

---

# Ação bactericida de isoaglutininas ABO em diferentes diluições de anticorpos anti-ABO

## *Bactericidal action of ABO isoagglutinins at different dilutions of anti-ABO antibodies*

Naiara Merenciano Gomes<sup>1</sup>; Nicolli Butzke de Souza<sup>1</sup>; Alexandre Bella Cruz<sup>1</sup>; Daniela Valcarenghi<sup>1</sup>; Alexandre Geraldo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Itajaí, Câmpus Itajaí, Itajaí, Santa Catarina, Brasil.

\*Autor correspondente: Alexandre Geraldo. E-mail: alexandregeraldo@univali.br

Recebido: 30/11/2021; Aceito: 15/12/2021

---

### RESUMO

O sistema de grupo sanguíneo ABO tem sido muito associado ao desenvolvimento de doenças infecciosas, influenciando o prognóstico de determinadas patologias e favorecendo ou não, a progressão de quadros clínicos. Com isto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a ação bactericida *in vitro* dos anticorpos anti-ABO sobre a bactéria *Escherichia coli*. Foi observada diferença significativa no crescimento bacteriano ( $p < 0,0001$ ) nas comparações do Grupo O, Grupo A, Grupo B e Grupo AB, quando comparados ao controle positivo, demonstrando o efeito bactericida dos anticorpos anti-ABO. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) intergrupos sanguíneos O, A, B e AB. Apesar de não haver diferença estatística ( $p > 0,05$ ) intergrupos sanguíneos O, A, B e AB, o grupo sanguíneo AB apresentou menor ação bactericida. A partir da ação bactericida dos anticorpos anti-ABO, estes podem ser utilizados no futuro como alternativas não farmacológicas no auxílio de quadros clínicos de sepse.

**Palavras-chaves:** Anticorpos, *Escherichia coli*, grupo sanguíneo ABO.

### ABSTRACT

The ABO blood group system has been closely associated with the development of infectious diseases, influencing the prognosis of certain pathologies and favoring or not the progression of clinical conditions. With this, this research had as its objective to evaluate the bactericide action *in vitro* of the anti-ABO antibodies upon the *Escherichia coli* bacteria. It was observed a substantial difference in the bacterial growth ( $p < 0,0001$ ) in the comparisons of Group O, Group A, Group B, and Group AB when compared to the Positive Control, demonstrating the bactericide effect of the anti-ABO antibodies. There was no significant difference ( $p > 0,05$ ) between the blood systems O, A, B, and AB. Although there was no statistical difference ( $p > 0,05$ ) between blood groups O, A, B and AB, blood group AB had less bactericidal action. Based on the bactericidal action of anti-ABO antibodies, these can be used in the future as non-pharmacological alternatives to help with sepsis clinical conditions.

**Keywords:** Antibodies, *Escherichia coli*, ABO blood group

---

## INTRODUÇÃO

O sistema ABO, descoberto pelo médico austríaco Karl Landsteiner no ano de 1900, foi o primeiro sistema de grupos sanguíneos a descrever os fenótipos A, B e O, sendo o fenótipo AB descrito apenas alguns anos depois, por Alfred Von Decastello (BRASIL, 2014). O sistema ABO é considerado até os dias de hoje, o sistema mais importante na medicina clínica transfusional, podendo-se encontrar quatro diferentes fenótipos sanguíneos, sendo eles: O, A, B e AB. Estes tipos são caracterizados pela presença ou ausência de antígenos na membrana eritrocitária e aglutininas (anticorpos) no plasma sanguíneo, sendo que na membrana das hemácias pode-se encontrar dois tipos de antígenos do sistema ABO, o antígeno A e/ou B, e no plasma sanguíneo pode-se encontrar duas especificidades de anticorpos, o anti-A e/ou anti-B, bem como ausência desses (FRIDMAN, 2019). Há hipóteses de que o polimorfismo dos antígenos de grupos sanguíneos seja devido a sua co-evolução com patógenos, e a partir desta relação, pesquisas com o objetivo de compreender estas interações e os prováveis mecanismos de ação se tornam cada vez mais necessárias (ONSTEN, 2013).

Os antígenos do sistema ABO são sintetizados a partir de enzimas glicosiltransferases, as quais são codificadas pelo gene ABO localizado no braço longo do cromossomo 9 (BRASIL, 2014; DANIELS, 2013). Para a síntese destes antígenos é necessário um substrato precursor na membrana eritrocitária – o antígeno H, que é sintetizado pela enzima  $\alpha$ -2-L-fucosiltransferase, sendo a mesma codificada pelo gene *FUT1* presente no cromossomo 19 (LEE, 2016). Estes antígenos começam a ser detectados nas hemácias a partir da quinta semana de vida intrauterina e completam seu desenvolvimento entre 2 e 4 anos de idade, no qual permanecem constantes ao longo da vida (ARBELÁEZ-GARCÍA, 2009; BRASIL, 2014).

O desenvolvimento dos anticorpos contra os antígenos do grupo sanguíneo ABO ocorre através de duas vias: natural ou imune. Os anticorpos naturais ocorrem principalmente devido ao aumento da microbiota intestinal, cujo as bactérias presentes no trato intestinal apresentam antígenos similares aos do sistema ABO, estimulando a síntese de anticorpos contra os mesmos (STEPHENS *et al.*, 2013; VIZZONI *et al.*, 2013). Outros fatores como uso de medicamentos de origem animal, vacina antigripal, poeira e infecções também podem estimular de forma natural estes anticorpos (BRASIL, 2014). Os anticorpos denominados imunes ocorrem em uma gravidez ABO incompatível ou até mesmo em casos de transfusões incompatíveis. Estas imunoglobulinas, que são predominantemente da classe IgM e IgG, começam a ser detectados a partir do 3º e 6º mês de vida, apresentando um aumento até a fase adulta e uma diminuição em idosos (ARBELÁEZ-GARCÍA, 2009; STEPHENS *et al.*, 2013). Em um estudo realizado por Muschel e Osawa (1959), foi observado que a cepa de *Escherichia coli* O86 era inibida quando em contato com anticorpos anti-B, evidenciando uma maior defesa intrínseca aos indivíduos que possuem essas imunoglobulinas presentes no organismo.

A sepsé pode ser definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica, sendo ocasionada em resposta a um processo infeccioso, levando a uma disfunção orgânica no indivíduo (QUEMEL, 2021). A doença é ocasionada principalmente por bactérias e suas toxinas, sendo as bactérias gram-negativas as mais frequentes, em especial, a *Escherichia coli* (FRACASSO, 2008). Atualmente, o tratamento da sepsé consiste no uso de antimicrobianos como os beta-lactâmicos e glicopeptídeos, porém, sabe-se que esta opção farmacológica é responsável por diversos efeitos adversos que podem acometer o sistema nervoso, ocasionar nefrotoxicidade, alterações sanguíneas e defeitos na coagulação. Ainda, outra questão de extrema importância é a multirresistência dos micro-organismos aos antibióticos utilizados, no qual seu uso contínuo e muitas vezes exagerado, leva a infecções mais graves e difíceis de serem controladas (VELASCO, 2019).

