Immunohistologic pattern of type 1 (Lea, Leb) and type 2 (X, Y, H) blood group-related antigens in the human pyloric and duodenal mucosae. *Lab Invest*, v.53, p.219-27, 1985.

MOLLICONE, R. *et al.* Heterogeneity of the ABH antigenic determinants expressed in human pyloric and duodenal mucosae. *Glycoconj J*, v.3, p.187-202, 1986.

MOLLICONE, R. *et al.* Red cell H-deficient, salivary ABH secretor phenotype of Réunion island. Genetic control of the expression of H antigen in the skin. *Glycoconj J*, v.5, p.499-512, 1988.

MOLLICONE, R., CAILLEAU, A., ORIOL, R. Molecular genetics of H, Se, Lewis and other fucosyltransferases genes. *Transfus Clin Biol*, v.4, p.235-42, 1995.

MOLLISSON, PL. *Blood transfusion in clinical medicine*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1983. 988p.

MOORE, S., GREEN, C. The identification of specific Rhesus polypeptide blood group ABH active glycoprotein complexes in the human red cell membranes. *Biochem J*, v.244, p.735-41, 1987.

MORGAN, W. T. J., WATKINS, W. M. Genetic and biochemical aspects of human blood group A, B, H, Le^a and Le^b specificity. *Br Med Bull*, v.25, p.30-4, 1969.

MOURANT, A. E. A new human blood group antigen of frequent occurrence. *Nature*, v.158, p.237-8, 1946.

MOURANT, AE; KOPEC, AC; DOMANIEWSKA-SOBCZAK, K. *The distribution of the human blood groups and other polymorphisms*. London: Oxford University Press, 1976. 140p.

MOURANT, AE; KOPEC, AC; DOMANIEWSKA-SOBCZAK, K.. *Blood groups and diseases*. A study of associations of diseases with blood groups andt others polymorphisms. London: Oxford University Press, 1978. 328p.

NEDRUD, J. G., STEVEN, J. C. Un update on *Helicobacter pylori*. *Curr Op Gastroenterol*, v.12, p.62-7, 1996.

- NGUYEN, T. N., BARKUN, A. N., FALLONE, C. A. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter*, v.4, n.3, p.185-97, 1999.
- NIH CONSENSUS CONFERENCE. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer. *JAMA*, v.272, n.1, p.65-9, 1994.
- NIV, Y. *et al.* *Helicobacter pylori* infection and blood groups. *Am J Gastroenterol*, v.91, n.1, p.101-4, 1996.
- NISHIHARA, S. *et al.* Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. *J Biol Chem*, v.269, n.46, p.29271-8, 1994.
- O'KEEFE, D. S., DOBROVIC, A. A rapid and realible PCR method for genotyping the ABO blood group. *Hum Mut*, v.2, p.67-70, 1993.
- OLIVEIRA, M. C. V. C., GÓES, S. M. P. M. *Práticas em imunologia eritrocitária*, 1ª edição, Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica. 1999. 270p.
- OLSSON, M. L., CHESTER, M. A. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O² versus A/O² discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox Sang*, v.69, p.242-7, 1995.
- OLSSON, M. L., CHESTER, M. A. Frequent occurrence af a variant O1 gene at the blood group ABO locus. *Vox Sang*, v.70, p.26-30, 1996.



OLSSON, M. L., *et al.* Heterogeneity of the O alleles at the ABO blood group locus in amerindians. *Vox Sang*, v.74, p.46-50, 1998.

ORIOLO, R., LE PENDU, J., MOLLICONE, R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang*, v.51, p.161-71, 1986.

ORIOLO, R. Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *J Immunogenet*, v.17, p.235-45, 1990.

ORIOLO, R. *et al.* Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS*, v.100, suppl.1, p.128-38, 1992.

ORIOLO, R. ABO, Hh, Lewis and Secretion: serology, genetics and tissue distribution. In: CARTRON, J. P., ROUGER, P. Blood Cell Biochemistry: molecular basis of human blood group antigens. New York: Plenum, 1995. v.6, cap.2, p.37-73.

PATEL, P., MENDALL, M.A., KHULUSI, S. *Helicobacter pylori* infection in childhood: risk factors and effect on growth. *BMJ*, v.309, p.1119-23, 1994.

REID, M. E., LOMAS-FRANCIS, C. *The blood group antigens*. New York: Academic Press, 1997. p.212-214.

SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostics of sickle cell anemia. *Science*, v.230, p.1350-4, 1985.

- SAKAGAMI, T., DIXON, M., O'ROURKE, J. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut*, v.39, p.639-48, 1996.
- SALMON, C., RUFIE, J. *Hemotypologie des populations*. In Immunohématologie et immunogénétique. Paris: Flammarion, 1980. p.544-73.
- SALMON, C., CARTRON, J. P., ROUGER, P. *The human blood groups*. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1984. 460p.
- SCHENKEL-BRÜNNER, H., HALFLAND, P. Immunochemistry of the Lewis blood group system: studies of the molecular basis of the Lex property. *Vox Sang*, v.40, p.358-66, 1981.
- SCHIFF, F., SASAKI, H. Der ausscheidungstypus, ein auf serologischem wege nachweisbares mendelndes merkmal. *Klin Woch*, v.II, p.1426-9, 1932 citado em ORIOL, R. ABO, Hh, Lewis and Secretion: serology, genetics and tissue distribution. In: CARTRON, J. P., ROUGER, P. *Blood Cell Biochemistry: molecular basis of human blood group antigens*. New York: Plenum, 1995. v.6, cap.2, p.37-73.
- SHAHID, A. *et al.* Genetic markers and duodenal ulcer. *J Pak Med Assoc*, v.47, n.5, p.135-7, 1997.
- SHARON, N., LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am*, v.jan, p.74-81, 1993.



