



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Marcos Paulo Miola

Variações na Expressão Fenotípica dos Antígenos do Sistema ABO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para a obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

São José do Rio Preto
2023

Marcos Paulo Miola

Variações na Expressão Fenotípica dos
Antígenos do Sistema ABO

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
a obtenção do Título de Doutor no Curso
de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Eixo Temático: Medicina e
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto
2023

Miola, Marcos Paulo
Variações na Expressão Fenotípica dos Antígenos do Sistema ABO.
São José do Rio Preto, 2023
70 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

1. Sistema ABO de Grupos Sanguíneos; 2. Glicosiltransferases;
3. Testes de Hemaglutinação; 4. Técnicas de Genotipagem; 5.
Variação Antigênica.

Marcos Paulo Miola

Variações na Expressão Fenotípica dos
Antígenos do Sistema ABO

BANCA EXAMINADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente:	Prof. ^a Dra. Cinara de Cássia Brandão
2º Examinador:	Prof. Dr. Carlos Eduardo Miguel
3º Examinador:	Prof. ^a Dra. Carla Luana Dinardo
4º Examinador:	Prof. ^a Dra. Márcia Maria Urbanin Castanhole Nunes
5º Examinador:	Prof. ^a Dra. Claudia Regina Bonini Domingos
Suplentes:	Prof. ^a Dra. Lilian Castiglione Prof. ^a Dra. Patricia Carvalho Garcia

São José do Rio Preto, 05 / 05 / 2023.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas e Quadros.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. A história do sistema ABO.....	2
1.2. A base genética.....	3
1.3. Estruturas precursoras.....	5
1.4. A biossíntese.....	7
1.5. A variabilidade antigênica.....	9
1.6. A expressão dos antígenos ABH.....	11
1.7. Análises sorológicas e moleculares.....	13
1.8. Principais contribuições deste estudo.....	14
1.8.1. Anticorpos monoclonais contendo maiores títulos auxilia na detecção dos antígenos ABO fracamente expressos.....	14

1.8.2. Alteração na concentração do anticorpo monoclonal anti-A elimina a reação de campo misto em subgrupos de A fraco.....	17
1.8.3. Subgrupo A _w B com anti-A ₁ pode mascarar uma discrepância.....	18
1.8.4. Separação das hemácias reativas em campo misto.....	20
1.9. Objetivos.....	21
2. Artigos.....	22
2.1. Artigo 1. Anti-A and anti-A,B monoclonal antisera with high titers favor the detection of A weak phenotypes.....	25
2.2. Artigo 2. ABO discrepancy resolution in two patients with acute myeloid leukemia presenting the transient weak expression of A antigen.....	31
2.3. Artigo 3. Mixed field resolution in ABO phenotyping in a rare case of a blood donor with hematopoietic mosaicism.....	36
2.4. Artigo 4. Resolução de divergência na herança do gene ABO entre pais e filhos causada pela presença do alelo <i>cisAB</i>	42
3. Conclusões.....	52
4. Referências.....	54
5. Anexos.....	68
Anexo 1. Discrepâncias ABO, causas prováveis e formas de resolução.....	69
Anexo 2. Método para separação de hemácias do campo misto.....	70

DEDICATÓRIA:

*Dedico este trabalho à minha esposa Sabrina, aos
meus filhos Artur e Sofia e ao meu orientador
Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos.*

AGRADECIMENTOS:

A Deus

Pela saúde, discernimento, equilíbrio, clareza para resolução dos casos investigados e força para manter-me na caminhada e poder chegar até aqui.

À minha esposa Sabrina

Pela parceria, compreensão, paciência e amor de todos os dias e para a vida.

Aos meus filhos Artur e Sofia

Pela motivação, ensinamentos e alegrias.

Aos meus pais Armando e Izaura

Pela vida e formação pautada em seus princípios pessoais e valores éticos que moldaram meu caráter, tornando-me o que sou.

Aos meus irmãos Jair, Heder, Edna, Ricardo e Kassia

Pela troca de experiências, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Aos meus familiares e amigos

Pelos reencontros, descontração, acolhimento e apoio nos momentos precisos.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Pela oportunidade e manutenção do curso de Pós-Graduação com alta qualidade.

À Diretoria Geral da FAMERP Prof. Dr. Francisco de Assis Cury e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e seu coordenador Prof. Dr. José Fernando Vilela Martin.

Ao colaborador do projeto Prof. Dr. Octávio Ricci Junior

Pela confiança, parceria e ensinamentos.

A todas as pessoas que aceitaram participar da pesquisa

Pelo aceite, confiança e contribuição ao desenvolvimento científico.

Aos colaboradores e instituições que nos submeteram amostras

Pela confiança e paciência em aguardar o desenvolvimento da pesquisa e os resultados.

Aos funcionários (Márcio, Cidinha e Regina) e colegas do Laboratório de Imunogenética da FAMERP

Por todo auxílio, contribuição e apoio em todos os momentos que precisei.

Aos meus colegas de trabalho da Agência Transfusional do Hospital de Base e do Hemocentro de São José do Rio Preto

Pela convivência, respeito, parceria, troca de experiências e suporte.

À Prof.^a Dra. Cinara de Cássia Brandão

Pela parceria e suporte.

Ao meu orientador, Prof. Dr Luiz Carlos de Mattos

Pela oportunidade e confiança.

Por ter me dado a honra de conhecê-lo, ser meu orientador e dividir comigo o conhecimento necessário, de forma empolgante, precisa e sem reservas.

Por parabenizar os acertos e demonstrar que os erros são partes do processo de aprendizagem.

Por estimular, apoiar e lapidar minhas ideias.

Por mostrar a direção e manter-me no caminho certo.

Pela parceria, respeito e amizade.

Aos membros da banca examinadora

Pela disponibilidade em contribuir com a finalização deste trabalho.

A todos que não referi, mas que de maneira direta ou indireta, colaboraram de forma essencial para realização e alcance dos resultados obtidos neste trabalho; o meu muito obrigado.

EPÍGRAFE.

“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento.”

(Frederick Herzberg)

LISTA DE FIGURAS

Introdução.

- Figura 1. Representação das interações biossintética dos antígenos ABH e Lewis a partir da estrutura bilipídica precursora comum (globosilceramida)..... 9
- Figura 2. Demonstração de dois casos de A_wB com presença do anticorpo anti-A₁..... 19

Artigo 2.

- Figure 1. Results of ABO phenotyping in Column Agglutination Technology and PCR-RFLP analysis in agarose gel electrophoresis in the two studied cases..... 35

Artigo 3.

- Figure 1. ABO, Rh, and Kell phenotyping results in Column Agglutination Technology of the separated (A and C) and non-separated (B) RBCs from the Mixed Field..... 39
- Figure 2. Data from sequencing of the ABO gene..... 40
- Figure 3. Heredogram showing the phenotypes (ABO, Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, and Lewis) and genotypes (*ABO*, *FUT2*) identified in the blood donor and all his family members..... 41

Artigo 4.

- Figura 1. Heredograma mostrando os fenótipos e genótipos da probanda e seus familiares..... 41

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Introdução.

Tabela 1. Genes <i>ABO</i> e <i>FUT1</i> , seus precursores, alelos, transferases e antígeno.....	4
Quadro 1. Estruturas precursoras utilizadas pelas glicosiltransferases A e B.....	6

Artigo 1.

Table 1. Data from blood donors (BD) and patients (PT) as informed by samples senders.....	27
Table 2. Sorological and molecular data from ten cases presenting the weak expression of A antigen.....	28
Table 3. Evaluation of the reactivity of the antiserum with predetermined titers.....	29

Artigo 2.

Table 1. Clinical and laboratory features of 1 and 2 cases.....	35
Table 2. Results of phenotyping and ABO genotyping.....	34

Artigo 3.

Table 1. Serological and genotyping data from the blood donor and his relatives.....	39
--	----

Artigo 4.

Tabela 1. Dados sorológicos e moleculares (PCR-RFLP) dos membros da família.....	46
Tabela 2. Dados moleculares obtidos do sequenciamento da probanda e seus familiares.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

\geq	Maior ou igual que
\leq	Menor ou igual que
=	Igual
%	Porcentagem
μL	microlitro
α	Alfa
β	Beta
A	Adenina
Ala	Alanina
AMAT	Anticorpos monoclonais de altos títulos
Arg	Arginina
C	Citosina
Cer	Ceramida
CM	Campo misto
del	Deleção
delG	Deleção de uma base de nucleotídeo guanina
DTT	Ditiotreitol
Fuc	Fucose
Fuc α 2	Fucose em ligação alfa nos carbonos 1 e 2.
G	Guanina
Gal	Galactose
Gal α 3	Galactose em ligação alfa entre os carbonos 1 e 3.
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina

Gb3	Globotriosilceramida
Gb4	Globotetraosilceramida
GDP	Guanosina difosfato
Glc	Glicose
GlcNac	<i>N</i> -acetilglicosamina
Globo-A	Antígeno A formado a partir do precursor do tipo 4
Globo-B	Antígeno B formado a partir do precursor do tipo 4
Gly	Glicina
GT(s)	Glicosiltransferase(s)
GTA	Glicosiltransferase A (α 3- <i>N</i> -acetilgalactosaminiltransferase)
GTB	Glicosiltransferase B (α 3-D-galactosiltransferase)
IgM	Imunoglobulina de classe M
IgG	Imunoglobulina de classe G
ISBT	Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea
kb	Quilobase
Leu	Leucina
LISS	Solução de baixa força iônica
M	Molar
Met	Metionina
NHAc	Acetamina
OH	Hidroxila
pb	Pares de bases
PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição

pH	Potencial Hidrogeniônico
R	Radical
R1	Radical Lactotriaosilceramida
R2	Radical A tipo 2
Se	Secretor
Ser	Serina
T	Timina
UDP	Uracila Difosfato

RESUMO

Introdução: O gene *ABO* é consideravelmente polimórfico, possui mais de 200 alelos responsáveis pela expressão de glicosiltransferases (GTs) que sintetizam os antígenos A e B. Estas variantes alélicas podem afetar a especificidade e/ou atividade das GTs, resultando em variações antigênicas. Além disso, a composição e expressão dos antígenos A e B também estão associadas a fatores de regulação enzimática, como tipo e disponibilidade de precursores, grau de ramificação de suas cadeias, tipos de glicoconjugados, glicoproteínas ou glicosfingolipídios, bem como, fatores transcricionais e/ou translacionais. Apesar das variações antigênicas serem atribuídas a diversos fatores conhecidos; estes nem sempre podem ser identificados ou são insuficientes para sustentar um padrão populacional. **Objetivo:** O objetivo geral deste estudo foi identificar as causas das variações antigênicas do sistema de grupo sanguíneo ABO em casos com resultados fenotípicos inesperados. **Material e Método:** Foram analisadas amostras de doadores de sangue, indivíduos saudáveis e pacientes que apresentaram alterações na fenotipagem ABO nos testes de rotina. A fenotipagem ABO foi realizada em tubo e em coluna de gel, com reagentes de diferentes clones. Hemácias suspeitas de apresentarem os antígenos A ou B fracos, foram testadas contra um painel de antissoros monoclonais anti-A ou anti-B (títulos de 128 a 2048), respectivamente. O antissoro anti-A, B (títulos de 64 a 2048) também foi utilizado, exceto nos casos com fenótipo de AB. Os casos que apresentaram campo misto (CM) com os diferentes títulos de antissoros, foram avaliados por uma técnica de separação das hemácias do CM para fenotipagem das duas populações. Também foram

avaliados por PCR-RFLP e sequenciamento dos genes *ABO* e *FUT2*.

Resultados: Todos os casos com antígenos A ou B fracos, detectados na fenotipagem ABO direta, apresentaram resultados divergentes entre os métodos e/ou antissoros, desde o não reativo até os reativos, com intensidades variáveis (w a 4+) ou em CM. Os resultados obtidos com antissoros monoclonais de títulos mais elevados favoreceram tanto a detecção dos antígenos, bem como, o aumento da intensidade da reação de aglutinação. A técnica de separação das hemácias reativas das não reativas do CM possibilitou a caracterização fenotípica das duas populações presentes no caso de mosaicismo hematopoiético. As análises moleculares do gene *ABO* por PCR-RFLP permitiram a detecção da mutação c.261delG e a caracterização do alelo O. A análise criteriosa dos eletroferogramas obtidos com sequenciamento favoreceu a identificação das mutações presentes no gene *ABO*. **Conclusões:** Antissoros monoclonais com títulos mais elevados favoreceram a detecção dos antígenos A ou B fracamente expressos na hemácia, bem como, eliminaram reações em CM decorrentes dos fenótipos A ou B fracos. Além disso, o antissoro anti-A,B apresentou melhor resolução quando comparado ao antissoro anti-A, de mesmo título. A técnica de separação das hemácias do CM, embora simples, mostrou-se eficiente na resolução de casos de mosaicismo, contendo populações de hemácias com distintos fenótipos ABO. As análises moleculares corroboraram a interpretação dos resultados alcançados.

Palavras-chave: Sistema ABO de Grupos Sanguíneos; Glicosiltransferases; Testes de Hemaglutinação; Técnicas de Genotipagem; Variação Antigênica.

ABSTRACT

Introduction: The ABO gene is considerably polymorphic, with more than 200 alleles that account for the expression of glycosyltransferases (GTs) that synthesize A and B antigens. These allelic variants may affect the specificity and/or activity of GTs, resulting in antigenic variations. In addition, the composition and expression of A and B antigens are also associated with enzymatic regulation factors, such as type and availability of precursors, degree of branching of their chains, types of glycoconjugates, glycoproteins or glycosphingolipids, as well as transcriptional and/or translational factors. Although antigenic variations are attributed to several known factors, these cannot always be identified or are insufficient to support a population pattern.

Objective: The general objective of this study was to identify the causes of antigenic variations of the ABO blood group system in cases with unexpected phenotypic results. **Material and Method:** Samples of blood donors, healthy individuals, and patients who presented alterations in ABO phenotyping in routine tests were analyzed. ABO phenotyping was performed in a tube and gel column, with reagents from different clones. Red blood cells suspected of presenting weak A or B antigens were tested against a panel of anti-A or anti-B monoclonal antisera (titers 128 to 2048), respectively. Anti-A,B antiserum (titers 64 to 2048) was also used, except in cases with AB phenotype. The cases that presented mixed field (MF) with the different titers of antisera were evaluated by a technique of separation of red blood cells from MF for phenotyping of the two populations. They were also evaluated by PCR-RFLP and sequencing of the *ABO* and *FUT2* genes. **Results:** All cases with weak A or B antigens, detected in direct ABO

phenotyping, presented divergent results between methods and/or antisera, from non-reactive to reactive, with varying intensities (w to 4+) or in MF. The results obtained with monoclonal antisera of higher titers favored both the detection of antigens as well as the increase in the intensity of the agglutination reaction. The technique of separating the reactive from the non-reactive red blood cells of the MF allowed the phenotypic characterization of the two populations present in the case of hematopoietic mosaicism. Molecular analyses of the ABO gene by PCR-RFLP allowed the detection of the c.261delG mutation and the characterization of the *O* allele. The careful analysis of electropherograms obtained with sequencing favored the identification of mutations present in the *ABO* gene.

Conclusions: Monoclonal antisera with higher titers favored the detection of weakly expressed A or B antigens in the red blood cells, as well as eliminating reactions of MF resulting from weak A or B phenotypes. In addition, anti-A,B antiserum presented better resolution when compared to anti-A antiserum of the same title. The technique of separating red blood cells from the MF, although simple, proved efficient in resolving cases of mosaicism, containing populations of red blood cells with distinct ABO phenotypes. The molecular analyses have corroborated the interpretation of the results achieved.

Keywords: ABO Blood-Group System; Glycosyltransferases; Hemagglutination Tests; Genotyping Techniques; Antigenic Variation.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A história do sistema ABO

O sistema de grupo sanguíneo ABO surgiu a partir do conhecimento adquirido no final do século 19, em que foi observado que hemácias poderiam ser aglutinadas por soros de outros indivíduos humanos.⁽¹⁾ A partir destas observações, Karl Landsteiner idealizou um experimento utilizando amostras de seis indivíduos saudáveis, no qual pôde testar e observar um padrão de aglutinação compatível com três grupos sanguíneos.⁽²⁾ Estes achados estimularam Landsteiner a expandir sua pesquisa, totalizando 22 indivíduos. Quando todos os resultados foram avaliados, Landsteiner pôde concluir que havia três diferentes tipos de hemácias e dois anticorpos. No primeiro tipo, relatou a presença do antígeno A nas hemácias e do anticorpo anti-B no soro. No segundo tipo, o antígeno B nas hemácias e do anticorpo anti-A no soro. Por fim, no terceiro tipo, relatou que não havia nas hemácias o antígeno A e nem o antígeno B, mas que ambos os anticorpos anti-A e anti-B estavam presentes.⁽³⁾ Esta interpretação dos resultados levou Landsteiner a classificar os indivíduos analisados em três grupos: A ou B ou C, conforme sua publicação de 1901.⁽³⁾ Posteriormente, o grupo C foi substituído por O, derivado da palavra “*ohne*” (ausência em alemão). Em 1902, seus colegas de laboratório, Decastello e Sturli, identificaram o quarto grupo, nomeado como AB, em que o plasma destes indivíduos não aglutinava nenhuma das hemácias testadas.⁽⁴⁾ Assim, o primeiro sistema de grupos sanguíneos, denominado ABO, foi caracterizado. Estas descobertas possibilitaram a compreensão da ocorrência dos anticorpos regulares anti-A e anti-B, sendo a sua compatibilidade de vital importância para

uma transfusão; conforme apontado por Landsteiner em seu artigo de 1901.⁽³⁾ No entanto, somente após a Primeira Guerra Mundial (1914 - 1918) que a utilização do sangue para fins terapêuticos foi difundida.⁽⁵⁾ Landsteiner obteve o reconhecimento de sua descoberta, em 1930, quando recebeu o prêmio Nobel em Medicina.⁽¹⁾

A partir do reconhecimento dos grupos A, B, O e AB, foi possível realizar estudos familiares que demonstraram que estes grupos possuíam caracteres herdados.⁽⁶⁾ Em 1924, Bernstein⁽⁷⁾ apresentou um modelo de herança em que o mecanismo envolvia três alelos, A, B e O, em um único locus. Posteriormente, em 1930, Thomsen e colaboradores⁽⁸⁾ incluíram a este modelo os alelos A_1 e A_2 , como subgrupos de A. Somente após mapeamento do locus ABO (cromossomo 9q34) em 1976⁽⁹⁾ e clonagem do gene ABO em 1990⁽¹⁰⁾, foi possível confirmar que o princípio geral de múltiplos alelos em um único locus, proposto por Bernstein, em 1924, é a base correta da herança deste grupo sanguíneo. De acordo com vários estudos filogenéticos, as linhagens A, B e O desenvolveram-se entre um e quatro milhões de anos atrás.⁽¹¹⁾

1.2. A base genética

O gene ABO está localizado na posição 9q34.2, contendo 7 exons (1062 nucleotídeos) e 6 introns, em uma extensão de 19,5 kb.^(12,13) A transcrição destes exons produz diferentes proteínas, chamadas de glicosiltransferases (GTs), podendo ser funcionais ou afuncionais. GTs funcionais são responsáveis pela síntese dos antígenos A e B, enquanto as GTs afuncionais são incapazes de realizar a síntese de novos antígenos, sendo responsável pela manutenção do antígeno O.⁽¹³⁻¹⁶⁾

O alelo *A* (*ABO***A1.01*) é considerado a sequência referência do gene, a partir desta sequência uma glicosiltransferase *A* (GTA, α 1-3-*N*-acetilgalactosaminiltransferase) é formada, possuindo atividade catalisadora específica. É capaz de reconhecer e adicionar o substrato doador UDP-*N*-acetilgalactosamina ao substrato aceptor, antígeno H, resultando no antígeno *A*₁ (Tabela 1).^(17,18)

A partir do alelo *B* (*ABO***B.01*), uma glicosiltransferase *B* (GTB, α 1-3-*D*-galactosiltransferase) é formada, que difere da GTA por sete trocas de nucleotídeos (c.297A>G, c.526C>G, c.657C>T, c.703G>A, c.796C>A, c.803G>C e c.930G>A); destas quatro levam a alteração de aminoácidos (p.Arg176Gly, p.Gly235Ser, p.Leu266Met e p.Gly268Ala). Estas alterações não afetam a função (reação enzimática), mas alteram a especificidade, fazendo com que a GTB reconheça e adicione outro substrato doador (UDP-galactose) ao aceptor comum, antígeno H, resultando no antígeno *B* (Tabela 1).^(18,19)

O alelo *O* (*ABO***O.01.01*) comparado ao alelo referência (*ABO***A1.01*), possui uma mutação no exon 6 (c.261delG), que altera a sequência de leitura e cria um códon de parada prematuro (p.Thr88Profs*31), formando uma GT truncada e inativa. Sem atividade, substratos de *A* ou *B* não serão adicionados ao aceptor, mantendo o antígeno H terminal, resultando no grupo *O* (Tabela 1).^(17,20,21)

Tabela 1. Genes *ABO* e *FUT1*, seus precursores, alelos, transferases e antígeno.