A partir disto e da alta taxa de mortalidade ocasionada pela sepsé, percebe-se a necessidade de novas alternativas de tratamento não farmacológicas (BARCELOS, 2007). Um estudo realizado por Martins *et al.*, (1997),

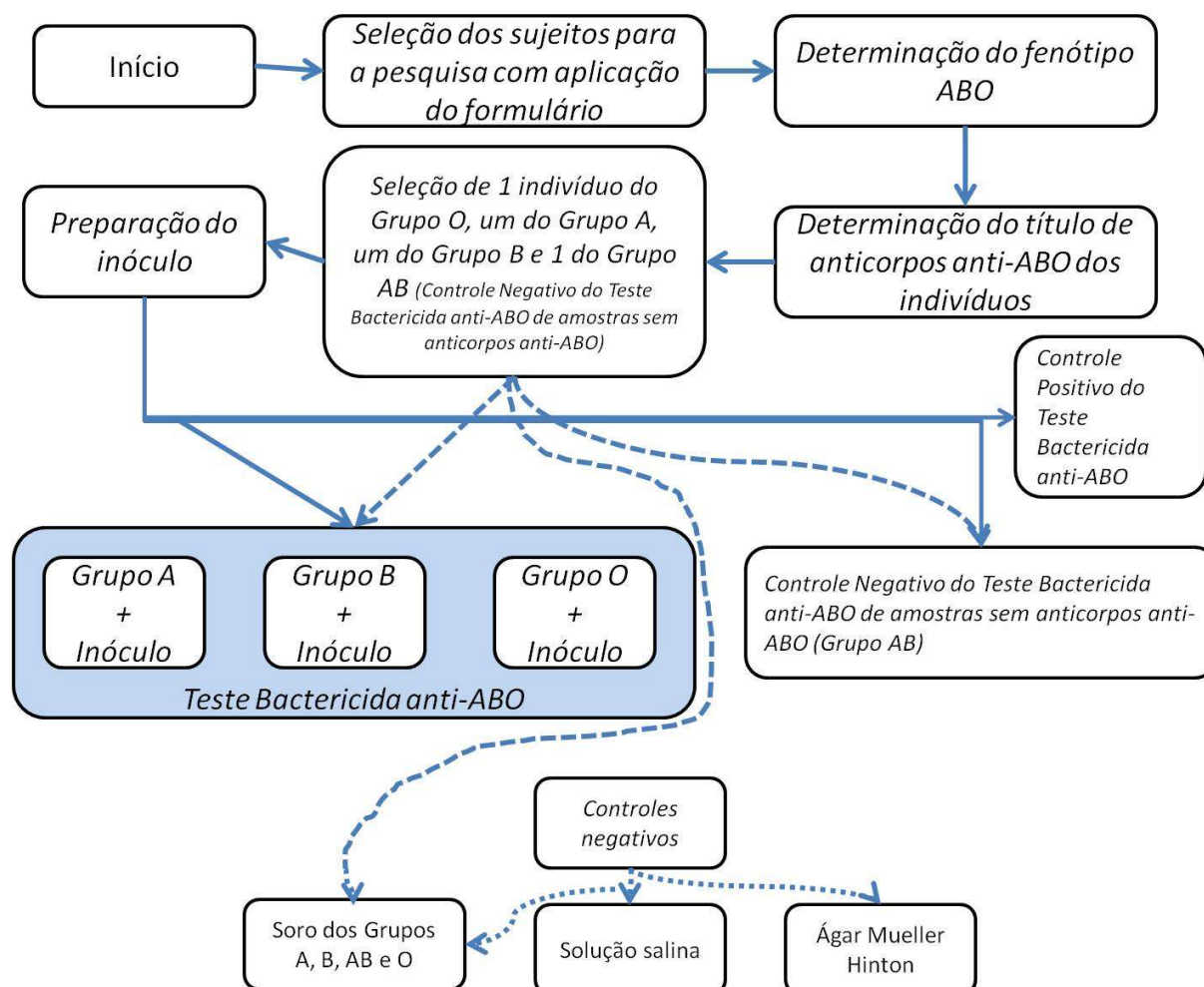
avaliou a eficácia terapêutica do uso de imunoglobulinas policlonais enriquecidas com IgM no tratamento de sepse, sendo visualizado redução significativa na taxa de mortalidade e ausência de efeitos adversos. Abordagens terapêuticas não farmacológicas estão sendo cada vez mais utilizadas, ganhando destaque o uso de anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais são moléculas de imunoglobulinas idênticas produzidas a partir de uma célula B, e atualmente, são adotados no tratamento de diversas condições, incluindo infecções, processos inflamatórios e neoplasias (TANDON *et al.*, 2020).

Tendo em vista que a função dos antígenos e anticorpos do sistema sanguíneo ABO em seres humanos ainda não está elucidada (EWALD; SUMNER, 2016), estudos como este, que buscam compreender a relação dos anticorpos dos grupos sanguíneos com patógenos, são de grande importância para a sociedade, visto que se for comprovado a capacidade destes em imunomodular processos infecciosos, estas imunoglobulinas podem vir a auxiliar no tratamento de infecções e septicemias, principalmente em casos em que há resistência bacteriana aos fármacos. Desta forma, esse estudo teve como objetivo avaliar a ação bactericida *in vitro* dos anticorpos anti-ABO sobre a bactéria *Escherichia coli*, visando o entendimento da relação desses anticorpos e o patógeno, com ênfase na inibição e/ou destruição do mesmo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Seleção dos sujeitos para a pesquisa*

Após aprovação do estudo no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Itajaí sob o parecer número 4.013.440, foram recrutados 10 indivíduos do sexo feminino que possuíam entre 18 e 69 anos de idade; que não tivessem feito uso de antibióticos e/ou anti-inflamatórios nos últimos 90 dias e que não tenham passado por procedimentos cirúrgicos ou odontológicos nos últimos 90 dias. Foram obtidas 2 amostras sanguíneas de cada participante do estudo, sendo uma coletada com anticoagulante EDTA e outra sem anticoagulante, sendo essa coleta denominada de Ensaio 1. Para cada participante foi realizado a determinação do fenótipo ABO, a fim de se obter amostras do grupo sanguíneo ABO (O, A, B e AB) e a titulação dos anticorpos anti-ABO (com excessão do grupo sanguíneo AB). Dentre os 10 indivíduos, quatro foram selecionados por terem títulos acima de 64 para anticorpos anti-ABO. Desta forma, permaneceram no estudo um indivíduo do grupo O, um do grupo A, e um do grupo B que e um do grupo AB. A pesquisa foi realizada em duplicata em um intervalo de 21 dias, no qual foi realizado uma nova coleta das amostras biológicas dos participantes e todos os testes foram repetidos, sendo esta etapa denominada de Ensaio 2. O resumo e organograma estão apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Organograma da metodologia e testes da pesquisa.

### ***Determinação do fenótipo ABO***

Para a determinação do grupo sanguíneo ABO de cada participante da pesquisa foi utilizada a amostra coletada com EDTA após ser centrifugada a 1000 g por 5 minutos. Posteriormente, foi realizada a técnica em tubo mediante realização da Prova Direta utilizando os antissoros monoclonais anti-A, anti-B e anti-AB Bio-Rad Laboratories® e Prova Reversa com o uso de reagentes de Hemácias A1 e B do mesmo fabricante (BRASIL, 2014). A leitura das reações foi realizada após centrifugação dos tubos por 15 segundos à uma rotação de 2.326 g, seguindo o padrão de leitura da intensidade da reação de acordo com Girello e Kuhn (2016).

### ***Determinação do título de anticorpos anti-ABO dos indivíduos***

Para a determinação do título de anticorpos anti-A e anti-B foi utilizada a amostra coletada com EDTA centrifugada a 1000 g por 5 minutos. A técnica foi feita de acordo com Judd e colaboradores (2008) por meio da titulação seriada do plasma em tubo em temperatura ambiente. Foi realizada uma série de diluições do plasma dos indivíduos para anticorpos anti-ABO até 1/512 em solução salina (NaCl 0,89%). Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 2.326 g por 15 segundos. A leitura da reação foi realizada verificando-se a presença ou ausência de hemólise e/ou aglutinação de acordo com Girello e Kuhn (2016).

### Preparo do inóculo utilizado no Teste Bactericida anti-ABO.

O inóculo utilizado no teste foi preparado após a ativação por repicagem da cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), em meio ágar Mueller Hinton e incubada a 35 °C por 24 horas. Posteriormente, o inóculo foi preparado através de suspensão de colônias da bactéria em solução salina estéril, e a concentração de células foi ajustada através de comparação com a escala de MacFarland 0,5 para atingir o equivalente a  $1,5 \times 10^8$  células/mL. A partir desta solução, foi realizada uma série de diluições em solução salina estéril até a concentração final de  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL, sendo esta a concentração padrão de inóculo utilizada em todos os testes.

