

ARTEMIS SOCORRO DO NASCIMENTO RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS VARIANTES DO
SISTEMA Rh EM PACIENTES PORTADORES DE
ANEMIA FALCIFORME**

Orientadora: PROF. DRA. LILIAN MARIA DE CASTILHO

CAMPINAS

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ARTEMIS SOCORRO DO NASCIMENTO RODRIGUES

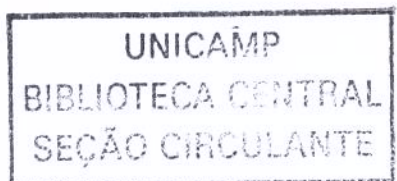
**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS VARIANTES DO
SISTEMA Rh EM PACIENTES PORTADORES DE
ANEMIA FALCIFORME**

*Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas*

Orientadora: PROF. DRA. LILIAN MARIA DE CASTILHO

CAMPINAS

2002



UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
R618c
V EX
TOMBO BCI 30636
PROC 16-837102
C DX
PREÇO R\$ 17,00
DATA 07/09/02
Nº CFD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

CM00172648-B

BIB ID 255948

R618c

Rodrigues, Artemis

Caracterização molecular das variantes do sistema Rh em pacientes portadores de anemia falciforme. / Ártemis Rodrigues. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

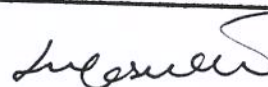
Orientador : Lillian Maria de Castilho

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antigenos. 2. Genes. I. Lillian Maria de Castilho. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Profa. Dra. Lílian Maria de Castilho*

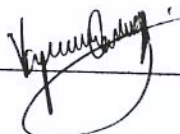


Membros:

1. Professor Doutor Dimas Tadeu Covas



2. Professor Doutor Wagner de Castro



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

Data: 25.02.2002

***“Um objetivo na vida é a única fortuna
valiosa que se encontra; não se deve procurá-lo
em terras estranhas, mas dentro do coração”.***

Robert Louis Stevenson

Aos meus pais, Amélia e Miguel,

“Reconheço que nesses anos, em muitos momentos, não estive presente.

Por muitas vezes não choramos e nem sorrimos juntos,

não dei o beijo que queria dar e me furtei em dizer que os amava.

O tempo era curto, rápido e não me esperava

Mas vocês compreendiam e torciam por mim.

**“E agora, que realizo mais este sonho,
compartilho com vocês minha alegria,
quero sorrir e dizer com todas palavras
que amo muito vocês.”**

**Dedico este trabalho aos meus pais, Amélia e Miguel,
aos meus irmãos Áurea, Clésio, Adla, Célio e Alessandra
e a DEUS, essência de nossas vidas.**

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, **Prof. Dra. Lilian Castilho**, pela lição do saber, pela orientação constante, pela dedicação, por ter repartido comigo de forma tão desprendida o fruto de seus anos de estudos e pesquisa .

Ao **Prof. Dr. Jordão Pellegrino Jr**, pelos conselhos, críticas e sugestões, os quais contribuíram para o meu crescimento e por ser uma das pessoas com quem sempre pude contar. Agradeço também sua dedicação e colaboração em todas as fases deste trabalho.

Aos **pacientes**, por terem confiado e contribuído espontaneamente para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**, que apoiou a conclusão desta dissertação.

Ao **Arthur**, pela amizade e principalmente pelo apoio de todas as horas.

Aos amigos **Roberta Violati, Wilson Balleoti Jr e Laércio Melo**, agradeço a amizade e o incentivo.

Aos demais amigos do laboratório, **Lena, Natasha, Dilmara, Edna, Aline, Patricia, Manoela, Paulo, Teresa, Dulcinéia, Tatiana, Nicola, Tiago, Flávia, Raquel, Simone, Ucha, Heloisa, Adriana, Anderson, Jorge, Daniela, Marcela, André, Marcelo Brandão, Amanda, Raimundo, Ana e Angela**, que me proporcionaram amizade em toda a minha jornada.

As amigas **Cláudia Cardoso, Adriana Vellasco, Natasha e Patrícia**, minhas amigas do coração, agradeço o constante carinho e amizade que vocês me dedicaram.

Aos meus irmãos, **Áurea, Clésio, Adla, Célio e Alessandra**, obrigada pelo incentivo e apoio que sempre recebi de vocês.

A minha grande amiga e cunhada **Ivana**, obrigada pela sua amizade e incentivo e aos meus sobrinhos **Nicolas e Felipe**.

*Trabalho realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp,
com auxílio financeiro da FAPESP (Processos 99/03620-0 e 00/03510-0)*

	<i>Pág</i>
RESUMO.....	<i>xvi</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
A. Material.....	18
1. Amostras.....	18
2. Anti-soros.....	19
3. Cartões gel (ID-micro typing cards).....	19
4. Tampão LISS modificado (Diluyente 2).....	20
5. Suspensão de hemácias a 0,8%.....	20
6. Diluição dos anti-soros.....	20
7. Easy DNA Kit.....	20
8. DNazol.....	20
9. Blood DNA purification Kit	21
10. dNTP 10mM.....	21
11. Taq DNA polymerase.....	21
12. Tampão Tris-Acetato-EDTA(TAE) 50X.....	21
13. Tampão Tris-Borato (TEB).10X.....	21
14. Tampão Tris-Acetato-EDTA(TAE) 1X.....	22
15. Tampão Tris-Borato (TEB).10X.....	22

16. Gel de agarose a 1.5%.....	22
17. Gel de agarose a 3%.....	22
18. Gel de poliacrilamida a 8%.....	22
19. Marcadores moleculares.....	23
20. Enzimas de restrição.....	23
21. Concert rapid gel extraction system.....	23
22. Concert rapid PCR purification system.....	23
B. Métodos.....	24
1. Fenotipagem eritrocitária.....	24
2. Extração de DNA.....	24
3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	24
4. Análise dos fragmentos de PCR após digestão com enzimas de restrição (RFLP).....	25
5. Genotipagem <i>RHD</i>	26
6. Genotipagem <i>RH E/e</i>	26
7. Genotipagem <i>RH C/c</i> e determinação do pseudogene <i>RHD (RHDΨ)</i>	27
8. Caracterização molecular do gene híbrido <i>RHD-CE-D^s</i>	28
9. Caracterização molecular das variantes <i>D^{IIIa}</i> , <i>D^{Va}</i> e <i>DAR</i>	28
10. Determinação da variante <i>D^{Va}</i>	29
11. Determinação da variante <i>D^{IIIa}</i>	31
12. Determinação da variante <i>DAR</i>	31
13. Caracterização molecular do antígeno <i>VS</i>	32
14. Determinação da mutação 48C (Cys16).....	32

4. RESULTADOS.....	37
A. Padronização de técnicas moleculares para a realização da genotipagem <i>RHD</i> e <i>RHCE</i>	38
B. Resultados da genotipagem <i>RHD</i>	38
C. Caracterização molecular das variantes <i>RHD</i> categorias D^{IIIa} , D^{Va} e DAR	41
D. Caracterização molecular das variantes do antígeno Rhe associadas ao alelo <i>RH ce</i>	41
5. DISCUSSÃO.....	43
A. Padronização de técnicas moleculares para a realização da genotipagem <i>RHD</i> e <i>RHCE</i>	44
B. Genotipagem <i>RHD</i> e caracterização molecular das variantes do antígeno RhD.....	45
C. Caracterização molecular das variantes do antígeno Rhe.....	48
D. Aplicação das variantes do sistema Rh na medicina transfusional.....	50
6. CONCLUSÕES.....	51
7. SUMMARY.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
9. APÊNDICE.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Descrição
Rh	Sistema Rh
RhD	Antígeno RhD
RhC	Antígeno RhC
Rhc	Antígeno Rhc
RhE	Antígeno RhE
Rhe	Antígeno Rhe
<i>RH</i>	Gene <i>RH</i>
<i>RHD</i>	Gene <i>RHD</i>
<i>RHCE</i>	Gene <i>RHCE</i>
<i>RHD</i> Ψ	Pseudogene <i>RHD</i>
<i>RHD-CE-D^s</i>	Gene híbrido <i>RHD-CE-D^s</i>
RH C/c	Genes alelos Cc
RH E/e	Genes alelos Ee
RhD+	Fenótipo Rh-positivo
RhD-	Fenótipo Rh-negativo
RhCC	Fenótipo RhCC
RhCc	Fenótipo RhCc
Rhcc	Fenótipo Rhcc
RhEE	Fenótipo RhEE
RhEe	Fenótipo RhEe
Rhee	Fenótipo Rhee
R0r	Fenótipo RhDccee
r r	Fenótipo dccee
D ^{IIIa}	Antígeno D parcial categoria D ^{IIIa}

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (cont.)

Sigla	Descrição
D ^{Va}	Antígeno D parcial categoria D ^{Va}
DAR	Antígeno D parcial categoria DAR
VS	Antígeno do sistema Rh denominado VS
Cys16	Aminoácido cisteína resíduo 16
<i>RH ce</i>	Gene alelo <i>RH ce</i>
48C	Mutação no nucleotídeo 48 G>C
733G	Mutação no nucleotídeo 733 C>G
μl	Microlitro
ml	Mililitro
g	Giros
ng	Nanogramas
pmol	Picomol
nmol	Nanomol
pb	Pares de base
LISS	Low ionic strength salt solution
GEL-LISS	Técnica de hemaglutinação em gel
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
INTRON	Região do gene que não codifica aminoácidos
EXON	Região do gene que codifica aminoácidos
PCR	Reação de cadeia da polimerase / Polymerase Chain Reaction
AS-PCR	Técnica de PCR alelo-específica
PCR-RFLP	Técnica de PCR seguida por análise dos fragmentos
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms
primers	Sequência de oligonucleotídeos sintéticos
nt	Nucleotídeo

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Sequência dos primers utilizados nas genotipagens <i>RHD</i> , <i>RH C/c</i> , <i>RH E/e</i>	34
TABELA 2 : Sequência dos primers utilizados na caracterização do gene híbrido <i>RHD-CE-D^s</i>	35
TABELA 3 : Primers utilizados na técnica de PCR para caracterização das variantes <i>RHD^{IIIa}</i> e <i>DAR</i>	36
TABELA 4 : Primers utilizados na técnica de PCR para a determinação da mutação 48C (Cys16) e da mutação 733G (antígeno VS)	36
TABELA 5 : Resultados de fenotipagem e genotipagem para o sistema Rh, em 250 amostras de sangue e DNA de doadores voluntários de sangue	39
TABELA 6 : Resultados de fenotipagem e genotipagem para o antígeno RhD em amostras de sangue e DNA de 141 pacientes portadores de anemia falciforme	39
TABELA 7 : Presença do pseudogene <i>RHD</i> (<i>RHDΨ</i>) e do gene híbrido <i>RHD-CE-D^s</i> em 91 pacientes	40

LISTA DE TABELAS (cont.)

TABELA 8:	Ocorrência das variantes D ^{IIIa} , D ^{Va} e DAR em 130 pacientes com o fenótipo RhD-positivo	41
TABELA 9:	Ocorrência das mutações 48C (Cys16) e 733G (VS) em 58 pacientes com o alelo <i>RH ce</i>	42
TABELA 10:	Resultados de hemaglutinação da fenotipagem para o antígeno Rhe com a utilização de anti-soros monoclonais	42
TABELA 11:	Resultados de fenotipagem e genotipagem para os antígenos do sistema Rh, em 250 amostras de sangue e DNA de doadores voluntários de sangue (apêndice)	70
TABELA 12:	Resultados da caracterização molecular das variantes <i>RHD</i> em 131 amostras de DNA de pacientes falciformes (apêndice)	77
TABELA 13:	Resultados da determinação das variantes associadas ao antígeno Rhe em 58 amostras de DNA de pacientes falciformes com o alelo <i>RH ce</i> (apêndice)	80

LISTA DE FIGURAS

	Pág
FIGURA 1 : Família de proteínas Rh	4
FIGURA 2 : Modelo do locus Rh proposto por Wagner & Flegel	6
FIGURA 3 : Categorias do antígeno D parcial definidas por Tippett	7
FIGURA 4 : Antígeno D parcial	8
FIGURA 5 : Antígeno D fraco	9
FIGURA 6 : Variantes do antígeno Rhe	10
FIGURA 7 : Moléculas associadas com o complexo Rh	11
FIGURA 8 : Análise qualitativa de DNA em gel de agarose	25
FIGURA 9 : PCR para genotipagem <i>RHD</i>	26
FIGURA 10 : PCR-RFLP para genotipagem <i>RH E/e</i>	27

LISTA DE FIGURAS (cont)

	Pág
FIGURA 11 : PCR multiplex para genotipagem <i>RHD</i> , <i>RH C/c</i> e Pseudogene <i>RHD</i> (<i>RHD Ψ</i>)	28
FIGURA 12: PCR multiplex para detecção do gene híbrido <i>RHD-CE-D^s</i>	29
FIGURA 13: PCR-RFLP para caracterização das variantes <i>D^{IIIa}</i> , <i>D^{Va}</i> e DAR	30
FIGURA 14: PCR-RFLP para caracterização da variante <i>D^{Va}</i>	30
FIGURA 15: PCR-RFLP para caracterização da variante <i>D^{IIIa}</i>	31
FIGURA 16: Sequenciamento do éxon 7 para caracterização da variante DAR	32
FIGURA 17: PCR-RFLP para caracterização da mutação 733G VS)	33
FIGURA 18: ASPA e PCR-RFLP para caracterização da mutação 48C (Cys16)	33

RESUMO

O sistema Rh é o maior, mais complexo e mais imunogênico sistema de grupos sanguíneos. Representa um dos sistemas de maior interesse clínico, por seu envolvimento na Doença Hemolítica Peri-Natal; nas Reações Transfusionais Hemolíticas e nas Anemias Hemolíticas Auto-Imunes.

Os antígenos do sistema Rh são codificados por 2 genes altamente homólogos, *RHD* e *RHCE*. As bases moleculares da maioria dos fenótipos Rh foram determinadas nos últimos 10 anos e rearranjos gênicos, deleções e mutações de ponto podem ser responsáveis por algumas variantes dos antígenos RhD e RhCE.

A elucidação da base molecular das variantes Rh possibilitou o desenvolvimento de técnicas para a determinação de variantes que parecem ser predominantes em algumas populações. Desta forma, é possível estabelecer a correlação adequada entre os genótipos e os fenótipos e o esclarecimento da perda de expressão de alguns antígenos Rh comuns. A determinação da frequência das variantes Rh em populações distintas pode auxiliar na determinação de fenótipos raros que não são caracterizados sorologicamente

Estudos envolvendo variantes Rh em pacientes falciformes politransfundidos, poderão em futuro próximo auxiliar no melhor entendimento da correlação entre o fenótipo e o genótipo e aumentar a segurança transfusional destes pacientes que muitas vezes desenvolvem anticorpos após transfusão de sangue.

Tendo em vista a relevância que a caracterização molecular das variantes do sistema Rh pode vir a ter na segurança transfusional de pacientes falciformes, foram nossos objetivos: padronizar técnicas moleculares para realização da genotipagem *RHD* e *RHCE*; determinar a frequência do pseudogene *RHD* e do gene híbrido *RHD-CE-D^s* em pacientes com os fenótipos Ror e rr; verificar a frequência dos antígenos D parciais categorias D^{IIIa}, D^{Va} e DAR em pacientes RhD-positivo e determinar a ocorrência das variantes do antígeno Rhe em pacientes com o alelo *RH ce*.

A frequência do pseudogene *RHD* (*RHD Ψ*) e do gene híbrido *RHD-CE-D^s* em pacientes falciformes, foi estudada em amostras de DNA de 91 pacientes fenotipados

como R0 r e rr através de 2 técnicas de PCR multiplex. Nossos resultados demonstraram que dezoito (19.8%) pacientes apresentaram o pseudogene *RHD* (*RHD Ψ*) e 2 (2%), o gene híbrido *RHD-CE-D δ* . Estes resultados em conjunto com publicações anteriores que mostram que o pseudogene *RHD* apresenta alta frequência em populações de origem africana sugerem que a determinação do genótipo *RHD* deve incluir ampla análise do gene *RHD*.

A frequência dos antígenos D parciais categorias D^{IIIa}, D^{Va} e DAR em pacientes falciformes RhD-positivo foram estudadas em amostras de DNA de 130 pacientes pelas técnicas de PCR-RFLP e de sequenciamento. Vinte e cinco (19.2%) dos pacientes estudados apresentaram as variantes D^{IIIa}, D^{Va} e DAR. Em 4 (3.1%) destes pacientes foi identificada a variante D^{Va} e em 21 (16.1%) as variantes D^{IIIa} e DAR. A alta frequência destas variantes em pacientes falciformes, principalmente de D^{IIIa} e DAR sugere um aumento no risco de aloimunização ao antígeno RhD, uma vez que estes indivíduos são classificados na rotina como RhD-positivos.

A ocorrência das variantes do antígeno Rhe em pacientes falciformes com o alelo *RH ce* associadas às mutações 48C (Cys16) e 733G (VS) foi investigada em 58 amostras de DNA de pacientes portadores de anemia falciforme previamente fenotipados para os antígenos RhD, C/c, E/e e VS pelas técnicas de PCR alelo específico e PCR-RFLP. Dos 58 pacientes estudados, 56 apresentaram a mutação 48C (Cys16) e 50 a mutação 733G (antígeno VS). A ocorrência simultânea destas mutações foi observada em 50 pacientes. Estas mutações encontravam-se em heterozigose, sugerindo que estes pacientes apresentavam a mutação 48C em um alelo e a mutação 733G em outro alelo. A ocorrência simultânea destas mutações levou a uma fraca expressão do antígeno Rhe nas hemácias destes pacientes demonstrada pelo resultado negativo da fenotipagem Rhe com a utilização de 3 anti-soros monoclonais anti-e. Diante destes resultados recomenda-se que a rotina de fenotipagem Rh de pacientes falciformes seja realizada com a utilização de pelo menos 2 anti-soros monoclonais ou com um anti-soro policlonal e outro monoclonal, melhorando desta forma o atendimento à necessidade de transfusão pelo aumento da disponibilidade de sangue.

Em conclusão, a caracterização molecular das variantes Rh deve ser recomendada em pacientes falciformes dependentes de transfusão, pois permite a seleção correta do sangue a ser transfundido. Auxilia ainda, na prevenção da aloimunização, podendo diminuir os efeitos de potenciais reações hemolíticas.

1. INTRODUÇÃO

O sistema Rh é o maior e mais complexo sistema de grupos sanguíneos, compreendendo atualmente 46 antígenos (DANIELS et al,2001). Representa um dos sistemas de maior interesse clínico, por seu envolvimento na Doença Hemolítica Peri-Natal (GIBLETT, 1977); nas Reações Transfusionais Hemolíticas e nas Anemias Hemolíticas Auto-Imunes (PETZ & GARRATY, 1980).

Descoberto em 1939, tornou-se o sistema de grupo sanguíneo com maior grau de polimorfismo entre os marcadores conhecidos da membrana eritrocitária (HUANG, 1997). Até o momento, os estudos genéticos e bioquímicos deste sistema têm sido caracterizados por controvérsias, debates e a co-existência de distintas nomenclaturas (ISSITT, 1996; DANIELS, 2001).