Precursor	Gene	Alelo	Transferase	Antígeno
I	<i>FUT1</i>	<i>H</i>	α 1,2-L- fucosiltransferase	H
		<i>h</i>	afuncional	I
H	<i>ABO</i>	<i>A</i>	α 1,3- <i>N</i> -acetilgalactosaminiltransferase (GTA)	A
		<i>B</i>	α 1,3- <i>D</i> -galactosiltransferase (GTB)	B
		<i>O</i>	afuncional	H

De acordo com a Sociedade Internacional de transfusão de Sangue (ISBT), em sua última atualização, foram considerados 206 dos alelos variantes da sequência referência para o gene; o alelo *ABO*A1.01*, decorrentes de mutações nos exons do gene ABO (200 alelos), especialmente exons 6 e 7 (194 alelos), mas também nos íntrons (6 alelos). Estes alelos promovem alterações nas GTs e leva a formação dos fenótipos variantes classificados em subgrupos de A, B, AB e O.⁽²²⁾

1.3. Estruturas precursoras

Os antígenos A e B são compostos por trissacarídeos terminais, $\text{GalNAc}\alpha 3(\text{Fuc}\alpha 2)\text{Gal-R}$ e $\text{Gal}\alpha 3(\text{Fuc}\alpha 2)\text{Gal-R}$, respectivamente. Estas estruturas são homólogas, diferem somente por uma troca de uma acetamida (NHAc) por uma hidroxila (OH) no carbono 2 da galactose terminal.^(14,23) O precursor da *N*-acetilgalactosamina ($\text{GalNAc}\alpha 3$) ou D-galactose ($\text{Gal}\alpha 3$) possui um monossacarídeo L-fucose ($\text{Fuc}\alpha 2$) adicionado à estrutura terminal (Gal-R) a partir da ação enzimática de uma $\alpha 2$ -L-fucosiltransferase codificada por dois genes diferentes, *FUT1* (H) ou *FUT2* (Se), mas estreitamente ligados e homólogos.






O gene *FUT1*, codifica uma fucosiltransferase com afinidade a aceptores de substrato do tipo 2 e atividade em tecidos de origem endodérmica e mesodérmica; principal responsável por adicionar o antígeno H na hemácia.^(17,24)

O gene *FUT2*, codifica uma fucosiltransferase com afinidade a aceptores de substrato do tipo 1 e atividade em tecidos de origem ectodérmico, sendo responsável por adicionar o antígeno H nas estruturas solúveis presentes nas secreções e no plasma.^(17,24,25) As estruturas ABO tipo 1 possuem uma variedade

de formas, dependendo se foram modificadas ou não pela ação das transferases α 3/4-L-fucosiltransferase codificadas a partir do gene *FUT3*, que compõe sistema Lewis. Estas enzimas são capazes de modificar alguns antígenos A e B, tornando-os antígenos compostos ALe^b e BLe^b, respectivamente, que podem ser absorvidos e incorporados na membrana das hemácias posteriormente.⁽²⁶⁾

Cadeias precursoras dos tipos 3 e 4 também são alvos das GTs A e B, que juntamente com as cadeias precursoras do tipo 1 e 2 compõem as quatro principais cadeias precursoras dos antígenos ABO.⁽²⁷⁾ Além disso, evidências de grupo sanguíneo A com cadeia precursora do tipo 6 foram relatadas.⁽²⁸⁾ O Quadro 1 agrupa os precursores utilizados na biossíntese dos antígenos ABO na hemácia e secreções, representados pelos dissacarídeos terminais.

Quadro 1. Estruturas precursoras utilizadas pelas glicosiltransferases A e B

Precursor	Cadeia	Representação esquemática
Tipo 1	Gal β 3GlcNAc β 3-R	
Tipo 2	Gal β 4GlcNAc β 3-R	
Tipo 3	Gal β 3GalNAc α 3-R	
Tipo 4	Gal β 3GalNAc β 3-R	
Tipo 6	Gal β 4Glc β 3-R	

1.4. A biossíntese

A biossíntese e formação dos antígenos ABO são dependentes do alelo herdado (base genética), da disponibilidade e tipo de precursores e da atividade e especificidade das GTs; que por vez é dependente da disponibilidade de substrato doadores e cofatores. Além disso, o gene *ABO* sofre interações biossintéticas com um conjunto de genes independentes (*FUT1*, *FUT2*, *FUT3*, *GCNT2*, *GBGT1*, *A4GALT*, *GLOB*, *C1GALT1* etc.) que formam mais de 200 GTs capazes de atuar no mesmo substrato que as transferases ABO.^(29–32)

De maneira geral, a biossíntese de glicolipídios dos sistemas de grupos sanguíneos ABO, I, P1PK, GLOB e FORS (glicoesfingolipídios), inicia-se com adição de uma glicose (Glc β 1) a uma ceramida (globosilceramida) e, posteriormente, ocorre a adição de uma galactose (Gal β 4) formando uma lactosilceramida (Gal β 4Glc β 1-Cer). A biossíntese a partir da lactosilceramida divide-se em duas vias alternativas: em uma ocorre a formação da lactotriaosilceramida (base de precursores tipo 1, 2 e 3) e na outra a formação de uma globotriaosilceramida (base do precursor tipo 4), com a adição de uma GlcNAc β 3 e Gal α 4, respectivamente.^(26,30,33)

A via da lactotriaosilceramida (GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1-Cer) divide-se em outras duas vias alternativas: em uma ocorre a adição de Gal β 3 formando a lactotetraosilceramida (Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1-Cer), precursor tipo 1; enquanto na outra ocorre uma ligação Gal β 4, formando a neolactotetraosilceramida (Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1-Cer), precursor tipo 2. Em ambas os precursores podem ser fucosilados pela enzima H para formar antígenos H tipo 1 e tipo 2. Na cadeia H do tipo 2, se for adicionado o

monossacarídeo GalNAc α 3; o antígeno A tipo 2 é formado, que pode ser estendido com adição de um dissacarídeo Fuca2Gal β 3 criando o H tipo 3 (Fuca2Gal β 3GalNAc α 3-R), que ainda pode ser estendido com adição do monossacarídeo GalNAc α 3 [GalNAc α 3(Fuca2)Gal β 3-R], formando o antígeno A tipo 3.^(18,30,34)

A biossíntese do precursor tipo 4, também ocorre na via lactosilceramida, mas com a adição do monossacarídeo Gal α 4 que leva à globotriaosilceramida (Gb3), antígeno P^k, depois à globotetraosilceramida (Gb4), antígeno P. Esta estrutura pode ser alongada por três vias diferentes. Em uma, o dissacarídeo H na forma H tipo 4 (globo-H) e a transferase A₁ pode formar o A tipo 4 (globo-A) adicionando o monossacarídeo GalNAc α 3 ao precursor H tipo 4. Em uma segunda via alternativa ocorre a adição de uma GalNAc β 3, criando o glicolípido para-Forssman (p-Fs). Na terceira via, a enzima Forssman catalisa a transferência do monossacarídeo GalNAc α 1-3 ao precursor Gb4, sendo uma atividade pouco relatada em humanos.⁽³³⁻³⁸⁾

Os diferentes precursores utilizados pelas GTs ABO levam a modificações na conformação da estrutura antigênica formada. As cadeias de carboidratos formadas a partir dos precursores tipos 1, 2, 3 e 4 compõem estas principais variações conformacionais dos antígenos ABO na superfície da membrana da hemácia. O tipo 1 é quase vertical à membrana, enquanto o tipo 2, 3 e 4 possuem dobras que os deixam mais ou menos paralelos.^(14,19,33,34,39,40) A Figura 1 ilustra a biossíntese dos antígenos ABH e Lewis a partir da estrutura bilipídica precursora comum (globosilceramida) na via da lactotriaosilceramida (R1), sendo a origem dos precursores do tipo 1, 2 e 3.

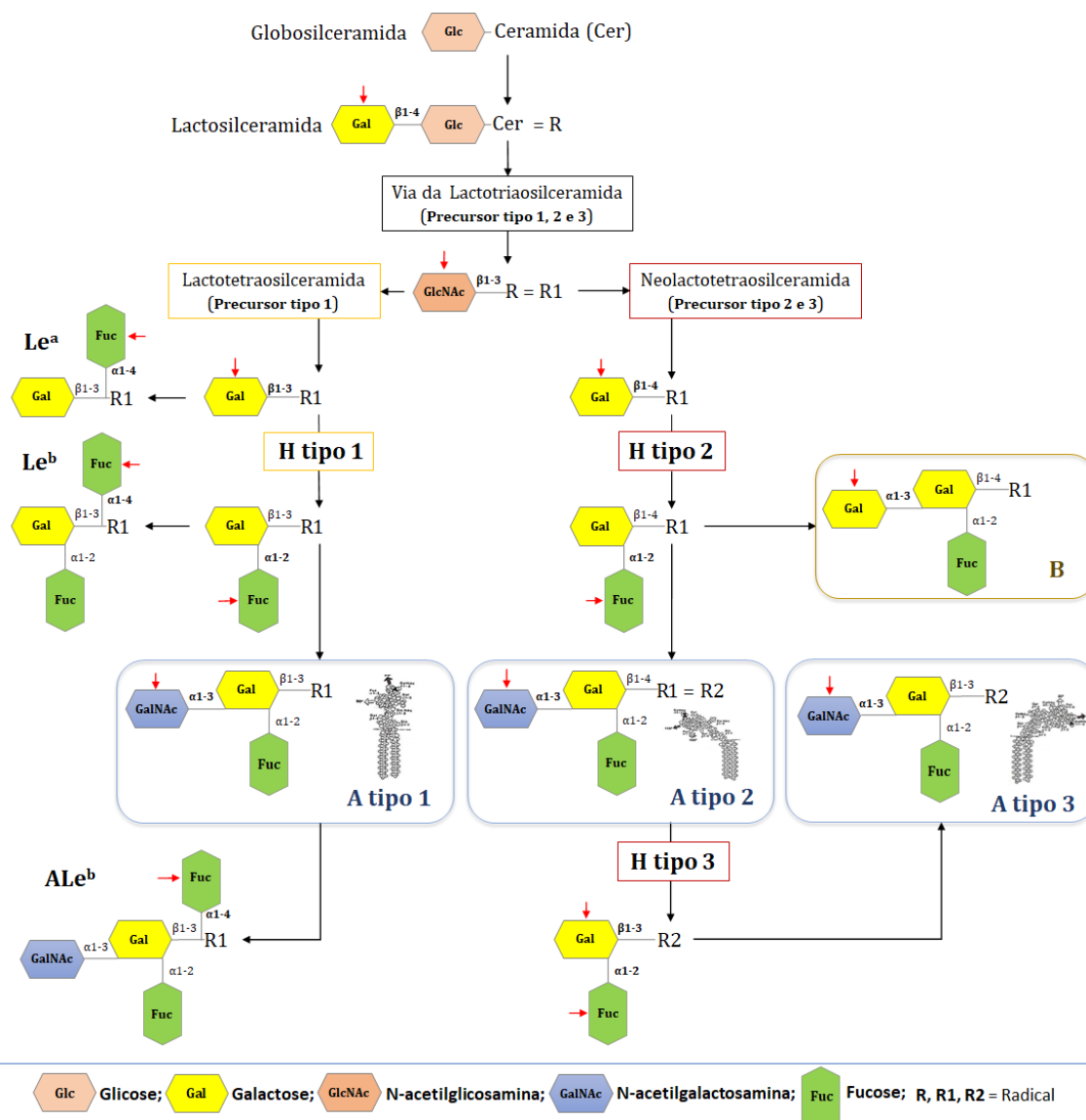


Figura 1. Representação das interações biossintéticas dos antígenos ABH e Lewis a partir da estrutura bilipídica precursora comum (globosilceramida). Setas pretas indicam a direção da biossíntese. Setas vermelhas indicam o monossacarídeo adicionado em cada etapa da biossíntese.⁽³⁰⁾

1.5. A variabilidade antigênica

O gene ABO é consideravelmente polimórfico, com 207 alelos reconhecidos pela ISBT, divididos em 84 alelos *A*, 49 alelos *B*, 6 alelos *cisAB*, 6 alelos *B(A)* e 62 alelos *O*.⁽²²⁾ Estes alelos são responsáveis por formar os antígenos A₁, A, B e AB, além de variações na expressão destes antígenos, classificadas e

agrupados em subgrupos A, B ou AB, de acordo com características fenotípicas observadas pelos autores que as identificaram.^(17,24)

Considerando-se as alterações moleculares reconhecidas pela ISBT e o impacto delas na atividade ou especificidade da enzima; a expressão dos antígenos ABO podem ser separadas em quatro formas distintas. A primeira está relacionada à especificidade, com atividade normal das GTs, em que a GTA ou GTB formadas sintetizam antígenos específicos A ou B, respectivamente e em níveis normais. A segunda forma, leva a perda da atividade das GTs, devido à presença de mutações que formam uma GT truca ou anômala, incapaz de adicionar qualquer antígeno A ou B ao seu precursor, antígeno H, resultando no fenótipo O. A terceira forma é caracterizada por mutações que alteram a atividade das GTs, resultando na expressão de menor quantidade de antígenos A ou B e, conseqüentemente, diminuição significativa nas intensidades de reação observados nos resultados sorológicos, ao ponto de serem negativas e os antígenos não serem detectados, sendo características dos fenótipos fracos de A e de B. Na quarta forma, mutações codificam uma GT com dupla função, comprometendo a especificidade e quase sempre a atividade das GTs, conforme se observa na maioria dos fenótipos cisAB ou B(A). Independente da forma, qualquer mutação que altere a atividade ou a especificidade da GT codificada pode levar a alterações na expressão dos antígenos ABO.^(13,41,42)

Além das mutações genéticas, a expressão antigênica ABO pode sofrer com a ação de inúmeros fatores de regulação da ação enzimática responsável pela síntese de seus antígenos. A principal está relacionada a seus precursores, que atribuem grande variação estrutural dos antígenos ABO, influenciado também

pelo grau de ramificação e pela extensão das estruturas poli-*N*-acetilgalactosamina repetitivas (Gal β 1-4GlcNAc β 1), tipo de glicoconjugado, glicoproteínas ou glicoesfingolipídios. Além disso, também influenciam na regulação e expressão dos antígenos ABO os fatores transcricionais e/ou translacionais de proteínas, a disponibilidade de oligossacarídeos precursores e de cofatores, assim como, a disponibilidade ou a ordem com que as enzimas GTA e GTB encontram-se nos compartimentos do aparelho de Golgi.^(19,43)

1.6. A expressão dos antígenos ABH

Os antígenos ABH não são exclusivos de hemácias, são expressos em uma ampla variedade de tecidos humanos e fluidos corporais de indivíduos secretores, exceto líquido cefalorraquidiano. Cada hemácia de um adulto normal expressa cerca de dois milhões de antígenos H. O alelo *A* consegue produzir concentrações mais altas de transferase do que o alelo *B* e, consequentemente, converter quase todo precursor H em antígeno A, o que resulta em cerca de 810.000 a 1.170.000 antígenos A, nas hemácias de indivíduo adulto, diante de algo em torno de 610.000 a 830.000 antígenos B. Por outro lado, quando ambos os alelos *A* e *B* são herdados, na competição enzimática pelo precursor H; a GTB apresenta melhor resultado, formando em média cerca 720.000 antígenos B, enquanto a GTA forma em torno de 600.000 antígenos A.⁽⁴⁴⁾

A redução ou perda na expressão dos antígenos ABH é amplamente conhecida e frequentemente relatada, possuindo causas distintas. Nas doenças oncológicas (cânceres de bexiga, oral e pulmonares) ou oncohematológicas (leucemias) esta redução ou perda na expressão é temporária, a depender da remissão da doença ou do tipo e evolução do tratamento, como utilização de

agentes hipometilantes que contribuem para o reestabelecimento fenotípico.^(45–49) Estas alterações quantitativas ocorrem devido os antígenos ABH serem expressos de forma específica ao tipo celular, sofrendo mudanças drásticas durante o desenvolvimento, diferenciação e maturação das células. Com isso, a expressão é facilmente afetada em processos patológicos que levam a mutações na região promotora do gene, como a carcinogênese.^(50–53) De maneira geral, qualquer condição que aumente a demanda de hemácias pode promover o enfraquecimento natural da expressão dos antígenos ABO. Além disso, a região promotora é um alvo da metilação de DNA que está correlacionada com a repressão do gene ABO, levando a alterações que interferem na codificação da enzima e consequentemente uma redução da biossíntese e expressão de seus antígenos, pela indisponibilidade de enzimas.^(50,54,55)

Diferente do observado nos processos promotores de alteração temporária da condição ideal para a expressão dos antígenos A e B; alterações polimórficas presentes no gene ABO comprometem a especificidade e/ou atividade das GTs de forma permanente, formando novos alelos que poderão ser repassados aos seus filhos. No entanto, fenótipos A ou B fracos também foram relatados em indivíduos saudáveis e sem alteração molecular identificada.^(56–58) Esta ocorrência pode estar relacionada ao complexo processo de biossíntese com formação em camadas dos antígenos ABO na hemácia que se inicia pela natureza das estruturas lineares que se alongam em ramificadas, podendo conter até 60 moléculas de carboidratos, chamadas de poliglicosilceramidas.⁽⁵⁹⁾ Estas cadeias longas podem formar novos epítomos, enquanto as estruturas lineares possuem característica estrutural que reduz a avidéz das ligações com

os anticorpos. Assim, as estruturas lineares ou ramificações podem influenciar na reação antígeno-anticorpo e causar alterações na fenotipagem ABO.

Interações com genes *FUT2* e *FUT3* também pode afetar a expressão dos antígenos ABH na hemácia. As GTs Lewis são capazes de modificar alguns antígenos A e B presentes nas secreções, que podem ser absorvidos do plasma de indivíduos secretores para a membrana das hemácias e serem detectados pelos reagentes utilizados nas fenotipagens ABO.⁽¹⁷⁾ Portanto, ao determinar a base de um fenótipo fraco, é fundamental conhecer o fenótipo, por vezes o genótipo, Lewis e Secretor, para poder correlacionar os resultados a presença ou ausência de glicolipídios absorvidos na membrana das hemácias.

1.7. Análises sorológicas e moleculares

As análises sorológicas e moleculares utilizadas na resolução de casos com resultados fenotípicos ABO inesperados relatadas neste estudo, teve início em 2014, mas constituem a continuidade de um trabalho desenvolvido há mais de 20 anos no Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.^(60,61) A continuidade dos estudos na mesma linha de pesquisa possibilitou adequações e a consolidação de estratégias eficazes, que têm contribuído no esclarecimento de diversos casos raros, alguns com publicações em periódicos.^(48,62–64)

Nos últimos oito anos, recebemos 46 casos com resultados fenotípicos ABO inesperados e não resolvidos pelos testes de rotina dos serviços de origem. Analisamos também amostras de pacientes que apresentavam reatividade fraca ($\leq 2+$) ou CM em prova direta (dados não publicados). As amostras dos casos analisados foram testadas com antissoros de diferentes títulos, clones,

fabricantes, em tubo e coluna de gel. Análises moleculares dos genes *ABO* e *FUT2* foi utilizada em complementação nos casos não esclarecidos sorologicamente ou para correlação entre tipo e alteração fenotípica com genótipo ou seus polimorfismos.