### Teste Bactericida anti-ABO

Para a realização do Teste Bactericida anti-ABO foi utilizado a amostra coletada sem anticoagulante após centrifugação por 10 minutos a 1000 g, a fim de se obter o soro. O Teste Bactericida visava a diluição dos anticorpos presentes no soro do indivíduo e a constância do inóculo, e para isso, foram separados 7 tubos de microcentrífuga estéreis para cada grupo sanguíneo, sendo realizado uma série de diluições de 1 a 64 do soro em solução salina estéril. Com as diluições finalizadas, 100 µL do inóculo foi adicionado em todos os tubos de microcentrífuga, permanecendo em contato com a amostra por 10 minutos antes da solução ser semeada (tempo este estipulado pelos pesquisadores para que ocorresse a ação bactericida dos anticorpos anti-ABO). Posteriormente, 100 µL de cada diluição foi transferido para as placas com ágar Mueller Hinton e estendido, com o auxílio da alça de Drigalski, sobre toda a superfície do meio. As placas foram incubadas a 35 °C e após 24 horas foi realizada a leitura e contagem das colônias (Figura 2).

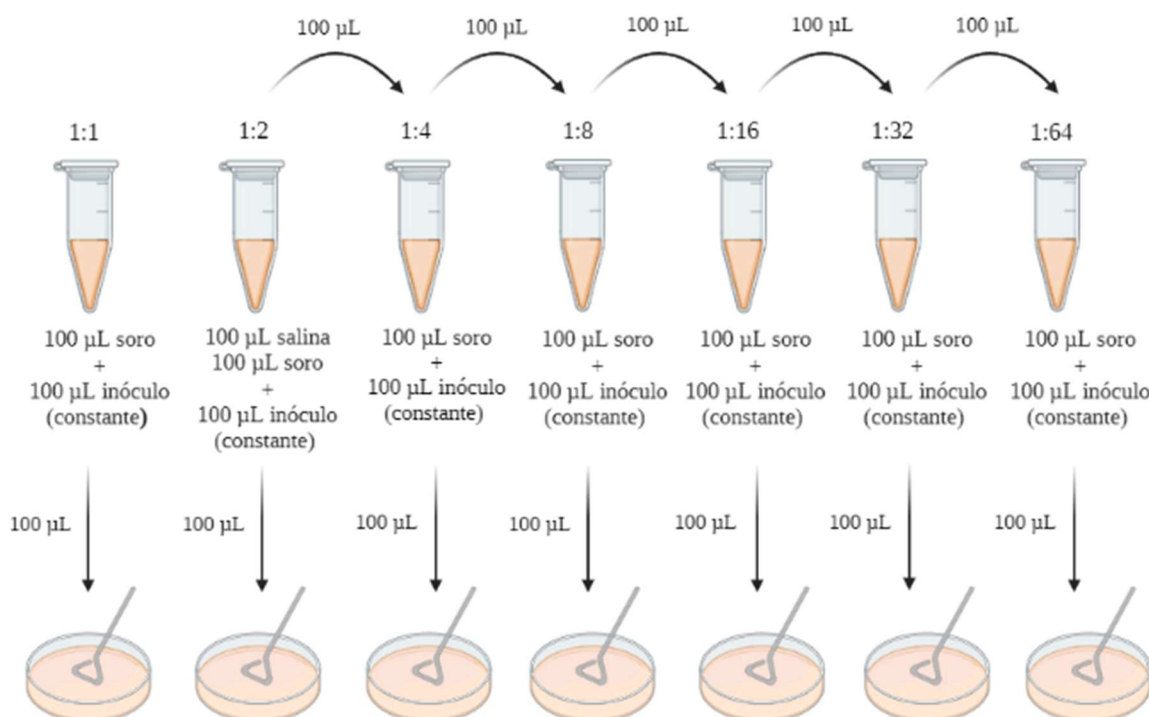


Figura 2. Ilustração da realização do Teste Bactericida anti-ABO.

### Controle Positivo do Teste Bactericida anti-ABO

Para avaliação do crescimento bacteriano sem a amostra de soro utilizada no Teste Bactericida, foi semeado 100 µL do inóculo puro em ágar Mueller Hinton e incubada a 35 °C. Após 24 horas foi feita a contagem das colônias, analisando seu crescimento e desenvolvimento no meio de cultura, sendo o controle positivo do teste.

### **Controle Negativo do Teste Bactericida anti-ABO de amostras sem anticorpos anti-ABO**

Para avaliar o potencial efeito bactericida dos anticorpos anti-ABO, foi realizada a mesma técnica do Teste Bactericida anti-ABO utilizando soro humano do grupo AB, visto que indivíduos deste grupo não possuem anticorpos anti-ABO.

### **Controles negativos**

Foram realizadas culturas do meio ágar Mueller Hinton, da solução salina e dos soros dos indivíduos participantes da pesquisa, a fim de certificar que estavam devidamente estéreis e livres de contaminação microbiana. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada por Teste de Múltipla comparação Tukey's com Intervalo de Confiança de 95% através do software GraphPad Prism 8.0.2 de 2019 e considerou-se diferença significativa o valor de  $p < 0,05$ . Foi realizada a média e desvio padrão da Unidade Formadora de Colônias (UFC)/mL da amostra pura e demais diluições dos grupos sanguíneos O, A, B e AB no Ensaio 1 e Ensaio 2.

## **RESULTADOS**

Para a realização do estudo foram coletadas amostras de 10 indivíduos, sendo todos do sexo feminino e com idade entre 20 e 24 anos. Desses 10 indivíduos, prosseguiu-se com a fenotipagem ABO e titulação dos anticorpos anti-ABO, sendo excluídas aquelas amostras que não apresentaram títulos de anticorpos anti-ABO iguais ou superiores a 64. Dentre os 10 sujeitos da pesquisa, 6 foram excluídas devido à baixa titulação estipulada e apenas 4 permaneceram no estudo, sendo cada amostra pertencente a um diferente fenótipo do grupo ABO.

No Ensaio 1 foi observado as seguintes titulações: indivíduo do grupo O (32 anti-A, 64 anti-B), indivíduo do grupo A (128) e indivíduo do grupo B (64). No Ensaio 2, realizada 21 dias após o Ensaio 1, encontrou-se as seguintes titulações: indivíduo do grupo O (128 anti-A, 256 anti-B), indivíduo do grupo A (128) e indivíduo do grupo B (32), como demonstrado na Quadro 1.

	Título de Anticorpos dos Grupos Sanguíneos				
	O		A	B	AB
	anti-A	anti-B	anti-B	anti-A	-
Ensaio 1	32	64	128	64	-
Ensaio 2	128	256	128	32	-
Idade do indivíduo	23 anos		21 anos	21 anos	21 Anos
Sexo	Feminino		Feminino	Feminino	Feminino

**Quadro 1.** Resultado da titulação dos anticorpos anti- ABO dos indivíduos no Ensaio 1 e Ensaio 2, idade e sexo dos sujeitos da pesquisa.