Os cinco principais antígenos do Sistema Rh incluem: D, C/c e E/e. Estes antígenos, formam oito complexos gênicos, conhecidos como haplótipos Rh (*Cde*, *cde*, *cDE*, *cDe*, *cdE*, *Cde*, *CDE*, *CdE*) (RACE, 1965). Destes, o antígeno D é o mais importante do ponto de vista clínico devido ao seu alto grau de imunogenicidade. As hemácias humanas têm sido tradicionalmente classificadas como “Rh-positivas” e “Rh-negativas”, dependendo da presença ou ausência do antígeno D (FISHER, 1944). Diferentemente dos antígenos ABO e Lewis, os antígenos Rh estão localizados somente nos eritrócitos e, portanto, não são encontrados nos fluidos (PETZ et al, 1996).

MOORE et al, 1982 e GAHMBERG, 1982 trabalhando independentemente foram os que pioneiramente conseguiram com sucesso, isolar por imunoprecipitação, componentes de membrana associados aos antígenos Rh. Este achado, possibilitou o conhecimento mais detalhado das características bioquímicas das proteínas Rh e de suas funções na membrana eritrocitária (CARTRON, 1994; RIDGWELL et al, 1994).

Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Rh são definidos por polipeptídios não glicosilados, denominados RhD e RhCE (deVETTEN & AGRE, 1988). A presença ou ausência do antígeno na superfície das hemácias está correlacionada com a presença ou ausência de um membro desta família de polipeptídios. Os polipeptídios Rh atravessam a

membrana eritrocitária 12 vezes, apresentando os segmentos amino-terminal e carboxi-terminal intracelularmente (AVENT et al, 1992). Os polipeptídios D e CE têm um único resíduo externo *cisteína* na quinta alça extracelular que pode estar relacionado com a expressão antigênica.

O sistema Rh é uma família de proteínas constituída pelos polipeptídios RhD e RhCE com peso molecular de 30 kD (proteínas Rh ou Rh30) codificados pelos genes *RHD* e *RHCE* e, pela glicoproteína Rh de 50 kD (glicoproteína RhAG ou Rh50) codificada pelo gene *RH50*. Os antígenos Rh somente são expressos na superfície da membrana eritrocitária quando a glicoproteína Rh50 está presente. Na ausência de Rh50 os antígenos Rh não são expressos. A associação das proteínas Rh30 e Rh50 dentro de uma mesma família de proteínas, baseia-se no fato de ambas apresentarem 36% de homologia na sequência genômica e 50% de identidade nas 12 α hélices transmembranares. Devido a estas homologia, acredita-se que estas proteínas sejam originadas de um gene ancestral comum (AVENT & REID, 2000) (Figura 1).

Os genes que codificam as proteínas Rh30 e Rh50 diferem na sua localização cromossômica. Os genes *RHD* (LE VAN KIM et al, 1992; KAJI et al, 1993) e *RHCE* (CHERIF-ZAHAR et al, 1990) estão localizados no cromossomo 1p36.13-34.3 (CHERIF-ZAHAR et al, 1991; CARRIT et al, 1997) organizados em 10 éxons dentro de uma sequência genômica de aproximadamente 75kb. O gene *RH50* reside na região 6p11-21 (RIDGWELL et al, 1992) e parece estar distribuído nos 10 éxons correspondentes aos genes *RHD* e *RHCE* (CARTRON, 1994).

O gene *RHD* codifica o antígeno **D** enquanto que o gene *RHCE* (alelos *RH Ce*, *RH cE*, *RH ce* e *RH CE*) codifica os antígenos **C/c** e **E/e** (SIMSEK et al, 1994). Existe um alto grau de homologia (98%) entre os genes *RHD* e *RHCE*, com uma variação de 35 aminoácidos em 417 posições (PETZ, 1996) (Figura 1). As diferenças básicas entre os dois genes estão na região do exon 10 e na deleção de 600pb no intron 4 do gene *RHD*, se comparado ao gene *RHCE*.

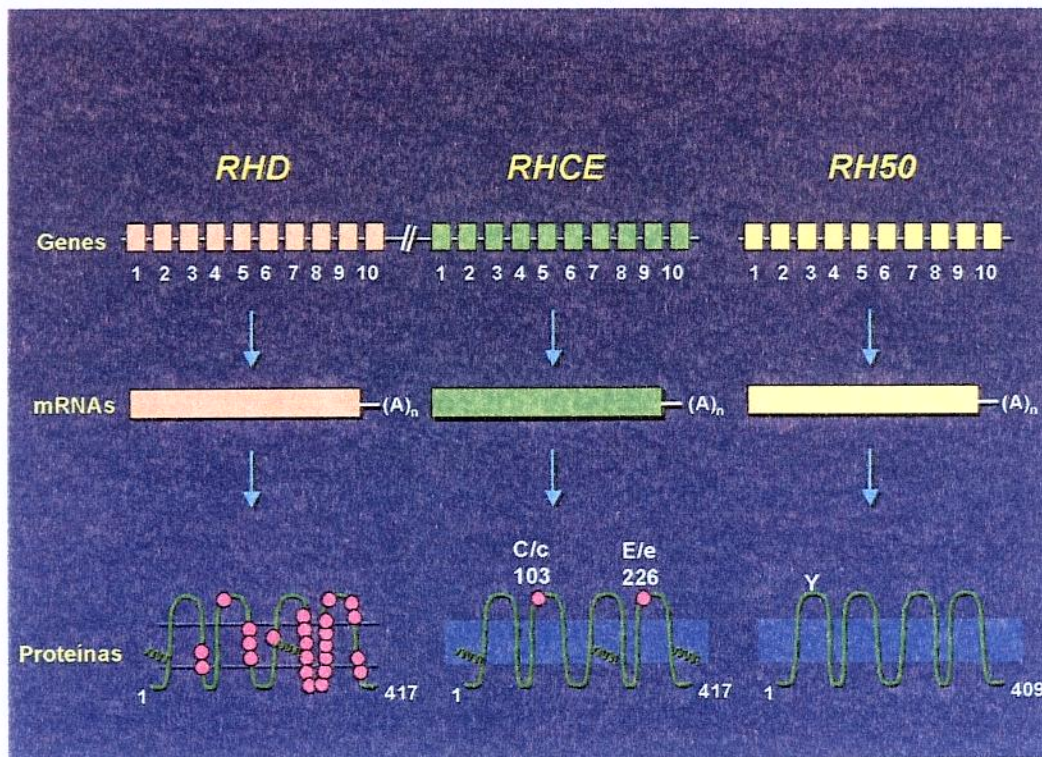


Figura 1: Família de proteínas Rh

O polimorfismo E/e resulta da substituição de um único aminoácido no exon 5, na quarta alça extracelular, quando da substituição de uma *Prolina* (E) na posição 226, para uma *Alanina* (e) (MOURO et al, 1992 e SIMSEK et al, 1994). Já o polipeptídeo Rh que carrega os antígenos C e c diferem, um do outro, pela substituição de 4 aminoácidos em uma cadeia de 417 aminoácidos, muito embora, apenas a substituição de uma *Serina* na posição 103 (segunda alça extracelular) para uma *Prolina* (c) pareça ser crítica para o polimorfismo C/c (MOURO et al, 1992; WOLTER et al, 1994). Por outro lado, o polipeptídeo codificado pelo gene *RHD*, difere daquele codificado pelo *RHCE*, em 35 aminoácidos. Estas diferenças podem talvez explicar em parte, a imunogenicidade do antígeno D (ISSITT, 1996) (Figura 1).

Em 1991, COLLIN et al demonstraram através da análise do DNA genômico de diferentes fenótipos do sistema Rh, que os indivíduos RhD-positivo possuem os genes

RHD e *RHCE*, enquanto que os indivíduos RhD-negativo possuem somente o gene *RHCE*. Na quase totalidade dos casos dos indivíduos caucasianos RhD-negativo, o gene *RHD* está deletado (LE VAN KIM et al, 1992; ARCE et al, 1993). Em alguns casos, o fenótipo RhD negativo pode também estar associado com trocas homólogas dos éxons 3 a 7, ou éxons 2 a 9 do gene *RHCE* no gene *RHD* (BLUNT, 1994; HUANG, 1996).

OKUDA et al e DANIELS et al (1997) demonstraram a presença de um gene *RHD* intacto em japoneses e africanos RhD-negativo, que parecia estar associado com as frequências dos fenótipos RhD-negativo e RhC-positivo em diferentes populações.

Em 2000, SINGLETON et al verificaram que 66% dos Africanos RhD-negativo originários da África do Sul, apresentavam uma duplicação de 37 pb na região limítrofe entre o íntron 3 e o éxon 4 do gene *RHD*. Esta duplicação introduz um códon de terminação na posição 210 e uma alteração no quadro de leitura, levando à produção de uma proteína que não é expressa na membrana eritrocitária. Além disto, foi também observado em 15% destes africanos, a presença de um gene *RHD* híbrido (*RHD-CE-D^s*) associado ao fenótipo VS+V. Este gene apresenta os éxons 4 a 8 de *RHCE* e codifica uma proteína alterada com fraca expressão do antígeno RhC e nenhuma expressão do antígeno RhD.

Recentemente WAGNER & FLEGEL, 2000 propuseram um novo modelo para o locus Rh, em que os dois genes *RHD* e *RHCE* possuem orientações opostas e encontram-se separados por 30000 pb (Figura 2A). Nesta região, encontra-se um outro gene denominado *SMP1* que tem a mesma orientação do gene *RHD* e cuja função no locus Rh ainda é desconhecida. Além disto, demonstraram que o gene *RHD* está flanqueado por dois segmentos de DNA, denominados “caixas Rhesus”, com um comprimento de aproximadamente 9000 pb, apresentando 98% de homologia e orientação idêntica.(Figura 2A). De acordo com estes autores, a “caixa Rhesus” conteria a deleção do gene *RHD* com 1463 pb de extensão e estaria presente na maioria dos indivíduos caucasianos RhD-negativo. Esta descoberta possibilitou a padronização de técnicas moleculares para a determinação da zigosidade do antígeno RhD.

A proximidade entre estes genes facilitaria a ocorrência de conversão gênica em cis durante os rearranjos gênicos entre eles (**Figura 2B**), levando assim à formação de genes híbridos (partes do gene *RHD* em *RHCE* e vice-versa), responsáveis por algumas variantes do antígeno RhD (**Figura 2C**).

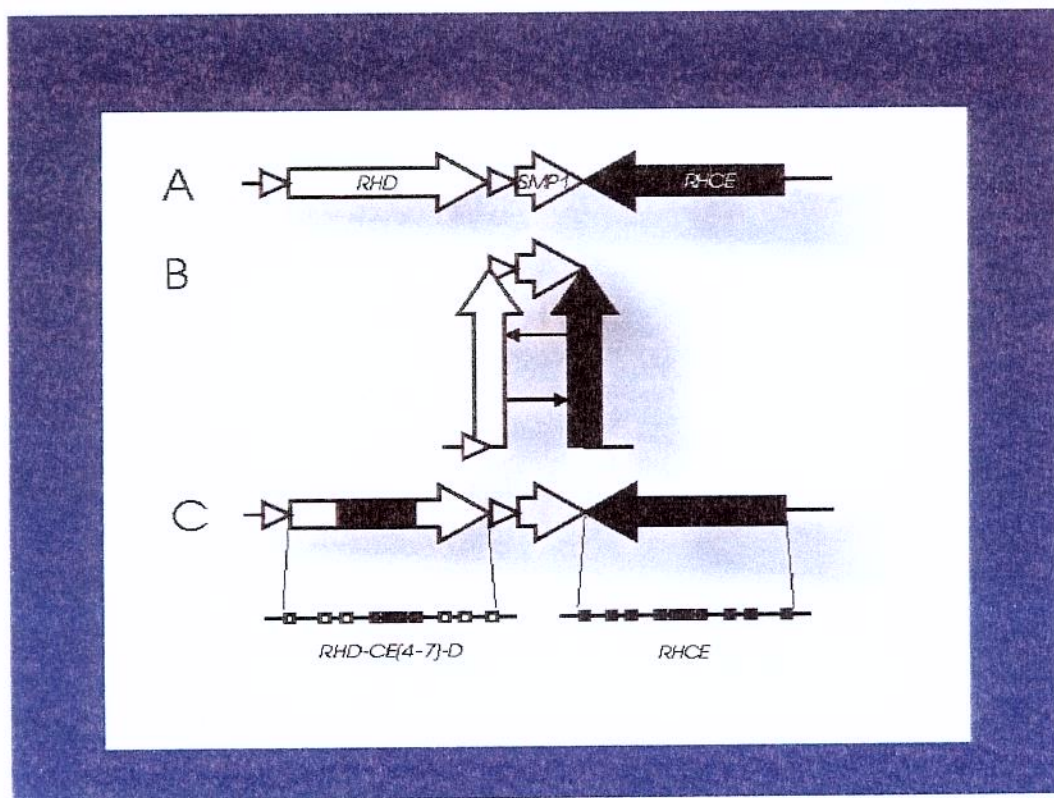


Figura 2: Modelo do locus Rh proposto por Wagner & Flegel, 2000.

As bases moleculares do polimorfismo do antígeno D foram objetos de numerosos trabalhos. O antígeno D é considerado como um mosaico composto de 37 epítomos, onde pelo menos nove epítomos (epD1-epD9) já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais (LOMAS et al, 1984). Alguns indivíduos RhD-positivo podem desenvolver aloanticorpos anti-D dirigidos contra um ou mais dos epítomos ausentes, definindo-se assim, as categorias do antígeno D parcial (D^{II} , D^{III} , D^{IV} , D^V , D^{VI} , D^{VII} , DFR, DBT, R^{oHar}) que são diferenciadas umas das outras, de acordo com a presença ou ausência de um ou mais epítomos (TIPPETT, et al, 1996).

D	Reação com anticorpos monoclonais							
	epD1	epD2	epD3	epD4	epD5	epD6/7	epD8	epD9
II	+	+	+	0	+	+	+	0
IIIa	+	+	+	+	+	+	+	+
IIIb	+	+	+	+	+	+	+	+
IIIc	+	+	+	+	+	+	+	+
Iva	0	0	0	+	+	+	+	0
Va	0	+	+	+	0	+	+	+
VI	0	0	+	+	0	0	0	+
VII	+	+	+	+	+	+	0	+
DFR	+/0	+/0	+	+	+/0	+/0	0	+
DBT	0	0	0	0	0	+/0	+	0
R ^{oHar}	0	0	0	0	+/0	+/0	0	0

Figura 3: Categorias do antígeno D parcial definidas por Tippett, 1996.

A análise molecular das variantes de D mostrou que a perda da expressão de certos epítomos D está associada à mutações de ponto no gene *RHD* ou a rearranjos gênicos entre os genes *RHD* e *RHCE*. As variantes D^{II}, D^{IIIa}, D^{IVa}, D^{VII}, DMH, DNU, DHR, DHMi, DFW, R₀^{Har} e DAR são devidas à mutações de ponto no gene *RHD*, enquanto que as variantes D^{IIIb}, D^{IIIc}, D^{IVb}, D^{Va}, D^{VI}, DFR, DBT e DCS ocorrem pela formação de genes híbridos, onde um fragmento do gene *RHD* é substituído por um fragmento genômico do gene *RHCE*. Estes genes codificam proteínas híbridas RhD-CE-D de 417 aminoácidos que conservam alguns epítomos D mas que podem, ocasionalmente, expressar novos epítomos detectáveis sorologicamente. Estas alterações, ocorrem nos segmentos extracelulares da proteína RhD, as alças onde estão localizados os epítomos Rh (Figura 4), mudando a sua conformação e a exposição dos epítomos de D. Este fato explica porque os indivíduos com o fenótipo D parcial, perdem a expressão de alguns epítomos do antígeno RhD e podem

desenvolver aloanticorpo anti-D, ao entrar em contacto com hemácias RhD-positivo normais (HUANG et al, 1996; ROUILLAC et al, 1995; MOURO et al, 1994; BECKER et al, 1996, WAGNER et al, 1998; HEMKER et al, 1999; WAGNER & FLEGEL, 2000).

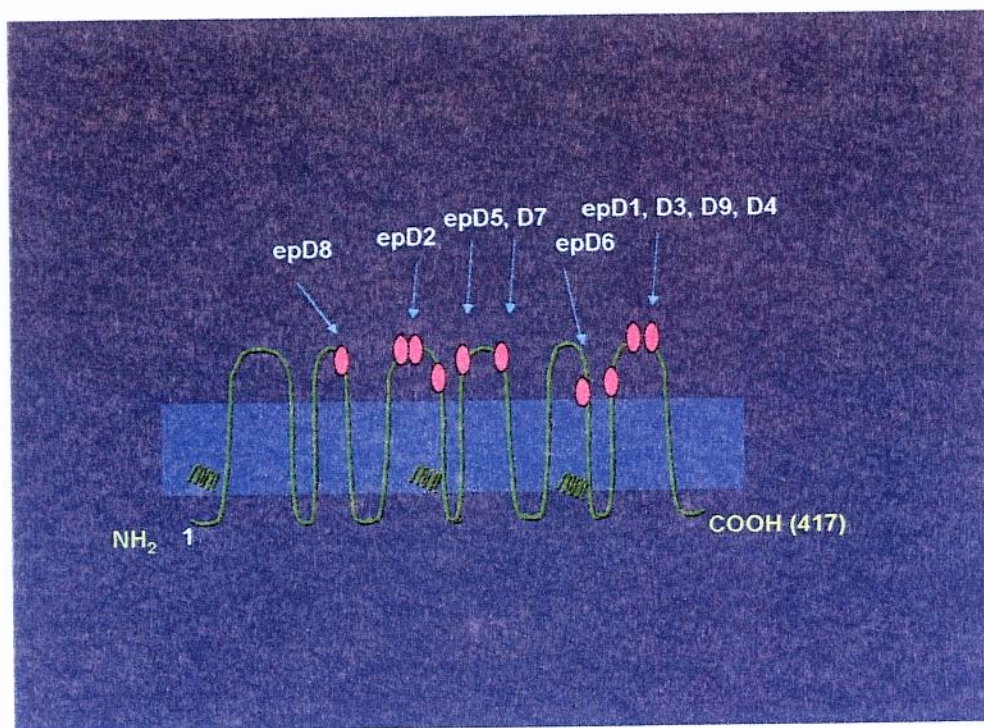


Figura 4: Antígeno D parcial

Os antígenos D parciais categorias D^{III} e DAR não são caracterizados sorologicamente devido ao fato de não existirem anticorpos monoclonais que reconhecem os epítomos específicos expressos por estas variantes. Estudos moleculares demonstraram que elas ocorrem predominantemente em indivíduos de origem africana e seus descendentes (HUANG et al, 1997; HEMKER et al, 1999).