Contudo, os resultados de nossa pesquisa, possibilitou maior entendimento de alguns dos fatores promotores das variações antigênica e das causas de resultados inesperados na fenotipagem ABO, além de contribuir com desenvolvimento de estratégias de resolução, com possibilidade de aplicação na rotina dos laboratórios de imunohematologia ou clínico (Anexo 1).

1.8. Principais contribuições deste estudo

As principais contribuições deste estudo são apresentadas a seguir, subdivididas em tópicos contendo comentários, discussão com fundamentação e conclusão.

1.8.1. Anticorpos monoclonais contendo maiores títulos auxilia na detecção dos antígenos ABO fracamente expressos.

Nossos resultados demonstraram que a utilização de anticorpos anti-A ou anti-A,B contendo títulos mais altos favorecem a identificação dos antígenos A fracamente expressos na hemácia. Além disso, observamos que o antissoro anti-A,B apresenta melhor resultado quando comparado com anti-A na mesma titulação.⁽⁶²⁾ Em alguns relatos de casos onde foi observado reatividade diferencial com anti-A,B em relação ao anti-A ou anti-B; os autores atribuíram a melhor reatividade a diferenças na especificidade do anticorpo (clone celular) ou simplesmente não apresentaram nenhuma explicação.^(65–70) Diante destes casos e de nossa observação que anti-A,B apresentava reação mais forte que anti-A

na mesma titulação, passamos a observar a reatividade diante do clone celular e o título dos antissoros nos casos de A ou B fraco. A maioria dos antissoros anti-A,B utilizados era uma mistura de clones de anti-A e anti-B; os mesmos utilizados separadamente. Isso permitiu observar que em muitos casos em que a reatividade estava ocorrendo com outro antissoro anti-A ou com o anti-A,B e não com o anti-A, não poderia ser atribuída ao clone, pois eram os mesmos em ambos os antissoros.⁽⁶²⁾ No entanto, apesar de não termos encontrado nenhuma reatividade atribuída a diferenças clonais nos casos analisados, não é possível excluí-las, pois os diferentes tipos de precursores e alongamento das cadeias podem formar novos epítomos, conforme apresentado anteriormente.

Como observado nos casos de A ou B fracos decorrentes de polimorfismos no gene ABO, os pacientes com doenças oncohematológicas (leucemias) e recém-nascidos (cadeias lineares) que foram analisados com anticorpos monoclonais de altos títulos (AMAT), quando o antígeno A ou B reagia fracamente ou não era detectado, também apresentaram melhora na intensidade ou passaram a ser reativos, respectivamente.⁽⁴⁸⁾

Contudo, a partir de nossos resultados podemos concluir que a maior concentração de anticorpos ABO presentes nos antissoros, favorece a detecção dos respectivos antígenos A ou B fracamente expressos. Os principais fundamentos para esta conclusão são:

- 1. Lei de ação em massa.** De acordo com esta lei, uma simples diluição ou concentração dos antígenos ou anticorpos na reação, sem alterar as quantidades absolutas, pode afetar significativamente o número de ligações por hemácia, para mais ou para menos. Ao realizar uma diluição adicionando

o dobro de plasma (prova reversa) ou antissoro (prova direta) a reação será melhorada somente se os anticorpos presentes forem de alta afinidade. Para melhorar a reatividade de anticorpos de baixa afinidade, é necessário aumentar a concentração dos anticorpos na reação.⁽⁷¹⁾

2. Afinidade e avides dos anticorpos ABO. A afinidade reflete a capacidade de ligação de cada sítio de ligação, enquanto a avides se refere à força de ligação total conferida pelos efeitos combinados de múltiplas ligações.⁽⁷¹⁾ A afinidade é dependente do sistema de grupo sanguíneo e do amadurecimento de sua resposta imune. As ligações individuais de anticorpos ABO são de afinidade relativamente baixa, no entanto, anticorpos da classe IgM possuem alta avides ao antígeno por possuir 10 locais de ligações.⁽⁷²⁾ Porém, os fenótipos fracos possuem menor concentração de antígenos, consequentemente, anticorpos IgM não conseguem completar todas as ligações pela indisponibilidade de antígenos, o que reduz a avides. Portanto, anticorpos de baixa afinidade são mais sensíveis às concentrações de antígenos e anticorpos enquanto os de alta afinidade são sensíveis a relação soro e hemácias.^(71,72)

3. Anticorpos monoclonais. Inicialmente os fenótipos ABO fracos foram detectados e classificados a partir de padrões de reatividade contra os anticorpos policlonais. Os anticorpos monoclonais surgiram na década de 1980, sendo amplamente utilizados nas rotinas dos laboratórios a partir da década de 1990, principalmente por serem mais facilmente padronizados e concentrados.⁽⁷³⁾ Com a utilização destes anticorpos mais concentrados, muitos dos subgrupos fracos identificados no passado, devem estar reagindo

mais forte agora e sendo definidos como fenótipos ABO sem alterações ou comuns. Assim como, aqueles subgrupos fracos que estão sendo detectados agora, devem estar apresentando reatividade ou padrões de intensidade de reatividade diferentes. Além disso, podemos apontar a utilização dos anticorpos monoclonais anti-A,B, composta de uma mistura de anti-A mais anti-B, por vezes até, anti-A, mais anti-B e anti-A,B.⁽⁷⁴⁾ Esta combinação pode reduzir o potencial Zeta e favorecer o acesso dos anticorpos específicos aos poucos antígenos presentes nas hemácias dos fenótipos A ou B fracos. Consequentemente, é esperado uma melhora na afinidade, pelo aumento do número de ligações das imunoglobulinas IgM aos antígenos, resultando na melhora da avidéz.^(62,71) Por outro lado, anticorpos monoclonais são menos tolerantes a variações na concentração e pH do que os policlonais, podendo não reagir se as condições não forem as ideais, requerendo maior cuidado com as soluções onde as hemácias são preparadas.⁽⁷⁵⁾

1.8.2. Alteração na concentração do anticorpo monoclonal anti-A elimina a reação de campo misto em subgrupos de A fraco.

Reatividade em CM possui causas conhecidas e bem definidas, sendo as mais comuns transfusões ABO não idênticos e quimeras artificiais (transplantes de medula óssea).⁽⁶³⁾ No entanto, a revelação de resultados em colunas de gel e os testes com as hemácias pré e pós separação do CM, permitiu observar uma diferença entre reação de CM decorrente de transfusões ABO não idênticos e quimeras, daqueles decorrentes de fenótipos ABO fracos, anteriormente classificados como A₃.⁽⁷⁶⁾ As amostras dos casos com suspeita de A₃ pelos testes sorológicos iniciais analisados neste estudo, foram testadas em prova direta com

um painel contendo 6 antissoros monoclonais (anti-A ou anti-B e anti-A,B), além dos testes iniciais com quatro configurações de cartões de fenotipagens ABO de dois fabricantes diferentes. Após agrupar os resultados dos primeiros casos, observamos reações divergentes entre os antissoros anti-A e/ou anti-A,B, desde fraca (w a 2+) a CM e normal (3 a 4+). A depender dos resultados de determinados conjuntos de antissoros, o mesmo indivíduo poderia ser classificado como A_w , A_3 ou A_2 , excluindo o A_1 somente pelo fato de serem negativos com lectinas anti- A_1 . Interpretando estes resultados, observamos que havia uma correlação entre o título dos antissoros e a reatividade em CM. Em conclusão, a reação de CM é resultado de uma correlação entre a baixa concentração de antígenos, presentes nos fenótipos A ou B fracos, contra uma determinada concentração de anticorpos e não uma característica exclusiva de subgrupo A_3 . Consequentemente, se esta correlação for desfeita a reação de CM deixa de existir, tornando-se uma reação mais fraca se a concentração dos anticorpos for diminuída ou mais forte se a concentração dos anticorpos for aumentada, desde que em ambas as situações a concentração de antígenos e o método de revelação não sejam alterados.

1.8.3. Subgrupo A_wB com anti- A_1 pode mascarar uma discrepância.

Observamos indivíduos A_wB , com hemácias não reativas com anti-A em prova direta devido fraca expressão do antígeno A, mas com plasma reativo com hemácias A_1 em prova reversa devido presença do anticorpo anti- A_1 , sendo classificados indevidamente como sendo do grupo B. O anti- A_1 é de ocorrência natural e comum em indivíduos AB, desprovidos dos antígenos A_1 .⁽¹⁷⁾ De acordo com as informações destes casos que recebemos para investigação, a suspeita

de que as classificações anteriores estavam erradas surgiu quando houve uma detecção fraca do antígeno A em prova direta pelo uso de diferentes reagentes e/ou metodologias. Análise retroativa identificou que reatividade com hemácia A₁ em prova reversa era fraca ($\leq 2+$) nas análises anteriores (método gel) e que a forma de resolução adotada para esclarecer esta alteração fenotípica em prova reversa foi a utilização de métodos para potencializar a reatividade com a hemácia A₁ (método tubo). Contudo, ressalta-se a importância da pesquisa do antígeno em prova direta e o risco de utilizar métodos que visam potencializar a reatividade do anticorpo em prova reversa. A figura 2 ilustra dois casos com fenótipo A_wB e o anticorpo anti-A₁.

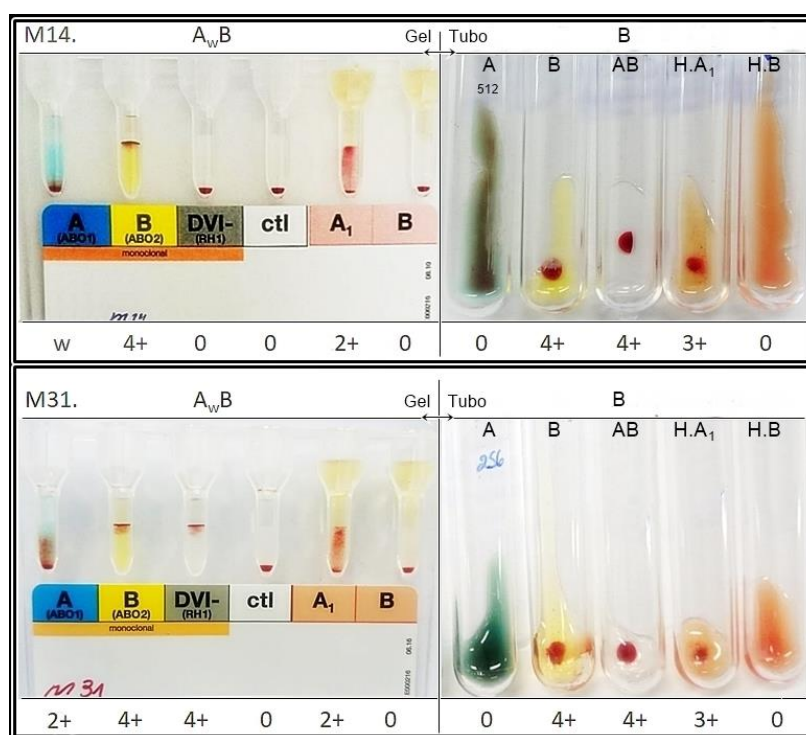


Figura 2: Demonstração de dois casos de A_wB com presença do anticorpo anti-A₁. Casos M14 (Doadora) e M31 (Doador) possuem história de doações de sangue classificados como B. Os testes com anticorpos monoclonais anti-A com títulos ≤ 512 não apresentaram reatividade, podendo ser classificados como B (tubo) se combinado com anti-A₁ fortemente reativo em prova reversa. Graduação de intensidade: 0 = não reagente; w, 1+, 2+, 3+ e 4+ = reagente. H.A₁ = Hemácia A₁; H.B = Hemácia B.

1.8.4. Separação das hemácias reativas em campo misto.

A separação de hemácias do CM observado nos resultados de fenotipagem ABO possibilitou a confirmação da existência de duas populações e a determinação dos fenótipos de cada população. Diante da necessidade em resolver casos apresentado CM, desenvolvemos um protocolo simples e eficaz para separação de hemácias reativas das não reativas do CM, utilizando os antissoros ABO, adaptado de Svensson e colaboradores.⁽⁷⁶⁾ Com esta técnica, as hemácias reativas e não reativas do CM foram separadas, permitindo a testagem e classificação ABO dos dois grupos de hemácias, dos casos de quimerismo ou mosaicismo. Por outro lado, a contribuição desta técnica para os casos de fenótipos ABO fracos é dada pela observação de que a fenotipagem após a separação, usando as hemácias não reativas do CM, apresenta reatividade de CM, com o mesmo padrão anterior a separação, quando testadas com o mesmo antissoro e nas mesmas condições.⁽⁷⁶⁾ Estes resultados possibilitam a exclusão de quimerismo ou mosaicismo dos casos de CM por fraca expressão ABO, onde a reatividade em CM é ocasionada pela fraca reatividade frente ao título (concentração) do antissoro utilizado, conforme discutido anteriormente. A técnica detalhada é apresentada no Anexo 2.

1.9. Objetivos

O presente estudo teve como objetivo geral identificar causas das variações antigênicas do sistema de grupo sanguíneo ABO em casos com resultados fenotípicos inesperados. Os objetivos específicos foram:

1. Identificar os antígenos ABO suspeitos ou fracamente expressos na hemácia;
 2. Compreender as divergências sorológicas promovidas pelos antissoros monoclonais utilizados na fenotipagem ABO;
 3. Realizar a identificação dos alelos e a confirmação dos antígenos ABO suspeitos ou fracamente expressos na hemácia;
 4. Esclarecer os casos com resultados ABO inesperados submetidos ao laboratório de Imunogenética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; e
 5. Compreender o mecanismo molecular responsável pelo controle da expressão dos antígenos ABO fracos.
-

2. ARTIGOS

2. ARTIGOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de quatro artigos; dois relacionados à fraca expressão do antígeno A, um com dupla população de células decorrente de mosaicismos hematopoiético e um com divergência hereditária do gene ABO em uma família devido à presença de alelo *cisAB*.

2.1. Artigo 1.

Título: Anti-A and anti-A,B monoclonal antisera with high titers favor the detection of A weak phenotypes.

Autores: Marcos Paulo Miola, Tatiana Elias Colombo, Roberta Maria Fachini, Octávio Ricci Junior, Cínara de Cássia Brandão de Mattos, Luiz Carlos de Mattos.

Periódico: Transfusion and Apheresis Science

Classificação: Impact Score (IS): 2.07; SCImago Journal Rank (SJR) = 0.583; h-index = 57; Overall Rank (OR)= 8533; Qualis/CAPES = B1.

2.2. Artigo 2.

Título: ABO discrepancy resolution in two patients with acute myeloid leukemia presenting the transient weak expression of A antigen.

Autores: Marcos Paulo Miola, Tharsis Cardoso de Oliveira, Andrea Aparecida Garcia Guimarães, Octávio Ricci-Junior, Luiz Carlos de Mattos

Periódico: Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Classificação: IS = 1.59; SJR = 0.396; h-index = 25; OR = 12175; Qualis/CAPES = B3.

2.3. Artigo 3.

Título: Mixed field resolution in ABO phenotyping in a rare case of a blood donor with hematopoietic mosaicism.

Autores: Marcos Paulo Miola, Cristiane da Silva Rodrigues de Araújo, Octávio Ricci Junior, Luiz Carlos de Mattos.

Periódico: Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Classificação: IS = 1.59; SJR = 0.396; h-index = 25; OR = 12175; Qualis/CAPES = B3.

2.4. Artigo 4

Título: Resolução de divergência na herança do gene *ABO* entre pais e filhos causada pela presença do alelo *cisAB*.

Autores: Marcos Paulo Miola, Janaína Guilhem Muniz, Octávio Ricci Junior e Luiz Carlos de Mattos.

Periódico: Não submetido

2.1. ARTIGO 1

ARTICLE IN PRESS

Transfusion and Apheresis Science xxx (xxxx) xxxx



Contents lists available at ScienceDirect

Transfusion and Apheresis Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/transci

Anti-A and anti-A,B monoclonal antisera with high titers favor the detection of A weak phenotypes

Marcos Paulo Miola^{a,*}, Tatiana Elias Colombo^b, Roberta Maria Fachini^c, Octávio Ricci-Junior^c, Cíntia Cássia Brandão de Mattos^a, Luiz Carlos de Mattos^a

^a Department of Molecular Biology, Medical School of São José do Rio Preto - FAMERP, São Paulo, Brazil

^b Department of Dermatological, Infectious and Parasitic Diseases, Medical School of São José do Rio Preto - FAMERP, São Paulo, Brazil

^c Department of Clinical Medicine, Medical School of São José do Rio Preto - FAMERP, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

ABO subgroups
Red blood cell phenotyping
Blood group genotyping
Antigen-antibody reactions

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to evaluate the reactivity and the titers of commercial anti-A and anti-A,B antisera in the detection of A weak antigen expression in human red blood cells.

Background: Commercial monoclonal antisera for ABO phenotyping are useful reagents allowing the identification of the four main ABO phenotypes (A, B, AB, and O). However, the reactivity of these commercial reagents can not be evident when the A or B antigens are weakly expressed, and these antisera have low titers.

Methods/Materials: Six samples from blood donors and five samples from patients with ABO forward and reverse discrepant phenotyping were evaluated. The ABO phenotyping was carried out with different commercial monoclonal anti-A and anti-A,B antisera under different temperatures, using test tubes and gel column agglutination.

Results: Monoclonal anti-A antisera with titers less than 256 and anti-A,B with titers less than 128 failed to detect the weak expression of A antigen in 73% and 67% of the A weak phenotypes, respectively. Titres equal to or higher than 2048 (anti-A) and 1024 (anti-A,B) showed better reactivity, independent of the cell clone.

Conclusion: Our data indicate that anti-A and anti-A,B antisera with high titers give better reactivity with red blood cells carrying A weak antigen expression.

1. Introduction

The serological identification of the four main ABO phenotypes requires the forward and reverse phenotyping tests. The results of both tests must be complementary to allow the correct phenotyping [1]. However, under some circumstances, discrepancies, which are defined as inconsistent results between forward and reverse phenotyping, can occur due to weak antigen expression on the red blood cells, faint expression of regular anti-A, and or anti-B antibodies, among others [1–4]. These discrepancies can be transitory as results of some diseases (cancer, leukemia, for instance) or resulting from polymorphisms in the exons of the ABO gene coding the functional region of the glycosyltransferases [3–7].

The ABO gene located at chromosome 9 (q34.2) contains various single nucleotide polymorphisms, which reduces the affinity of the encoded glycosyltransferases for the H antigen [6,7]. Additionally, the availability of this substrate within the Golgi apparatus affects the level of A and B antigens expressed in the red blood cell membrane creating

A or B weak phenotypes, which can present discrepancies between forward and reverse phenotyping [8–11].

Most of the discrepancies observed in the ABO forward and reverse phenotyping can be solved with an extensive serological approach to confirm the presence or absence of the A or B antigens [1,12]. However, the resolution of some discrepancies is not so simple. Sometimes it is necessary to associate different serological methods with distinct cell clones combined with molecular analysis [13,14]. Even thus, some cases present complexities that are not always resolved by serological and molecular analysis.

Some studies analyzed the reactivity of ABO commercial antisera using red blood cells with weak A antigen expression. One of them, based on the data of a reference laboratory, reported variability in the reactivity of monoclonal anti-A and anti-A,B commercial antisera [15]. The other one also observed differences in the reactivity of monoclonal antibodies tested in forwarding phenotyping (anti-A non-reactive, and anti-A,B weakly reactive) [13]. These studies demonstrate that ABO commercial monoclonal antisera might fail in cases where the A and or

* Corresponding author.

E-mail addresses: mpmiola@hotmail.com (M.P. Miola), luiz.demattos@edu.famerp.br (L.C. de Mattos).