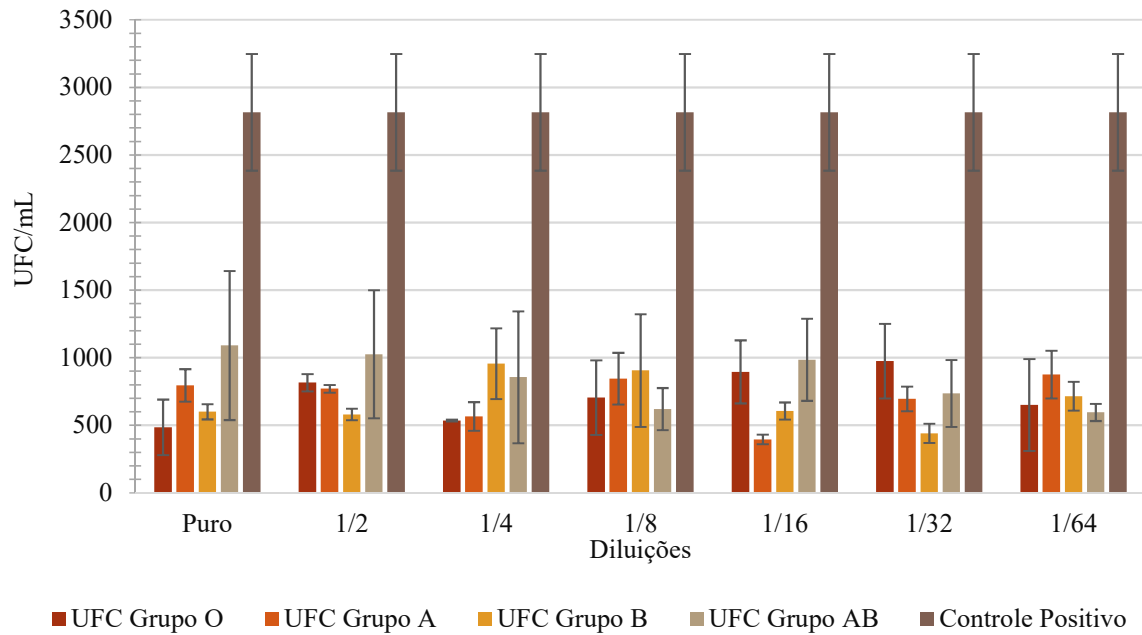
A partir da análise da Tabela 1, percebeu-se que um menor crescimento de UFC/mL nos grupos O, B e A respectivamente, do que grupo AB e Controle Positivo. Ainda, não houve crescimento bacteriano (contaminação) no Controle Negativo do Teste Bactericida anti-ABO de amostras sem anticorpos anti-ABO, assim como não

houve nos Controles Negativos do meio ágar Mueller Hinton, da solução salina estéril e do soro dos sujeitos da pesquisa.

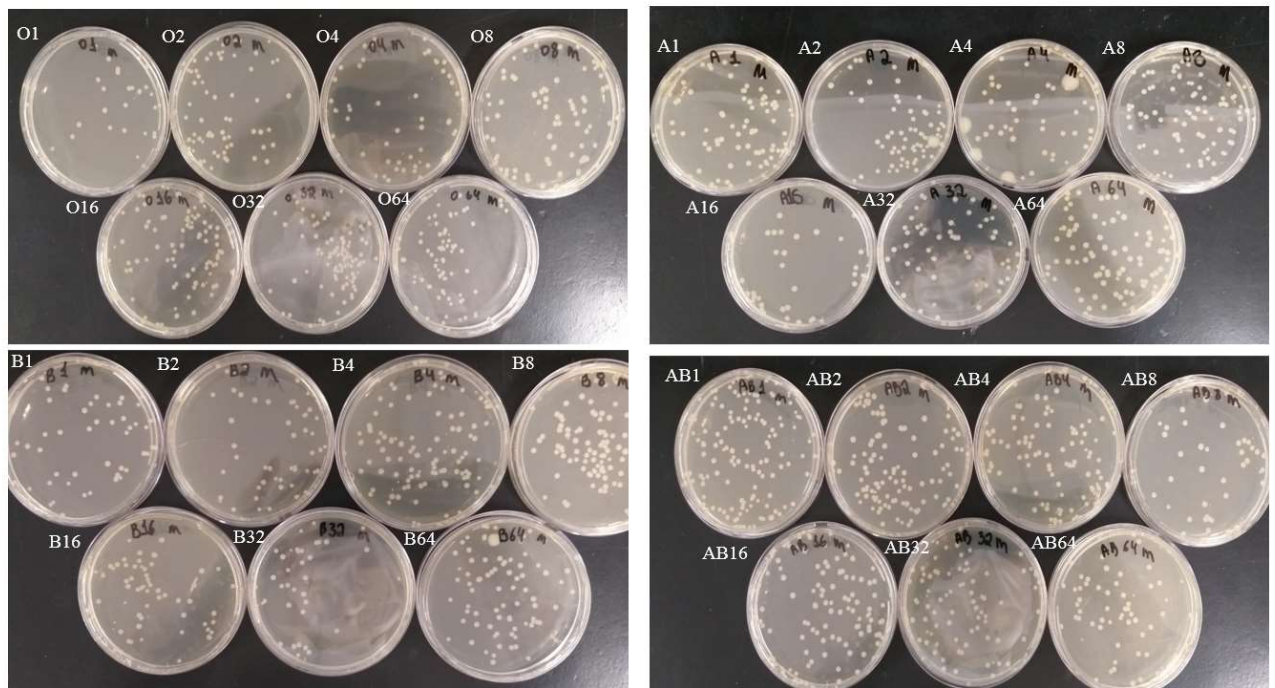
Diluição	UFC Grupo O	UFC Grupo A	UFC Grupo B	UFC Grupo AB	Controle Positivo	Controle Negativo
Puro	485 ± 205	795 ± 120	600 ± 56	1090 ± 551	2815 ± 431	0 ± 0
1/2	815 ± 63	770 ± 28	580 ± 42	1025 ± 473	2815 ± 431	0 ± 0
1/4	535 ± 7	565 ± 106	955 ± 261	855 ± 487	2815 ± 431	0 ± 0
1/8	705 ± 275	845 ± 190	905 ± 417	620 ± 155	2815 ± 431	0 ± 0
1/16	895 ± 233	395 ± 35	605 ± 63	985 ± 304	2815 ± 431	0 ± 0
1/32	975 ± 275	695 ± 91	440 ± 70	735 ± 247	2815 ± 431	0 ± 0
1/64	650 ± 339	875 ± 176	715 ± 106	595 ± 63	2815 ± 431	0 ± 0

**Tabela 1.** Média e Desvio Padrão das UFC/mL de cada diluição por grupo sanguíneo do Ensaio 1 e Ensaio 2 e Controle Positivo e Negativo do teste.

Na Figura 3 foi observada diferença significativa no crescimento bacteriano ( $p < 0,0001$ ) em todas as análises (puro ao título 64) nas comparações Grupo O x Controle Positivo, Grupo A x Controle Positivo, Grupo B x Controle Positivo, Grupo AB x Controle Positivo, demonstrando o efeito bactericida dos anticorpos anti-ABO. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) intergrupos sanguíneos O, A, B e AB, tanto na amostra pura como diluída de soro. Observou-se que na amostra pura de todos os grupos sanguíneos, houve uma maior concentração de UFC/mL do grupo AB, seguido dos grupos A, B e O. Na diluição 1/2, o grupo AB também apresentou uma maior concentração de UFC/mL, seguido dos grupos O, A e B. Já na diluição 1/4, identificou-se que o grupo com maior concentração de UFC/mL foi o grupo B, seguido dos grupos AB, A e O. Na diluição 1/8, o grupo com maior UFC/mL foi o grupo B, seguido dos grupos A, O e AB. Na diluição 1/16, novamente o grupo AB foi o que apresentou uma maior concentração de UFC/mL, seguido dos grupos O, B e A. Analisando a amostra na diluição 1/32, observou-se que o grupo O apresentou uma maior concentração de UFC/mL, seguido dos grupos AB, A e B. Na última diluição realizada no estudo (1/64), foi observado que o grupo A apresentou uma maior concentração de UFC/mL, seguido dos grupos B, O e AB. Apesar de não haver diferença estatística intergrupos sanguíneos, os resultados do teste sugerem que o grupo AB teve uma menor eficácia quando avaliado sua ação bactericida, visto que o grupo apresentou altas concentrações de UFC/mL em praticamente todas as diluições.