O fenótipo D fraco (D^U) pode surgir como uma consequência de mutações de ponto missenses em diferentes éxons do gene *RHD* (WAGNER et al, 1999). Até o momento, 22 tipos moleculares de D fraco já foram identificados. As substituições dos

aminoácidos dos diferentes tipos de D fraco estão localizadas nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína RhD (**Figura 5**). Este fato, explica a fraca expressão do antígeno RhD na membrana da hemácia, bem como a ausência de aloanticorpo anti-D (**WAGNER et al, 2000; MULLER et al, 2001**).

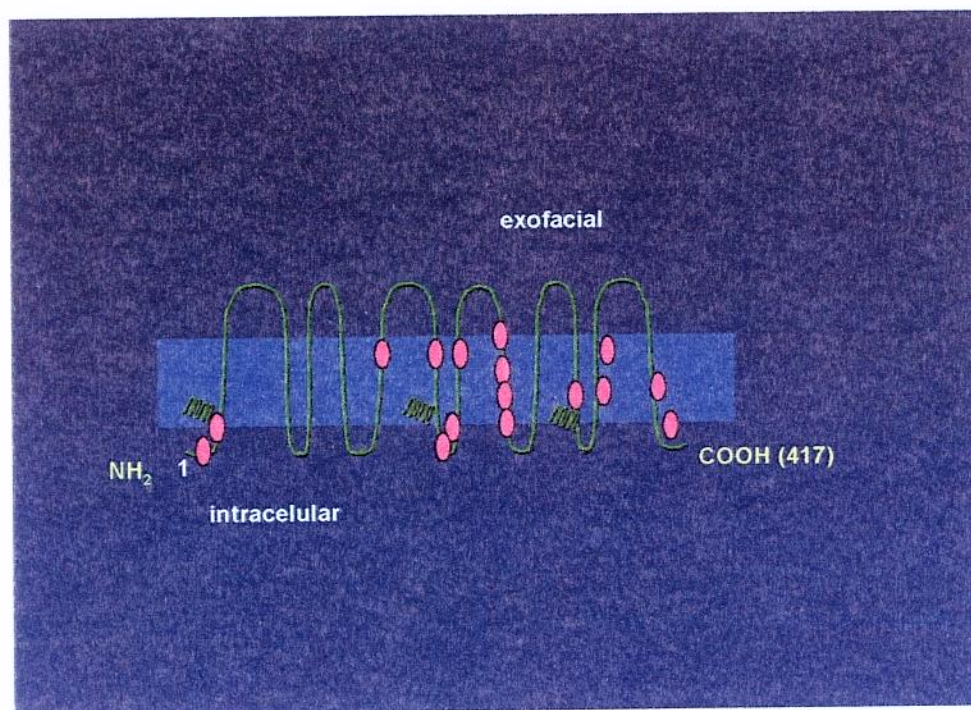


Figura 5: Antígeno D fraco

Estudos análogos têm mostrado que as alterações no gene *RHCE* estão também associadas a mutações de ponto em certas variantes (C^x , C^w , Rh26, e^s , E cat I) e a rearranjos gênicos em outras (D---, Dc-, r^G , RN, RoHar, E cat II e E cat III). Estes genes híbridos do tipo *RHCE-D-CE* codificam proteínas que determinam a perda dos epítopos de CE e, além disto, podem levar a uma fraca expressão de alguns epítopos de D. A expressão dos epítopos RhCE pode ser alterada por mudanças de aminoácidos em qualquer parte da proteína, incluindo as regiões transmembranares (**HUANG et al, 1996; FAAS et al, 1997; CHERIF-ZAHAR et al, 1994; BLUNT et al, 1994; MOURO et al, 1996; NOIZAT-PIRENNE et al, 1996; ROUILLAC et al, 1996 NOIZAT-PIRENNE et al, 2000**).

Variantes da expressão do antígeno Rhe têm sido descritas (ISSITT, 1991) e as bases moleculares para alguns destes fenótipos já são conhecidas (AVENT & REID, 2000; HUANG et al, 2000). A presença da mutação 733G que codifica o aminoácido valina na posição 245 é responsável pela expressão do antígeno VS (245 Val). Este antígeno do sistema Rh, de baixa incidência em caucasianos, porém freqüente em africanos, está associado a uma fraca expressão do antígeno Rhe nas hemácias (FAAS et al, 1997) (Figura 6).

Mais recentemente, WESTHOFF et al, 2001 descreveram uma nova variante do antígeno Rhe associada ao alelo *RH ce*. A presença de uma mutação de ponto no nucleotídeo 48 G>C no éxon 1 do gene *RHCE*, leva a substituição do aminoácido triptofano (Trp) para cisteína (Cys) na posição 16. Quando o aminoácido Cys16 está associado ao alelo *RH ce*, a expressão do antígeno Rhe fica alterada e esta variante pode então não ser reconhecida por alguns anticorpos monoclonais (Figura 6).

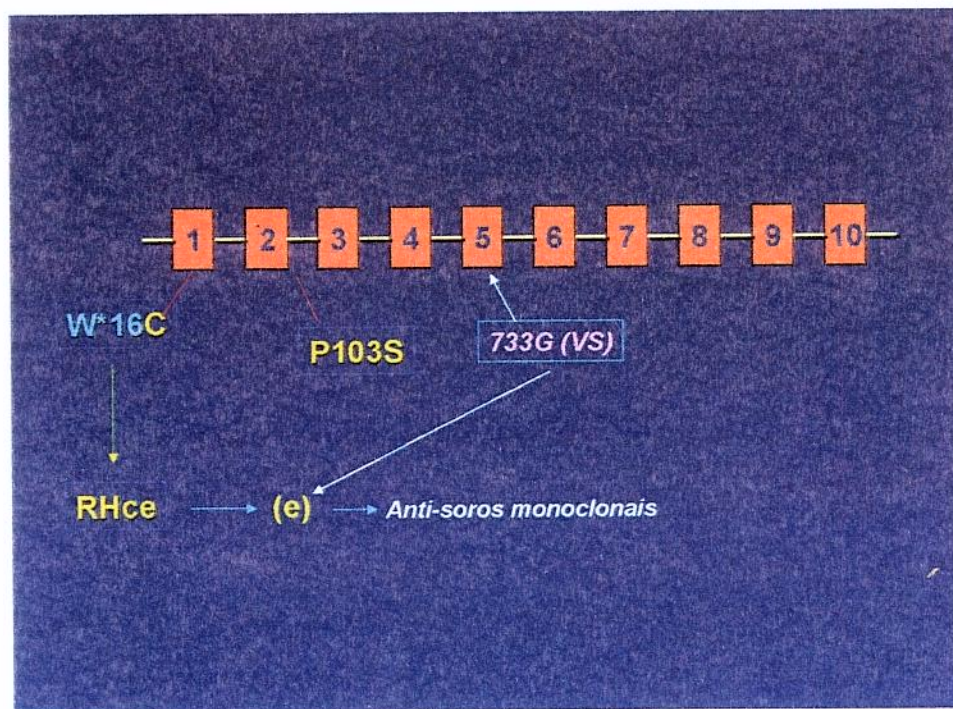


Figura 6: Variantes do antígeno Rhe

A ausência de expressão de antígenos Rh na membrana das hemácias determina o fenótipo Rhnull. O estudo molecular destes indivíduos permitiu demonstrar que na superfície das células normais as proteínas Rh estão fisicamente associadas, sob a forma de um complexo molecular, com outras proteínas codificadas por genes independentes (LW, RH50, CD47, GPB) (AGRE & CARTRON, 1991; CARTRON, 1994; CARTRON & AGRE, 1995).

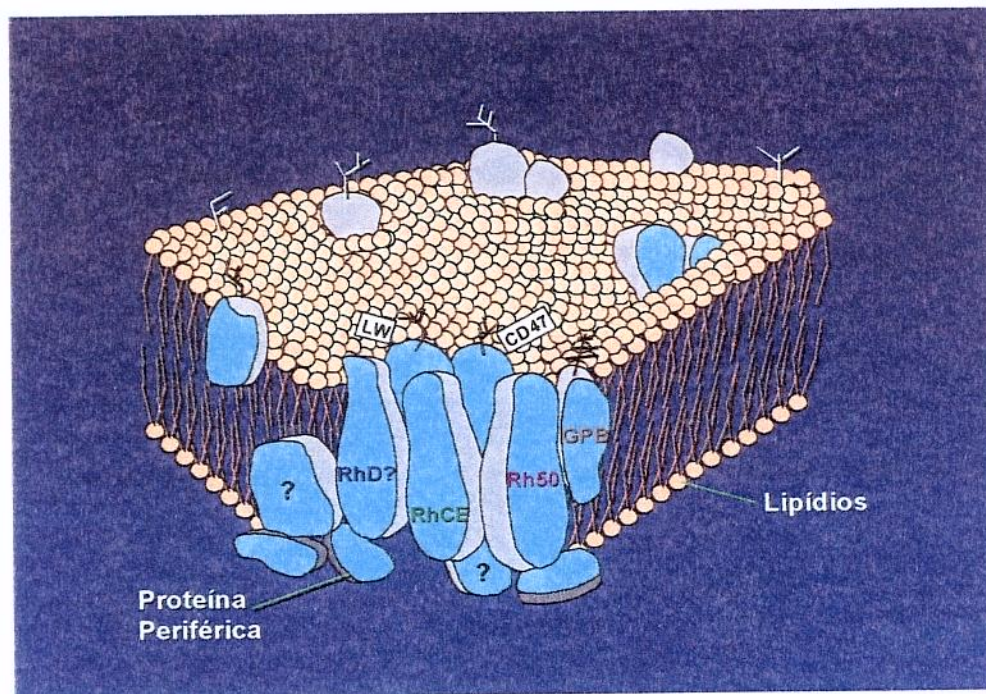


Figura 7: Moléculas associadas com o complexo Rh (HUANG et al, 1997).

HUANG et al, 1996; CARRITT et al, 1993 e CHERIF-ZAHAR et al, 1993 demonstraram a presença de um locus *RH* silencioso mas não deletado em indivíduos Rh null, sugerindo que todos os fenótipos Rh poderiam resultar de defeitos ainda não identificados nos mecanismos de regulação que governam a transcrição dos genes *RH*. No entanto, foi demonstrado que a maioria das mutações dos fenótipos Rhnull encontram-se na sequência do código do gene *RH50* (CHERIF-ZAHAR et al, 1998; HUANG et al, 1999). Em termos de formação do complexo Rh, isto estabelece uma correlação genética entre as proteínas Rh50 e Rh30 na manutenção da arquitetura da membrana eritrocitária.

Tendo em vista o importante significado clínico do sistema Rh, as informações obtidas com os estudos moleculares têm sido rapidamente traduzidas para a aplicação diagnóstica. (CARTRON et al, 1994; HYLAND et al, 1995; LEGLER et al, 1999; RIOS et al, 1999; REID et al, 2000; ROZMAN et al, 2000; CASTILHO et al, 2001).

Foi observado que os casos de síndrome da deficiência Rh (fenótipo Rhnull), apresentam uma anemia crônica de grau variável associada com esferocitose, fragilidade osmótica anormal e aumento da permeabilidade a cátions (NASH & SHOJANIA, 1987). Estudos de famílias mostram que a deficiência Rh está associada com consangüinidade e surge de diferentes origens genéticas (RACE & SANGER, 1975).

A genotipagem Rh pode ser importante em pacientes falciformes politransfundidos, como um método de auxílio no processo de identificação de anticorpos (PELLEGRINO JR, 2001; CASTILHO et al, 2001), uma vez que os anticorpos mais freqüentemente encontrados nestes pacientes pertencem ao Sistema Rh (GIBLETT, 1977). Estudos recentes mostram que a presença de leucócitos nos produtos de sangue transfundido não interfere na genotipagem Rh (REID et al, 1999; RIOS et al, 1999). Além disto, a genotipagem de variantes dos antígenos Rh, de difícil caracterização sorológica, podem ser de grande auxílio na segurança transfusional destes pacientes.

Os métodos de genotipagem Rh baseiam-se atualmente nas técnicas de PCR alelo-específicas ou PCR-RFLP (LE VAN KIM et al, 1994; FAAS et al, 1995; POULTER et al, 1996; COLIN et al, 1991), buscando identificar as diferenças nas seqüências entre os genes *RHD* e *RHCE* (BENNETT et al, 1993; SIMSEK et al, 1994; CARRITT et al, 1994; LIGHTEN et al, 1996; RIOS et al, 1999; REID et al, 2000).

Como rotina, os métodos que amplificam regiões específicas do intron 4 e exon 10 têm sido utilizados na genotipagem *RHD*. A amplificação simultânea do intron 4 e exon 7 em uma técnica de PCR multiplex tem sido utilizada na genotipagem dos alelos RH C/c e detecção do pseudogene *RHD* (SINGLETON et al, 2000). A técnica de PCR multiplex tem possibilitado também a caracterização molecular das variantes *RHD* híbridas, ou seja, as variantes que possuem inserção total ou parcial do exon *RHD* pelo exon *RHCE*

equivalente (MAASKANT van WIJK et al, 1998).

Devido ao alto grau de polimorfismo do sistema Rh, além das técnicas anteriormente mencionadas, pode ser ainda necessário o emprego de métodos específicos para a genotipagem de um antígeno particular, podendo até mesmo requerer métodos de sequenciamento direto para identificação de genes *RH* alterados.

A elucidação da base molecular das variantes Rh possibilitou o desenvolvimento de técnicas para a determinação de variantes que parecem ser predominantes em algumas populações. Desta forma, é possível estabelecer a correlação adequada entre os genótipos e os fenótipos e o esclarecimento da perda de expressão de alguns antígenos Rh comuns. A determinação da frequência das variantes Rh em populações distintas pode auxiliar na determinação de fenótipos raros que não são caracterizados sorologicamente

A caracterização molecular do pseudogene *RHD* e do gene híbrido *RHD-CE-D^s* que são freqüentes em africanos, pode auxiliar na adequada correlação entre o fenótipo e o genótipo em pacientes falciformes RhD-negativo.

A possibilidade de identificar categorias do antígeno D parcial como D^{IIIa} e DAR que não são caracterizadas por hemaglutinação e que aparentemente são freqüentes em africanos e seus descendentes, pode aumentar a segurança transfusional de pacientes falciformes politransfundidos que muitas vezes desenvolvem anti-D após transfusão de sangue RhD-positivo.

Outra aplicação clínica da caracterização molecular das variantes Rh em pacientes falciformes inclui as variantes do antígeno Rhe que podem não ser detectadas por alguns dos anticorpos monoclonais utilizados na rotina, o que diminuiria consideravelmente a disponibilidade de sangue para estes pacientes.

Apesar de todos estes avanços, principalmente em relação aos mecanismos moleculares que envolvem as variantes Rh, ainda há muitas questões não resolvidas sobre a expressão dos antígenos Rh e das relações da proteína Rh com a função e estrutura da membrana eritrocitária. Há também pouca informação de como os domínios

transmembranares modulam a exposição dos antígenos Rh na superfície da membrana eritrocitária e dos fatores que regem a interação entre as proteínas Rh30 e Rh50 no transporte intracelular e na estrutura da membrana. Do ponto de vista de antígenos, ainda não se conhece a frequência das variantes Rh em diferentes populações.

Novos estudos envolvendo variantes Rh em pacientes com patologias diversas, poderão em futuro próximo auxiliar no melhor entendimento da correlação entre o fenótipo e o genótipo e sua aplicação clínica.

1. OBJETIVOS

Tendo em vista a importância do tema, sua atualidade e a relevância que pode vir a ter na segurança transfusional de pacientes falciformes, foram nossos objetivos:

1. Padronizar técnicas moleculares para realização da genotipagem *RHD* e *RHCE*
2. Determinar a frequência do pseudogene *RHD* e do gene híbrido *RHD-CE-D^s* em pacientes falciformes fenotipados como rr e Ror
3. Verificar a frequência dos antígenos D parciais categorias D^{IIIa}, D^{Va} e DAR em pacientes falciformes RhD-positivo.
4. Determinar a ocorrência das variantes do antígeno Rhe em pacientes falciformes com o alelo *RHce*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A. MATERIAL

Amostras

a) Amostras de sangue de doadores voluntários de sangue

Após consentimento informado, foram coletadas 250 (duzentos e cinquenta) amostras de sangue, anticoaguladas com EDTA, de doadores voluntários de sangue de Campinas e região atendidos no Hemocentro da Unicamp, no período de outubro de 1998 a outubro de 1999. Estas amostras foram previamente fenotipadas para os antígenos RhD, RhCc, RhEe.

b) Amostras de sangue de pacientes portadores de anemia falciforme

Amostras de sangue, anticoaguladas com EDTA, de 141 (cento e quarenta e hum) pacientes portadores de anemia falciforme (homozigotos para hemoglobina S) atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp. Estes pacientes, foram previamente fenotipados para os antígenos RhD, RhCc, RhEe, por testes de hemaglutinação em gel.

1. Anti-soros

Os anti-soros empregados na determinação dos antígenos RhD, RhCc, RhEe, foram:

- anti-RhD (lote DMD18, Gamma Biologicals Inc. ®, Houston, TX)
- antiC (lote CM217, Gamma Biologicals Inc. ®, Houston, TX)
- anti-c (lote cM12, Gamma Biologicals Inc ®, Houston, TX)
- anti-E (lote EM10, Gamma Biologicals Inc. ®, Houston, TX)
- anti-e (lote eM217, Gamma Biologicals Inc. ®, Houston, TX)

2. Anti-soros monoclonais anti-e

Os anti-soros monoclonais anti-e empregados na determinação do antígeno Rhe em pacientes que apresentavam o alelo *RH ce* foram obtidos através do III Workshop Internacional de Anticorpos Monoclonais, realizado em julho de 2001 em Paris, França. Os clones utilizados foram: MS16, MS17, MS19, MS62, MS63

3. Cartões Gel (ID-Micro Typing Cards)

Os cartões ID-Liss/Coombs (lote 50530.7623) foram utilizados na realização da fenotipagem eritrocitária e foram obtidos junto à Diamed AG ®, Morat, Switzerland.. Cada cartão ID-Liss/Coombs, contém 6 microtubos e, em cada um deles, uma mistura de gel e soro antiglobulina humana poliespecífica.

4. Tampão LISS modificado (Diluyente 2)

Tampão de baixa força iônica, utilizado na diluição dos anti-soros e das hemácias, para a realização da fenotipagem (Diamed AG ®, Morat, Switzerland).

5. Suspensão de hemácias a 0,8%

Foram preparadas suspensões de hemácias a 0,8%, em LISS modificado (Diluyente 2). Após lavar 3 vezes, as hemácias em solução fisiológica, usando centrifugação a 100 g durante 1 minuto, a cada vez, 2 µl do concentrado de hemácias obtido foi resuspenso em 0,5 ml de LISS modificado.

6. Diluição dos anti-soros

As diluições dos anti-soros foram realizadas em tampão LISS modificado (diluyente 2) na razão 2 contra hemácias específicas. A diluição de trabalho foi definida na última diluição que apresentou reação de aglutinação de 4 + do anti-soro com o antígeno correspondente.

7. Easy DNA Kit

O Easy DNA Kit, utilizado na extração de DNA de amostras de sangue periférico e de células do epitélio bucal, foi obtido da Invitrogen ®, Carlsbad, CA , lotes 206610, 206611, 206612, 206613.