- SOLOMON, J., WAGGONER, R., LEYSHON, W. C. A quantitative immunogenetic study of gene suppression invoking A₁ and H antigens of erythrocyte without affecting secreted blood group substance. The A^hm and O^hm. *Blood*, v.25, p.470-85, 1965.
- STRONCEK, D. F. *et al.* Determination of ABO glycosyltransferase genotypes by use of polymerase chain reaction and restriction enzymes. *Transfusion*, v.35, p.231-40, 1995.
- SUADICANI, P., HEIN, H. O., GYNTELBERG, F. Genetic and life-style determinants of peptic ulcer. A study of 3387 men aged 54 to 74 year. *Scand J Gastroenterol*, v.34, n.1, p.12-7, 1999.
- SUNG, J. J. Y., CHUNG, S. S. C., LING, T. K. W. Antibacterial treatment of gastric ulcers associated with *Helicobacter pylori*. *N Engl J Med*, v.332, p.139-42, 1995.
- SZULMAN, A. E. The histological distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. III. The, A, B and H antigens in embryos and fetuses from 18 mm in length. *J Exp Med*, v.119, p.503-16, 1964.
- SZULMAN, A. E. The ABH antigens in human tissues and secretions during embryonal development. *J Histochem Cytochem*, v.13, p.752-4, 1965.
- SZULMAN, A. E. Chemistry, distribution and function of blood group substances. *Ann Rev Med*, v.17, p.307-10, 1966.

- UGELLI, L. Distribuzione dei gruppi sanguigni negli individui portatori de ulcere gastroduodenale. *Il Bioclinico*, v.43, p.1591-4, 1936.
- VENGELEN-TYLER, V. *Technical manual*, 12th edition. New York: AABB, 1996. 540p.
- VILLA, A. ABO genotyping in italian blood donors. *Haematologica*, v.81, p.492-6, 1996.
- WALLACE, J. Blood groups and disease. *BMJ*, v.2, p.534-5, 1954.
- WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, v.4, p.1273-5, 1983.
- WATKINS, W. M., MORGAN, W. T. J. Neutralization of anti-H agglutinin in gel serum by simple sugars. *Nature*, v.169, p.825-6, 1952.
- WATKINS, W. M. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems. *Adv Hum Genet*, v.10, p.:1-136, 1980.
- WATKINS, W. M. *et al.* Regulation of expression os carbohydrate blood group antigens *Biochimie*, v.70, p.1597-611, 1988.
- WEBB, P. M., KNIGHT, T., GREAVES, S. Relation between infection with *Helicobacter pylori* and livind conditions in childhood: evidence of person-to-person transmission in early life. *BMJ*, v.308, p.750-3, 1994.

YAMAKAMI, K. The individuality of semen, with reference to its property of inhibiting specifically isohemagglutination. *J Immunol*, v.12, p.185-9, 1926 citado em ORIOL, R. ABO, Hh, Lewis and Secretion: serology, genetics and tissue distribution. In: CARTRON, J. P., ROUGER, P. Blood Cell Biochemistry: molecular basis of human blood group antigens. New York: Plenum, 1995. v.6, cap.2, p.37-73.

YAMAMOTO, F. *et al.* Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system, *Nature*, v.345, n.6272, p.229-33, 1990.

YAMAMOTO, F., HAKOMORI, S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J Biol Chem*, v.265, n.31, p.19257-62, 1990.

YAMAMOTO, F. *et al.* Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc-alfa 1-2-alfa 1-3 GalNAc transferase (Histo-blood group A transferase) mRNA. *J Biol Chem*, v.265, n.2, p.1146-51, 1990.

YAMAMOTO, F. *et al.* Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. another type of O allele. *Vox Sang*, v.64, p.175-8, 1993.

YAMAMOTO, F., MACNEILL, P. D., HAKOMORI, S. Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology*, v.5, n.1, p.51-8, 1995.



YOSHIDA, A. YAMAGUCHI, Y. T., DAVE, V. Immunologic homology of human blood group glycosyltransferases and genetic background of blood group (ABO) determination. *Blood*, v.54, p.344-7, 1979.

YIP, S. P., YOW, C. M. N., LEWIS, W. H. P. DNA polymorphism at the ABO *locus* in the chinese population of Hong Kong. *Hum Hered*, v.45, p.266-71, 1995.

YU, L. C., YANG, Y. H., BROADBERRY, R. E. Correlation of a missense mutation in the secretor α 1,2-fucosyltransferase gene with the Lewis(a+b+) phenotype: a potential molecular basis for the weak secretor allele (Se^w). *Biochem J*, v.312, p.329-32, 1995.

ZAGO, M. A. *et al.* Racial heterogeneity of DNA polymorphisms linked to the A and O alleles of the ABO blood group gene. *Ann Hum Genet*, v.60, p.67-72, 1996.