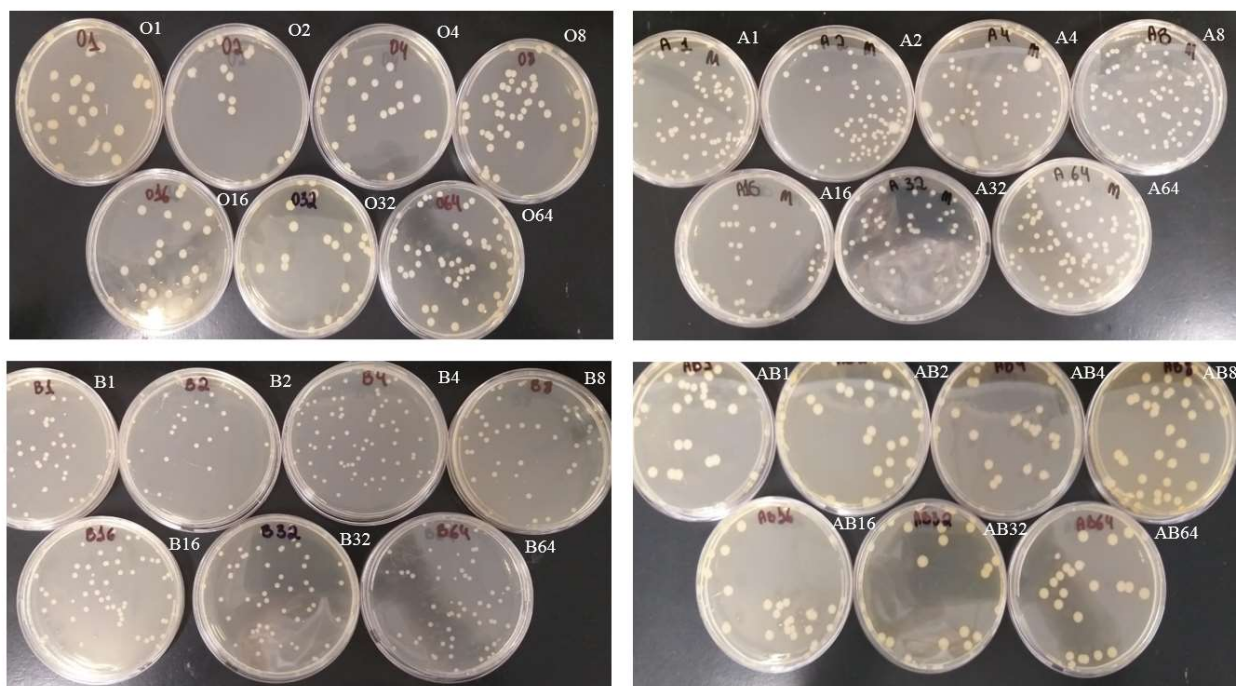
**Figura 3.** Média e desvio padrão das UFC/mL da amostra pura e nas diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 dos grupos sanguíneos.



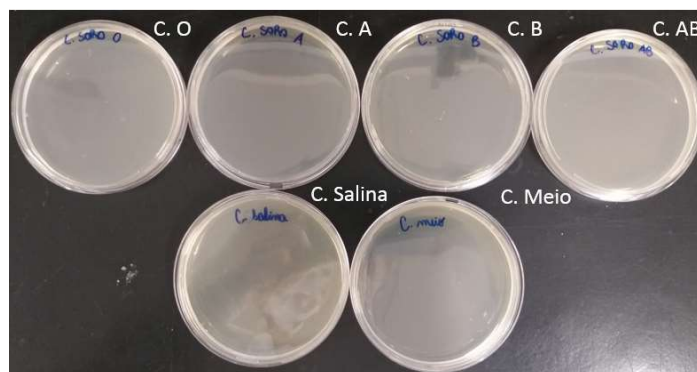
**Figura 4.** Crescimento bacteriano no soro puro e diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 dos grupos sanguíneos na Etapa 1. **Legenda:** O1 = Soro humano grupo O e inóculo; O2 = Soro humano grupo O e inóculo 1/2; O4 = Soro humano grupo O e inóculo 1/4; O8 = Soro humano grupo O e inóculo 1/8; O16 = Soro humano grupo O e inóculo 1/16; O32 = Soro humano grupo O e inóculo 1/32; O64 = Soro humano grupo O e inóculo 1/64; A1 = Soro humano grupo A e inóculo; A2 = Soro grupo A e inóculo 1/2; A4 = Soro humano grupo A e inóculo 1/4; A8 = Soro humano



grupo A e inóculo 1/8; A16 = Soro humano grupo A e inóculo 1/16; A32 = Soro humano grupo A e inóculo 1/32; A64 = Soro humano grupo A e inóculo 1/64; B1 = Soro humano grupo B e inóculo; B2 = Soro humano grupo B e inóculo 1/2; B4 = Soro humano grupo B e inóculo 1/4; B8 = Soro humano grupo B e inóculo 1/8; B16 = Soro humano grupo B e inóculo 1/16; B32 = Soro humano grupo B e inóculo 1/32; B64 = Soro humano grupo B e inóculo 1/64; AB1 = Soro humano grupo AB e inóculo; AB2 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/2; AB4 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/4; AB8 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/8; AB16 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/16; AB32 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/32; AB64 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/64.



**Figura 5.** Crescimento bacteriano no soro puro e diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 dos grupos sanguíneos na Etapa 2. **Legenda:** O1 = Soro humano grupo O e inóculo; O2 = Soro humano grupo O e inóculo 1/2; O4 = Soro humano grupo O e inóculo 1/4; O8 = Soro humano grupo O e inóculo 1/8; O16 = Soro humano grupo O e inóculo 1/16; O32 = Soro humano grupo O e inóculo 1/32; O64 = Soro humano grupo O e inóculo 1/64; A1 = Soro humano grupo A e inóculo; A2 = Soro humano grupo A e inóculo 1/2; A4 = Soro humano grupo A e inóculo 1/4; A8 = Soro humano grupo A e inóculo 1/8; A16 = Soro humano grupo A e inóculo 1/16; A32 = Soro humano grupo A e inóculo 1/32; A64 = Soro humano grupo A e inóculo 1/64; B1 = Soro humano grupo B e inóculo; B2 = Soro humano grupo B e inóculo 1/2; B4 = Soro humano grupo B e inóculo 1/4; B8 = Soro humano grupo B e inóculo 1/8; B16 = Soro humano grupo B e inóculo 1/16; B32 = Soro humano grupo B e inóculo 1/32; B64 = Soro humano grupo B e inóculo 1/64; AB1 = Soro humano grupo AB e inóculo; AB2 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/2; AB4 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/4; AB8 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/8; AB16 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/16; AB32 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/32; AB64 = Soro humano grupo AB e inóculo 1/64.



**Figura 6.** Controles negativos dos soros dos indivíduos, solução salina e do ágar Mueller Hinton. **Legenda:** C.O = Controle do soro do indivíduo O; C. A = Controle do soro do indivíduo A; C. B = Controle do soro do indivíduo B; C. AB = Controle do soro do indivíduo AB; C. Salina = Controle da solução salina; C. Meio = Controle do ágar Mueller Hinton.

As Figuras 4, 5 e 6 apresentam as imagens dos resultados do teste bactericida no Ensaio 1, 2 e controles da pesquisa, respectivamente. Nota-se a importância de realizar os testes com mais indivíduos da população para melhor elucidar os resultados encontrados, uma vez que os testes foram realizados com um número amostral relativamente baixo, sendo necessário a reprodução do estudo em grupos populacionais diferentes e maiores, analisando se a ação bactericida é visualizada em demais indivíduos. Ainda, por se tratar de um estudo com variáveis, é interessante que estas sejam exploradas em demais pesquisas, observando se os resultados são condizentes aos encontrados no presente trabalho. Com isto, é possível que em metodologias futuras ocorra a alteração do micro-organismo utilizado; do tempo de contato entre o soro dos indivíduos e a bactéria; da concentração de inóculo e dos títulos de anticorpos anti-ABO, o qual podem ser superiores ou inferiores ao utilizado no teste.