<https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102865>

Received 29 April 2020; Received in revised form 4 June 2020; Accepted 18 June 2020

1473-0502/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ARTICLE IN PRESS

M.P. Miola, et al.

Transfusion and Apheresis Science xxx (xxxx) xxx

B antigens are faintly expressed.

The reports above mentioned rise up an essential concern about the inability of commercial antisera in detecting A weak antigen expression in human red blood cells. However, these reports did not evaluate the titers of commercial antisera used to ABO phenotyping. This study evaluates the reactivity and the titers of commercial anti-A, anti-A,B antisera commercialized by different suppliers in the detection of A weak antigen expression in human red blood cells.

2. Material and methods

2.1. Ethical aspects of the research

This study was approved by the Ethics and Research Committee from Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (case 784.164). All participants were informed about the objectives of the study and signed the informed consent form.

2.2. Casuistic

Six samples from blood donors (BD) and five samples from patients (PT) with ABO forward and reverse phenotyping discrepancies or discordant results concerning previous annotations, were sent to our laboratory for additional investigations. All the BD were able to donate, and the PT had a history of a medical prescription for transfusion due to elective surgery or low hemoglobin levels. No information about the physiopathological evidence that could affect the expression of red blood cell ABO antigens or serum antibodies from all BD and all PT were informed to our laboratory by senders. Table 1 shows the data of the BD and PT as informed by sample senders.

2.3. Adopted criteria to recognize discrepancies in the ABO phenotyping

We adopted the following criteria to identify an ABO discrepancy: inconsistent results between the forward and the reverse ABO phenotyping; unexpected reactions that might hide a potential discrepancy; divergence between previous and current results reported by the sample senders (Table 1). The variant ABO phenotypes were assigned in general terms as A_{weak} in cases where the subgroup status could not be determined.

2.4. Standard phenotyping

Forward and reverse ABO phenotyping were carried out using standard test tubes with commercial antisera anti-A (cell lines: 9113D10, Birma-1, and 11H5), anti-B (cell lines: 9621A8, LB-2, and ES-4), and Anti-A,B (cell lines: 9113D10 + 152D12, ES-15 + Birma-1 + LB-2, and ES-15 + Birma-1 + ES-4) from five different manufacturers.

Additionally, ABO phenotyping was performed: 1 - using commercial gel column agglutination (CAT) [ID-card ABO/D + Reverse Grouping (CAT 1)], containing monoclonal anti-A (cell line A5) and anti-B (Cell lines: G1/2) antibodies; 2 - ID-Card DiaClon ABO/Rh for newborns (CAT 2) containing the monoclonal anti-A [Cell lines: A: LM297/628 (LA-2)], and anti-B [Cell line: LM306/686 (LB-2)], and anti-A,B [Cell line: ES131 (ES-15), Birma-1, ES-4] antibodies. Commercial A₁ and B red blood cells (DiaMed - Latin America, Brazil) were used in both test tubes and CAT for reverse phenotyping. The red blood cells from blood donors and patients were tested with anti-A1 (*Dolichos biflorus*) and anti-H (*Ulex europaeus*) lectins in tubes as well as in CAT. All manufacturers' instructions were strictly followed.

2.5. Modified phenotyping

We performed a modified forward and reverse ABO phenotyping using different temperatures and incubation times as well as red blood cells treated with enzymes (bromelain) to potentialize the agglutination reactions [1]. Adsorption and elution tests were also performed. All these tests were performed using ID-Card NaCl (Neutral gel: NG) and ID-Diluent 1 Bromelain (DiaMed - Latin America, Brazil) with the same commercial antisera and red blood cells.

2.6. Titration of anti-sera anti-A and anti-A,B

All commercial antisera anti-A and anti-A,B used were previously titrated using A₁, A₂, and A₂B red blood cells, according to American Association Blood Bank's protocol [1], and with the certificates of analysis provided by the commercial suppliers, and the recommendations from Brazilian Health Ministry legislation for transfusional medicine [16]. We used antisera from the different commercial suppliers in Brazil identified as M1, M2, M3, M4.1, M4.2, and M5. Some of them belong to the same cell clone and two (M4.1 and M4.2), from the same supplier.

2.7. Extraction of genomic DNA

Genomic DNA from white blood cells was extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). All manufacturers' instructions were strictly followed.

2.8. Molecular analysis

We used a protocol to analyze the single nucleotide polymorphism 261delG of the exon 6 by PCR-RFLP as well as amplified fragments from exon 2 to exon 7 of the ABO gene for sequencing analysis [17]. The amplified fragments from these exons were sequenced using commercial kits BigDye Terminator and ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer

Table 1
Data from blood donors (BD) and patients (PT) as informed by sample senders.

Cases	ABO Grouping			Previous observations
	Red Cells	Serum	Previous record	
C1-PT	O	A	O	A antigen not investigated in previous sample.
C2-PT	AB	B	NA	Negative agglutination with two different anti-A.
C10-BD	O	A	NA	A antigen investigated but not detected.
C14-BD	B	B	AB	Phenotype divergent from the previous donation.
C18-BD	AB	AB	B	Phenotype divergent from the previous donation.
C21-BD	AB	B	NA	Presence of an irregular anti-A1.
C25-BD	O	A	O	Divergent, positive and negative eluate results
C26-PT	O	A	NA	Positive with anti-A,B monoclonal antibody
C27-PT	O	A	NA	Positive with anti-A,B monoclonal antibody
C28-PT	O	A	NA	Divergent, eluate not investigated
C31-BD	AB	B	B	Phenotype divergent from the previous donation.

NA: data not available.

ARTICLE IN PRESS

M.P. Miola, et al.

Transfusion and Apheresis Science xxx (xxxx) xxx

(Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). The Sequence Scanner Software 2 (Applied Biosystems Software) and the BioEdit sequence alignment editor were used [18]. The ABO sequences obtained were aligned with the NCBI Reference Sequence for *ABO*A1.01* (NG_006669.1) using the software BioEdit [18].

2.9. Score agglutination

The agglutination score followed the proposition by Marsh [19], revised by the American Association of Blood Banks [20].

2.10. Molecular adopted nomenclature

We adopted the terminology for the ABO gene and alleles, according to the International Society of Blood Transfusion (ISBT) (www.isbtweb.org) [21].

3. Results

3.1. Serological data

The results of the serological analysis are showed in Table 2. All the samples evaluated (six A, five AB) presented weak expression of A antigen according to the agglutination score adopted. An irregular anti-A1 antibody was detected in four samples (C2-PT, C14-BD, C21-BD, C31-BD).

The C10-BD sample showed reactivity only in the eluate test. The red blood cells from the other samples showed distinct reactivity in the forward phenotyping when tested with antisera anti-A in CAT, independent of the treatment or non-treatment with the enzymes.

The samples C2-PT, C14-BD, C21-BD, and C31-BD showed reactivity in the reverse phenotyping in test tubes with A red blood cells. On the other hand, the remaining samples (except C18-BD) presented distinct reactivity with A red blood cells in reverse phenotyping, in the modified methods. All samples did not react with anti-A1 lectin but reacted with anti-H lectin. All eluates presented reactivity with A red blood cells.

Table 3 shows the results of the serological evaluation of the samples with anti-A and anti-A,B antisera, with different titration. We observed that the anti-A and anti-A,B antisera from the same cell clone, but commercialized by different manufacturers and presenting different titrations, showed distinct reactivity with samples carrying the weak expression of the A antigen in test tubes and CAT at 4 °C and 22 °C. Except for C10-BD sample, all other samples presented better reactivity in modified methods from antisera with high titrations.

The antisera anti-A from cell clone 9113D10, commercialized by different suppliers, presented the same reactivity with all samples when the titrations were equivalent, except for the C10-BD sample. The

behavior of the antisera anti-A from cell clone BIRMA-1 was equivalent to the antisera anti-A from cell clone 9113D10 under the same conditions. The anti-A antisera from cell clone 11H5 (titer 512) presented similar reactivity to the anti-A antisera from cell clones 9113D10 and BIRMA-1 (titer 1024) (Table 3).

3.2. ABO molecular analysis by PCR-RFLP and sequencing

The common deletion 261delG at the exon 6 was identified by PCR-RFLP only in the samples C1-PT, C25-BD, C26-PT, C27-BD, C28-BD, and C10-BD. The sequencing analysis confirmed the heterozygote genotype, with an A allele and one deletional O allele. An insertion c.804 in. G at exon 7 was found at the sample C10-BD, which is compatible with the *ABO*AEL.01* allele. The sequencing of the exons 2 to 7 from sample C25-BD revealed the presence of the mutations c.297A>G, c.646T>A, c.681G>A, c.771C>T, and c.829G>A which allowed us to identify the allele *ABO*AW31.01*. The sequencing of the sample C31-BD showed the mutations c.46G>A, c.106G>T, c.188G>A, c.220C>T, c.467C>T and c.1061delC which allowed the identification of the allele *ABO*AW.09*.

The samples C1-PT, C2-PT, C-14-BD, C18-BD, C21-BD, C26-PT, C27-PT, C28-PT were sequenced in the exons 6 and 7 and the only the mutations c.467C>T and c.1061delC were identified in all of them. The samples carrying the AB phenotype presented the single nucleotide polymorphisms (c.297A>G, c.526C>G; c.657C>T, c.703G>A, c.796C>A, c.803G>C, c.930G>A) that allowed to confirm the presence of the B allele in these cases.

4. Discussion

This study evaluated eleven blood samples from BD and PT, which presented discrepancies in the forward and reverse phenotyping, or discordant results concerning previous annotations in the medical records informed by the sample senders. To resolve these cases, we explored a serological approach determining the titration of the commercial antisera in combination with molecular analysis based on PCR-RFLP and sequencing. These strategies allowed us to demonstrate the presence of A antigen through the reactivity of eluates from all samples as well as infer the presence of a functional A weak allele in the genotypes through the molecular approach. By the author's knowledge, this is the first study evaluating the commercial antisera titration applied to detect the weak expression of A antigen.

Our data showed variability in the weak reactivity of red blood cell samples evaluated, which seems to be dependent on the titration of anti-A and anti-A,B commercial antisera, but not necessarily from the cell clone from which they come. Previous observations support the view that the serological performance of the antisera correlates their

Table 2
Serological and molecular data from ten cases presenting the weak expression of A antigen.

Cases	Antisera (FP)			Red blood cell (RP)		Lectins		Eluates	Phenotypes	Genotypes
	A	B	AB	RA	RB	A ₁	H	A ₁		
C1-PT	0	0	0	0	4	0	4	4	A _{weak}	A/O
C25-BD	0	0	0	0	4	0	4	4	A _{weak}	A/O
C26-PT	0	0	W	0	4	0	4	3	A _{weak}	A/O
C27-PT	0	0	1	0	4	0	4	4	A _{weak}	A/O
C28-PT	0	0	0	0	4	0	4	3	A _{weak}	A/O
C10-BD	0	0	0	0	4	0	4	2	A _{el}	A/O
C2-PT	w	4	4	0	0	0	2	4	A _{weak} B	A/B
C14-BD	0	4	4	2	0	0	2	4	A _{weak} B	A/B
C18-BD	1	4	4	0	0	0	2	4	A _{weak} B	A/B
C21-BD	1	4	4	1	0	0	2	4	A _{weak} B	A/B
C31-BD	1	4	4	2	0	0	2	4	A _{weak} B	A/B

FP: Forward Phenotyping; RP: Reverse Phenotyping; Results of the phenotyping ABO standard method using CAT 1 and CAT 2; Anti-A₁ was reactive in C2-PT and showed stronger results in C14-BD, C21-BD, and C31-BD in the tube test (results not shown).

Table 3

Evaluation of the reactivity of the antiserum with predetermined titers.

Antisera	Cell clones	Suppliers ^a	Titration ^b A ₂	Cases										
				C1-PT	C25-BD ^c	C26-PT	C27-PT	C28-PT	C10-BD ^d	C2-PT	C14-BD	C18-BD	C21-BD	C31-BD ^e
Anti-A	9113D10	M1	256	0	0	0	W	0	0	1	0	0	W	0
		M3	1024	1	0	0	1	W	0	3	1	MF	MF	W
		M2	2048	2	1	1	2	1	0	3	1	2	3	1
	BIRMA-1	M4.1	128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		M4.2	1024	–	W	0	1	W	0	–	W	MF	MF	W
Anti-A,B	11H5	M5	512	–	0	0	1	0	0	–	W	MF	MF	0
	9113D10, 152D12	M1	128	0	0	0	2	MF	0	–	–	–	–	–
		M2	256	2	0	0	3	MF	0	–	–	–	–	–
		M3	1024	2	3	1	4	4	0	–	–	–	–	–
	ES-15, BIRMA-1, LB-2	M4.1	64	0	0	0	W	0	0	–	–	–	–	–
		M4.2	2048	–	4	2	4	4	0	–	–	–	–	–
	ES-15, BIRMA-1, ES-4	M5	512	–	0	0	4	3	0	–	–	–	–	–

MF: Mixed Field; Results of the phenotyping ABO using ID-Card NaCl at 22 °C.

^a Different commercial suppliers in Brazil.^b The titer was previously determined with A₂ red blood cells.^c ABO*AW31.01.^d ABO*AE1.01.^e ABO*AW09.01.

antibody concentrations [22]. Besides, the ability of ABO blood grouping reagents to detect low levels of antigens in ABO subgroups can be influenced by the concentration or titer of the anti-A and anti-B antibodies [23,24].

We observed that the anti-A from cell clone 9113D10 reacted only with three samples at the titration 256 but reacted with 9 samples at the titration 2048. Similar reactivity was observed with anti-A from cell clone BIRMA-1. However, this anti-A antisera did not show reaction with any of the samples at low titration (128). An international consensus recommends that commercial ABO antisera must have a minimum of potency able to detect ABO antigens in red blood cells since the haemagglutination tests vary widely in their sensitivity and reproducibility between laboratories [23]. Our data demonstrate that variations in the concentration of anti-A and anti-B antisera belonging to the same cell clones and commercialized by different suppliers might affect the performance of haemagglutination tests.

The same serological behavior observed with the anti-A antisera and related to titration was also observed with the anti-A,B antisera. For instance, the anti-A,B antisera from mixing cell clones 9113D10 (anti-A) plus 152D12 (anti-B), reacted at the titration of 128, only with two from six evaluated samples, but reacted with five samples, at the titration of 1024. Similar reactivity was observed with anti-A,B from cell clone BIRMA-1 (anti-A) mixed with the cell clones ES-15 (anti-A), LB-2 (anti-B) and or ES-4 (anti-B). These observations support the proposition that the antibody levels of commercial antisera for blood typing seems to be important in determining their performance [22].

Our data also show that anti-A and anti-A,B commercial antisera with elevated titration increase the score of haemagglutination towards to eliminate the MF reaction. Two of the samples (C18-BD, C21-BD) presenting MF reaction at the titration 1024, showed higher agglutination score at titration 2048 when tested with anti-A from the cell clone 9113D10. One of the samples tested with anti-A,B (cell clone 9113D10 plus 152D12) presenting MF reaction at titration 128 and 256, showed strong reactivity when tested with the same antisera at the titration 1024. These observations reinforce the proposition that higher titers of antisera improve the score of agglutination, allowing the disappearance of MF reaction. The anti-A (cell clone BIRMA-1) did not react at titer 128 but showed MF at titer 1024. As this cell clone with titer higher than 1024 was unavailable we can not confirm the disappearance of the MF.

Red blood cells presenting MF with the expression weak of ABO antigens are not necessarily positive and negative. Evaluation of ABO subgroups presenting MF carried out by flow cytometry demonstrated

the presence of A antigen in all red blood cells with similarities to A_x and A₂ phenotypes [25–27].

All red blood cells in MF do not react totally with low titer antisera anti-A and anti-A,B. Maybe, the small quantities of A or B antigens present a spatial distribution on the red cell membrane that does not favor the occurrence of antibody bridges between all red blood cells [28]. Therefore, antisera with high titers of anti-A and or anti-B antibodies might reach A and or B antigens spread on the red blood cell surface, reacting with them with more intensity, eliminating the MF reaction. Additionally, increasing antibody concentration on the mixed anti-A,B (anti-A + anti-B) antisera modify the zeta potential, allowing red blood cell agglutination with weak expression of antigen A even in lower titers.

This study presents some limitations. Firstly, it evaluated a small number of cases. Secondly, the sequencing of the ABO exons (2 to 7) was performed for some samples and in which the alleles and genotypes were revealed. In the remaining samples, the sequencing was performed only for the exons 6 and 7. However, these limitations did not prevent us from demonstrating that low titers of antisera fail to detect the weak expression of antigen A in red blood cells.

In conclusion, the data observed in this study suggest that anti-A and anti-A,B commercial antisera with high antibody titers give better reactivity with red blood cells carrying a weak expression of A antigen.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/ São Paulo Research Foundation (FAPESP 2012/07716-9 to LCM). The opinions, assumptions, and conclusions or recommendations expressed in this material are the responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the FAPESP

CRediT authorship contribution statement

Marcos Paulo Miola: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft. **Tatiana Elias Colombo:** Validation, Resources. **Roberta Maria Fachini:** Resources, Writing - review & editing. **Octávio Ricci-Junior:** Resources, Writing - review & editing. **Cinara Cássia Brandão de Mattos:** Funding acquisition, Resources, Writing - review & editing. **Luiz Carlos de Mattos:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Resources, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

- [1] AABB. Technical Manual. 18th ed. AABB; 2014.
- [2] Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest* 2008;55:174–82. <https://doi.org/10.2152/jmi.55.174>.
- [3] Cai X, Jin S, Liu X, Fan L, Lu Q, Wang J, et al. Molecular genetic analysis of ABO blood group variations reveals 29 novel ABO subgroup alleles. *Transfusion* 2013;53:2910–6. <https://doi.org/10.1111/trf.12168>.
- [4] Yudin J, Hedde NM. A 13-question approach to resolving serological discrepancies in the transfusion medicine laboratory. *Lab Med* 2014;45:193–206. <https://doi.org/10.1309/LMEWVSNT2F3O5JDN>.
- [5] Daniels G. Human Blood Groups: Introduction. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2013.
- [6] Yamamoto F, Cid E, Yamamoto M, Blancher A. ABO research in the modern era of genomics. *Transfus Med Rev* 2012;26:103–18. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2011.08.002>.
- [7] Storry JR, Olsson ML. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology* 2009;25:48–59.
- [8] Stanley P. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005199>.
- [9] Salmon C, Cartron JP. [Allelic enhancement]. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1976;19:145–55.
- [10] Hassinen A, Rivinoja A, Kauppi A, Kellokumpu S. Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells. *J Biol Chem* 2010;285:17771–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103184>.
- [11] Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Rodrigues MJ, Chester MA, Olsson ML. ABO exon and intron analysis in individuals with the AweakB phenotype reveals a novel O1v-A2 hybrid allele that causes four missense mutations in the A transferase. *BMC Genet* 2003;4:17. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-4-17>.
- [12] Quraishi N, Sapatnekar S. Advances in blood typing. *Adv Clin Chem* 2016;77:221–69. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.06.006>.
- [13] Goebel M, Halm-Heinrich I, Parkner A, Rink G, Heim MU, Bugert P. A novel ABO gene variant leads to discrepant results in Forward/Reverse and molecular blood grouping. *Transfus Med Hemother* 2013;40:454–8. <https://doi.org/10.1159/000356378>.
- [14] Storry JR, Condon J, Hult AK, Harrison A, Jørgensen R, Olsson ML. An age-dependent ABO discrepancy between mother and baby reveals a novel A(weak) allele. *Transfusion* 2015;55:422–6. <https://doi.org/10.1111/trf.12840>.
- [15] Moulds MK. Review: monoclonal reagents and detection of unusual or rare phenotypes or antibodies. *Immunohematology* 2006;22:52–63.
- [16] BRASIL. Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017 - ministério da saúde. Consolidação Das Normas Sobre as Ações E Os Serviços De Saúde Do Sistema Único de Saúde. 2017. p. 930 (Accessed 23 August 2018). <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/MattrizesConsolidacao/Matriz-5-Programas.html>.
- [17] Miola MP, Lopes AG, Silva AP, Gomes EGC, Machado LAF, Veloso WA, et al. Hematopoietic chimera in a male blood donor and his dizygotic twin sister. *Transfus Med Hemother* 2019;0:1–6. <https://doi.org/10.1159/000495583>.
- [18] Hall TA. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. 1999. p. 95–8.
- [19] Marsh WL. Scoring of hemagglutination reactions. *Transfusion* 1972;12:352–3. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.1972.tb04459.x>.
- [20] Roback JD, Grossman BJ, Harris TH. American association of blood banking technical manual. In: AABB Editor. Am. Assoc. Blood Bank. Tech. Man. 17th ed. Bethesda; 2011. p. 863–74.
- [21] International Society of Blood Transfusion. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology; 2020 Working Party n.d. (Accessed March 29, 2020). <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>.
- [22] Le Pendu J, Henry S. Section 2: immunochemical, immunohistological and serological analysis of monoclonal antibodies with carbohydrates. Coordinator's report. *Transfus Clin Biol* 2002;9:55–60. [https://doi.org/10.1016/s1246-7820\(01\)00217-8](https://doi.org/10.1016/s1246-7820(01)00217-8).
- [23] Thorpe SJ, Fox B, Heath AB, Scott M, de Haas M, Kochman S, et al. International standards for minimum potency of anti-A and anti-B blood grouping reagents: evaluation of candidate preparations in an international collaborative study. *Vox Sang* 2006;91:336–44. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2006.00834.x>.
- [24] Perry H, Bovin N, Henry S. A standardized kocyte method to quantify ABO antibodies in undiluted plasma of patients before ABO-incompatible kidney transplantation. *Transfusion* 2019;1–10. <https://doi.org/10.1111/trf.15247>.
- [25] Hult AK, Olsson ML. Many genetically defined ABO subgroups exhibit characteristic flow cytometric patterns. *Transfusion* 2010;50:308–23. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02398.x>.
- [26] Hult AK. Flow cytometry in transfusion medicine: an overview. *ISBT Sci Ser* 2018;13:3–10. <https://doi.org/10.1111/vox.12365>.
- [27] Svensson L, Bindila L, Angström J, Samuelsson BE, Breimer ME, Rydberg L, et al. The structural basis of blood group A-related glycolipids in an A3 red cell phenotype and a potential explanation to a serological phenomenon. *Glycobiology* 2011;21:162–74. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq143>.
- [28] Quinley ED. Immunohematology - Principles and Practice. Third Jones & Bartlett Learning; 2011. p. 106.