8. DNAzol

Solução utilizada na extração de DNA de leucócitos de sangue periférico (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD).

9. Blood DNA purification Kit

Kit utilizado na extração de DNA de leucócitos de sangue periférico (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA).

10. dNTP 10mM

Os nucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP foram obtidos da Promega ®, Madison, WI e Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD. A concentração de dNTP 10 mM utilizada nas reações de PCR foi obtida diluindo-se 20 µl de cada nucleotídeo em 120 µl de água deionizada e destilada (ddH₂O).

11. Taq DNA polymerase

As enzimas Taq DNA polymerase, utilizadas nas reações de PCR, foram obtidas da Promega ®, Madison, WI e Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD. O Kit contendo 5 unidades/µl desta enzima, incluía 1 ml de tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH8.4) e 500 mM de KCl e 1 ml de MgCl₂ 50mM.

12. Tampão Tris-Acetato-EDTA(TAE) 50X

Este tampão foi preparado, dissolvendo-se 242 g de Tris (Sigma Chemical CO ® St Louis,), 57,1 g de ácido acético glacial (Sigma Chemical CO ®, St Louis) e 100 ml de EDTA 0,5 M, pH8.0 (Sigma Chemical CO ®, St Louis), em 1000 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

13. Tampão Tris-Borato (TEB) 10X

Este tampão foi preparado, dissolvendo-se 108 g de Tris (Sigma Chemical CO), 55 g de ácido bórico (Sigma Chemical CO) e 40 ml de EDTA 0,5 M pH8.0 (Sigma Chemical CO), em 1000 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

14. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X

O tampão TAE 1X foi preparado diluindo-se 20 ml de TAE 50X em 980 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

15. Tampão Tris-Borato (TEB).10X

O tampão TEB 1X foi preparado diluindo-se 100 ml de TEB 10X em 900 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

16. Gel de agarose a 1.5%

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 1,5 g de agarose (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD®) em 100 ml de TAE 1X. Esta solução era aquecida em forno e microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, adicionava-se 50 µg de brometo de etídio (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD).

17. Gel de agarose a 3%

Três gramas de agarose (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD®) foram dissolvidas em 100 ml de TAE 1X. Esta solução era aquecida em forno de microondas, durante um minuto e, após resfriamento, adicionava-se 50 µg de brometo de etídio (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD).

18. Gel de poliacrilamida a 8%

A solução de poliacrilamida foi preparada misturando-se, em um becker, 23,3 ml de acrilamida 40% (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD), 8,8 ml de TEB 10X, 55 ml de ddH₂O, 363 µl de persulfato de amônio 10% (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD) e, 66 µl de TEMED (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD). Esta solução era colocada em uma placa de vidro, previamente preparada, até que ocorresse a sua polimerização.

19. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares de 50 pb, 100 pb e low DNA mass, foram obtidos da Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD.

20. Enzimas de restrição

As enzimas *Mnl* I, *Ban* I, *Hinc* II, *Taq* I, *Hph* I, *Bfa* I e *Nla* III foram obtidas da New England Biolab ®, Beverly MA e MBI Fermentas ®, Amherst, NY.

21. Concert rapid gel extraction system

Kit utilizado na purificação do PCR extraído do gel de agarose para a reação de sequenciamento (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD).

22. Concert rapid PCR purification system

Kit utilizado na purificação da reação de PCR para sequenciamento automático (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD).

B. MÉTODOS

1. Fenotipagem eritrocitária

A fenotipagem eritrocitária foi determinada pelo teste de hemaglutinação em gel, utilizando-se cartões ID-Liss/Coombs. Após identificação dos cartões, 50 µl das hemácias em teste a 0,8% em Diluente 2, foram adicionadas aos microtubos contendo gel e soro antiglobulina humana. A seguir, 25 µl do anti-soro diluído, contendo anticorpos específicos ao antígeno a ser estudado, -foram adicionados ao mesmo tubo. Após incubação a 37°C durante 15 minutos, os cartões foram centrifugados a 70 g por 10 minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação do gel teste.

2. Extração de DNA

O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico utilizando-se Dnazol (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD), Blood DNA purification Kit periférico (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) e o Easy DNA Kit (Invitrogen®, Carlsbad, CA), de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes.

A concentração e a qualidade de todos os DNAs preparados foram analisadas. A qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose (**Figura 8**) e a concentração de DNA foi determinada pela medida da densidade ótica em espectrofotômetro a 260 nm.

3. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da Polimerase (PCR), utiliza 200 ng de DNA, 50 pmol de cada *primer*, 2 nmol de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase e tampão em um volume final de 50 µl.

Os ciclos de amplificação foram realizados em um termo ciclador Perkin Elmer 9700 (Foster City, CA). O mesmo protocolo foi utilizado para todos os ensaios: desnaturação a 95 °C por 15 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94 °C; 20 segundos a 62 °C; 20 segundos a 72 °C e uma extensão de 10 minutos a 72 °C .

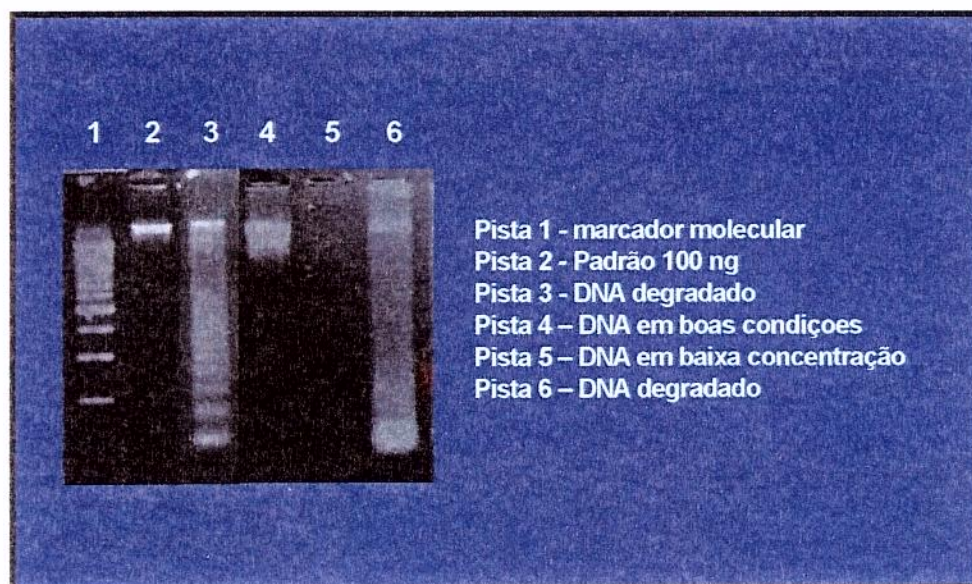


Figura 8. Análise qualitativa de DNA em gel de agarose a 1%

4. Análise dos fragmentos de PCR após digestão com enzimas de restrição (RFLP)

Os produtos de PCR amplificados foram digeridos *overnight* com as enzimas de restrição apropriadas (New England Biolab ®, Beverly MA e MBI Fermentas ®, Amherst, NY) em um volume final de 20 µl, utilizando 10 µl do produto de PCR e, 10 µl da mistura de enzima/tampão, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A análise do tamanho dos fragmentos obtidos com a digestão enzimática foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 3% ou gel de poliacrilamida a 8%.

5. Genotipagem *RH D*

Devido a alta homologia existente entre os genes *RH D* e *RHCE*, a estratégia utilizada na genotipagem *RH D* levou em consideração as diferenças existentes entre eles em duas regiões genômicas: intron 4 e exon 10. No intron 4, o gene *RHCE* possui 600 pares de bases a mais que o gene *RH D*, enquanto que, na região 3' não traduzida do exon 10, o gene *RH D* possui 47 pares de bases a mais que o gen *RHCE*. Assim, foram utilizados *primers* (REID et al, 2000) que permitem determinar a presença do gene *RH D*, pela análise direta do produto de PCR, após eletroforese em gel de agarose a 3% (Figura 9). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na Tabela 1.

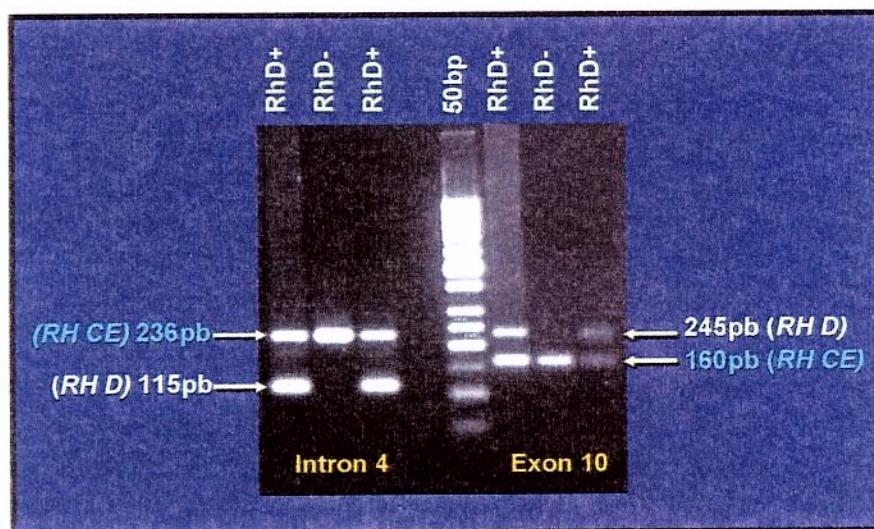


Figura 9. PCR para genotipagem *RH D*

6. Genotipagem *RH Ee*

A genotipagem *RH Ee*, foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto de PCR (amplicon) obtido, foi digerido com a enzima de restrição *Mnl I* (PCR-RFLP) de acordo com o descrito por RIOS et al, 1999 e REID et al, 2000. A análise dos fragmentos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 3% ou em gel de poliacrilamida a 8% (Figura 10). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.

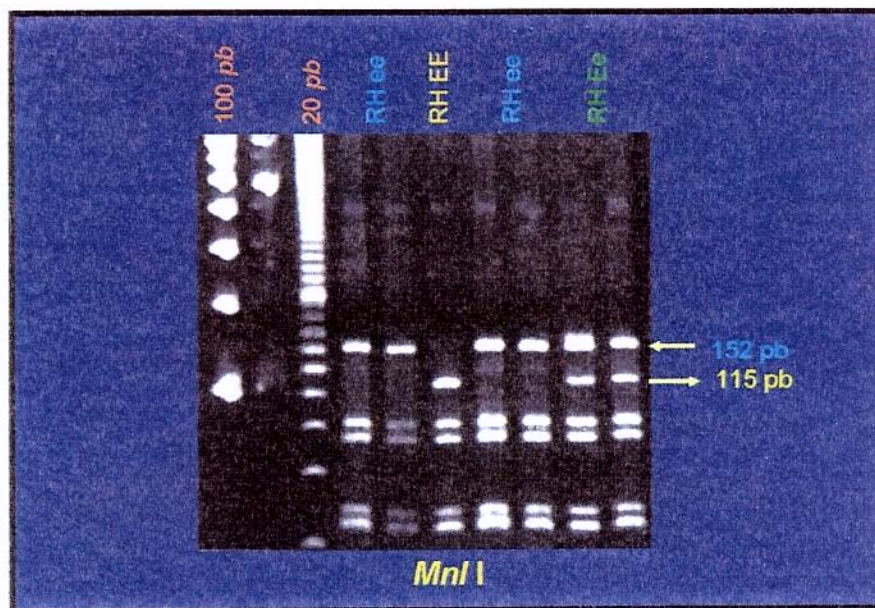


Figura 10. PCR-RFLP para genotipagem *RH Ee*

7. Genotipagem *RH Cc* e determinação do pseudogene *RHD* (*RHD Ψ*)

A genotipagem *RH Cc* e a determinação do pseudogene *RHD* foram realizadas utilizando-se uma técnica de PCR multiplex que permite a amplificação dos alelos *RH Cc* na presença do gene *RH D* e a detecção da duplicação de 37 pb no gene *RHD* conhecida como pseudogene *RHD* ou *RHD Ψ* (SINGLETON et al, 2000). A reação de PCR utiliza 200 ng de DNA, 50 pmol de cada primer, 2 nmol de cada dNTP, 1,0 U de Taq DNA polimerase e tampão em um volume final de 50 μ l. Os ciclos de amplificação foram realizados em um termo ciclador Perkin Elmer 9700 (Foster City, CA) e consistiram de: desnaturação a 95°C por 15 minutos e 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, e 1 minuto a 72°C seguidos de uma extensão de 10 minutos a 72°C. A análise dos produtos de PCR obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 3%. (Figura 11). As mutações de ponto associadas com este polimorfismo e a sequência dos primers utilizados encontram-se na Tabela 1.

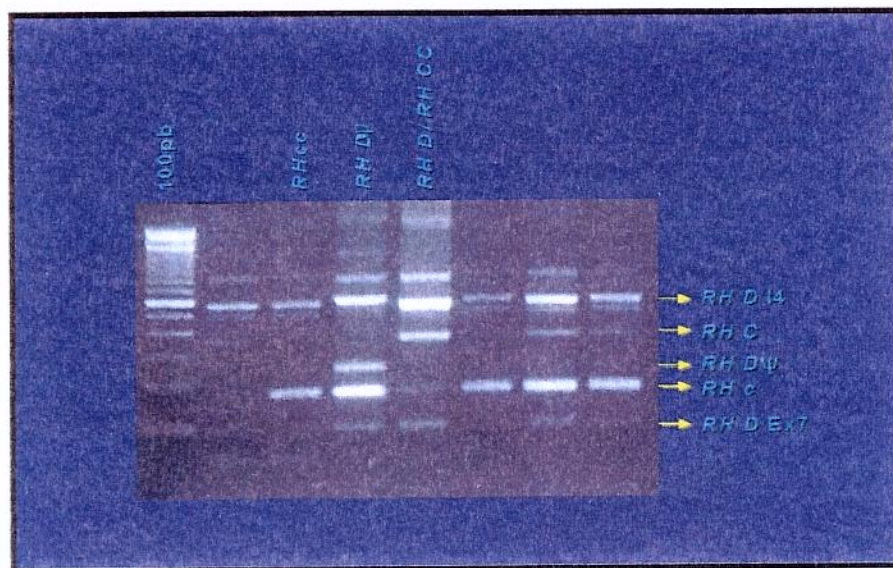


Figura 11: PCR multiplex para genotipagem *RH D*, *RH Cc* e Pseudogen *RH D* (*RH D Ψ*)

8. Caracterização molecular do gene híbrido *RHD-CE-D^s*

A caracterização molecular do gene híbrido *RHD-CE-D^s* foi realizada utilizando-se uma técnica de PCR multiplex que amplifica 6 exons específicos do gene *RHD* (MAASKANT-van-WIJK, 1998). Na presença do gene híbrido somente o exon 9 é amplificado uma vez que esta variante apresenta os exons 3-8 do gene *RHCE* (Figura 12). A sequência dos primers utilizados encontram-se na tabela 2.

9. Caracterização molecular das variantes *D^{IIIa}*, *D^{Va}* e *DAR*

A caracterização molecular das variantes *D^{IIIa}*, *D^{Va}* e *DAR*, foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto de PCR (amplicon) obtido, foi inicialmente digerido com a enzima de restrição *Hinc* II (PCR-RFLP) de acordo com o descrito por RIOS et al, 1999. A análise dos fragmentos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 3% ou em gel de poliacrilamida a 8% (Figura 13). As sequências dos primers utilizados para detecção da mutação 667G no exon 5 do gene *RHD* que é comum às três variantes encontram-se na Tabela 3.

10. Determinação da variante D^{Va}

A caracterização da variante D^{Va} foi realizada em todas as amostras de DNA que foram digeridas com a enzima *Hinc* II pela técnica descrita no item 9. Nestas amostras, foi realizada uma nova digestão com o mesmo produto de PCR utilizando-se a enzima *Taq* I. Na presença da variante D^{Va}, o produto de PCR não é digerido pela *Taq* I (**Figura 14**). As mutações de ponto associadas com esta variante e a sequência dos primers utilizados encontram-se na **Tabela 3**.

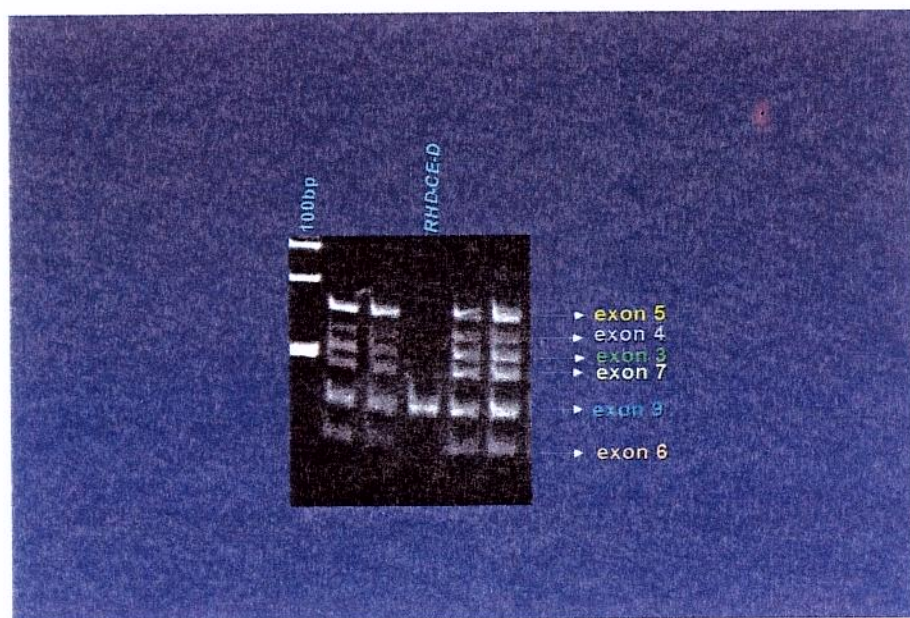


Figura 12: PCR multiplex para detecção do gene híbrido RHD-CE-D^s

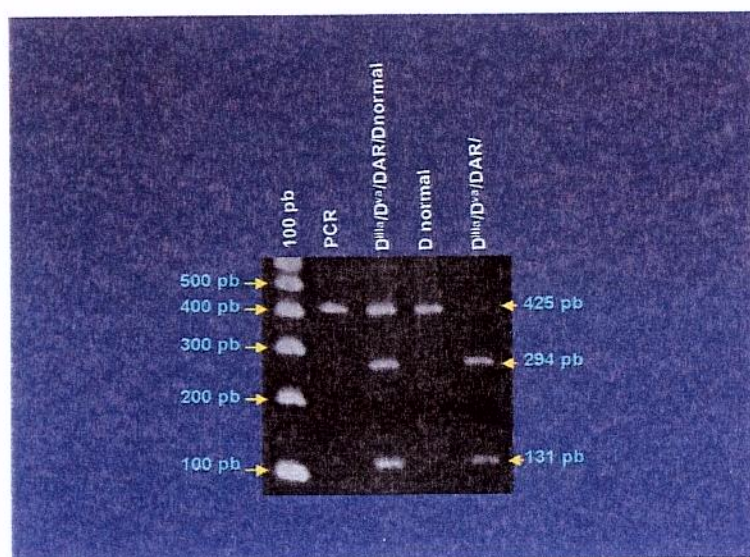


Figura 13: PCR-RFLP para caracterização das variantes D^{IIIa}, D^{Va} e DAR

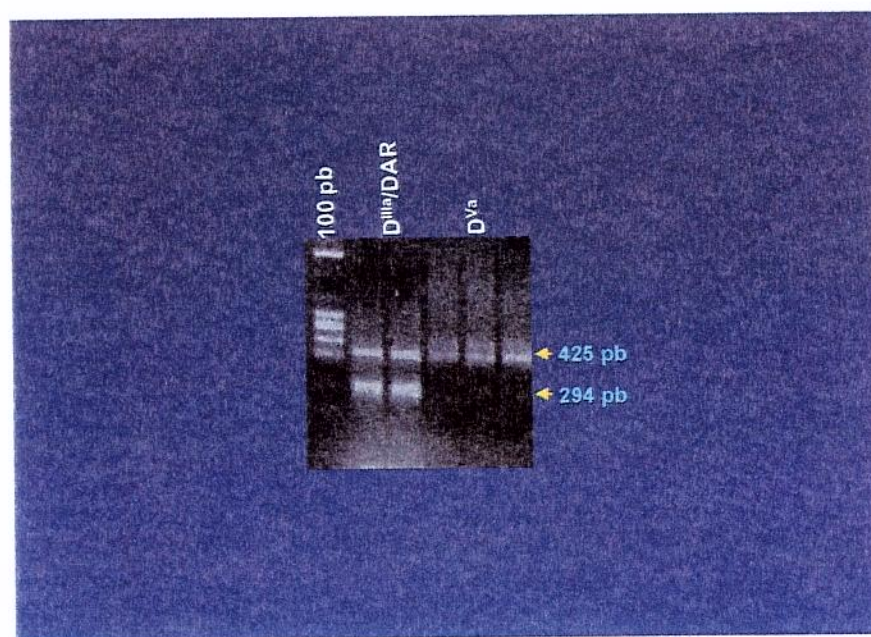


Figura 14: PCR-RFLP para caracterização da variante D^{Va}

11. Determinação da variante D^{IIIa}

A determinação da variante D^{IIIa} foi realizada em todas as amostras de DNA que foram digeridas com as enzimas *Hinc* II e *Taq* I pelas técnicas descritas nos itens 9 e 10. Nestas amostras foi realizado um novo PCR amplificando-se o exon 3 do gene *RHD* que contém a mutação específica da variante D^{IIIa} e o produto de PCR obtido foi digerido com a enzima *Ban* I. (Figura 15). As mutações de ponto associadas com esta variante e a sequência dos primers utilizados encontram-se na Tabela 3.