## DISCUSSÃO

Há muitos anos, a associação entre sistemas de grupos sanguíneos e doenças infecciosas têm sido objeto de estudos. A partir disto, estudos já foram realizados com o intuito de compreender a associação entre bactérias e grupos sanguíneos, principalmente o grupo ABO (EWALD; SUMNER, 2016). Um estudo realizado por Springer e Horton (1969), envolvendo a bactéria *Escherichia coli* O86 e o grupo sanguíneo ABO, apontou uma alta interação entre o micro-organismo e o grupo em questão, sendo demonstrado a capacidade da bactéria em interagir com os antígenos deste sistema e aumentar os títulos de anticorpos anti-ABO. Os pesquisadores relataram que todos os participantes da pesquisa (adultos, crianças e de ambos os sexos), aumentaram os títulos de anticorpos anti-ABO após o consumo ou inalação de bactérias *Escherichia coli* O86 mortas, demonstrando a capacidade da bactéria em interagir e estimular estes anticorpos. Foi verificado também que esta resposta era mais frequente em pessoas do grupo sanguíneo B do que as do grupo sanguíneo A e O.

No presente estudo foi observado diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) no crescimento bacteriano nas análises do soro puro e nas demais diluições (1/2 a 1/64) nas comparações Grupo O x Controle Positivo, Grupo A x Controle Positivo, Grupo B x Controle Positivo, Grupo AB x Controle Positivo. Estes dados demonstram o efeito bactericida dos anticorpos anti-ABO, visto que houve uma redução significativa das UFC/mL quando comparado ao Controle Positivo (sem anticorpos anti-ABO). O efeito bactericida de anticorpos anti-ABO já havia sido elucidado em experimentos realizados por Muschel e Osawa (1959), no qual foi observado que o anticorpo anti-B exercia um efeito bactericida sobre a bactéria *Escherichia coli* O86, fornecendo um modelo para a possível relação dos

sistemas de grupos sanguíneos e a resistência a infecções. Em outro estudo realizado por Shang *et al.* (2016), foi demonstrado uma nova técnica para a adsorção e/ou remoção de anticorpos anti-A e/ou B do plasma sanguíneo, tendo como base a semelhança estrutural entre a bactéria *Escherichia coli* O86: B7 e o epítipo B humano. A partir desta semelhança, os pesquisadores conseguiram remover anticorpos anti-B do grupo sanguíneo O e do grupo A, apresentando uma redução significativa deste título de anticorpos. Ambos os trabalhos demonstram a capacidade da bactéria *Escherichia coli* O86 em interagir com os anticorpos do grupo ABO, em especial o anti-B.

Sabe-se que indivíduos do grupo sanguíneo AB não apresentam anticorpos anti-ABO em seu plasma, e apesar de não haver diferença estatística ( $p > 0,05$ ) intergrupos sanguíneos O, A, B e AB quando avaliado sua ação bactericida, percebeu-se uma tendência do grupo sanguíneo AB em ser menos eficaz quando comparado aos demais grupos. Nota-se isto já que o grupo apresentou altas concentrações de UFC/mL para o soro puro e nas diluições 1/2, 1/4, 1/16 e 1/32, sendo que apenas nas diluições 1/8 e 1/64 apresentou baixa concentração de UFC/mL quando comparado aos demais grupos. A partir disto, pode-se sugerir que anticorpos naturais presente nos indivíduos possam ter potencializado a ação bactericida dos anticorpos anti-ABO. Tal hipótese se baseia nos achados do estudo em que indivíduos do grupo AB apresentaram ação bactericida. Dos anticorpos naturais, o anti-Gal é o mais abundante presente em humanos, sendo produzido em resposta a epítopos  $\alpha$ -galactosil expressos por bactérias gastrointestinais. Apesar de seu papel fisiológico ainda não estar bem elucidado, estima-se que uma de suas funções seja na defesa contra determinadas bactérias gastrointestinais, sendo capazes de ativar o sistema complemento (COELHO *et al.*, 2019; GALILI, 1993).

Estudos já demonstraram que os anticorpos anti-  $\alpha$ -Gal conferem proteção para doenças como a malária, sendo visualizado o aumento dos títulos destes anticorpos em pacientes com infecção aguda por *Plasmodium falciparum* (COELHO *et al.*, 2019 e YILMAZ *et al.*, 2014). Ainda, Li *et al.* (1999), conseguiram desenvolver um novo epítipo  $\alpha$ -Gal conjugado a glicopolímeros específicos, no qual ao se ligarem a bactéria *Escherichia coli*, foram capazes de promover a ligação do anticorpo anti-Gal e a ativação do sistema complemento, ocasionando a lise bacteriana. Além dos anticorpos naturais, outros elementos da resposta imune são capazes de ocasionar a destruição de micro-organismos (MACHADO, 2004). Stowell *et al.* (2010), estudaram duas lectinas imunes inatas com possível potencial de reconhecer antígenos de grupos sanguíneos humanos. Neste estudo, essas lectinas (galectinas-4 e -8), foram capazes de reconhecer e matar a bactéria *Escherichia coli*. Ambas as lectinas independem do sistema complemento, provocando uma ruptura da integridade da membrana do patógeno e conseqüentemente sua destruição. Ambos os trabalhos demonstram a importância dos diversos elementos da resposta imune na defesa contra patógenos, podendo interferir na evolução de quadros clínicos infecciosos.

Um dos critérios adotados na pesquisa em relação as amostras utilizadas, era que apresentassem títulos de anticorpos anti-ABO igual ou superior a 64. É importante ressaltar a existência do efeito pró-zona, sendo este definido como um resultado falso negativo que ocorre devido ao alto título de anticorpos presente na amostra, o qual interfere na formação do complexo antígeno-anticorpo (Murphy *et al.*, 2020). A partir disto, pode-se analisar a possibilidade de que se tivéssemos utilizados amostras com títulos de anticorpos anti-ABO superiores ao estipulado, talvez o efeito bactericida não fosse visualizado, visto que a concentração de anticorpos presente no soro seria superior ao de antígeno utilizado no Teste Bactericida. Estudos como o de Jain *et al.* (2018), mostram a importância do conhecimento do efeito pró-zona. Os pesquisadores relataram um caso de um receptor de transplante renal altamente sensibilizado com 64% de positividade para anticorpos reativos ao painel (PRA). Com este achado, foi realizado um ensaio de esfera de antígeno único (SAB) para identificar a especificidade dos anticorpos para uma comparação com o potencial doador, sendo o resultado do teste negativo. A partir destes dados, sugeriu-se que se tratava de um resultado falso negativo, provavelmente ocasionado pelo efeito pró-zona. Com isto, diluições em série do soro foram feitas para realizar testes adicionais, no qual desta vez, se obteve resultados

positivos. A partir disto, percebe-se que a concentração de anticorpos anti-ABO foi muito importante para o desenvolvimento do presente ensaio, interferindo diretamente na visualização ou não do seu efeito bactericida.

Demais bactérias também já foram investigadas em relação a suas interações com o grupo sanguíneo ABO. Isto é visualizado em estudos como o de Ewald e Sumner (2016), no qual ao estudarem quadros de meningite bacteriana, os pesquisadores relataram a capacidade de algumas bactérias como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* em alterar o antígeno B para antígeno A, dependendo do ambiente do grupo sanguíneo em que se encontram. Com isto, foi visualizado que indivíduos do grupo sanguíneo B tinham menor prevalência de infecção por essas bactérias, visto que seus anticorpos anti-A respondiam como anticorpos naturais aos antígenos bacterianos. Em contrapartida, indivíduos dos grupos O, A e AB tinham maior prevalência a estes micro-organismos, já que contavam apenas com anticorpos anti-pneumocócicos específicos produzidos em resposta ao patógeno. Dados como estes demonstram a importância dos anticorpos anti-ABO, já que podem interferir diretamente na progressão do quadro clínico do indivíduo.