2.2. ARTIGO 2

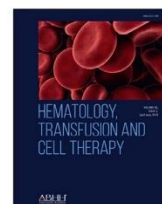
ARTICLE IN PRESS

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;xxx(xx):1–4



HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY

www.htct.com.br



Case Report

ABO discrepancy resolution in two patients with acute myeloid leukemia presenting the transient weak expression of A antigen

Marcos Paulo Miola , Tharsis Cardoso de Oliveira,
 Andrea Aparecida Garcia Guimarães, Octávio Ricci-Junior,
 Luiz Carlos de Mattos *

Molecular Biology Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São Paulo, SP CEP 15090-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 August 2021

Accepted 28 January 2022

Available online xxx

Introduction

ABO, P1PK, LE, H, I, GLOB, and FORS are blood group systems characterized by the expression of carbohydrate antigens in hematopoietic, non-hematopoietic tissues and exocrine secretions. These antigens are synthesized by specific glycosyltransferases adding monosaccharide units to oligosaccharide precursors. The hematopoietic disturbance in some oncohematological diseases affects the expression of ABO, H, and I glycosyltransferases, reducing the synthesis of A and B carbohydrate antigens modifying red blood cell (RBC) phenotypes.¹ Acute myeloid leukemia (AML) can induce the transitory loss of RBCs carbohydrate antigens, especially from the ABO system allowing discrepancies in the forward and reverse phenotyping.² A consistent explanation for this phenomenon is the

DNA hypermethylation of the ABO promoter, which underlies the loss of ABO allelic expression in leukemic patients.^{3,4}

These set of events contribute to the expression of natural specific autoantibodies to the ABO, H, and I carbohydrate antigens such as anti-I e anti-IH, anti-i, anti-H, and anti-IA. The majority of these autoantibodies react near 4°C and generally do not interfere in ABO reverse phenotyping. However, in some cases, these cold autoantibodies react at room temperature affecting the correct ABO phenotyping. Anti-I is a common cold antibody that reacts with adult RBCs but can react weakly or not react with cord blood RBCs. This autoantibody sometimes occurs in patients with acute leukemia blood plasma due to the loss of the I antigen and leftover of the i antigen.¹ Anti-IH is a cold antibody that reacts with RBCs expressing both I and H antigens. Its reactivity depends on the quantities of H antigen, which vary according to the ABO phenotypes (O>A₂>B>A₂B>A₁>A₁B). The anti-IH shows a better reaction with RBCs from adults, especially O, compared to A₁.⁵

Here we report the loss of A antigen in the RBCs and the concomitant presence of cold autoantibodies in two cases of

* Corresponding author.

E-mail address: luiz.demattos@edu.famerp.br (L.C. de Mattos).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.01.015>2531-1379/© 2022 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ARTICLE IN PRESS

2

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;xxx(xx):1–4

Table 1 – Clinical and laboratory features of 1 and 2 cases.

Features	Case 1	Case 2
Gender/ Age (years)	Female / 79	Female / 56
Diagnosis (WHO Classification)	AML (Unclassified)	Therapy-related to acute myeloid leukemia (tAML)
Flow cytometry	CD34, CD117, HLA-DR, CD45, CD38, CD13, CD33, CD64, MPO, CD56	CD34, CD117, HLA-DR, CD45, CD38, CD33 and CD13.
Cytogenetics	Not Performed	46, XX -21, t(21;?)(q11;?)
ABO phenotyping (Under AML)	O	O (Forward) / A (Reverse)
Cells at diagnosis	32% immature myeloid cells with anomalous CD56	35% immature myeloid cells with anomalous CD45
Hypomethylating drugs	5-Azacitidine, Decitabine	5-Azacitidine
After treatment with hypomethylating	Primary, complete response (DRM negative). After a relapse, 5% of immature myeloid cells (anomalous CD56 and CD7) were observed.	Presence of 11% immature myeloid cells (anomalous CD45, CD56).
ABO phenotyping (After AML)	A, (Complete Response)	A (Partial Remission)

AML patients. Table 1 shows the clinical and laboratory features of cases 1 and 2.

Case presentation

Case 1

A female patient aged 79, diagnosed with AML in December 2017 (Table 1), needed platelet transfusion due to thrombocytopenia ($11,000/\text{mm}^3$). The first pretransfusional test carried out at that time showed that she had O phenotype and weak plasma reactivity with A₁ RBC (2+) than B RBC (4+) (Table 2 and Figure 1A). Six RBC samples phenotyped in one month by routine test showed the O phenotype. When tested with high-titer monoclonal antisera (HTMA) anti-A (2048; cell clone 9113D10; Fresenius-Kabi, Brazil; Lorne Laboratories, UK) and anti-A,B (1024; cell clone 9113D10+152D12, Fresenius-Kabi, Brazil; Lorne Laboratories, UK; cell clone ES-15+Birma-1+LB-2, Prothemo, Brazil; Ebram, Brazil), these same samples revealed the presence of A antigen. The reappearance of the A antigen in the RBC was concomitant with reducing the agglutination with anti-H lectin. She presented an anti-I IgM cold autoantibody reacting strongly with A and O adult RBCs but not with O RBCs from cord blood. After six months, she was phenotyped as A by a routine test showing the reappearance of the A antigen. Molecular analysis of exon 6 of the ABO gene showed the AA genotype (Figure 1A).⁶

Case 2

A female patient aged 56 with a history of breast cancer in 2013 and treated with chemotherapy and radiation therapy was diagnosed with therapy-related myelodysplastic syndrome (tMDS) in 2019 and overt therapy-related AML (tAML) in May 2020 (Table 1), undergoing treatment with 5-azacitidine with no induction, presented A blood type according to the forward and reverse phenotyping. In 20 days of follow-up, routine tests showed reduction and

loss of the A antigen. Tests with the same HTMA anti-A (2048) and anti-A,B (1024) used in the investigation of case 1, revealed A antigen. The loss of the A antigen in the RBC, detected after tAML, was concomitant with increased agglutination with anti-H lectin. She presented an anti-IH IgM cold autoantibody reacting with O adult RBCs but not with O RBCs from cord blood and a weak reaction with A RBCs (Table 2). Molecular analysis of exon 6 of the ABO gene showed the AO genotype (Figure 1B).⁶

Discussion

This report of two cases of AML shows the loss and the reappearance of A antigen in the RBCs. The first patient presented an O blood type at admittance but recovered her original A blood type after complete remission of the disease. The second patient was phenotyped as A blood type, but she remained O blood type after losing the A antigen. She recovered her original A blood type after the partial remission of the disease. The loss of ABO carbohydrate antigens from RBCs is a known phenomenon in myeloid malignancies.⁷ DNA methylation affects the gene regulation of the ABO gene underlying the loss of ABO allelic expression in a significant proportion of leukemia patients.^{3,4} Both patients reported here recovered their original A blood type after treatment with hypomethylating drugs.

We applied a modified protocol using high titers of anti-A and anti-A,B antisera as performed in our previous publication to resolve these two cases.⁸ In case 1, the patient's plasma presented weak reactivity (2+) with A RBCs and strong reactivity (4+) with B RBCs in the reverse phenotyping. This result was concordant with the forward phenotyping but attracted our attention since a strong reactivity (4+) of the O blood type plasma is expected with A₁ and B RBCs in the reverse phenotyping. We used a modified protocol in which the patient RBCs were tested with a HTMA anti-A (2048) and anti-A,B (1024) in column agglutination technology (CAT). We observed a weak reaction (+1) with anti-A and a strong (+4) with anti-A,B. These

Table 2 – Results of phenotyping and ABO genotyping

Table 2 – Results of phenotyping and ABO genotyping																	
Characteristics		Routine ABO Phenotyping				Extended ABO Investigation											
Cases	Samples / Days	Forward		Reverse		Reverse Phenotyping		Lectins		Eluate RBCs A ₁	Forward HTMA				Phenotypes	Genotypes	
		CAT				Tube 22°C		CAT-NG			CAT-NG						
		A	B	RA ₁	RB	RA ₁	RB	O _i adult	O _i cord		Anti-A ₁	Anti-H	A ^c	B			A ₁ B ^d
1	1/D0	0	0	2 ^a	4	0	4	4 ^a	0	0	4	3	1	0	3	A	A/A
	6/D103	0	0	2 ^a	4	0	4	3 ^a	0	0	4	3	1	0	4	A	-
	7/ D204	4	0	0	4	A	1 ^a	4	1 ^a	0	3	2	-	-	-	A	A/A
2	15/D471	4	0	0	4	A	0	4	0	4	1	-	-	-	-	A	-
	2/D3	4	0	0	4	A	W ^b	4	3 ^b	4	2	-	-	-	-	A	A/O
	4/D9	1	0	0	4	ND	0	4	2 ^b	0	3	4	2	0	4	A	A/O
	6/D20	0	0	0	4	ND	0	4	2 ^b	0	4	3	1	0	3	A	-
	7/D394	4	0	0	4	A	0	4	1 ^b	0	4	1	-	-	-	A	A/O
CAT: Column Agglutination Technology; CAT-NG: Column Agglutination Technology – Neutral Gel; RBCs: Red Blood Cells; HTMA: High-Titers Monoclonal Antisera; ND: Not Determined; D: Day.																	
^a Anti-I.																	
^b Anti-IH																	
^c Anti-A (titer 2048).																	
^d Anti-AB (titer 1024).																	

CAT: Column Agglutination Technology; CAT-NG: Column Agglutination Technology – Neutral Gel; RBCs: Red Blood Cells; HTMA: High-Titers Monoclonal Antisera; ND: Not Determined; D: Day.

^a Anti-I.^b Anti-IH.^c Anti-A (titer 2048).^d Anti-AB (titer 1024).

data are concordant with the results of the eluate testing by the Lui freeze-thaw elution technique.⁵

Extended investigations performed in tubes reveal the presence of a cold autoantibody anti-I reacting with adult A and O RBCs but not with cord blood O RBCs. This cold anti-I antibody created a false concordance between the forward and the reverse phenotyping leading to a misinterpretation of the patient ABO type as O. This false concordance has hidden the absence of the A antigen in the patient RBCs. This fact agrees with our previous observations in which we show an anti-A₁ irregular antibody with the same behavior.⁸

In case 2, the patient plasma did not react with A₁ RBC but showed strong reactivity (4+) with B RBC in the reverse phenotyping in CAT, with no discrepancies in the forward and reverse phenotyping. In a third and fourth blood sample, the patient RBCs showed a weak reaction with anti-A (2+ and 1+, respectively) in CAT. The fifth and sixth samples showed the complete disappearance of the A antigen from the RBCs. This result attracted our attention to investigate the potential disappearance of the A antigen. We used a modified protocol using high titers of anti-A and anti-A,B antisera in CAT.⁸ We observed a strong reaction of the patient RBC with a titer equal to or higher than 2048 and 1024, for anti-A and anti-A,B, respectively. These data are concordant with the results of the eluate testing. Extended investigations performed in tubes reveal a cold autoantibody anti-IH showing a weak reaction with A RBC but a strong reaction with adult O RBC but not with cord blood O RBC. This cold anti-IH antibody did not interfere in the forward and reverse phenotyping. However, we observed the disappearance of the A antigen in the patient RBC.

The methods used routinely failed in detecting the A antigen in part of the samples analyzed. However, detecting the A antigen in those samples in which the routine methods failed was achieved by antisera anti-A and anti-A,B with high titers (Table 2). The data reported here demonstrate that the temporary loss of the A antigen in patients with myeloid malignancies is not total, and antisera might detect it in high titers in the different phases of this disease. Therefore, we can infer that HTMA ABO are helpful to resolve discrepancies between forward and reverse phenotyping resulting from weak expression or even loss of antigens from the RBCs.

There are different explanations to justify the loss of ABO antigens from RBC among patients suffering from myeloid malignancies. One tentative explanation for the loss of A and B antigens in oncohematological diseases is the 9;22 chromosomal translocation, but this phenomenon is uncommon in AML.^{9,10} Other researchers believe that the absence of the A antigen is consequent to H antigen loss, but our data do not agree with this proposition.²

Our data show that patients with the apparent loss of A antigen preserved the expression of the H antigen in the RBC membrane, which was detected by the strong reactivity with anti-H lectin. This observation was consistent with the weak expression of the A antigen undetected by routine tests but detected in both cases by the HTMA anti-A and anti-A,B. In conclusion, the data of these reports demonstrate that HTMA can detect the weak expression of ABO antigens in cases with

ARTICLE IN PRESS

4

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;xxx(xx):1–4

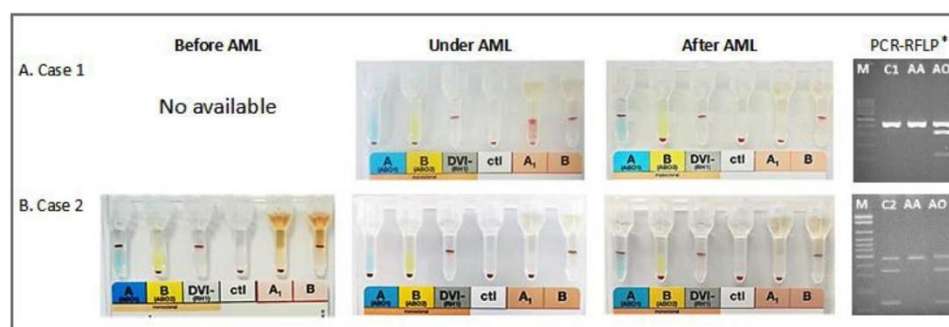


Figure 1 – Results of ABO phenotyping in Column Agglutination Technology and PCR-RFLP analysis in agarose gel electrophoresis in the two studied cases. Case 1 (C1), Case 2 (C2). *Miola et al., 2019.

transitory weak antigen expression in patients with myeloid malignancies.

Funding

This work was supported by FAPESP São Paulo Research Foundation (#2009/17540-2 and 2012/07716-9 to LCM).

Funding disclosure

The opinions, assumptions, and conclusions or recommendations expressed in this material are the authors' responsibility and do not necessarily reflect the views of the FAPESP. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or manuscript preparation.

Conflicts of interest

All authors have read the journal's policy on conflicts of interest and have none to declare.

REFERENCES

1. Harmening Denise E, ed. *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*, Seventh ed., Philadelphia: F. A. Davis Company; 2019.
2. Nambiar RK, Narayanan G, Prakash NP, Vijayalakshmi K. Blood group change in acute myeloid leukemia. 2017;30(1):74–5.
3. Bianco-Miotto T, Hussey DJ, Day TK, O'Keefe DS, Dobrovic A. DNA methylation of the ABO promoter underlies loss of ABO allelic expression in a significant proportion of leukemic patients. *PLoS One*. 2009;4(3):e4788.
4. Kronstein-Wiedemann R, Nowakowska P, Milanov P, Gubbe K, Seifried E, Bugert P, et al. Regulation of ABO blood group antigen expression by miR-331-3p and miR-1908-5p during hematopoietic stem cell differentiation. *Stem Cells*. 2020;38(10):1348–62.
5. Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM. *Technical Manual*. 20th ed. Bethesda, Maryland: AABB; 2020. p. 816.
6. Miola MP, Lopes AG, Silva AP, Gomes EGC, Machado LAF, Veloso WA, et al. Hematopoietic chimera in a male blood donor and his dizygotic twin sister. *Transfus Med Hemotherapy*. 2019;000:1–6.
7. Bianco T, Farmer BJ, Sage RE, Dobrovic A. Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *Blood*. 2001;97(11):3633–9.
8. Miola MP, Colombo TE, Fachini RM, Ricci-Junior O, Brandão de Mattos CC, de Mattos LC. Anti-A and anti-A,B monoclonal antisera with high titers favor the detection of A weak phenotypes. *Transfus Apher Sci*. 2020;59(5):102865.
9. Soupir CP, Vergilio JA, Dal Cin P, Muzikansky A, Kantarjian H, Jones D, et al. Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia: a rare aggressive leukemia with clinicopathologic features distinct from chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *Am J Clin Pathol*. 2007;127(4):642–50.
10. Fisher AM, Strike P, Scott C, Moorman AV. Breakpoints of variant 9;22 translocations in chronic myeloid leukemia locate preferentially in the CG-rich regions of the genome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;43(4):383–9.

2.3. ARTIGO 3

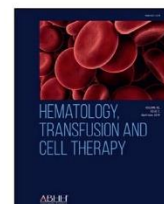
ARTICLE IN PRESS

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;xxx(xx):1–5



HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY

www.htct.com.br



Case Report

Mixed field resolution in ABO phenotyping in a rare case of a blood donor with hematopoietic mosaicism

Marcos Paulo Miola ^a, Cristiane da Silva Rodrigues de Araújo ^b,
Octávio Ricci Junior ^a, Luiz Carlos de Mattos ^{a,*}

^a Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, São Paulo, Brazil

^b Hospital São Vicente de Paulo. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2022

Accepted 23 August 2022

Available online xxx

Introduction

The hemagglutination reaction, when applied to immuno-hematology, whether positive or negative, suggests the presence or absence of Red Blood Cell (RBC) antigens, respectively. The simultaneous occurrence of positive and negative agglutination in the same sample, called Mixed Field (MF), results from distinct antigenic phenotypic changes in RBC.¹

Different factors may contribute to MF. Among them are transfusions and allogeneic transplants of non-identical hematopoietic stem cells (HSC), chimerism or mosaicism of hematopoietic cells, and mutations that weaken RBC expression antigens.¹ The occurrence of MF resulting from chimerism or mosaicism is not always explained by Mendelian inheritance.²

Post-transfusion or post-transplant of non-identical HSC MF is acquired and transient. It is influenced by the allogeneic transfusion demand and the transplant transition, ranging from the grafting of transplanted HSC to the complete replacement of autologous RBC by allogeneic ones.¹ On the other hand, the MF seen in hematopoietic mosaicism may result from mutations affecting the gene regulation in the steps prior to RBC differentiation. It can affect different proportions of RBC and remains for the whole life.²

The MF resulting from hematopoietic mosaicism involving only the ABO system is uncommon in healthy individuals. Two reports of hematopoietic mosaicism showed MF with different RBC populations in blood donors. In one of them, Beatrice and colleagues reported a healthy male Negro blood donor carrying an unequal proportion (10:1) of A and B RBC, respectively.³ In another, Borley and colleagues found a proportion of 40% of A1 and 60% A₁B RBC in a Caucasian female blood donor.⁴ These reports demonstrate that hematopoietic mosaicism is one of the causes of MF associated with the ABO system and that, although rare, it occurs in healthy individuals. In this study, we describe the strategies used to resolve a case of a male blood donor with MF in ABO phenotyping resulting from presumed hematopoietic mosaicism.