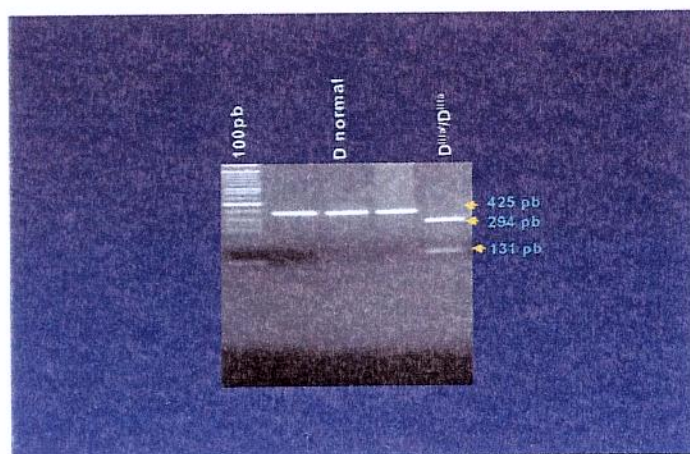


Figura 15: PCR-RFLP para caracterização da variante D^{IIIa}

12. Determinação da variante DAR

A determinação da variante DAR foi realizada em todas as amostras de DNA digeridas com as enzimas *Hinc* II e *Taq* I pelas técnicas descritas nos itens 9 e 10. Nestas amostras foi realizado sequenciamento direto do exon 7 para a detecção da mutação 1025 T>C específica da variante DAR (Figura 16). Os produtos de PCR obtidos com primers específicos (tabela 3) foram sequenciados através do sequenciador automático ABI prism 377 após extração do gel de agarose e purificação pelos kits: Concert rapid gel extraction system e Concert rapid PCR purification system (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD).

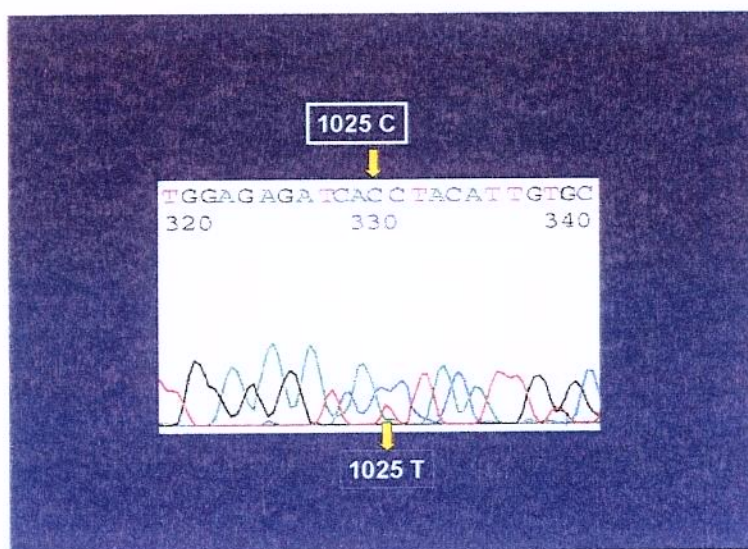


Figura 16: Sequenciamento do exon 7 para caracterização da variante DAR

13. Caracterização molecular do antígeno VS

A caracterização molecular da mutação 733G no exon 5 do gene *RHCE* que leva à substituição Leu245Val (antígeno VS) foi realizada utilizando-se uma técnica de PCR-RFLP com amplificação do exon 5 do gene *RHCE* e digestão do produto de PCR com a enzima *Bfa* I (Figura 17). A sequência dos primers utilizados encontram-se na tabela 4.

14. Determinação da mutação 48C (Cys16)

Para caracterização da mutação 48G>C no exon 1 do gene *RHCE* que leva à substituição Trp16Cys e à fraca expressão do antígeno Rho foram padronizadas duas técnicas de PCR: uma técnica de PCR alelo-específico (ASPA) que detecta a mutação 48C e uma técnica de PCR-RFLP com amplificação do exon 1 e digestão do produto de PCR com a enzima *Hha* I que determina a zigosidade da mutação 48C (Figura 18). A sequência dos primers utilizados encontram-se na tabela 4.

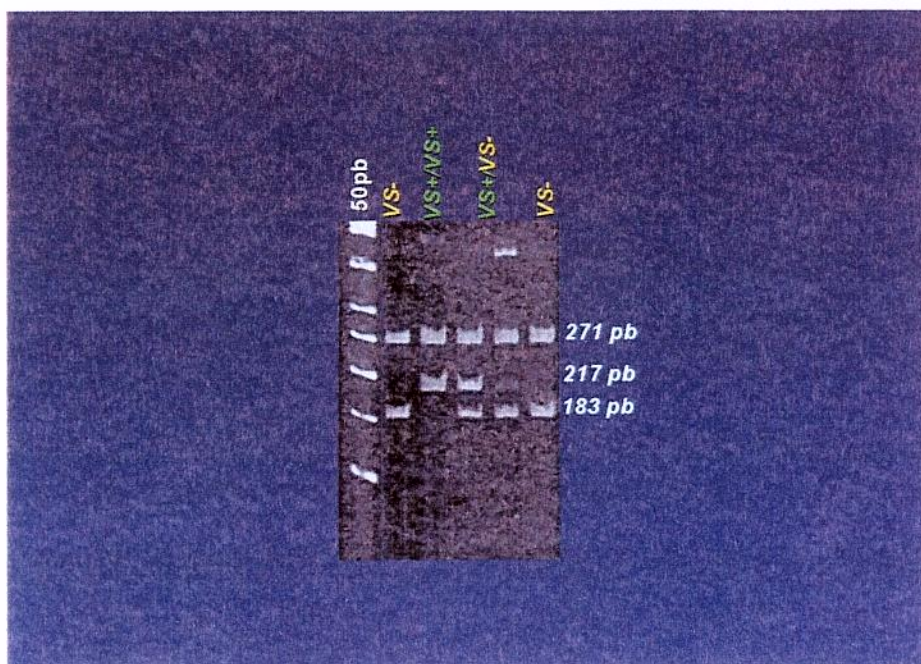


Figura 17: PCR-RFLP para caracterização da mutação 733G (VS)

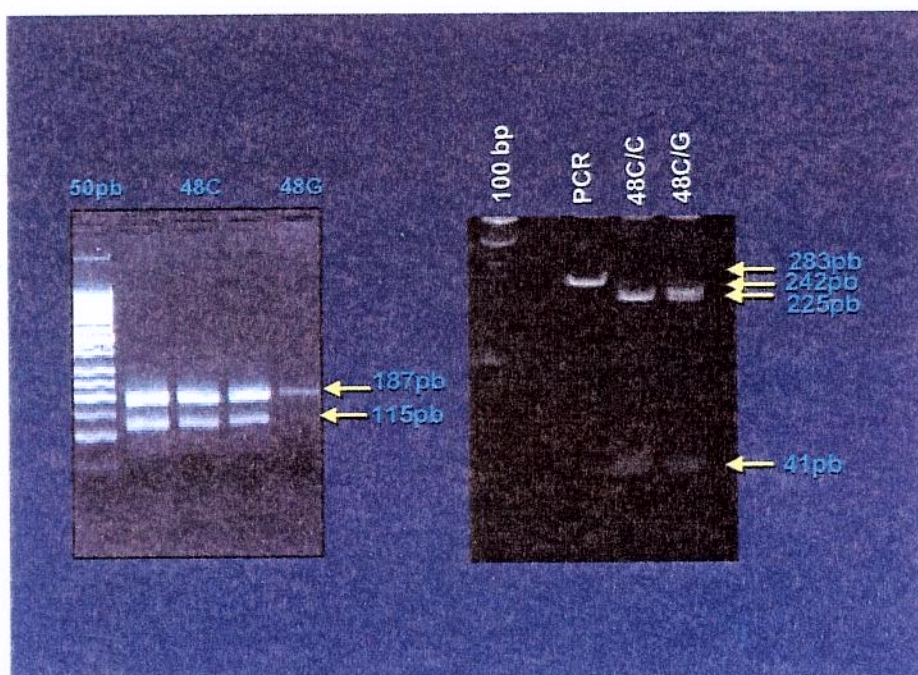


Figura 18: ASPA e PCR-RFLP para caracterização da mutação 48C

**Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados nas genotipagens
RH D, *RH C/c*, *RH E/e***

Primers	Sequências	Genbank
RHI41	5' -GTG TCT GAA GCC CTT CCA TC -3'	Y10604, Y10605
RHI42	5'-GAA ATC TGC ATA CCC CAG GC -3'	Y10604, Y10605
RHI43	5'ATT AGC TGG GCA TGG TGG TG 3'	Y10605
EX10F	5'-TTT CCT CAT TTG GCT GTT GGA TTT TAA -3'	X54534,L08429
RHD3'-UTR	5'-GTA TTC TAC AGT GCA TAA TAA ATG GTG -3'	(Huang, 1996)
RHCE3'-UTR	5'-CTG TCT CTG ACC TTG TTT CAT TAT AC -3'	(Huang, 1996)
EXON 7 for	5'-AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA -3'	AJ299026
EXON 7 rev	5'-ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC -3'	AJ299026
INTRON 3 for 1	5'-GGG TTG GCT GGG TAA GCT CT -3'	AB035192
INTRON 4 rev	5'-GAA CCT GCT CTG TGA AGT GCT -3'	AB041536
EXON 4 insert	5'-AAT AAA ACC AGT AAG TTC ATG TGG -3'	AB041536
INTRON 3 for 2	5'-AAC CTG GGA GGC AAA TGT TT -3'	AB035192
C for	5'-CAG GGC CAC CAC CAT TTG AA 3'	X54534
C rev	5' -GAA CAT GCC ACT TCA CTC CAG 3'	U66340
c for	5' -TCG GCC AAG ATC TGA CCG 3'	X54534
c rev	5' -TGA TGA CCA CCT TCC CAG G 3'	U66340
CEI4	5'-GGC AAC AGA GCA AGA GTC CA -3'	Y10605
CEX5	5'-CTG ATC TTC CTT TGG GGG TG -3'	X54534, L08429

Tabela 2: Sequência dos *primers* utilizados na caracterização do gene híbrido *RHD-CE-D^s*

Primers	Sequências	Exon/pb
MR364	5'-TCGGTGACTGATCTCAGTGGA-3'	Exon3/111
MR474M	5'-ACTGATGACCATCCTCATGT-3'	
MR496	5'-CACATGAACATGATGCACA-3'	Exon4/126
MR621	5'-CAAACCTGGGTATCGTTGCTG-3'	
MR648	5'-GTGGATGTTCTGGCCAAGTT-3'	Exon5/157
Mrex5	5'-CACCTTGCTGATCTTACC-3'	
MR898	5'-GTGGCTGGGCTGATCTACG-3'	Exon5/57
Mrex6	5'-TGTCTAGTTTCTTACCGGCAAGA-3'	
MR973	5'-AGCTCCATCATGGGCTACAA-3'	Exon7/96
MR1068	5'-ATTGCCGGCTCCGACGGTATC-3'	
Mre9SD2	5'-AACAGGTTTGCTCCTAAATATT-3'	Exon9/71
MR1219	5'-AAACTTGGTCATCAAAATATTTAACCT-3'	

Tabela.3-Primers utilizados na técnica de PCR para a caracterização das variantes *RHD^{IIIa}* e *DAR*

Primers	Sequências	Exon/mutação
RHDI4	5'-TAAGCACTTCACAGAGCGG-3'	Exon 5/667T>G
EX5R	5'-TCT TGC TGA TCT TCC CTT GG -3'	D ^{IIIa} /D ^{Va} /DAR
RHDI4	5'-TAAGCACTTCACAGAGCGG-3'	Exon 5/697 G>A
EX5R	5'-TCT TGC TGA TCT TCC CTT GG -3'	D ^{Va}
RHDEX3F	5'-TAT TCG GCT GGC CAC CAT GA -3'	Exon3/455 A>C
RHDI3R	5'-TTC TAA TTT TGC CTG TAA TC -3'	D ^{IIIa}
RHD16F	5'-TCA TAG TGT GGT CCG TAA AC -3'	Exon 7/1025 T>C
RHDEX7R	5'-CAA TCA TGC CCA TTG CC-3'	DAR

Tabela.4-Primers utilizados na técnica de PCR para a determinação da mutação 48G (Cys16) e da mutação 733G (antígeno VS)

Primers	Sequências	Exon/mutação
CEex1S	5'-CGA CAC AGG ATG AGC TCT AA -3'	Éxon 1/48C>G
CEint1R	5'-CTC CTT TTC TAA GGG GGT AGA -3'	Cys16
RHCEint4S	5'-GAG GTT GCA GTG AGC CCA TGA TCG -3'	Exon 5/733 C>G
RHCEex5R	5'-TGA CCC TGA GAT GGC TGT CA-3'	Antígeno VS

4.RESULTADOS

A. PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA A REALIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM *RHD* e *RHCE*

Com o objetivo inicial de padronizar as técnicas moleculares de genotipagem *RHD* e *RHCE*, empregamos 250 amostras de sangue e de DNA extraído de leucócitos de sangue periférico, de doadores voluntários de sangue com antecedentes étnicos diversos.

Apesar dos protocolos de genotipagem de grupos sanguíneos estarem bem estabelecidos é necessário validá-los nas diferentes populações. Isto se faz necessário, tendo em vista que a maioria dos *primers* desenhados para a genotipagem de grupos sanguíneos, foram baseados em sequências de um ou poucos indivíduos, geralmente de origem caucasiana (CARTRON, 1994).

Para a validação das técnicas, comparamos os resultados obtidos na genotipagem com os resultados da fenotipagem previamente realizada pela técnica de hemaglutinação em gel.

Os resultados das fenotipagens e genotipagens Rh realizadas nestas amostras, encontram-se na **Tabela 5**. Houve 100% de concordância entre os resultados de fenotipagem e de genotipagem no sistema Rh.

Estes resultados demonstram que os *primers* utilizados na determinação destes genótipos, se hibridizaram adequadamente com as regiões intrônicas das sequências obtidas em amostras de DNA de indivíduos caucasianos. Assim, estes protocolos podem ser utilizados para a genotipagem *RHD* e *RHCE* e, na determinação das variantes do sistema Rh em nossa população.

B. RESULTADOS DA GENOTIPAGEM *RHD*

Os resultados da genotipagem *RHD* obtidos em pacientes portadores de anemia falciforme foram comparados com os resultados da fenotipagem RhD

previamente realizada nestes pacientes (Tabela 6). Dos 141 pacientes estudados, 8 apresentaram discrepância entre os resultados.

TABELA 5: Resultados de fenotipagem e genotipagem para o sistema Rh em 250 amostras de sangue e DNA de doadores voluntários de sangue.

Genótipo	Fenótipo		
Sistema Rh	RhD+	RhD–	
<i>RH D/RH CE</i>	207	0	
<i>RH CE</i>	0	43	
	RhEE	RhEe	Rhee
<i>RH EE</i>	6	0	0
<i>RH Ee</i>	0	25	0
<i>RH ee</i>	0	0	219
	RhCC	RhCc	Rhcc
<i>RH CC</i>	22	0	0
<i>RH Cc</i>	0	82	0
<i>RH cc</i>	0	0	146

TABELA 6: Resultados de fenotipagem e genotipagem para o antígeno RhD em amostras de sangue e DNA de 141 pacientes

Genótipo	Fenótipo		Total
	RhD+	RhD–	
<i>RHD/RHCE</i>	130	8	138
<i>RHCE</i>	0	3	3
Total	130	11	141

Estes oito pacientes foram fenotipados como **RhD-negativo** e genotipados como **RHD-positivo**. Quando analisamos estas amostras através das técnicas de PCR multiplex desenvolvidas por MAASKANT-van WIJK et al, 1998 e SINGLETON et al, 2000, verificamos que 6 apresentavam uma duplicação de 37 pb que caracteriza o pseudogene *RHD* (*RHDΨ*) (Figura 11) e, 2 apresentavam o gene híbrido *RHD-CE-D^s* (Figura 12). Estes achados explicam as discrepâncias encontradas entre o fenótipo RhD-negativo e o genótipo *RHD*-positivo pois, indivíduos que apresentam estas variantes não expressam o antígeno RhD nas suas hemácias.

Com a finalidade de verificarmos a freqüência destas variantes em pacientes falciformes, estudamos todos os pacientes fenotipados como RhD-negativos e R0r (cDe/cde) ou seja, indivíduos que apresentam um gene *RHD* que não é expresso.