Além das bactérias, os vírus também têm sido estudados por apresentarem interações com o grupo sanguíneo ABO. Atualmente, um vírus emergente que tomou proporções mundiais é o novo coronavírus, e por isto, pesquisas foram feitas no intuito de analisar a influência do grupo sanguíneo ABO na susceptibilidade a infecção pelo patógeno (FERNÁNDEZ-BOTRÁN, 2020; MATHEW *et al.*, 2021). Número crescente de estudos sugerem que indivíduos do grupo sanguíneo A possuem um risco significativamente maior de infecção e de desenvolverem formas mais graves da doença quando comparados a indivíduos do grupo sanguíneo O (MORAIS *et al.*, 2021; ZIETZ *et al.*, 2020). Na busca pelo entendimento da fisiopatologia desencadeada pelo vírus, algumas hipóteses foram sugeridas para explicar a associação entre o grupo sanguíneo ABO e o patógeno. A hipótese descrita por Amorim *et al.* (2020), é de que o anticorpo anti-A seja capaz de interferir na ligação entre a proteína Spike com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), visto que este é o mecanismo visualizado na infecção pelo coronavírus relacionado à síndrome respiratória aguda grave (SARS-Cov-1). Outra hipótese é em relação a neutralização que os anticorpos anti-A e/ou anti-B poderiam exercer em infecções virais, mecanismo este já visualizado em infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

O estudo desenvolvido por Ewald e Sumner (2016), comprovou a semelhança química da membrana de micro-organismos como a *Escherichia coli* com os antígenos dos grupos sanguíneos A e B, sendo que seus experimentos *in vitro* mostraram a capacidade dos anticorpos anti-B em provocar a destruição da bactéria, sendo possível, portanto, desenvolver uma função semelhante *in vivo*. Contudo, deve-se levar em consideração que em experimentos *in vitro* existem condições controladas como títulos de anticorpos e concentração do inóculo utilizado. Com isto, há a possibilidade de que caso o teste tivesse sido realizado com uma menor concentração de inóculo, o efeito bactericida poderia ter sido potencializado, ou seja, indivíduos que são expostos a menores concentrações de antígenos talvez pudessem ter uma melhor resposta contra o patógeno pelo qual foi exposto. Em contrapartida, caso fosse utilizadas amostras com baixos títulos de anticorpos anti-ABO, o efeito bactericida poderia não ser visualizado. Desta forma é possível que indivíduos que tenham baixos títulos de anticorpos anti-ABO sejam mais susceptíveis ao desenvolvimento de quadros infecciosos mais graves, já que não teriam anticorpos suficientes para serem eficazes contra o patógeno.

A partir dos dados obtidos nesse estudo, e em futuros, caso a ação bactericida dos anticorpos anti-ABO seja comprovada, é possível a utilização de uma nova alternativa terapêutica não farmacológica para quadros clínicos de sepse. Esta nova terapia imunobiológica poderia ser utilizada para pacientes que possuem resistência bacteriana a fármacos e para o auxílio de tratamentos já existentes, uma vez que os anticorpos anti-ABO possam diminuir a taxa de crescimento bacteriano. Com o avanço da tecnologia, a utilização de anticorpos monoclonais se tornou

uma terapia imunológica potente, sendo muito estudada atualmente, para o uso terapêutico em casos de Covid-19, visto que estes anticorpos são capazes de detectar a região do epítipo do antígeno viral, reduzindo sua proliferação e a gravidade da doença, demonstrando ser uma terapia eficaz (JAHANSHAHLU e REZAEI, 2020). No Brasil, terapias com uso de imunoglobulinas humanas para outras especificidades já são uma realidade para tratamento de pacientes (BRASIL, 2019). Contudo, o uso de imunoglobulinas humana anti-ABO não é explorado e pode servir como alternativas terapêuticas não farmacológicas. Vale destacar que o mercado farmacêutico brasileiro aumentou de R\$ 57,9 bilhões em 2013 para R\$ 126,2 bilhões em 2020. Estima-se que aumente a uma taxa composta de crescimento anual de 13%, saltando para R\$ 229,8 bilhões em 2025 (GLOBAL DATA, 2021). Com isto, pesquisas que buscam novas opções não farmacológicas, como o uso de anticorpos monoclonais, se tornam cada vez mais necessárias, visto que já possuem sua eficácia comprovada e que cada vez mais estão sendo inseridos nas práticas terapêuticas.

## CONCLUSÃO

Os anticorpos anti-ABO apresentaram ação bactericida contra a bactéria *Escherichia coli*, visto que foram capazes de diminuir a contagem de UFC/mL no soro puro e demais diluições (1/2 a 1/64). Apesar de não haver diferença estatística ( $p > 0,05$ ) intergrupos sanguíneos O, A, B e AB, o grupo sanguíneo AB parece possuir menor ação bactericida, uma vez que apresentou altas concentrações de UFC/mL em muitas análises. Para melhor entendimento dos mecanismos pelo qual micro-organismos, em especial bactérias, interagem com os antígenos e/ou anticorpos do grupo sanguíneo ABO, é necessário a realização de mais estudos.

Entre as limitações da pesquisa, pode-se citar principalmente a escassez de estudos acerca do tema que tenham utilizado metodologia semelhante a realizada no presente trabalho, sendo necessário o desenvolvimento de uma nova técnica para a realização do teste. Contudo, a técnica desenvolvida pelos presentes pesquisadores se mostrou eficaz para auxiliar na elucidação da função dos anticorpos anti-ABO, uma vez que foi possível observar sua ação bactericida.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), pela disponibilização dos laboratórios e insumos utilizados na pesquisa e ao Laboratório de Análises Clínicas da UNIVALI (LEAC), pela doação de materiais utilizados para a obtenção das amostras biológicas dos participantes. Ambas as instituições foram de extrema importância para o desenvolvimento do presente estudo.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, C.F.; GÓES, F.S.R.; LIMA, F.L.O; GOMES; L.N.L; ALMEIDA, F.C.; ALMEIDA, P.C.; RIOS, J.O.; SANTOS, B.R.S.D. Grupo ABO e a suscetibilidade a infecção por SARS-Cov-2: uma revisão de literatura. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, [S.I.], v. 42, p. 536, nov. 2020.

ARBELÁEZ-GARCÍA, C.A. Sistema de grupo sanguíneo ABO. **Medicina & Laboratorio**, [S.I.], v. 15, n. 7-8, p. 329-346, 2009.

BARCELOS, M.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E.L. Utilização de ácidos graxos poliinsaturados na modulação da resposta inflamatória na sepse. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, [S.I.], v. 36, n. 4, p. 84-89, jan. 2007.

BRASIL. **Imuno-Hematologia laboratorial**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Imuno-hematologia laboratorial** / Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014, p. 1-62.

BRASIL. Resolução – RDC Nº 298, de 12 de agosto de 2019. Dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 ago. 2019, p. 1-874.

COELHO, Z.B.A; BRAGA, E.M. Preliminary assessment of anti- $\alpha$ -Gal IgG and IgM levels in patients with patent Plasmodium vivax infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 114, p. 1-3, 04 jul. 2019.

DANIELS, G. **Human Blood Groups**. 3. ed. Inglaterra: Wiley-blackwell, 2013. 560p.

EWALD, R.; SUMNER, S.C. Blood Type Biochemistry and Human Disease. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.**, [S.I.], v. 6, n. 8, p. 517-535, nov. 2016.

FRACASSO, J.F. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [S.I.], v. 29, n. 2, p. 119-127, set. 2008.

FERNÁNDEZ-BOTRÁN, R. Asociación del grupo sanguíneo ABO con susceptibilidad a COVID-19. **Ciencia, Tecnología y Salud**, [S.I.], v. 7, n. 3, p. 325-332, out. 2020.