* Corresponding author at: Molecular Biology Department - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, Avenue Brigadeiro Faria Lima, 5416, CEP 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

E-mail address: luiz.demattos@edu.famerp.br (L.C. de Mattos).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.08.006>

2531-1379/© 2022 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Material and method

Ethical considerations

The Research Ethics Committee approved this study of FAMERP (CAAE 34163114.6.0000.5415). All analysed individuals received information about the research objectives and signed an informed consent form.

Description of the case

Samples from a 24-year-old male blood donor showing an MF in the forward ABO phenotyping were referred to our service. Their RBCs presented MF reaction with anti-A antiserum but not with anti-B and anti-A,B antisera. The reverse phenotyping suggested he was an AB phenotype. Analyses with anti-A₁ lectin showed a reaction in MF equal to one observed with anti-A. The blood donor declared not to have twin brothers and was never transfused or transplanted. Peripheral blood samples, genomic DNA, saliva, and oral swab samples from him and his family members were analyzed as needed for the investigation. Phenotyping for 17 additional RBC antigens did not reveal MF.

Serological investigations of RBC

Forward and reverse ABO phenotyping was performed in column agglutination technology (CAT) (DiaMed - Latin America, Brazil) and tubes using commercial antisera anti-A (clone: 9113D10), anti-B (clone: 9621A8), and anti-A,B (clone: 152D12 + 9113D10) (Fresenius-Kabi, Brazil; Lorne Laboratories, UK). Additional tests were also performed with commercial anti-A₁ (*Dolichos biflorus*) and anti-H (*Ulex europaeus*) lectins in CAT, neutral gel (CAT-NG) (DiaMed - Latin America, Brazil).

The antigens of the Rh systems (D, C, C^w, c, E, e), Kell (K), Kidd (Jk^a, Jk^b), Duffy (Fy^a, Fy^b), MNS (M, N, S, s) were identified using CAT (DiaMed - Latin America, Brazil). Lewis RBC phenotypes were identified in test tubes with commercial anti-Le^a (clone: LEA2 and 3643B9) and anti-Le^b (clone: LEB2 and GX336) antisera (Lorne Laboratories, USA; Fresenius-Kabi, Brazil).

RBC separation from MF

The RBC from MF were separated according to Miola et al.⁵ protocol, with adaptations in test tubes with commercial anti-A antiserum.

After reacting with anti-A antiserum, non-agglutinated RBCs were removed, transferred to another tube, and washed in an isotonic solution. To remove anti-A antibodies from agglutinated RBCs, they were washed in an isotonic solution and treated with 0.2 M Dithiothreitol (DTT). RBC percentages in the two phases of MF were performed in a cell counter (XN 2000 – Sysmex Europe GmbH, Bornbarch, Germany). The suspensions of both RBCs were adjusted according to the method used (CAT or test tube) (Figure 1). The unreactive RBCs in the MF were analyzed by adsorption and elution with anti-A antiserum (clone: 9113D10) and tested with higher-titers monoclonal antisera (HTMA), anti-A (1024), and anti-A,B (2048), according to the protocol of Miola and collaborators.⁵

Serological investigations of saliva

The Secretor and non-Secretor phenotypes were determined in saliva samples with the same antisera prior mentioned, according to the protocol by American Association for Blood Banks.¹

Molecular investigations

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using commercial kits (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germany). Genomic DNA from the oral swab was extracted using a phenol-chloroform method.⁵ The characterization of the ABO alleles was performed by PCR-RFLP and sequencing from exon 2 to exon 7. The FUT2 (Secretor) genotyping was carried out by sequencing, according to the protocol of Miola and collaborators.^{5,6}

Results

The results of the serological and molecular analyses are shown in Table 1 and Figure 3. The reaction in MF was observed only in the forward ABO phenotyping with anti-A monoclonal antiserum and anti-A₁ lectin but not in the other identified antigens. Separation of MF reactive and non-reactive RBCs showed that 52% did not have the A antigen but the B antigen, while the remaining 48% had both antigens when phenotyped with anti-A and anti-B antisera (Figure 1). This separation procedure eliminated the MF and allowed to verify that part of the RBCs was type B and part of type AB. The eluate and tests with HTMA of anti-A did not detect the presence of the A antigen in the MF non-reactive RBCs.

Lewis RBC phenotyping showed that the blood donor is Le (a+b-), and his mother is Le(a+b+). The hemagglutination inhibition test in saliva was in agreement, demonstrating the presence of Le^a antigen and A, H, Le^a, and Le^b antigens, respectively (Table 1). These data indicate that the blood donor has the non-Secretor phenotype.

Electropherograms obtained from peripheral blood genomic DNA sequencing revealed distinct signals for alleles A and B at positions 526, 703, 796, and 803 of exon 7 of the ABO gene. These weak signals coincide with the absence of the A antigen in half of the RBCs (52% of the MF). The electropherograms from the sequencing of genomic DNA extracted from the oral swab showed equivalent signals at the mentioned positions, indicating the presence of an A allele and another B allele (Figure 2).

Data from ABO genotyping by PCR-RFLP are shown in Table 1. The presence of the O allele was not observed in the blood donor, but his parents and siblings present this allele. The sequencing of the FUT2 gene demonstrated the presence of alleles FUT2*01N.02/FUT2*01N.02 in the blood donor and FUT2*04/FUT2*01N.02 in its mother, being compatible with the non-Secretor and Secretor phenotype, respectively.

Discussion

This study describes a case with evidence of hematopoietic mosaicism in a type AB blood donor presenting MF in the

ARTICLE IN PRESS

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;xxx(xx):1–5

3

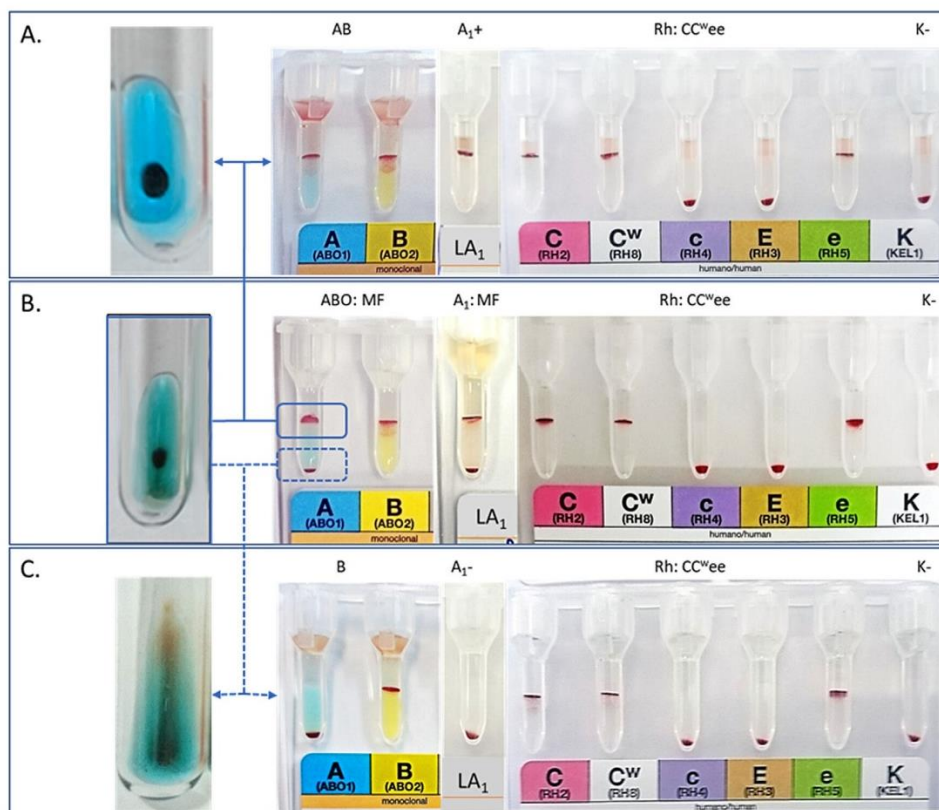


Figure 1 – ABO, Rh, and Kell phenotyping results in Column Agglutination Technology of the separated (A and C) and non-separated (B) RBCs from the Mixed Field.

forward RBC phenotyping with anti-A antiserum. Total agglutination of his RBC with anti-B antisera indicates the presence of B antigen and excludes the presence of O RBCs in the sample. The occurrence of MF with anti-A antiserum demonstrates the presence of the A antigen in part of the RBCs. The protocol for separating reactive and non-reactive RBCs from the MF was crucial to clarify this case.⁵

Analyses of the RBCs separated from the MF showed a lack of antigen A in 52% and A and B antigens in 48% of the RBCs. Equivalent proportions were also observed in another case in

which the authors observed 60% of A₁B RBCs and 40% of A₁ RBCs.⁴ Maybe the hematopoietic mosaicism is only characterized by two distinct RBC populations in the ABO system, resulting from alterations in the ABO gene regulation in somatic cells.⁷

The RBC antigenic profile observed in this study suggests that the blood donor presents mosaicism composed of two populations of RBCs: one of type B and the other of type A₁B. This observation is reinforced by the results obtained from eluate analyses and additional ABO phenotyping performed

Table 1 – Serological and genotyping data from the blood donor and his relatives.

Cases	ABO						Lectinas	ABH / Lewis	Lewis	Rh	Kell	Kidd	Duffy	MNS	Genotyping PCR-RFLP
	Forward			Reverse											
	A	B	AB	A ₁	B	Anti-A ₁									
M20.1 (Blood Donor)	CM	4	4	0	0	CM	2	Le ^a	Le(a+b-)	D_CC ^w ee	K-	a-b+	a+b+	MNss	A/B
M20.2 (Mother)	4	0	4	0	4	4	1	A; H; Le ^a ; Le ^b	Le(a+b+)	D_CC ^w ee	K+	a-b+	a+b+	MMss	A/O
M20.3 (Father)	0	4	4	4	0	-	-	-	Le(a+b-)	D_CC ^w cEe	K-	a-b+	a-b+	MNss	B/O
M20.4 (Sister)	0	4	4	4	0	-	-	-	Le(a+b+)	D_CcEe	K-	a-b+	a+b+	MMss	B/O
M20.5 (Brother)	0	0	0	4	4	-	-	-	Le(a+b-)	D_CC ^w ee	K-	a-b+	a+b+	MNss	O/O

Please cite this article as: M.P. Miola et al., Mixed field resolution in ABO phenotyping in a rare case of a blood donor with hematopoietic mosaicism, Hematology, Transfusion and Cell Therapy (2022), <https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.08.006>

ARTICLE IN PRESS

4

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;xxx(xx):1–5

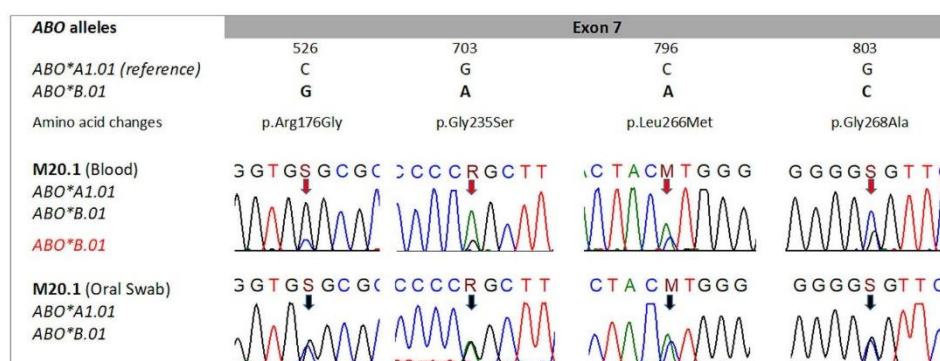


Figure 2 – Data from sequencing of the ABO gene. Direct sequencing reveal signals in all nucleotide positions 526, 703, 796, and 803, suggesting heterozygosity in the main alleles ABO*A1.01 and ABO*B.01 in DNA from peripheral blood (red arrows) and DNA from oral swab (black arrows). Distinct signals in the DNA from peripheral blood suggest the presence of mosaicism in the blood donors. The nomenclature S, R, and M follow the IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

with anti-A antisera containing titers greater than 1024 and with the Anti-A₁ lectin (*Dolichos biflorus*). Phenotyping of other RBC antigens (Rh, Duffy, MNS, Kell, Kidd, Lewis) did not show MF in the blood donor and his relatives, suggesting that the hematopoietic mosaicism generated MF only in the ABO system. These data agree with previous reports demonstrating that hematopoietic mosaicism exclusively affecting the ABO system also occurs in healthy individuals.^{3,4}

In order to reinforce the proposition of hematopoietic mosaicism, we performed molecular analyses by PCR-RFLP and sequencing of the blood donor's genomic DNA. Molecular analysis of exons 6 and 7 of the ABO gene by PCR-RFLP indicated the presence of alleles A and B in both genomic DNA from peripheral blood and oral swab. This result was compatible with the AB genotype and the AB RBC phenotype observed in approximately 48% of the RBC. However, the analysis of the electropherograms obtained from the exon 7 sequencing showed distinct signals in the nucleotides that occupy positions 526, 703, 796 and 803, which differ from the A and B alleles. The peripheral blood genomic DNA sequencing showed divergent signals in these positions, where there was a lower signal for the nucleotides that define the A allele than those that define the B allele. This observation coincides with the absence of the A antigen in approximately 50% of the RBCs. This divergence was not observed in the electropherograms obtained from oral swab genomic DNA sequencing. Differences in signals obtained from peripheral blood genomic DNA sequencing and oral swab were previously reported.⁵

The presence of identical alleles of the *FUT2* gene in the genomic DNA of peripheral blood and oral swab suggests that blood donor mosaicism is restricted to hematopoietic tissue. Furthermore, the *FUT2* alleles (*FUT2*01N.02/FUT2*01N.02*) revealed that the donor is non-Secretor, consistent with the Le(a+b-) phenotype and the presence of Le^a antigen in saliva.

The investigation of Secretor and non-Secretor phenotypes and genotypes, although necessary, is not sufficient for the resolution of cases of hematopoietic mosaicism. In

Secretory individuals, the A, B, and H antigens will be present in the saliva in the soluble form, contributing to the confirmation of the RBC ABO phenotypes and genotypes. In non-Secretor individuals, only *FUT2* genotyping will contribute to the confirmation of RBC phenotypes and genotypes.⁸ Therefore, in similar cases, *FUT2* genotyping is crucial, but the contribution of saliva analysis is dependent on the Secretor status.

This study brings contributions to the resolution of hematopoietic mosaicism cases. The separation and counting of MF reactive and non-reactive RBCs enable antigenic serological characterization of their populations by evaluating each blood group system.⁵ The careful analysis of the electropherogram allows the verification of distinct signals in the nucleotides that differentiate the A and B alleles, obtained by sequencing of the ABO gene.⁵ The investigation of Secretor and non-Secretor phenotypes, although necessary, is not always sufficient for the resolution of cases like this in which a single individual presents an unusual serological ABO profile and is incompatible with the Mendelian inheritance model.² By the authors' knowledge, this is the first description of a hematopoietic mosaicism case involving only the ABO system in a blood donor, reported in Brazil.

Although the results achieved are consistent with hematopoietic mosaicism restricted to the ABO system, this study has limitations. Analyses using FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) were not performed as this procedure requires viable cells, especially erythroblasts, for resolution. Obtaining such cells would imply an invasive procedure, generally not indicated for healthy individuals and blood donors. Therefore, it was not possible to reveal whether part of the RBC precursor cells contains two alleles, A and B, and part, only one B allele.

The resolution of this case comprised the procedure of separating the RBCs from the MF with serological analysis and the analysis of the differences in the electropherogram signals of the DNA sequencing of the peripheral blood compared to that obtained from the DNA sequencing of the oral swab.

ARTICLE IN PRESS

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;xxx(xx):1–5

5

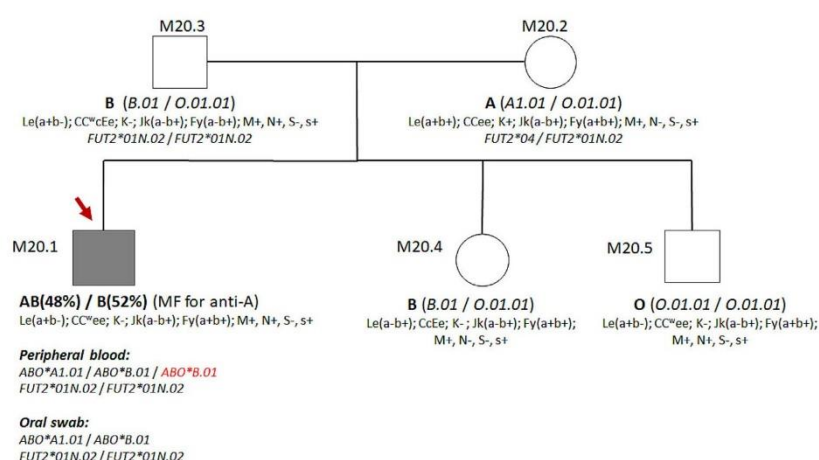


Figure 3 – Heredogram showing the phenotypes (ABO, Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, and Lewis) and genotypes (ABO, FUT2) identified in the blood donor and all his family members.

These results suggest that somatic mutations that affect the hematopoietic progenitor lineage (early mosaicism) or myeloid progenitor lineage (late mosaicism) can lead to loss of heterozygosity in about 50% of the affected erythrocyte population (Figure 3).^{9,10}

In conclusion, adequate separation of reactive and non-reactive RBC from MF combined with sequencing of the ABO gene constitutes adequate procedures for resolving rare cases of hematopoietic mosaicism in humans.

Conflicts of interest

The author declares no conflicts of interest.

REFERENCES

- Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, eds. Technical Manual, 20th ed., Bethesda, Maryland: AABB; 2020. p. 816.
- Yousoufian H, Peyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet.* 2002;3(10):748–58.
- Beattie KM, Zuelzer WW, Mcguire DA, Cohen F. Blood group chimerism as a clue to generalized tissue mosaicism. *Transfusion.* 1964;4:77–86.
- Borley R, Hsu TCS, Sawitsky A, Johnson CL, Marsh WL. Mosaicism of red cell ABO type without recognizable cause. *Revue Française de Transfusion et Immuno-hématologie.* 1980;23(3):299–304.
- Miola MP, Lopes AG, Silva AP, Gomes EGC, Machado LAF, Veloso WA, et al. Hematopoietic chimera in a male blood donor and his dizygotic twin sister. *Transfus Med Hemother.* 2019;000:1–6.
- Miola MP, Colombo TE, Fachini RM, Ricci-Junior O, Brandão de Mattos CC, de Mattos LC. Anti-A and anti-A,B monoclonal antisera with high titers favor the detection of A weak phenotypes. *Transfus Apher Sci.* 2020;59(5):102865.
- Marsh WL, Nichols ME, øyen R, Decary F, Whitsett C, Ethridge EL. Inherited mosaicism affecting the ABO blood groups. *Transfusion.* 1975;15(6):589–95.
- Tippett P. Blood group chimeras: a review. *Vox Sanguinis.* 1983;44(6):333–59.
- Frumkin D, Wasserstrom A, Kaplan S, Feige U, Shapiro E. Genomic variability within an organism exposes its cell lineage tree. *PLoS Comput Biol.* 2005;1(5):0382–94.
- Flegel WA. Mosaicism by somatic non-functional mutations: one cell lineage at a time. 2017;17(1):425–7.