Dos 91 pacientes estudados, 11 eram RhD-negativo e 80 RhD-positivo heterozigotos (Ror). Dos 11 pacientes RhD-negativo estudados, 3 apresentaram o gene *RHD* deletado, 6 apresentaram o pseudogene *RHDΨ* e 2 o gene híbrido *RHD-CE-D^s*. Dos 80 pacientes RhD-positivo, 12 apresentaram o pseudogene *RHD* (*RHDΨ*). Os resultados da presença do pseudogene *RHD* e do gene híbrido *RHD-CE-D^s* encontram-se na Tabela 7

Tabela 7: Presença do pseudogene *RHD* e do gene híbrido *RHD-CE-D^s* em 91 pacientes

Pacientes	Fenótipo	Genótipo		
		<i>RHD</i> –	<i>RHDΨ</i>	<i>RHD-CE-D^s</i>
11	RhD–	3	6	2
80	RhD+/RhD–	0	12	0

C. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS VARIANTES

RHD CATEGORIAS D^{IIIa} , D^{Va} E *DAR*

A caracterização molecular dos antígenos D parciais categorias D^{IIIa} , D^{Va} e *DAR* em pacientes portadores de anemia falciforme com o fenótipo RhD-positivo, permitiu demonstrar que estas variantes são frequentes nestes pacientes. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 8**. Dos 130 pacientes estudados, 25 (19.2%) apresentaram as variantes *RHD*. Em 3 pacientes foram detectadas a variante D^{IIIa} e em 4 a variante *DAR*. Outros 4 pacientes, apresentaram o antígeno D parcial categoria D^{Va} . Catorze pacientes apresentaram concomitantemente as variantes D^{IIIa} e *DAR*. Em 2 destes pacientes, foi detectado a presença de aloanticorpo anti-D.

Tabela 8 : Ocorrência das variantes D^{IIIa} , D^{Va} e *DAR* em 130 pacientes RhD-positivo

Pacientes	Genótipo				
	D normal	D^{IIIa}	<i>DAR</i>	D^{Va}	D^{IIIa}/DAR
130	105	3	4	4	14
%	80.7	2.5	3.1	3.1	11

D. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS VARIANTES

DO ANTÍGENO R_he ASSOCIADAS AO ALELO *RH ce*

Com o objetivo de determinar a ocorrência das variantes do antígeno R_he em pacientes que apresentavam o alelo *RH ce* foi investigada a presença das mutações 48C (Cys16) e 733G (VS) em 58 amostras de DNA de pacientes portadores de anemia falciforme, previamente fenotipados para os antígenos RhD, C/c, E/e e VS.

Dos 58 pacientes estudados, 56 apresentaram a mutação 48C (Cys16) e 50 a mutação 733G (antígeno VS). A ocorrência simultânea destas mutações foi observada em 50 pacientes. Estas mutações encontravam-se em heterozigose, sugerindo que estes pacientes apresentavam a mutação 48C em um alelo e a mutação 733G em outro alelo. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 9**.

Tabela 9: Ocorrência das mutações 48C(Cys16) e 733 G(VS) em 58 pacientes com o alelo *RH ce*

Fenótipo	48C (Cys16)	733 G(VS)
R0 (cDe)	56	0
Rh ccee VS+	50	50

Em 10 pacientes que apresentaram a ocorrência simultânea das mutações, foi possível realizar a fenotipagem para o antígeno Rhe empregando-se cinco anti-soros monoclonais anti-e de procedências diferentes. Observou-se que a expressão do antígeno Rhe encontrava-se enfraquecida, sendo que três dos anti-soros utilizados não aglutinaram com as hemácias destes pacientes (**Tabela 10**).

Tabela 10: Resultados de hemaglutinação da fenotipagem para o antígeno Rhe com a utilização de anti-soros monoclonais.

MONOCLONAIS				
MS16	MS17	MS19	MS62	MS63
0	0	0	2+	3+

5.DISSCUSSÃO

A PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA A REALIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM *RHD* e *RHCE*

Com a finalidade de padronizarmos as técnicas moleculares de genotipagem *RHD* e *RHCE*, foram estudadas 250 amostras de DNA extraídas de sangue periférico de doadores voluntários de sangue atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp. Estes doadores foram selecionados por apresentarem previamente resultados de fenotipagem para o sistema Rh.

O intenso processo de miscigenação que ocorreu na população brasileira a torna única em seu antecedente étnico. A região sudeste do Brasil possui alta densidade populacional e tem continuamente recebido imigrantes da região nordeste. É também caracterizada pelo alto grau de mistura entre descendentes de europeus e africanos. Assim, doadores desta região constituem uma amostra representativa de uma população miscigenada (PELLEGRINO et al, 2001).

Em nossas amostras, houve 100% de concordância entre os resultados de fenotipagem e genotipagem para os antígenos do sistema Rh (Tabela 5). Estes resultados demonstraram que os primers utilizados nas genotipagens para o sistema Rh desenhados de acordo com as sequências genômicas obtidas de indivíduos com ancestrais caucasianos podem ser empregados para a determinação dos genótipos e das variantes *RHD* e *RHCE* em populações com antecedentes étnicos diversos.

Diante destes dados, estes protocolos poderão ser aplicados para os pacientes de nossa população com transfusão recente e que necessitam de sangue fenotipado para o sistema Rh (REID et al, 2000, ROZMAN et al, 2000; PELLEGRINO et al, 2001; CASTILHO et al, 2001).

B. GENOTIPAGEM *RHD* E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS VARIANTES DO ANTÍGENO RhD

A genotipagem *RHD* em descendentes de Africanos fenotipados como RhD-negativo é complexa e deve ser cuidadosamente interpretada. O pseudogene *RHD* (*RHD* Ψ), caracterizado por uma inserção de 37 pb que introduz um códon de terminação prematuro, pode causar discrepância entre o fenótipo e o genótipo se não for utilizada uma técnica molecular específica para sua detecção. Este fenômeno foi descrito em 64% de africanos RhD-negativo da África do Sul e em 24% dos africanos da América (SINGLETON et al, 2000). Em nosso estudo 6 (55%) dos 11 pacientes RhD-negativo estudados apresentaram o gene *RHD* não funcional.

Estes resultados em conjunto com publicações anteriores que mostram que o pseudogene *RHD* apresenta alta frequência em populações de origem africana (SINGLETON et al, 2000) sugerem que a determinação do genótipo *RHD* deve incluir ampla análise do gene *RHD*. Recomenda-se nestes indivíduos, a utilização de uma técnica de PCR multiplex que detecta a presença de *RHD* Ψ para que possamos resolver com segurança a discrepância de resultados encontrada entre o fenótipo e o genótipo.

Quando o paciente fenotipado como RhD-negativo apresentar o pseudogene *RHD*, deve-se considerar o resultado do fenótipo uma vez que o gene *RHD* Ψ não é expresso. Estes indivíduos podem desenvolver aloanticorpo anti-D se vierem a ser transfundidos com hemácias RhD-positivo.

O gene híbrido *RHD-CE-D^s*, em que parte do exon 3 e os éxons 4 a 8 são derivados do gene *RHCE*, também tem sido associado com o fenótipo RhD-negativo em descendentes de africanos (FAAS et al, 1997; SINGLETON et al, 2000). O gene híbrido pode apresentar ainda a mutação 733G que leva à substituição de um aminoácido leucina para valina na posição 245, mutação esta, responsável pelo antígeno VS. Foi descrito a presença deste gene em 15% de africanos RhD-negativo da África do Sul (SINGLETON et al, 2000).

Em nosso estudo, 2 (18%) dos 11 pacientes RhD-negativo estudados, fenotipados como D-C(+)c+E-e+VS+, apresentaram o gene híbrido. Estas amostras foram RhD-positivas pela análise do exon 10 mas, D-negativas pela análise do intron 4 e exon 7.

Recomenda-se nestes pacientes, a amplificação do gene *RHD* em diferentes regiões (intron 4, exon 7 e exon 10 onde *RHD* e *RHCE* diferem) e a utilização de uma técnica de PCR multiplex que detecta a presença de *RHD-CE-D^s* (MAASKANT **van WIJK et al, 1998**). Pacientes que apresentam o gene híbrido devem ser considerados RhD-negativo.

Variantes do antígeno RhD, como os antígenos D parciais, são também importantes na medicina transfusional e materno-fetal. Indivíduos que apresentam estas variantes, correm o risco de aloimunização se transfundidos com sangue RhD-positivo normal (CASTILHO **et al, 2001**). Na rotina, a presença do antígeno D parcial em pacientes RhD-positivo somente é investigada após o desenvolvimento de aloanticorpo anti-D.

A possibilidade de identificar categorias do antígeno D parcial, como D^{IIIa}, D^{Va} e DAR que ocorrem predominantemente em africanos (HUANG **et al, 1997**; HEMKER **et al, 1999**), em pacientes falciformes politransfundidos pode ser de grande auxílio na prevenção da aloimunização contra o antígeno RhD.

A variante D^{IIIa} é de difícil caracterização sorológica pois apresenta reatividade sorológica com todos os anti-soros anti-D monoclonais disponíveis. Estudos moleculares demonstraram que esta categoria do antígeno D parcial apresenta mutações de ponto em 3 exons do gene *RHD*: 455A>C (exon 3), 602 C>G (exon 4) e 667 T>G (exon 5) (HUANG **et al, 1997**). No entanto, apenas a mutação 455 A>C no exon 3 de *RHD* é exclusiva da variante D^{IIIa}.

A variante D^{Va} pode ocorrer pela presença de 2 mutações de ponto no exon 5 do gene *RHD*: 667C>G e 697G>A (WAGNER **et al, 1998**) ou por rearranjos gênicos entre *RHD* e *RHCE* (ROUILLAC **et al, 1995**).

A variante DAR também é de difícil caracterização sorológica e foi descrita por **HEMKER et al, 1999** que demonstraram que esta categoria perde 9 epítomos do antígeno D devido a presença de 3 mutações de ponto: 602 C>G (exon 4), 667 T>G (exon 5) e 1025 T>C (exon 7). Apenas a mutação 1025 T>C é exclusiva de DAR pois as outras duas encontram-se também presentes no fenótipo D^{IIIa}.

A partir do conhecimento das bases moleculares envolvidas na expressão dos fenótipos D^{IIIa}, D^{Va} e DAR e, com o objetivo de verificarmos a ocorrência destas três variantes em pacientes portadores de anemia falciforme, bem como a real necessidade de sua identificação na seleção do sangue a ser transfundido, realizamos estudos moleculares em amostras de DNA de 130 pacientes. Nossos resultados indicam que vinte e cinco (19.2%) dos pacientes estudados apresentaram as variantes D^{IIIa}, D^{Va} e DAR. Em 4 (3.1%) destes pacientes foi identificada a variante D^{Va} e, em 21 (16.1%) as variantes D^{IIIa} e DAR.

A frequência de DAR por nós encontrada em pacientes falciformes (3,1%) é mais alta que a frequência de DAR (1.5%) observada por **HEMKER et al, 1999** em africanos provenientes da África do Sul.

Em nosso estudo foi identificado pela primeira vez a ocorrência concomitante das variantes D^{IIIa} e DAR em um mesmo paciente. Não foi encontrado na literatura nenhum outro trabalho que caracteriza estas três variantes em pacientes falciformes ou mesmo em outras populações.

Como mencionado anteriormente, indivíduos com os fenótipos D^{IIIa}, D^{Va} e DAR podem desenvolver anticorpo anti-D quando expostos ao antígeno D completo. De fato, dois dos pacientes estudados que estavam recebendo sangue com o fenótipo RhD-positivo, desenvolveram aloanticorpo anti-D.

A alta frequência destas variantes em pacientes falciformes, principalmente de D^{IIIa} e DAR, sugere um aumento no risco de aloimunização ao antígeno RhD uma vez que estes indivíduos são classificados na rotina como RhD-positivos. Considerando ainda que

não existem anticorpos monoclonais que reconheçam estas variantes sorologicamente, recomenda-se a utilização de protocolos moleculares que possam identificá-las em pacientes falciformes transfundidos. Pacientes que apresentam estas variantes devem ser classificados como RhD-negativos (HEMKER et al, 1999; AVENT & REID, 2000).

C. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS VARIANTES DO ANTÍGENO Rhe

Em termos de complexidade do sistema Rh, o antígeno Rhe é o mais complexo após o antígeno RhD. O antígeno Rhe encontra-se presente na maioria das hemácias humanas e, segundo alguns autores, pode também conter vários epítomos (RACE & SANGER, 1975; ISSITT, 1991). No entanto, apesar das tentativas em se classificar o antígeno Rhe em categorias, até o momento nenhuma classificação foi possível devido à heterogeneidade dos anticorpos anti-e desenvolvidos por indivíduos e-positivos.

Duas variantes do antígeno Rhe descritas em africanos, foram relacionadas com a fraca expressão deste antígeno nas hemácias. A substituição de aminoácidos nas regiões transmembranares e nas alças extracelulares da proteína Rh pode ser o fator responsável por esta fraca expressão. (FAAS et al, 1997; WESTHOFF et al, 2001).

A variante Rhe descrita por FAAS et al, 1997 foi associada com o fenótipo VS+ que leva à substituição de um aminoácido leucina para valina na posição 245 na região transmembranar da proteína Rh, podendo resultar em uma alteração na conformação da membrana e conseqüentemente em uma fraca expressão do antígeno Rhe.

WESTHOFF et al, 2001 descreveram uma outra variante Rhe associada com a transversoão 48 C>G no alelo *RH ce*. A presença de 48C que codifica o aminoácido cisteína, está associada ao alelo *RH Ce* e foi demonstrado ser importante na expressão do antígeno C (MOURO et al, 1996). Quando 48C está associada com o alelo *RH ce* tem sido observada uma fraca expressão do antígeno Rhe nas hemácias. Segundo WESTHOFF et al, 2001, apesar do aminoácido cisteína resíduo 16 estar localizado na primeira região

transmembranar e o antígeno Rhe estar localizado na quarta alça extracelular da proteína Rh, ele poderia modular a expressão da proteína à longa distância ou ocorrer uma interação entre os resíduos da primeira e quarta alças na superfície da hemácia, afetando assim a expressão do antígeno Rhe. Esta variante reage fortemente com anti-soros policlonais anti-Rhe, mas não é detectada por alguns clones atualmente utilizados na produção de anti-soros monoclonais.

Considerando a importância do antígeno Rhe na medicina transfusional e a associação destas duas variantes com o alelo *RH ce* em africanos, estudamos a sua ocorrência em 58 pacientes falciformes que apresentavam o alelo *RH ce*.

A ocorrência simultânea das mutações 48C (Cys16) e 733G (VS) foi observada em 50 pacientes demonstrando que ambas mutações são freqüentes em descendentes de africanos com o alelo *RH ce*. Estas mutações foram encontradas em heterozigose sugerindo que estes pacientes apresentavam a mutação 48C em um alelo e a mutação 733G em outro, o que teoricamente levaria a uma fraca expressão do antígeno Rhe nas hemácias. De fato, quando foi realizada a fenotipagem do antígeno Rhe nas hemácias de 10 destes pacientes, empregando cinco anti-soros monoclonais de procedências diferentes, verificou-se que três dos anti-soros utilizados não as aglutinaram, o que demonstra que a expressão do antígeno Rhe encontrava-se enfraquecida.

Se considerarmos que qualquer um dos 3 anti-soros monoclonais por nós utilizados, não detectaram o antígeno Rhe, podem ser empregados na rotina de fenotipagem, estes pacientes poderiam ter sido classificados erroneamente como Rhe-negativo. Este resultado levaria a uma diminuição considerável na disponibilidade de sangue para estes indivíduos, uma vez que o fenótipo Rhe-negativo ocorre na frequência de 1/50 em nossa população. Até o momento, não foi detectado anticorpo anti-e em pacientes que apresentam estas variantes.

A ocorrência simultânea das mutações 48C e 733G em um mesmo paciente é um resultado inédito e não foram encontrados na literatura outros trabalhos que tenham avaliado a presença destas variantes em pacientes falciformes.

D. APLICAÇÃO DAS VARIANTES DO SISTEMA Rh NA MEDICINA TRANSFUSIONAL

Considerando a importância do sistema Rh na medicina transfusional e a possibilidade de se realizar a determinação do genótipo Rh pelas técnicas de PCR alelo-específico e PCR-RFLP, em conjunto com a hemaglutinação, muda a gama de possibilidades nos procedimentos obstétricos e transfusionais aumentando a segurança dos pacientes transfundidos.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que para uma correlação adequada entre o fenótipo e genótipo no sistema Rh em populações de descendência africana é necessário analisar a presença do pseudogene *RHD* e do gene híbrido. Quando estes genes estão presentes, fenótipo e genótipo são discordantes e deve-se considerar o resultado do fenótipo. Esta análise é extremamente importante na determinação do gene *RHD*.

A caracterização molecular das variantes D^{IIIa} , D^{Va} e DAR em pacientes falciformes poderá contribuir significativamente na prevenção da aloimunização anti-D e, conseqüentemente, no aumento da segurança transfusional destes pacientes.

A importância da determinação das variantes do antígeno Rhe na seleção do sangue para pacientes falciformes foi demonstrada quando as amostras que apresentavam as mutações 48C (Cys16) e 733G (VS) foram fenotipadas como Rhe-negativo, com a utilização de 3 anti-soros monoclonais anti-e disponíveis no mercado. Diante destes resultados, recomenda-se que a rotina de fenotipagem Rh de pacientes falciformes seja realizada com pelo menos 2 anti-soros monoclonais ou com um anti-soro policlonal e outro monoclonal, melhorando desta forma o atendimento à necessidade de transfusão pelo aumento da disponibilidade de sangue.

Em conclusão, a caracterização molecular das variantes Rh deve ser recomendada em pacientes dependentes de transfusão, pois permite a seleção correta do sangue a ser transfundido. Auxilia ainda, na prevenção da aloimunização, podendo diminuir os efeitos de potenciais reações hemolíticas.

6. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos do presente trabalho, as condições em que foi realizado a caracterização molecular das variantes do sistema de grupos sanguíneos Rh em amostras de DNA de pacientes portadores de anemia falciforme, podemos concluir que:

1. Os protocolos utilizados nas genotipagens para o sistema Rh que incluíram *primers* desenhados de acordo com as sequências genômicas de indivíduos caucasianos, podem ser empregados para a determinação dos genótipos e, das variantes *RHD* e *RHCE* em populações com antecedentes étnicos diversos, como é a população brasileira;

2. A utilização da genotipagem Rh, em conjunto com a fenotipagem, pode auxiliar na prevenção da aloimunização, diminuir os efeitos de potenciais reações hemolíticas, bem como aumentar a disponibilidade de sangue para os pacientes que necessitam de transfusões de repetição como os pacientes portadores de anemia falciforme;

3. Neste estudo, com a determinação do pseudogene *RHD* e do gene híbrido *RHD-CE-D^s*, foi possível identificar que 19,8% dos pacientes falciformes com os fenótipos R0r e rr, apresentavam o pseudogene *RHD* e, 2% o gene híbrido. Não expressam, portanto, o antígeno D em suas hemácias;

4. Para uma correlação adequada entre o fenótipo e o genótipo *RHD* em pacientes falciformes é necessário analisar a presença do gene *RHD^ψ* e do gene híbrido *RHD-CE-D^s*;

5. Foi observado uma alta frequência das variantes D^{IIIa} e DAR (16.1%) em pacientes portadores de anemia falciforme quando comparada com a frequência observada em africanos da África do Sul;

6. Neste estudo foi identificado pela primeira vez a ocorrência concomitante das variantes D^{IIIa} e DAR em um mesmo paciente;

7. A caracterização molecular das variantes D^{IIIa} e DAR em pacientes falciformes poderá contribuir significativamente na prevenção da aloimunização anti-D e conseqüentemente, no aumento da segurança transfusional destes pacientes;

8. Foi observado uma alta freqüência das mutações 48C (Cys16) e 733G (antígeno VS) associadas ao alelo *RH ce* em pacientes falciformes;

9. A presença das mutações 48C (Cys16) e 733G (antígeno VS) leva a uma fraca expressão do antígeno Rhe nas hemácias;

10. A ocorrência simultânea das mutações 48C (Cys16) e 733G (antígeno VS) em um mesmo paciente é um resultado inédito;

11. A caracterização molecular das variantes Rh deve ser recomendada em pacientes falciformes que necessitam de transfusão de repetição pois, permite uma seleção mais adequada do sangue a ser transfundido. Auxilia ainda, na prevenção da aloimunização, podendo diminuir os efeitos de potenciais reações hemolíticas.

7. SUMMARY

The Rh blood group system is one of the most polymorphic and immunogenic systems known in humans. In the past decade, intense investigation has yielded considerable knowledge of the molecular background of this system. The genes encoding 2 distinct Rh proteins that carry C or c together with either E or e antigens, and the D antigen, have been cloned, and the molecular bases of many of the antigens and of the phenotypes have been determined. Gene rearrangements, deletions, or point mutations may cause partial D and CE antigens.

The purpose of this study was to investigate the presence of the *RHD* pseudogene or *RHD* ψ , the hybrid *RHD-CE-D^S*, partial D antigens such as D^{IIIa}, D^{Va} and DAR and the association of Cys16 and/or VS with the *RH ce* alleles in Sickle Cell Disease (SCD) Patients due to their ethnical origin.

DNA samples from 91 SCD patients phenotyped as rr and Ror were tested for *RHD* ψ and *RHD-CE-D^S* hybrid gene by two different multiplex-PCR. Eighteen of the 91 SCD patients studied had the *RHD* ψ , 2 had the *RHD-CE-D^S* hybrid gene and 3 completely lack the *RHD*. These data confirm that the inclusion of two different multiplex PCRs for *RHD* genotype is essential to test the D-negative SCD patients.

We also investigated the occurrence of D^{IIIa}, D^{Va} and DAR in a cohort of SCD patients phenotyped as D+. DNA samples from 130 SCD patients were tested for 455A>C, 667T>G, and 1025T>C by PCR-RFLP. The PCR-RFLP results showed that 3 samples were heterozygous D^{IIIa}, 4 were heterozygous DAR, 4 samples were homozygous D^{Va}, and 105 were normal *RHD*. The remaining 14 samples were heterozygous D^{IIIa} and DAR. Anti-D was detected in the serum of two of these patients. These results show that D^{IIIa} and DAR are prevalent in SCD patients and may occur concomitantly in the same patient. We believe that this is the first description of concomitant occurrence of D^{IIIa} and DAR alleles. Thus, genotyping for both D^{IIIa} and DAR is useful for the management of SCD patients.

DNA samples from 58 SCD patients were tested for 48 G>C transversion encoding for Cys16 and for VS status by allele-specific PCR and PCR-RFLP. Fifty-six of the 58 SCD patients studied had Cys16. Of these 56, 50 of them were also heterozygous for

245Val (VS). These 50 samples showed a weak “e” expression on RBCs with three monoclonal anti-e. We found a high incidence of Cys16 associated with the *RH ce* allele in our SCD cohort. Interestingly, we observed that a high percentage of these patients also carried VS in a heterozygous manner resulting in a weak expression of e antigen on RBCs.

In conclusion, genotyping for *RHD* and *RHCE* variants is useful for the management of SCD patients.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRE P & CARTRON JP . Molecular Biology of the Rh antigen . Blood 78: 551-563, 1991
- ARCE MA, THOMPSON ES, WAGNER FF, COYNER , FERDMAN KE & LUBLIN DM. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individual. Blood, 82:651-655, 1993
- AVENT ND, BUTCHER SK & LUI W. Localization of the C termini of the Rh (Rhesus) polypeptides to the cytoplasmatic face of the human erythrocyte membrane. Journal Biological Chemical, 267:15-134, 1992
- AVENT ND & REID ME. The Rh Blood group system: a review. Blood, 95:375-387, 2000
- BECKER EAM, FAAS BHW, SIMSER S, OVERBEEKER MAM & VAN RHERNEN DJ. The genetic basis of a new partial D antigen : D^{DBT} . British Journal of Haematology , 93: 720-727, 1996
- BENNETT PR, LE VAN KIM C & COLIN Y. Prenatal determination of RhD type by DNA amplification . N . Engl. J. Med, 329: 607-610, 1993
- BLUNT T, DANIELS G & CARRITT B. Serotype switching in a partially detected *RHD* gene. Vox Sanguinis, 67:397, 1994
- CARRITT, B.; BLUNT, T.; AVENT, N.; DANIELS, G.; STEERS, F. Rh null phenotypes are not due to a gross deletion and can occur on different Rh genetic background. Ann. Hum. Genet., 57: 273-279, 1993

- CARRITT, B.; STEERS, F.J.; AVENT, N.D. Prenatal determination of fetal RhD type. Lancet, 344:205-206, 1994
- CARRITT B, KEMP TJ & POULTER M. Evolution of the human Rh(Rhesus) blood group genes: A 50 year old prediction (partially) fulfilled. Human Molecular Genetic, 6:843-850, 1997
- CARTRON JP. Defining the blood group antigen: biochemistry and molecular genetics. Blood Reviews , 8: 199-211, 1994
- CARTRON, J.P.; AGRE, P. Rh blood groups and Rh-deficiency syndrome. Blood Cell Biochem., 6: 189-225, 1995
- CASTILHO L, RIOS M, BIANCO C, PELLEGRINO Jr J, ALBERTO FL, SAAD STO, COSTA FF. DNA-based typing of blood groups for the management of polytransfused sickle cell disease patients. Transfusion, *in press*
- CASTILHO L, RIOS M, VIOLATI RG, PELLEGRINO Jr J, COSTA FF. Prenatal determination of maternal plasma . Transfusion Clinique and Biologique, 8(S), 51S, 2001.
- CHERIF-ZAHAR B, BLOY C, LE VAN KIM C, BLANCHARD D, BAILLY P, HERMAND P, CARTRON JP & COLIN Y. Molecular cloning and proteins struture of a human blood group Rh polypeptide. Proc. Natl. Acad. Science USA, 87: 6243-6247, 1990

- CHERIF-ZAHAR B, MATTEI MG, LE VAN KIM C, BAILLY P & CARTRON JP.
Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region
1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. Human Genetics; 86:398-400, 1991
- CHERIF-ZAHAR B, LE VAN KIM C, ROUILLAC C, RAYNAL V, CARTRON JP
& COLIN Y. Organization of the gene (RHCE) encoding the human blood
group RhCcEe antigens and characterization of the promoter region. Genomics,
19: 68-74, 1993
- CHERIF-ZAHAR B, MATTEI MG & RAYNAL V. Rh-deficiency of the regulator
type caused by splicing mutation in the human RH50 gene. Blood, 92: 2535-2540,
1998
- COLIN Y, CHERIF-ZAHAR B, LE VAN KIM C, VAN HUFFEL R & CARTRON JP.
Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism
as determined by Southern analysis. Blood; 78:2747-52, 1991
- DANIELS G, GREEN C & SMART E. Differences between RhD-negative Africans
and RhD-negative Europeans. Lancet, 380:862-863, 1997
- DANIELS G, FAAS BHW, GREEN CA, SMART E, MAASKANT-VAN WIJK PA,
AVENT ND, ZONDERVAN H A, VON DEM BORNE AEGKR & VAN DER
SCHOOT CE. The VS and V blood group polymorphisms in Africans : a
serologic and molecular analysis. Transfusion, 38: 951-958, 1998
- DANIELS GL, ANSTEE DJ, CARTRON JP, DAHR W, FLETCHER A, GARRATTY
G, HENRY S, JORGENSEN J, JUDD WJ, KORNSTAD L, LEVENE C, LIN M,
LOMAS-FRANCIS C, LUBENKO A, MOULDS JJ, MOULDS JM,
OVERBEEKE M, REID ME, ROUGER P, SCOTT M, SISTONEN P, SMART
E, TANI Y, WENDEL S, ZELINSKI T. International Society of Blood

Transfusion working party on terminology for red cell surface antigens. Vox Sanguinis, 80:193-196, 2001

DE VETTEN MP & AGRE P .The Rh polypeptide is a major fatty acid acylated erythrocyte membrane protein. Journal Biological Chemical, 263: 18193-18196, 1998

FAAS BHW, SIMSEK S, BLEEKER PMM, OVERBEEKE MAM, CUIJERS HTHM, VON DEM BORNE AEGKR & SCHOOT CE. RhE/e genotyping by allele-specific primer amplification. Blood, 85: 829-832, 1995

FAAS BHW, BECKERS EAM, WILDOER P, LIGHTART PC, OVERBEEKE MAM, ZONDERVAN HA, VON DEM BORNE AEGKR, VAN DER SCHOOT CE. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. Transfusion; 37:38-44, 1997

FISHER RA, cited in RACE RR. An incomplete antibody in human serum. Nature, 153: 771-772, 1944

GAHMBERG, C. G. Molecular identification of the human Rh₀(D) antigen. FEBS Lett, 140: 93-97, 1982

GIBLETT ER. Blood group alloantibodies: an assessment of some laboratory practices. Transfusion, 4: 299-308, 1977

HEMKER MB, LIGHTART PC, BERGER L, VAN RHENEN DJ, VAN DER SCHOOT CE & MAASKANT-VAN WIJK PA. DAR, a new RhD variant involving exon 4,5 and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African Black. Blood, 94: 4337-4342, 1999

- HUANG CH, CHEN Y, REID ME & GHOSH S . Genetic recombination at the human RH locus: a family study of the red cell Evans phenotype reveals a transfer of exons 2-6 from the to the RHCE gene. American Journal Genetic ,59: 825-833, 1996.
- HUANG CH . Molecular insights into the Rh protein family and associated antigen. Current Opinion in Hematology,4: 94-103, 1997.
- HUANG CH, CHENG Y & REID ME. Human D^{IIIa} erythrocytes : RhD protein is associated with multiple dispersed amino acids variations. American Journal of Hematology, 55: 139-145, 1997
- HUANG, C-H.; CHENG, G.; REID, M.E.; CHEN, Y. Rh(mod) syndrome: a family study of the translation-initiator mutation in the Rh50 glycoprotein gene. Am.J.Hum.Genet., 64: 108-117, 1999.
- HUANG CH, PHILLIP Z & CHENG Y. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. Seminars in Hematology, 37: 150-165, 2000.
- HYLAND CA, WOLTER LC, SAUL Three unrelated RhD gene polymorphisms identified among blood donors with Rhesus Ccee (r'r') phenotypes. Blood; 84:321, 1994
- HYLAND CA, WOLTER LC & SAUL . Identification and analysis of RH genes: application of PCR and RFLP typing. Transfusion Medicine Reviews , 9: 289-301, 1995

- ISSIT PD. An invited review: The Rh antigen e , its variants, and some closely related serological observation . Immunohematology, 7: 29-36, 1991
- ISSITT PD. The Rh blood group system: additional complexities (editorial). Immunohematology 10:109-16, 1994
- ISSIT PD. Recent advances in the Rh blood group system. Vox Sanguinis ,70: 26-30, 1996
- KAJII E, UMENISHI F , IWAMOTO S & IKEMOTO S. Isolation of a new cDNA clone encoding an Rh polypeptide associated with the the Rh blood groups system. Human Genetic , 91:157-162, 1993
- LEGLER TJ, EBER SW, LAKOMER M, LYNEM R. MAAS JH, PEKRUM A, REPAS- HUMPE M, SCHROTER W & KOHLER M. Application of RHD and RHCE genotyping for correct blood group determination in chronically transfused patients. Transfusion, 39: 852-855, 1999
- LE VAN KIM C, MOURO I & CHERIF-ZAHAR B. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. Proc. Natl. Acad.Sci USA, 89: 925-929, 1992
- LE VAN KIM C, MOURO I , BROSSARD Y, CHAVINIE J, CARTRON JP & COLIN Y. PCR-based determination of Rhc and RhE status of fetuses at risk of Rhc and RhE haemolytic disease. British Journal Haematology, 88: 193-195, 1994

- LIGHTEN, A.D.; OVERTON, T.G.; SEPULVEDA, W.; WARWICK, R.M.; FISK, N.M.; BENNET, P.R. Accuracy of prenatal determination of RhD type status by polymerase chain reaction with amniotic cells. Am. J. Obstet. Gynecol., 175: 1182-1185, 1996
- LOMAS, C.; TIPPETT, P.; THOMPSON, K.M. et al. Demonstration of seven epitopes on the D antigen using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. Vox Sang., 57: 261-164, 1984
- MAASKANT-VAN WIJK PA, FAAS BH, DE RUIJTER JA, OVERBEEKE MA, VON DEM BORNE AE, VAN RHENEN DJ, VAN DER SCHOOT CE. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. Transfusion, 38:1015-1021 1998
- MOORE, S.; WOODROW, C.E.; McCLELLAND, D.B.L. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D), (c), (E) and Fy^a. Nature, 295: 529-531, 1982
- MOURO I, WOODROW CF & McCLELLAND DB. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D),(c),(E) and Fy. Nature, 295: 529-531, 1982
- MOURO I, COLIN Y & CHERIF-ZAHAR. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. Nature Genetic, 5: 62-65, 1992
- MOURO I, LE VAN KIM C & ROUILLAC C. Rearrangements of the blood group RhD gene associated with the D^{VI} category phenotype. Blood, 83: 1129-1135, 1994

- MOURO I, COLIN Y & GANE P. Molecular analysis of blood group Rh transcripts from a r^G r variant. British Journal Haematology, 93: 472-474 , 1996
- MÜLLER TH, WAGNER FF, TROCKENBACHER A, EICHER NI, FLEGEL W, SCHÖNITZER D, SCHUNTER F, GASSNER C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central Europeans populations. Transfusion, 41:45-52, 2001
- NASH R & SHOJANIA AM . Hematological aspect of Rh deficiency syndrome : a case report and a review of the literatura. Americam Journal Hematology, 24: 267-275, 1987
- NOIZAT- PIRENNE F, MOURO I, GANE P, OKUBO Y, HORI Y, ROUGER P, LE PENNER PY & CARTRON JP . A qualitative RhE variant encoded by a RhcE-D-Ce hybrid gene. Transfusion Clinique and Biologique, 3: 35s (PIC9), 1996
- NOIZAT-PIRENNE F, MOURO I, LE PENNEC PY, ANSART-PIRENNE H, JUSZAK G, PATEREAU C, VERDIER M, BABINET J,ROUSSEL M, ROUGER P & CARTRON JP. Two new alleles of the RHCE gene in Black individuals: the RHce allele ceMO and RHcE allele cEMI. British Journal of Haematology, 113: 672-679, 2000
- OKUDA H, KAWANO M, IWAMOTO S, TANAKA M, SENO T, OKUBO Y, KAJII E. The RHD gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. Journal Clinical Investigation; 100:373 ,1997
- PELLEGRINO Jr J. Biologia Molecular de grupos sanguíneos aplicada a medicina transfusional. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas . Faculdade de Ciências de Médicas, 2001

- PELLEGRINO Jr , CASTILHO L M, RIOS M & SOUZA CA. Blood group genotyping in a population of highly diverse ancestry. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 15: 8-13, 2001
- PETZ LD, SWISHER SN & KLEINMAN S. Blood groups . Clinical Practice in Transfusion Medicine, 3 ed, New York ,96-116, 1996
- PETZ LD & GARRATTY G. Acquired immune haemolytic anemias. New York: Churchill Livingstone, 1980
- POULTER M, KEMP T & CARRITT B. DNA-based Rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHD status using the polymerase chain reaction. Vox Sanguinis, 70: 164-168, 1996
- RACE RR. Modern concepts of the blood group system. Ann NY Acad. Scienc. 127: 884-891, 1965
- RACE RR & SANGER R. Blood groups in man . 6^{ed}, Oxford Scientific Publishers, 220-227, 1975
- REID ME, RIOS M & YAZDANBAKHS K. Application of molecular biology techniques to transfusion medicine . Seminars Hematology, 37: 166-176, 2000
- REID ME, RIOS M, POWELL D, CHARLES-PIERRE D & MALAVADE V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. Transfusion;40:48-53, 2000
- RIDGWELL K, SPURR NK, LAGUDA B, MACGOCH C, AVENT ND, TANNER MJA. Isolation of cDNA clone for a 50kd glycoprotein of the human erythrocyte

membrane associated with Rh (Rhesus) blood group antigen expression .

Biochemical Journal 287: 223-226, 1992

RIDGWELL K, EYERS SA, MAWBY WJ, ANSTEE DJ & TANNER MJ. Studies on the glycoprotein associated with Rh (Rhesus) blood group antigen expression in the human red blood cell membrane . Journal Biological Chemical 269: 6410-6416, 1994

RIOS M, CASH K, STRUPP A, UEHLINGER J & REID ME. DNA from urine sediment or buccal cells can be used for blood group molecular genotyping. Immunohematology 15: 61-65, 1999

ROUILLAC C, COLIN Y, HUGHES-JONES NC, BOELET MD, AMBROSIO AM, CARTRON JP & LE VAN KIM C. Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid RhD-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. Blood 85: 2937-2944, 1995

ROUILLAC C, GANE P, CARTRON JP, LE PENNEC PY & COLIN Y. Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D and RhC/e in phenotype. Blood 87: 4853-4861, 1996

ROZMAN P, DOVAN T & GASSNER C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL JK and FY blood groups genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusion . Transfusion 40: 936-942, 2000

SINGLETON BK, GREEN CA, AVENT ND, MARTIN PG, SMART E, DAKA A, NARTER-OLAGA EG, HAWTHORNE LM, DANIELS G. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation

in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. Blood, 95:12-18, 2000

SIMSEK S, JONG CAM, CUIJPERS HTM, BLEEKER PMMM, WESTERS TM, OVERBEEKER MAM, GOLDSCHIMEDING R, VAN DER SCHOOT & VON DEM BORNE AEG. Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNA coding for Rh polypeptides demonstration of E/e and C/c polymorphism. Vox Sanguinis, 67: 203-209, 1994

TIPPETT P, LOMAS-FRANCIS C & WALLACE M. The Rh antigen D: partial D antigen and associated low incidence antigen . Vox Sanguinis, 70: 123-131, 1996

WAGNER FF, GASSNER C, SMULLER TH, SCHONITZER D, SCHUNTER F & FLEGEL WA. Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct Immunohematological feature . Blood, 91: 2157-2168, 1998

WAGNER FF, GASSNER C, SMULLER TH, SCHONITZER D, SCHUNTER F & FLEGEL WA. Molecular of weak D phenotypes . Blood, 93: 385-393, 1999

WAGNER FF & FLEGEL WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. Blood, 95: 3662-3668, 2000

WESTHOFF CM, SILBERSTEIN LE, WYLIE DE, SKAVDAHL M & REID ME . 16 Cys encoded by the RHce gene is associated with altered expression of the e antigen is frequent in the Ro haplotype. British Journal of Haematology, 113: 666-671, 2001

WOLTER LC, HYLAND CA & SAUL A . Refining the DNA polymorphism that associate with the Rhesus c phenotype. Blood, 84: 985-986, 1994

9. APÊNDICE

Tabela 11: Resultados de fenotipagem e genotipagem para os antígenos do sistema Rh em amostras de sangue e DNA de 250 doadores voluntários de sangue.