FRIDMAN, C. **Replicação de DNA, Genótipo/Fenótipo e Herança Quantitativa**. Genética e Bioestatística. Disponível em: <[https://midia.atp.usp.br/plc/plc0030/impressos/plc0030\\_top03.pdf](https://midia.atp.usp.br/plc/plc0030/impressos/plc0030_top03.pdf)>.

GALILI, U. Evolution and pathophysiology of the human natural anti-alpha-galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. **Springer Semin Immunopathol.**, [S.I.], v. 15, n. 2-3, p. 155-171, 1993.

GIRELLO, A.L.; KUHN, T.I.B.B. **Fundamentos da Imuno-Hematologia Eritrocitária**. 3. ed. São Paulo: Senac São Paulo, 2016. 328p.

GLOBAL DATA. **CountryFocus: Healthcare, Regulatory, and Reimbursement Landscape**. 2021. Disponível em: <<https://www.marketresearch.com/product/sample-30156515.pdf>>.

JAHANSHAHU, L.; REZAEI, N. Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.I.], v. 129, p. 1-4, set. 2020.

JAIN, D.; CHOUDHURI, J.; CHAUHAN, R.; DORWAL, P.; SHARMA, D.; TIWARI, A.; RAINA, V. False negative single antigen bead assay: is it always an effect of prozone? **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [S.I.], v. 32, n. 2, p. 1-5, 2018.

JUDD, W. J.; JOHNSON, S. T.; STORRY, J. **Judd's methods in immunohematology**. 3. ed. Bethesda, Md: Aabb Press, 2008.

LEE, H. S.; CHOI, K.M.; WON, E.J.; PHAN, M.T.T.; LEE, S.Y.; SHIN, D.J.; CHUN, S.; PARK, G.; KIM, S.K.; LEE, K.B.; LEE, H.J.; CHO, D. Protein stability changes of the novel p. Arg180Cys mutant A glycosyltransferase resulted in a weak A phenotype. **Vox Sanguinis**, v. 111, n. 4, p. 441–444, 2016.

LI, J.; ZACHAREK, S.; CHEN, X.; WANG, J.; ZHANG, W.; JANCZUK, U.M.; WANG, P.G. Bacteria targeted by human natural antibodies using  $\alpha$ -gal conjugated receptor-specific glycopolymers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 7, n. 8, p. 1549-1558, ago. 1999.

MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.L.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, nov./dec. 2004.

MARTINS, G.A.R.; DAVID, C.M.; GOLDWASSER, R.; GOMES, R.C. Imunoglobulinas policlonais enriquecidas com IgM modificam a evolução de pacientes com sepse por pneumonia? **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, [S.I.], v. 9, n. 3, p. 119-125, set. 1997.

MATHEW, A.; BALAJI, V.E.; PAI, S.R.K.; KISHORE, A.; PAI, V.; CHANDRASHEKAR, K.S. ABO phenotype and SARS-CoV-2 infection: is there any correlation? **Infection, Genetics and Evolution**, [S.I.], v. 90, p. 104751, jun. 2021.

MORAIS, L.S.F.; NASCIMENTO, B. C. C. do; RODRIGUES, S. C. S., SILVA, M. Z. D. da; MATOS, S.S. Análise da Associação do Sistema Sanguíneo ABO e o Risco de Infecção e Mortalidade por Covid-19: revisão de literatura. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, [S.I.], v. 2, n. 1, p. 11, 25 mar. 2021.

MURPHY, C.H.; JIN, J.; ZEHNDER, J.L. Antiphospholipid Antibodies in Patients with Lupus Anticoagulant Prozone Effect. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.I.], v. 153, n. 2, p. 229-234, fev. 2020.

MUSHEL, L.; OSAWA, E. Substância B do Grupo Sanguíneo Humano e Escherichia coli 086. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, [S.I.], v. 101, n. 4, p. 614-617, ago. 1959.

ONSTEN, T.G.H.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; GOLDANI, L.Z. The Higher Frequency of Blood Group B in a Brazilian Population with HIV Infection. **The Open Aids Journal**, [S. I.], v. 7, p. 47-50, 18 out. 2013.

PEREIRA, L.M.M.; SIEBERT, T.H.R. Frequência fenotípica dos grupos sanguíneos ABO e fator RH em Santarém, Pará – Brasil. **Brazilian Journal of Development**, [S.I.], v. 6, n. 10, p. 78472-78481, 2020.

QUEMEL, G.K.C.; CORRÊA, A.A.; TEIXEIRA, E.A.C.; FERREIRA, M.S.; SOUSA, J.W.O.S.; LIMA, J.C.C. Fatores que intensificam o risco de óbito causado por SEPSE e o papel do farmacêutico nesse contexto: uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 8940-8962, abr. 2021.

SHANG, W.; ZHAI, Y.; MA, Z.; YANG, G.; DING, Y.; HAN, D.; LI, J.; ZHANG, H.; LIU, J.; WANG, P.G.; LIU, X.W.; CHEN, M. Production of human blood group B antigen epitope conjugated protein in Escherichia coli and

utilization of the adsorption blood group B antibody. **Microbial Cell Factories**, [S.I.], v. 15, n. 1, p. 15-138, 11 ago. 2016.

SPRINGER, G.F.; HORTON, R.E. Blood group isoantibody stimulation in man by feeding blood group-active bacteria. **Journal of Clinical Investigation**, [S.I.], v. 48, n. 7, p.1280-1291, 1 jul. 1969.

STEPHENS, P.R.S.; RIBEIRO, F.C.; SILVA, V.L.; MARQUES, M.A.P. Hematologia e imunologia aplicadas em imuno-hematologia. In: OLIVEIRA, M.B.S.C.; RIBEIRO, F.C.; VIZZONI, A.G. (Org.). **Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2013. p. 35-63.

STOWELL, S.; ARTHUR, C.M.; BARUFFI, M.D.; RODRIGUES, L.C.; GOURDINE, J.P.; MOLINARO, J.H.; JU, T.; MOLINARO, R.J.; MARRERO, C.R.; XIA, B.; SMITH, D.F.; CUMMINGS, R.D. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. **Nature Medicine**, [S.I.], v.16, n.3, p. 295-301, mar. 2010.

TANDON, S.; AGGARWAL, A.; JAIN, S.; SHUKLA, S.; CHAUDHARY, S. Perspective on the Role of Antibodies and Potential Therapeutic Drugs to Combat COVID-19. **The Protein Journal**, [S.I.], v. 39, p. 631-643, 2020.

VELASCO, A.M.H.; NETO, M.L.; LIMA, D.J.M.M.; TEIXEIRA, A.N.; ALEXANDRE, P.C.B. Abordagem farmacológica de pacientes idoso com sepse em UTI. **Revista Interdisciplinar do Pensamento Científico.**, [S.I.], v. 5, n. 2, p. 263-317, dez. 2019.

VIZZONI, A.G.; COTIAS, P.M.T. Imuno-hematologia eritrocitária. In: OLIVEIRA, M.B.S.C.; RIBEIRO, F.C.; VIZZONI, A.G. (Org.). **Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2013. p. 35-63.

YILMAZ, B.; PORTUGAL, S.; TRAN, T.M.; GOZZELINO, R.; RAMOS, S.; GOMES, J.; REGALADO, A.; COWAN, P.J.; D'APICE, A.J.F.; CHONG, A.S.; DOUMBO, O.K.; TRAORE, B.; CROMPTON, P.D.; SILVEIRA, H.; SOARES, M.P. Gut Microbiota Elicits a Protective Immune Response against Malaria Transmission. **Cell**, [S.I.], v. 159, n. 6, p. 1277-1289, dez. 2014.

ZIETZ, M.; ZUCKER, J.; TATONETTI, N.P. Associations between blood type and COVID-19 infection, intubation, and death. **Nature Communications**, [S.I.], v. 11, n. 1, p. 57-61, 13 nov. 2020.