2.4. ARTIGO 4

2.4. Artigo 4.

Título: Resolução de divergência na herança do gene *ABO* entre pais e filhos causada pela presença do alelo *cisAB*.

Introdução.

Os fenótipos eritrocitários *cisAB* e *B(A)* do sistema *ABO* são caracterizados como distintos em função de suas reatividades com os antissoros anti-A e anti-B. Estes fenótipos estão intimamente associados a dois alelos, *cis-AB* e *B(A)*, reconhecidos pela Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (ISBT) e, resultam de mutações no exon 7 do gene *ABO*. Estes alelos codificam glicosiltransferases (GT) capazes de sintetizar ambos os antígenos A e B.¹ Embora *cisAB* e *B(A)* sejam relativamente comuns em asiáticos, raramente são descritos em outros grupos étnicos.²

Os alelos *ABO*cisAB.05* e *ABO*BA.06* são apresentados como distintos pela ISBT, mas possuem as mesmas substituições de nucleotídeos.³ Neste texto utilizaremos apenas a nomenclatura *ABO*cisAB.05*.

Há relatos demonstrando que os fenótipos *cisAB* e *B(A)* expressam níveis distintos dos antígenos A e B comparados ao clássico fenótipo AB. Um deles observou maior nível de expressão de A^{1,4,5} enquanto outro, maior nível de expressão de B.^{1,4,5} Entretanto, expressão equivalente de ambos os antígenos também foi observada.²

A presença do alelo *cisAB* no genoma leva à expressão do fenótipo *cisAB*, o qual nem sempre se alinha ao modelo mendeliano de herança como por exemplo, quando genitores AB e O geram descendentes AB e/ou O. Estas

situações nem sempre são identificadas na fenotipagem individual e requerem análises moleculares ou estudos de famílias.

Neste estudo, descrevemos as estratégias utilizadas na investigação de uma família em que um dos genitores é AB e o outro O, com dois filhos AB.

Material e Método.

Aspectos éticos pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CAAE 34163114.6.0000.5415). Todos os indivíduos investigados receberam informações sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Descrição do caso

A probanda (M42.1), uma mulher de 44 anos, descendente de europeus (português e austríaco), entrou em contato com nosso laboratório de pesquisa solicitando a resolução de uma divergência verificada na herança mendeliana do sistema ABO em sua família. A probanda e seus dois filhos, um de 17 (M42.3) e outro de 9 anos (M42.4), apresentavam o fenótipo AB enquanto seu marido de 48 anos (M42.2) apresentava o fenótipo O. Todos os membros eram saudáveis, sem histórico de transfusão de sangue ou transplante. A probanda também relatou que a mesma divergência ocorria com seus pais e irmãos.

Investigação Sorológica

A fenotipagem ABO em prova direta e reversa foi realizada em tecnologia de aglutinação de coluna (DiaMed - América Latina, Brasil; Grifols - Espanha) e em tubo utilizando os antissoros comerciais anti-A (clone celular: 9113D10), anti-B (clone celular: 9621A8) e anti-A,B (clone celular: 152D12 + 9113D10) (Fresenius-

Kabi, Brasil; Lorne Laboratories, Reino Unido), com as respectivas suspensões de hemácias comerciais A₁ e B (DiaMed - América Latina, Brasil; Grifols - Espanha).

Testes adicionais também foram realizados com lectinas comerciais anti-A₁ (*Dolichos biflorus*) e anti-H (*Ulex europaeus*) em tubo e tecnologia de aglutinação em coluna (CAT) em cartão neutro (DiaMed - América Latina, Brasil).

Investigação Molecular

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico utilizando kits comerciais (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Alemanha). A caracterização dos genótipos e alelos *ABO* foi realizada por PCR-RFLP e sequenciamento, de acordo com o protocolo de Miola e colaboradores.⁵

Resultados.

Os resultados das análises sorológicas e moleculares por PCR-RFLP são mostrados na **tabela 1**. As hemácias de M42.1, M42.3 e M42.4 reagiram fortemente com os antissoros monoclonais anti-A, anti-B e anti-AB na fenotipagem ABO direta em tubo e CAT. Na fenotipagem reversa, o plasma de M42.1 e M42.3 não reagiu com as hemácias comerciais A₁ e B. Contudo, o plasma de M42.3 e M42.4 reagiu a hemácia comercial A₁. As hemácias de M42.1, M42.3 e M42.4 não reagiram com a lectina anti-A₁. M42.2 apresentou resultados compatível com o grupo O nas fenotipagens ABO direta e reversa. A genotipagem por PCR-RFLP identificou a deleção 261delG do exon 6 em heterozigose em M42.1, M42.3 e M42.4. Esta deleção foi encontrada em homozigose em M42.2.

Tabela 1. Dados sorológicos e moleculares (PCR-RFLP) dos membros da família.

Membros da família	ABO						Lectinas		Genótipo
	Prova direta			Prova reversa		Fenótipo			
	A	B	AB	A ₁	B		Anti-A ₁	Anti-H	
M42.1 (Probanda)	4	4	4	0	0	AB	0	4	<i>cisAB/O</i>
M42.2 (Marido)	0	0	0	4	4	O	-	4	<i>O/O</i>
M42.3 (1º filho)	4	4	4	w	0	AB	0	4	<i>cisAB/O</i>
M42.4 (2º filho)	4	4	4	2	0	AB	0	4	<i>cisAB/O</i>

Os resultados do sequenciamento dos exons 2 a 7 no gene *ABO* são demonstrados na **tabela 2**. M42.1, M42.3 e M42.4 apresentaram mutações em heterozigose nas posições c.261delG e c.297A>G do exon 6 e c.526C>G, c.657C>T, c.703G>A, c.796C>A e c.930G>A do exon 7. Estes resultados indicam a presença de um alelo *ABO*cisAB.05* e outro *ABO*O.01.01*. O resultado do sequenciamento do DNA genômico de M42.2 mostrou a deleção c.261delG em homozigose, compatível com o alelo *ABO*O.01.01*.

Tabela 2. Dados moleculares obtidos do sequenciamento da probanda e seus familiares.

Sequências do gene ABO	Nucleotídeos									Alelos
	Exons 2-5	Exon 6 (240 – 374)		Exon 7 (375 – 1062)						
	29 - 239	261	297	526	657	703	796	803	930	
NG_006669.2	-	G	A	C	C	G	C	G	G	ABO*A.01.01
AJ536135.1	-	-	G	G	T	A	A	C	A	ABO*B.01
M42.1 (Probanda)	-	-	G	G	T	A	A	-	A	ABO*cisAB.05
	-	delG	-	-	-	-	-	-	-	ABO*O.01.01
M42.2 (Marido)	-	delG	-	-	-	-	-	-	-	ABO*O.01.01
	-	delG	-	-	-	-	-	-	-	ABO*O.01.01
M42.3 (1º filho)	-	-	G	G	T	A	A	-	A	ABO*cisAB.05
	-	delG	-	-	-	-	-	-	-	ABO*O.01.01
M42.4 (2º Filho)	-	-	G	G	T	A	A	-	A	ABO*cisAB.05
	-	delG	-	-	-	-	-	-	-	ABO*O.01.01
ABO*cisAB.05	-	-	G	G	T	A	A	-	A	ABO*cisAB.05
Alteração de aminoácido	-	-	-	p.Arg176Gly	-	p.Gly235Ser	p.Leu266Met	-	-	Gly-Ser-Met-Gly (BBBA)*

Legenda: *Alelo B = Gly-Ser-Met-Ala (BBBB) e Alelo A = Arg-Gly-Leu-Gly (AAAA)

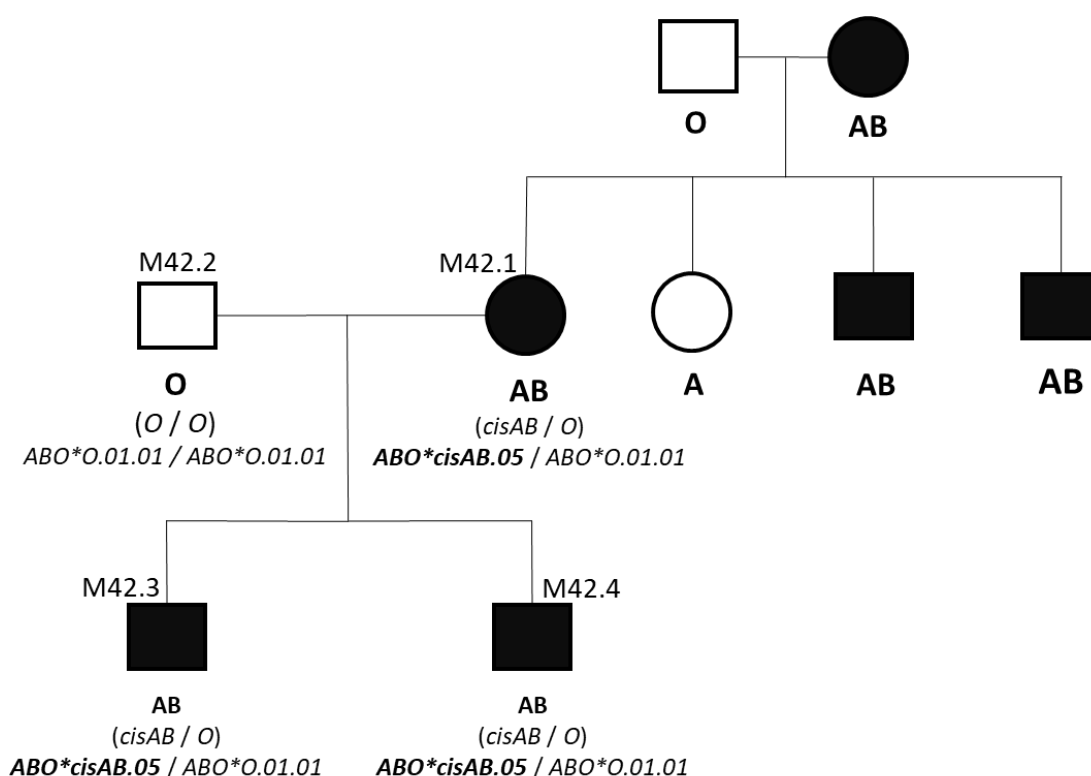


Figura 1. Heredograma mostrando os fenótipos e genótipos da probanda e seus familiares.

Discussão.

Neste estudo descrevemos uma família com fenótipos do sistema ABO que não se ligam ao modelo de herança mendeliana (Figura 1). As hemácias dos membros, com exceção de M42.2, reagiram fortemente com os antissoros monoclonais anti-A, anti-B e anti-A,B mas não com a lectina anti-A₁ e M42.4 apresentou um anticorpo anti-A₁. Estes resultados indicam que M42.1, M42.3 e M42.4 possuem o fenótipo sorológico compatível com A₂B, e M42.2 possui o fenótipo O. Estas observações estão alinhadas à literatura.¹

A análise molecular por sequenciamento identificou o alelo *ABO*O.01.01* em quatro membros e o alelo *ABO*cisAB.05* em três deles. Estes dados permitiram inferir que os três membros com genótipo *ABO*cisAB.05 / *O.01.01* possuem o

fenótipo cisAB. Estas observações fortalecem a proposição de que o fenótipo cisAB nem sempre apresenta alterações sorológicas nos testes de rotina.² Os resultados aqui relatados não se alinham às observações previamente publicados.^{4,5}

O alelo *ABO*cisAB.05* codifica uma glicosiltransferase capaz de sintetizar os antígenos A e B, mesmo quando em heterozigose com o alelo O. A dupla atividade desta glicosiltransferase é utilizada para explicar inconsistências na herança mendeliana do Sistema ABO.^{2,7}

As análises moleculares revelaram que a probanda e seus filhos são heterozigotos (*ABO*cisAB.05/*O.01.01*) enquanto o marido é homozigoto (*ABO*O.01.01/*O.01.01*). O sequenciamento do gene *ABO* identificou alterações presentes nos alelos *B* e *O* em comparação à sequência referência do alelo *A*. O polimorfismo c.261delG no exon 6 caracteriza o alelo *ABO*O.01.01*. As substituições de nucleotídeos nas posições c.297A>G, c.526C>G, c.657C>T, c.703G>A, c.796C>A e c.930G>A caracterizam o alelo *B*, exceto pela presença do nucleotídeo G na posição 803 que corresponde ao alelo *A*. Esta combinação de nucleotídeos (BBBA) permite definir um dos alelos como *ABO*cisAB.05*. Três das sequencias acima mencionadas (526, 703 e 796) resultam na troca dos aminoácidos p.Arg176Gly, p.Gly235Ser e p.Leu266Met e são compatíveis com uma glicosiltransferase capaz de sintetizar os antígenos A e B.⁸

Há demonstrações de que as substituições dos aminoácidos acima mencionados modificam a função da glicosiltransferase codificada atribuindo-lhe dupla especificidade na adição equilibrada dos monossacarídeos *N*-acetilgalactosamina e D-galactose ao oligossacarídeo precursor, na síntese dos

antígenos A e B.⁹ Em face desta proposição, acreditamos que esta glicosiltransferase híbrida sintetiza ambos os antígenos e determina um padrão de aglutinação compatível com o fenótipo A₂B nesta família. Este padrão de aglutinação não está alinhado à proposição de realce alélico em que a heterozigose do alelo *ABO**cisAB.05** com outro não contendo a deleção G na posição 261 do exon 6, eleva a expressão de antígeno sobre outro.¹⁰

Os resultados deste estudo demonstram que a presença de um alelo *ABO**cisAB.05** em famílias não se alinha ao clássico modelo mendeliano de herança no qual alelos A e B se comportam como codominantes entre si e dominantes em relação ao alelo O.¹ Além disso, este alelo não causa necessariamente alterações sorológicas perceptíveis nos testes de rotina tais como fraca expressão antigênica e discrepâncias de fenotipagem. Os dados aqui apresentados se mostram divergentes em relação àqueles que verificaram alterações nos padrões sorológicos rotineiros, mesmo em estudos que não envolveram famílias.^{2,7}

O fenótipo *cisAB* é mais comum em populações do leste asiático, com a maior frequência relatada na população coreana. Pelo conhecimento dos autores, este é o primeiro caso de *cisAB* relatado no Brasil de indivíduos com descendência europeia.

Em conclusão, o uso de métodos moleculares tais como PCR-RFLP e sequenciamento empregados neste estudo se mostra adequado para resolução de divergências genéticas do modelo mendeliano de herança causadas pela presença do alelo *cisAB*.

Referências.

1. Daniels G. Human blood groups. 3rd ed. Wiley-Blackwell, editor. Oxford, UK; 2013.
 2. Chun S, Choi S, Yu H, Cho D. Cis-AB, the blood group of many faces, is a conundrum to the novice eye. *Ann Lab Med*. 2019;39(2):115–20.
 3. Blood Group Terminology | The International Society of Blood Transfusion (ISBT) [Internet]. [cited 2022 Mar 17]. Available from: <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt/blood-group-terminology.html>
 4. Seyfried H, Walewska I, Werblinska B. Unusual Inheritance of ABO Group in a Family With Weak B Antigens. *Vox Sang* [Internet]. 1964;9:268–77. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14170898>
 5. Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3. A(X) and B(A) alleles. *Vox Sang* [Internet]. 1993;64(3):171–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8484250>
 6. Miola MP, Colombo TE, Fachini RM, Ricci-Junior O, Brandão de Mattos CC, de Mattos LC. Anti-A and anti-A,B monoclonal antisera with high titers favor the detection of A weak phenotypes. *Transfusion and Apheresis Science* [Internet]. 2020;59(5):102865. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102865>
-

7. Yazer MH, Olsson ML, Palcic MM. The cis-AB Blood Group Phenotype: Fundamental Lessons in Glycobiology. *Transfus Med Rev.* 2006 Jul;20(3):207–17.
 8. Kościelak J. The hypothesis on function of glycosphingolipids and ABO blood groups revisited. *Neurochem Res* [Internet]. 2012;37(6):1170–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22407244>
 9. Storry JR, Olsson ML. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology* [Internet]. 2009;25(2):48–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19927620>
 10. Deng ZH, Yu Q, Liang YL, Wang DM, Su YQ, Wu GG. Characterization of a novel B(A) allele with BBBA type at the ABO blood group. *J Hum Genet* [Internet]. 2006 Aug [cited 2022 Jul 12];51(8):732–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16871363>
-

3. CONCLUSÕES

3. CONCLUSÕES.

1. Antissoros monoclonais anti-A ou anti-B contendo maiores títulos de anticorpos favorecem a identificação dos antígenos A ou B fracos, respectivamente;
 2. O antissoro monoclonal anti-A,B apresenta melhor resultado quando comparado com anti-A na mesma titulação;
 3. A reação de CM não é uma característica exclusiva do subgrupo A₃, mas sim um resultado de uma determinada concentração dos anticorpos presentes nos antissoros contra a baixa concentração de antígenos A presentes nas hemácias de qualquer subgrupo com fenótipos A fraco;
 4. Não realizar a pesquisa do antígeno A em prova direta e utilizar métodos que visam potencializar a intensidade de reação do anticorpo anti-A suspeito ou fracamente reativo em prova reversa, pode levar a uma falsa resolução da discrepância, nos casos de A_wB com presença de anti-A₁;
 5. A separação de hemácias do CM observada nos resultados de fenotipagem ABO possibilita a confirmação da existência de duas populações e a determinação dos fenótipos de cada uma delas, contribuindo com a resolução dos casos de mosaicismo e quimerismo hematopoiético; e
 6. As análises moleculares por PCR-RFLP e sequenciamento utilizadas neste estudo foram suficientes para identificação das mutações e caracterização dos alelos dos genes *ABO* e *FUT2*, permitindo uma correlação entre fenótipo e genótipo ou seus polimorfismos.
-

4. REFERÊNCIAS

4. REFERÊNCIAS.

1. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med* [Internet]. 2001;11(4):243–65. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532183>
 2. Landsteiner K. Zur Kenntniss der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zbl Bakt.* 1900;27:357–66.
 3. Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. 1901.
 4. Decastello A. Über die Iso-agglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. *Munch med Wchnschr* [Internet]. 1902;49:1090–5. Disponível em: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10009472662/en/>
 5. Giangrande PL. The history of blood transfusion. *Br J Haematol* [Internet]. 2000;110(4):758–67. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054057>
 6. Figl M, Pelinka LE. Karl Landsteiner, the discoverer of blood groups. *Resuscitation* [Internet]. 2004;63(3):251–4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15582758>
 7. Bernstein F. Ergebnisse einer biostatistischen zusammenfassenden Betrachtung über die erblichen Blutstrukturen des Menschen. *Klin Wschr*; 1924. 1495–1497 p.
-

8. Thomsen O, Friedenreich V, Worsaae E. Über Die MÖGlichkeit Der Existenz Zweier Neuer Blutgruppen: Auch Ein Beitrag Zur Beleuchtung Sogenannter Untergruppen. *Acta Path Microbiol Scand*. 1930;7:157–90.
 9. Ferguson-Smith MA, Aitken DA, Turleau C, de Grouchy J. Localisation of the human ABO: Np-1: AK-1 linkage group by regional assignment of AK-1 to 9q34. *Hum Genet* [Internet]. janeiro de 1976 [citado 27 de julho de 2022];34(1):35–43. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/184030/>
 10. Yamamoto FI, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori SI. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*. 1990;345(6272):229–33.
 11. Calafell F, Roubinet F, Ramírez-Soriano A, Saitou N, Bertranpetit J, Blancher A. Evolutionary dynamics of the human ABO gene. *Human Genetics* 2008 124:2 [Internet]. 16 de julho de 2008 [citado 27 de julho de 2022];124(2):123–35. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00439-008-0530-8>
 12. Yamamoto F, McNeill PD, Hakomori S. Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology* [Internet]. 1995;5(1):51–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7772867>
 13. Storry JR, Olsson ML. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology* [Internet]. 2009;25(2):48–59. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19927620>
 14. Kościelak J. The Hypothesis on Function of Glycosphingolipids and ABO Blood Groups Revisited. *Neurochemical Research* 2012 37:6 [Internet]. 11
-

- de março de 2012 [citado 6 de setembro de 2022];37(6):1170–84. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-012-0734-0>
15. Yazer MH. What a difference 2 nucleotides make: a short review of ABO genetics. *Transfus Med Rev* [Internet]. 2005;19(3):200–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16010650>
 16. Yamamoto F, Cid E, Yamamoto M, Blancher A. ABO Research in the Modern Era of Genomics. *Transfus Med Rev*. abril de 2012;26(2):103–18.
 17. Daniels G. Human blood groups. 3rd ed. Wiley-Blackwell, organizador. Oxford, UK; 2013.
 18. Patenaude SI, Seto NOL, Borisova SN, Szpacenko A, Marcus SL, Palcic MM, et al. The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat Struct Biol* [Internet]. setembro de 2002 [citado 27 de outubro de 2014];9(9):685–90. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12198488>
 19. de Mattos LC. Structural diversity and biological importance of ABO, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2016;38(4):331–40. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27863762>
 20. Yazer MH, Olsson ML. The O2 allele: questioning the phenotypic definition of an ABO allele. *Immunohematology* [Internet]. 2008;24(4):138–47. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19856716>
 21. Mifsud NA, Haddad AP, Condon JA, Sparrow RL. ABO genotyping-identification of O1, O1*, and O2 alleles using the polymerase chain reaction-
-

- sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) technique. Immunohematology [Internet]. 1996;12(4):149–53. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15387726>
22. 001 ABO Alleles | The International Society of Blood Transfusion (ISBT) [Internet]. [citado 12 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.isbtweb.org/resource/001aboalleles.html>
23. Patenaude SI, Seto NOL, Borisova SN, Szpacenko A, Marcus SL, Palcic MM, et al. The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. Nature Structural Biology 2002 9:9 [Internet]. 19 de agosto de 2002 [citado 12 de setembro de 2022];9(9):685–90. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nsb832>
24. Harmening, Denise editor. Modern blood banking & transfusion practices. Seventh ed. Harmening, Denise editor., organizador. Philadelphia : F.A. Davis Company: FA Davis; 2019.
25. Wang CM, Hu SG, Ru YF, Yao GX, Ma WB, Gu YH, et al. Different effects of androgen on the expression of Fut1, Fut2, Fut4 and Fut9 in male mouse reproductive tract. Int J Mol Sci [Internet]. 2013;14(11):23188–202. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24284406>
26. Morgan WT, Watkins WM. Unravelling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity. Glycoconj J [Internet]. 2000;17(7–9):501–30. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11421345>
-

27. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. J Med Invest [Internet]. 2008;55(3–4):174–82. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18797129>
 28. Holgersson J, Breimer ME, Samuelsson BE. Basic biochemistry of cell surface carbohydrates and aspects of the tissue distribution of histo-blood group ABH and related glycosphingolipids. APMIS Suppl [Internet]. 1º de janeiro de 1992 [citado 30 de julho de 2022];27(27 S):18–27. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/1520526>
 29. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al. Essentials of Glycobiology. Essentials of Glycobiology [Internet]. 2022 [citado 5 de setembro de 2022]; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579918/>
 30. Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes. Second. Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T, organizadores. Vol. Second Edition. Japan: Springer; 2014. 1–1707 p.
 31. Blood Group Terminology | The International Society of Blood Transfusion (ISBT) [Internet]. [citado 17 de março de 2022]. Disponível em: <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt/blood-group-terminology.html>
 32. Reid ME Lomas-Francis C OML. The Blood Group Antigen FactsBook. London: Academia de Imprensa; 2012.
-

33. Clausen H, Lavery SB, Kannagi R, Hakomori S. Novel blood group H glycolipid antigens exclusively expressed in blood group A and AB erythrocytes (type 3 chain H). I. Isolation and chemical characterization. *J Biol Chem* [Internet]. 1986;261(3):1380–7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3944091>
 34. Clausen H, Lavery SB, Nudelman E, Tsuchiya S, Hakomori S. Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A1-specific monoclonal antibody TH-1: chemical basis of qualitative A1 and A2 distinction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1985;82(4):1199–203. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2579390>
 35. Watkins WM. Biochemistry and Genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Adv Hum Genet* [Internet]. 1980;10:1-136,379-385. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6156588>
 36. Oriol R, le Pendu J, Mollicone R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang* [Internet]. 1986 [citado 6 de setembro de 2022];51(3):161–71. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2433836/>
 37. Clausen H, Hakomori S. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* [Internet]. 1989;56(1):1–20. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2464874>
 38. Svensson L, Hult AK, Stamps R, Ångström J, Teneberg S, Storry JR, et al. Forssman expression on human erythrocytes: Biochemical and genetic
-

- evidence of a new histo-blood group system. *Blood*. 21 de fevereiro de 2013;121(8):1459–68.
39. de Mattos LC. Molecular polymorphisms of human blood groups: a universe to unravel. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2011;33(1):6–7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284234>
40. Schenkel-Brunner H. [Biochemical basis of the ABO system subgroups]. *Wien Klin Wochenschr* [Internet]. 2001;113(20–21):787–98. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732114>
41. Kościelak J. The hypothesis on function of glycosphingolipids and ABO blood groups revisited. *Neurochem Res* [Internet]. 2012;37(6):1170–84. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22407244>
42. Yamamoto F. Review: ABO blood group system - ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematology*. 2004;20(1):3–22.
43. Kominato Y, Sano R, Takahashi Y, Hayakawa A, Ogasawara K. Human ABO gene transcriptional regulation. *Transfusion (Paris)* [Internet]. 1º de abril de 2020 [citado 28 de julho de 2022];60(4):860. Disponível em: </pmc/articles/PMC7187371/>
44. Daniels G, Imelda B. *Essential Guide to Blood Groups*. 3rd ed. 2013: Wiley-Blackwell Publishing; 2013. 131 p.
45. Cordon-Cardo C, Lloyd K, ... CF... ; a journal of technical, 1986 undefined. Immunoanatomic distribution of blood group antigens in the human urinary tract. Influence of secretor status. *Lab Invest* [Internet]. 1986 [citado 29 de
-

- julho de 2022];55:444–54. Disponível em:
<https://europepmc.org/article/med/2429066>
46. David L, Leitaó D, Sobrinho-Simoes M, research EBC, 1993 undefined. Biosynthetic basis of incompatible histo-blood group A antigen expression: anti-A transferase antibodies reactive with gastric cancer tissue of type O individuals. *Cancer Res* [Internet]. 1993 [citado 29 de julho de 2022];53:5494–500. Disponível em:
<https://aacrjournals.org/cancerres/article-abstract/53/22/5494/499438>
47. Lee JS, Ro JY, Sahin AA, Hong WK, Brown BW, Mountain CF, et al. Expression of Blood-Group Antigen A — A Favorable Prognostic Factor in Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 18 de abril de 1991;324(16):1084–90.
48. Miola MP, de Oliveira TC, Guimarães AAG, de Mattos LC. ABO discrepancy resolution in two patients with acute myeloid leukemia presenting the transient weak expression of A antigen. *Hematol Transfus Cell Ther* [Internet]. março de 2022 [citado 23 de março de 2022]; Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2531137922000372>
49. Sheinfeld J, Reuter VE, Fair WR, Cordon-Cardo C. Expression of blood group antigens in bladder cancer: current concepts. *Semin Surg Oncol* [Internet]. 1992;8(5):308–15. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1462102>
50. Hata Y, Kominato Y, Yamamoto FI, Takizawa H. Characterization of the human ABO gene promoter in erythroid cell lineage. *Vox Sang* [Internet].
-

- 2002;82(1):39–46. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856466>
51. Bianco T, Farmer BJ, Sage RE, Dobrovic A. Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *Blood* [Internet]. 1º de junho de 2001 [citado 23 de março de 2022];97(11):3633–9. Disponível em:
<https://ashpublications.org/blood/article/97/11/3633/107521/Loss-of-red-cell-A-B-and-H-antigens-is-frequent-in>
52. Nambiar RK, Narayanan G, Prakash NP, Vijayalakshmi K. Blood group change in acute myeloid leukemia. 2017;30(1):74–5.
53. Novaretti MC, Domingues AE, Manhani R, Pinto EM, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA. ABO genotyping in leukemia patients reveals new ABO variant alleles. *Genet Mol Res* [Internet]. 2008;7(1):87–94. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18273824>
54. Bianco-Miotto T, Hussey DJ, Day TK, O’Keefe DS, Dobrovic A. DNA Methylation of the ABO Promoter Underlies Loss of ABO Allelic Expression in a Significant Proportion of Leukemic Patients. Hoheisel J, organizador. *PLoS One* [Internet]. 10 de março de 2009 [citado 23 de março de 2022];4(3):e4788. Disponível em:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0004788>
55. Kominato Y, Hata Y, Takizawa H, Tsuchiya T, Tsukada J, Yamamoto FI. Expression of Human Histo-blood Group ABO Genes Is Dependent upon DNA Methylation of the Promoter Region. *Journal of Biological Chemistry*. 24 de dezembro de 1999;274(52):37240–50.

56. Hansen T, Namork E, Olsson ML, Alan Chester M, Heier HE. Different Genotypes Causing Indiscernible Patterns of A Expression on A el Red Blood Cells as Visualized by Scanning Immunogold Electron Microscopy. *Vox Sang.* setembro de 1998;75(1):47–51.
57. Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, Blood NS, 1996 undefined. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. Elsevier [Internet]. [citado 29 de julho de 2022]; Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120623710>
58. Vernimmen D. Uncovering Enhancer Functions Using the α -Globin Locus. *PLoS Genet* [Internet]. 1º de outubro de 2014 [citado 29 de julho de 2022];10(10). Disponível em: [/pmc/articles/PMC4199490/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25749949/)
59. KOŚCIELAK J, MILLER-PODRAZA H, KRAUZE R, PIASEK A. Isolation and characterization of poly(glycosyl)ceramides (megaloglycolipids) with A, H and I blood-group activities. *Eur J Biochem* [Internet]. 1976 [citado 14 de setembro de 2022];71(1):9–18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/827447/>
60. Miola MP. Resolução de Discrepâncias do Sistema Histo-Sanguíneo ABO [Internet]. [Dissertação (Mestrado)]: FAMERP; 2017 [citado 13 de agosto de 2022]. Disponível em: http://bdtd.famerp.br/bitstream/tede/392/2/marcospaulomiola_dissert.pdf
61. Mattos LC, Sanchez FE, Cintra JR. Genotipagem do locus ABO (9q34 . 1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. 2001;23(1):15–22.
-

62. Miola MP, Colombo TE, Fachini RM, Ricci-Junior O, Brandão de Mattos CC, de Mattos LC. Anti-A and anti-A,B monoclonal antisera with high titers favor the detection of A weak phenotypes. *Transfusion and Apheresis Science* [Internet]. 2020;59(5):102865. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102865>
63. Miola MP, Lopes AG, Silva AP, Gomes EGC, Machado LAF, Veloso WA, et al. Hematopoietic Chimera in a Male Blood Donor and His Dizygotic Twin Sister. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [Internet]. 2019;000:1–6. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/495583>
64. Miola MP, de Araújo C da SR, Junior OR, de Mattos LC. Mixed field resolution in ABO phenotyping in a rare case of a blood donor with hematopoietic mosaicism. *Hematol Transfus Cell Ther* [Internet]. 2022 [citado 11 de fevereiro de 2023]; Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36273984/>
65. Thi Trung N, Nam Hai T, Quoc Viet H, Giay C. Study on mixing anti-A monoclonal antibody and anti-B monoclonal antibody to make anti-AB save as abo blood grouping reagent. *Vietnam J Sci Technol* [Internet]. 30 de janeiro de 2018 [citado 19 de setembro de 2022];56(1):17–23. Disponível em: <https://vjs.ac.vn/index.php/jst/article/view/9372>
66. Nair R, Gogri H, Kulkarni S, Gupta D. Detection of a rare subgroup of A phenotype while resolving ABO discrepancy. *Asian J Transfus Sci* [Internet]. 1º de julho de 2019 [citado 21 de setembro de 2022];13(2):129. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6910028/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36273984/)
-

67. Storry JR, Condon J, Hult AK, Harrison A, Jorgensen R, Olsson ML. An age-dependent ABO discrepancy between mother and baby reveals a novel Aweak allele. *Transfusion (Paris)*. 1º de fevereiro de 2015;55(2):422–6.
68. McKnight TFP, Strain JE, Vege S, Lam C, Hubbard EM, Kopko PM, et al. ABO maternal-child discordance: Evidence of variable allelic expression and considerations for investigation. *Transfusion (Paris)*. 1º de março de 2021;61(3):979–85.
69. Goebel M, Halm-Heinrich I, Parkner A, Rink G, Heim MU, Bugert P. A Novel ABO Gene Variant Leads to Discrepant Results in Forward/Reverse and Molecular Blood Grouping. *Transfus Med Hemother* [Internet]. 2013;40(6):454–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474897>
70. Cai XH, Jin S, Liu X, Shen W, Lu Q, Wang JL, et al. Molecular genetic analysis for the Bx subgroup revealing two novel alleles in the ABO gene. *Transfusion (Paris)*. novembro de 2008;48(11):2442–7.
71. Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus* [Internet]. novembro de 2007 [citado 22 de agosto de 2014];5(4):227–40. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2581910&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
72. Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, organizadores. *Technical Manual*. 20th ed. American Association of Blood Banks. Bethesda, Maryland: AABB; 2020. 816 p.
-

73. Stroup M. A review: the use of monoclonal antibodies in blood banking. *Immunohematology*. 1º de janeiro de 1990;6(2):30–6.
74. Thi Trung N, Nam Hai T, Quoc Viet H, Giay C. Study on mixing anti-A monoclonal antibody and anti-B monoclonal antibody to make anti-AB save as abo blood grouping reagent. *Vietnam J Sci Technol* [Internet]. 30 de janeiro de 2018 [citado 28 de janeiro de 2023];56(1):17–23. Disponível em: <https://vjs.ac.vn/index.php/jst/article/view/9372>
75. Kennedy MS, Waheed A, Moore J. ABO discrepancy with monoclonal ABO reagents caused by a pH-dependent autoantibody. *Immunohematology* [Internet]. 1995;11(3):71–3. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15447061>
76. Svensson L, Bindila L, Angström J, Samuelsson BE, Breimer ME, Rydberg L, et al. The structural basis of blood group A-related glycolipids in an A3 red cell phenotype and a potential explanation to a serological phenomenon. *Glycobiology* [Internet]. 2011;21(2):162–74. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926599>
-

Anexo 1: Discrepâncias ABO, causas prováveis e formas de resolução.

Prova direta (pesquisa do antígeno na hemácia)		
Tipo de reação	Causa provável	Resolução / Orientação
Frac (≤ 2+) ou Ausente (0)*	Fenótipos fracos	AMAT; ASS; AF; AMS
	Fenótipo Bombaim ou Para-Bombaim	anti-H; ASS; AF; AMS (<i>FUT1</i>)
	Excesso de antígenos ABH solúveis	AMAT; THL; ASS
	Doenças oncológicas / oncohematológicas	AMAT; AMPE (261delG); monitorar
	Transfusões ABO não idênticos	Repetir após 3 meses
	Transplantes alogênicos	Monitorar pega eritrocitária
	Fenótipo AB Híbrido [cisAB / B(A)]	AMAT; ASS; AF; AMS
	Recém-nascido (cadeias lineares)	AMAT; monitorar
Inesperada**	TAD positivo - autoanticorpos IgM	THL; THT-DTT
	TAD positivo - autoanticorpos IgG	THL; THT-Cloroquina
	TAD positivo - crioaglutininas Tn	THL; THT-DTT; THT-EP
	Excesso de proteínas plasmáticas	THL
	Reação contra constituintes dos reagentes	Mudar: reagentes / técnica de revelação
	Transplantes alogênicos	Monitorar pega eritrocitária
	Fenótipo B adquirido	THL; mudar antissoros e/ou técnica
	Fenótipo AB Híbrido [cisAB / B(A)]	AMAT; ASS; AF; AMS
Reatividade em Campo Misto	Transfusões ABO não idênticos	Repetir após 3 meses
	Transplantes alogênicos	Monitorar pega eritrocitária
	Quimerismo ou Mosaicismo	SHCM; ASS; AF; AMS
	Fenótipos fracos	AMAT; ASS; AF; AMS
	Recém-nascido (cadeias lineares)	AMAT; monitorar
	Doenças oncológicas (bexiga, oral, pulmão) / oncohematológicas (leucemias)	AMAT; monitorar
Prova reversa (pesquisa do anticorpo no soro ou plasma)		
Tipo de reação	Causa provável	Resolução / Orientação
Frac ou ausente*	Imunotolerância: Fenótipos fracos, mosaicismos teciduais, transplante	Pesquisar o antígeno suspeito na hemácia
	Imunodeficiência: Idade (crianças < 4-6 meses e idosos), Hipogamaglobulinemia	Afastar imunotolerância e monitorar
	Imunossupressão: Medicamentos	
Inesperada**	Anticorpos ABO (anti-A; anti-A ₁)	Pesquisar o antígeno A na hemácia
	Aloanticorpos	Testar com hemácia antígeno negativo ao anticorpo identificado
	Anticorpos indeterminados: autoanticorpos, excesso de proteína plasmática	Definir ABO pela prova direta e monitorar
	Anticorpo passivo: transfusão plasmática incompatível ou infusão de imunoglobulinas	Repetir com nova amostra após 2-24 horas da infusão
Legenda: AMAT = Anticorpos monoclonais de altos títulos (anti-A / anti-B: 2048 a 4096; anti-A,B: 1024 a 2048); AMS = Análise molecular por sequenciamento; AMPE = Análise molecular de polimorfismo específico; ASS = Análise do status Secretor; THL = Teste com hemácias lavadas; THT-DTT = Teste hemácias tratadas – Ditiotreitól; THT-EP = Teste hemácias tratadas – Enzimas proteolíticas (bromelina / papaína); AF = Análise de familiares; SHCM = Separação de hemácias do campo misto. *Reativo fraco: ≤ 2+ **Quando uma reatividade, em qualquer intensidade, promover uma discrepância.		

Anexo 2. Método para separação de hemácias do campo misto.**Separação de hemácias da reação de campo misto**

1. Preparar uma suspensão de hemácias a 20%:
 - a. 800 µL de solução fisiológica ou solução de baixa força iônica (LISS);
 - b. 200 µL do CH que apresenta CM
2. Dividir o volume da suspensão em dois tubos (tubo 1).
3. Adicionar 500 µL (1:1) do antissoro que apresenta reatividade no CM (tubo 1).
4. Tampar os tubos, homogeneizar e incubar 15 min na temperatura ambiente.
5. Centrifugar e retirar o sobrenadante deixando aproximadamente 200 µL.
6. Ressuspender com cuidado até liberar o botão de hemácias e desprender todas as hemácias que não reagiram.
7. Com auxílio de uma pipeta e ponteira de 200 µL, retirar o líquido com as hemácias não reativas e transferir para um segundo tubo (tubo 2):
 - a. Juntar as hemácias aglutinadas em um dos tubos 1 e reservar.
8. Centrifugar o tubo 2, ressuspender e observar coágulo, se presente, remover e descartar ou adicionar ao tubo 1. **Nota:** Repetir este passo até não ser observado coágulo/aglutinado.
9. Lavar as hemácias não aglutinadas do tubo 2 e utilizar para as fenotipagens de acordo com os protocolos convencionais.
10. Lavar as hemácias aglutinadas e reservadas do tubo 1:
 - a. Tratar com Ditioneitol (DTT) 0,2 M;
 - b. Após tratamento com DTT, lavar as hemácias e utilizar para as fenotipagens de acordo com os protocolos convencionais.