No	Doador	Doação	Iniciais	Raça	Rh	G-RHD	G-RHCE
1	074359-008	0298.139-007	AG	C	rr	Neg	RHccee
2	062521-007	0298.142-039	JF	C	R2r	D	RHccEe
3	029908-011	0298.145-002	SS	C	R1R1	D	RHCcEe
4	162040-008	0298.160-037	RDFS	C	rr	Neg	RHccee
5	114781-011	0298.161-003	CLA	C	R1r	D	RHCcEe
6	024257-017	0298.163-009	SRR	M	Ror	D	RHccee
7	072438-005	0298.170-026	GAL	C	R1r	D	RHCcEe
8	088189-005	0298.176-033	ERS	C	R1r	D	RHCcEe
9	197519-003	0298.117-013	AFS	C	R1r	D	RHCcEe
10	159532-012	0298.180-002	LQC	C	rr	Neg	RHccee
11	016376-006	0298.184-007	ONO	C	R1R1	D	RHCcEe
12	202669-003	0298.188-026	CAF	C	R1r	D	RHCcEe
13	089169-021	0298.189-008	JAP	DA	Ror	D	RHccee
14	042373-010	0298.194-007	ECA	C	Ror	D	RHccee
15	167260-005	0298.194-024	CG	C	R1R1	D	RhCcEe
16	022818-006	0298.196-003	FTN	C	Ror	D	RHccee
17	130432-013	0298.198-007	LBA	C	R1r	D	RHCcEe
18	097840-005	0298.204-022	CRG	C	R1R2	D	RHccee
19	190943-005	0298.208-001	UAP	C	R1r	D	RHCcEe
20	171143-004	0298.215-010	AAS	C	R1R1	D	RHCcEe
21	048234-012	0298.222-014	OS	C	rr	Neg	RHccee
22	171583-010	0298.223-020	EFG	C	R1r	D	RHCcEe
23	044678-009	0298.224-026	CHG	C	R2r	D	RHccEe
24	058969-006	0298.225-012	JSC	DA	R1R1	D	RHCcEe
25	051171-006	0298.231-018	JD	C	R1r	D	RHCcEe
26	028083-007	0298.233-005	CRR	C	R2r	D	RHccEe
27	163625-010	0298.238-035	GPC	DA	Ror	D	RHccee
28	115150-006	0298.239-005	AADS	C	R1r	D	RHCcEe
29	137407-004	0298.244-013	PCAA	DA	Ror	D	RHccee
30	157884-007	0298.245-019	JBR	C	R1r	D	RHCcEe
31	031556-018	0298.246-005	PNOS	C	rr	Neg	RHccee
32	141087-007	0298.252-008	ASB	C	R2r	D	RHccEe
33	017658-017	0298.261-003	AN	C	R1r	D	RHCcEe
34	196856-005	0298.266-001	NVB	C	R1r	D	RHCcEe
35	20071-003	0298.268-029	JPR	C	rr	Neg	RHccee
36	57371-004	0298.268-033	CA	C	R1r	D	RHCcEe
37	171387-003	0298.271-008	SAS	M	R1r	D	RHCcEe
38	184234-010	0298.271-011	ECS	M	rr	Neg	RHccee
39	29776-012	0298.273-015	JLT	C	rr	Neg	RHccee
40	163480-004	0298.279-005	RN	C	rr	Neg	RHccee
41	160092-007	0398.166-051	AAS	DA	R2Rz	D	RHCcEe
42	242204-001	0197.297-018	ACA	C	R1R2	D	RHCcEe

Tabela 11: Resultados de fenotipagem e genotipagem para os antígenos do sistema Rh em amostras de sangue e DNA de 250 doadores voluntários de sangue (cont.)

No	Doador	Doação	Iniciais	Raça	Rh	G-RHD	G-RHCE
43	37173-012	0398.166-023	JCCP	C	R1R2	D	RHCcEe
44	38400-011	0398.315-046	SFS	M	R1R1	D	RHCcEe
45	149057-007	0398.166-031	CCOG	C	Ror	D	RHccee
46	179914-011	0398.259-54	LCI	M	R2R2	D	RHccEE
47			PSF	C	R1R2	D	RHCcEe
48	48212-011	0398161-021	AFC	C	Ror	D	RHccee
49	190238-006	0398.265-034	LAT	M	R2r	D	RHccEe
50	127891-007	0398.166-007	CBA	C	Ror	D	RHccee
51	131118-014	0398.170-051	ODG	C	R1r	D	RHCcee
52	166775-000	0398.174-016	COS	C	R1R2	D	RHCcEe
53	166489-006	0398.169-017	RA	C	R1R2	D	RHCcEe
54	4384-014	0398.168-031	AEFS	DA	Ror	D	RHccee
55	145327-017	0398.168-006	ACC	C	R1R1	D	RHCcEe
56	164589-008	0398174-023	CACU	C	R1r	D	RHCcee
57	143328-006	0398.173-012	EGG	C	R1R1	D	RHCcEe
58	132060-013	0398.230-001	CA	C	R1R2	D	RHCcEe
59	055349-000	0398.239-017	AC	C	R1r	D	RHCcee
60	009559-014	0398.212-051	JCC	C	rr	Neg	RHccee
61			JAS	C	R1r	D	RHCcee
62	073272-007	0398-237-049	AFL	C	rr	Neg	RHccee
63	253902-003	0398.196-003	APBS	C	R2R2	D	RHccEE
64	186211-003	0398184-032	SAPC	C	R2r	D	RHccEe
65	61397-011	0398.184-032	AFO	C	R1R1	D	RHCcEe
66	215800-000	0398.222-042	ACSB	C	R1R1	D	RHCcEe
67			DSS	C	rr	Neg	RHccee
68	61445-007	0398.194-039	AFS	C	rr	Neg	RHccee
69	012749-028	0398.302-022	RTS	C	R1R1	D	RHCcEe
70	164212-007	0398.212-040	PGO	C	R1R1	D	RHCcEe
71	80730-020	0398.329-014	ADB	C	rr	Neg	RHccee
72	99925-007	0398.202-016	AVA	DA	Ror	D	RHccee
73	62617-008	0398.189-054	JJA	C	Ror	D	RHccee
74	216786-004	0398.198-019	AA	C	rr	Neg	RHccee
75	83869-000	0398.212-055	AIQ	DA	rr	Neg	RHccee
76	84946-008	0398.314-065	ER	C	R1R1	D	RHCcEe
77	042163-000	0398.205-005	JRC	DA	Ror	D	RHccee
78	24103-014	0398.329-018	AAA	C	R1r	D	RHCcee
79	002132-023	0398.232-002	RBA	C	R1r	D	RHCcee
80			GAV	C	Ror	D	RHccee
81	85802-006	0398.261-028	RCS	DA	R1r	D	RHCcee
82	85023-031	0398.267-006	CGS	C	R1r	D	RHCcee
83	154134-011	0398.825-004	JCU	C	rr	Neg	RHccee

Tabela 11: Resultados de fenotipagem e genotipagem para os antígenos do sistema Rh em amostras de sangue e DNA de 250 doadores voluntários de sangue (cont.)

No	Doador	Doação	Iniciais	Raça	Rh	G-RHD	G-RHCE
84	146555-015	0398.278-013	AJA	C	R1r	D	RHCcee
85	102959-021	0398.278-013	PHC	DA	R1r	D	RHCcee
86	42925-008	0398.299-005	CAN	DA	r"r	Neg	RHCcee
87	157239-000	0398.251-009	JAB	C	R2R2	D	RHccEE
88			SRS	C	R2R2	D	RHccEE
89	199140-006	0398.261-042	JSA	C	R1r	D	RHCcee
90	6698-014	0398.273-037	GBA	DA	R0r	D	RHccee
91	23628-019	0398.281-017	LCV	C	r'r	Neg	RHCcee
92	204374-000	0398.299-004	PGS	C	R1R1	D	RHCcee
93	2235-018	0398.257-040	EJA	DA	Ror	D	RHccee
94	192214-007	0398.252-014	LBC	DA	R0r	D	RHccee
95			JCA	C	R1r	D	RHCcee
96	216524-006	0398.295-009	ERP	C	rr	Neg	RHccee
97	83850-009	0398.273-029	JFA	C	R1r	D	RHCcee
98	030355-000	0398.244-013	AS	C	r'r	Neg	RHCcee
99	84692-006	0398.268-027	CA	DA	R2r	D	RHccEe
100	75631-011	0398.295-027	ERT	C	R1r	D	RHCcee
101	136011-005	299204-014	RAS	C	R0r	D	RHccee
102	42495-006	299218-009	PDZ	C	R0r	D	RHccee
103	138492-007	299215-037	JAPL	C	R0r	D	RHccee
104	92771007	298331-001	VA	C	rr	Neg	RHccee
105	111405004	298328-006	SF	C	R1r	D	RHCcee
106	152656007	298327-018	JCR	C	R0r	D	RHccee
107	144280010	298323-014	APS	C	rr	Neg	RHccee
108	166514003	298316-015	AAP	C	R1R1	D	RHCcee
109	39498006	298230-020	ROO	C	R0r	D	RHccee
110	44678010	298315-043	CHG	C	R0r	D	RHccee
111	115250003	298315-008	ARN	C	rr	Neg	RHccee
112	29908012	298303-043	SS	C	R0r	D	RHccee
113	67304014	298315-011	JSP	C	R1r	D	RHCcee
114	114781012	298299-028	CLA	C	R1r	D	RHCcee
115	134077044	298345-006	JSP	C	R0r	D	RHccee
116	177974003	398314-036	IAS	C	R1R2	D	RHCcEe
117	229842005	398324-036	NGD	C	r'r	Neg	RHCcee
118	52648018	398324-038	VCN	C	R0r	D	RHccee
119	74700020	398303-032	EPS	C	R1r	D	RHCcee
120	86078005	398334-058	JCG	C	R1R1	D	RHCcee
121	166377006	398301-030	AFA	C	R0r	D	RHccee
122	153660010	398330-020	JCS	C	R1r	D	RHCcee
123	38400011	398315-046	SFS	C	R1R1	D	RHCcee
124	225019004	398307-036	SAAO	C	rr	Neg	RHccee
125	79786007	398314-034	AAL	DA	R0r	D	RHccee

Tabela 11: Resultados de fenotipagem e genotipagem para os antígenos do sistema Rh em amostras de sangue e DNA de 250 doadores voluntários de sangue (cont.)

No	Doador	Doação	Iniciais	Raça	Rh	G-RHD	G-RHCE
126	38590008	398323-035	CSS	C	rr	Neg	RHccee
127	138533000	398323-038	LCS	C	R1R1	D	RHCcEe
128	121183018	398330017	AAS	C	rr	Neg	RHccee
129	113372007	398322-009	APF	C	R0r	D	RHccee
130	151686-005	298219-005	OR	C	R0r	D	RHccee
131	150102-003	298211-010	AHP	C	R0r	D	RHccee
132	118083-008	298223-021	AAO	C	R0r	D	RHccee
133	150526005	298351-003	RFS	C	R0r	D	RHccee
134	172827011	298348-005	ARS	C	rr	Neg	RHccee
135	43598002	199189-014	JAS	C	R1R2	D	RHCcEe
136	23847002	199190-004	CS	C	R0r	D	RHccee
137	91819008	199191-033	DASJ	C	R1r	D	RHCcEe
138	285384	199193-037	AO	DA	R0r	D	RHccee
139	9987004	199194-009	CRS	C	rr	Neg	RHccee
140	281053002	199198-027	TTL	C	R0r	D	RHccee
141	286155002	199198-029	AH	C	R0r	D	RHccee
142	54440003	199200-038	GBF	C	R1R1	D	RHCcEe
143	258414002	199201-018	JCBP	C	R0r	D	RHccee
144	284038002	199205-030	RA	C	R0r	D	RHccee
145	72613002	199206-023	IRC	C	R1r	D	RHCcEe
146	17276002	199208-043	ASA	C	R1r	D	RHCcEe
147	199380003	199210-006	ARG	C	R0r	D	RHccee
148	258575002	199213-016	JOG	C	R1r	D	RHCcEe
149	194715003	199214-028	AFAB	DA	R0r	D	RHccee
150	138464003	298233-024	ICG	C	R0r	D	RHccee
151	108822015	298226-036	JS	C	R1R2	D	RHCcEe
152	132763007	298198-004	DAO	C	R1r	D	RHCcEe
153	51343008	298217-002	CAA	C	R2r	D	RHccEe
154	107553008	298195-011	AAA	C	R0r	D	RHccee
155	185077004	298191-015	HP	C	R1R1	D	RHCcEe
156	177221003	298197008	ISF	C	R0r	D	RHccee
157	134077003	298231-001	JS	C	R1R2	D	RHCcEe
158	186817006	298231-021	CS	C	R0r	D	RHccee
159	47989-010	298208-021	APS	DA	R0r	D	RHccee
160	40947005	298208-022	JCD	C	rr	Neg	RHccee
161	3523011	298230-033	JGT	C	R0r	D	RHccee
162	159096003	299189-025	ANOF	C	rr	Neg	RHccee
163	148358004	299181-032	RJR	C	rr	Neg	RHccee
164	31775008	299189-031	AAL	C	R1r	D	RHCcEe
165	69071007	299188-031	VAS	C	R1r	D	RHCcEe
166	37173016	299174-028	JCCP	C	R0r	D	RHccee
167	31556021	299172-019	PNOS	C	rr	Neg	RHccee

Tabela 11: Resultados de fenotipagem e genotipagem para os antígenos do sistema Rh em amostras de sangue e DNA de 250 doadores voluntários de sangue (cont.)

No	Doador	Doação	Iniciais	Raça	Rh	G-RHD	G-RHCE
168	98279006	299183-025	JFA	C	R1R2	D	RHCcEe
169	147405009	299189-032	AVOAS	C	rr	Neg	RHccee
170	178567005	299176-012	SC	C	R1r	D	RHCcee
171	164526003	299173-022	JOA	C	R1R2	D	RHCcEe
172	285592002	299193-013	UT	C	R0r	D	RHccee
173	84300011	299188-019	JAAC	DA	R0r	D	RHccee
174	121632005	299181-035	LSS	C	R0r	D	RHccee
175	124240004	299181-034	JRLD	C	rr	Neg	RHccee
176	125043009	299168-023	HAS	C	R1R2	D	RHCcEe
177	169756003	299172-015	RS	C	R1r	D	RHCcee
178	251186004	299183-004	JCG	C	rr	Neg	RHccee
179	87536006	299188-010	GJA	C	R0r	D	RHccee
180	150646008	299186-021	ANO	C	R0r	D	RHccee
181	95910007	299189-027	VFO	C	R1r	D	RHCcee
182	164096005	299179-011	CBR	DA	R0r	D	RHccee
183	156567003	299169-065	PCA	C	R0r	D	RHccee
184	80572-006	298218-026	SOS	C	R0r	D	RHccee
185	36140-015	298215-017	APSF	C	R0r	D	RHccee
186	71711-006	298212-009	LSB	C	R0r	D	RHccee
187	57545008	299196-017	JBG	C	R1r	D	RHCcee
188	157884009	299180-006	JBR	A	R0r	D	RHccee
189	37574004	299183-001	AF	C	R0r	D	RHccee
190	196923004	299174-038	DFS	C	R1r	D	RHCcee
191	92787012	299176-011	DAO	C	R1r	D	RHCcee
192	75281010	299182-021	AGO	C	R2R2	D	RHccEE
193	203937002	299169-015	EEK	A	R0r	D	RHccee
194	173567011	299167-024	AV	A	R0r	D	RHccee
195	228075004	299197-029	OG	C	rr	Neg	RHccee
196	255118005	299197-005	JCV	A	rr	Neg	RHccee
197	154834009	299200-026	TCA	C	R1r	D	RHCcee
198	219437007	299202-022	FPS	DA	R0r	D	RHccee
199	206787-006	299176-016	HIB	DA	R0r	D	RHccee
200	181792-005	299193-003	CA	DA	R0r	D	RHccee
201	125043-009	299168-023	HAS	DA	R0r	D	RHccee
202	50032-007	299187-009	AVSF	DA	R0r	D	RHccee
203	255193-004	299169-062	LB	DA	R0r	D	RHccee
204	1741009	299209-026	AGX	C	R0r	D	RHccee
205	39296016	299218-011	GUS	C	R1r	D	RHccee
206	46898010	299221-002	HAON	A	R0r	D	RHccee
207	62520002	299221-036	CO	C	R1r	D	RHCcee
208	410011	299209-001	ASC	A	R0r	D	RHccee
209	148184006	299209-002	ZJNF	C	rr	Neg	RHccee

Tabela 11: Resultados de fenotipagem e genotipagem para os antígenos do sistema Rh em amostras de sangue e DNA de 250 doadores voluntários de sangue (cont.)

No	Doador	Doação	Iniciais	Raça	Rh	G-RHD	G-RHCE
210	200003012	299210-014	AJL	C	R1r	D	RHCcee
211	60951009	299211-001	RC	C	R1R1	D	RHCcee
212	211738003	299211-016	JOSA	DA	R0r	D	RHccee
213	182094006	299211-034	SSP	DA	R0r	D	RHccee
214	104116005	299217-041	ALG	C	R1r	D	RHCcee
215	177111003	299218-033	VL	A	R2r	D	RHccEe
216	174702003	299221-004	JAS	A	R0r	D	RHccee
217	168438015	299221-040	JVAA	C	R1r	D	RHCcee
218	102966004	299215-003	AS	C	R0r	D	RHccee
219	80572008	299216-010	SOS	C	rr	Neg	RHccee
220	55659005	299216-024	RT	DA	R0r	D	RHccee
221	181829006	299217-001	JCS	C	R0r	D	RHccee
222	9849010	299217-008	JCA	C	R1r	D	RHCcee
223	25523006	299217-017	LPR	DA	R0r	D	RHccee
224	47055006	299222-003	ACNJ	DA	R0r	D	RHccee
225	3153020	299222-021	JBA	C	R1r	D	RHCcee
226	233448006	299222-014	RAS	C	R0r	D	RHccee
227	254727-002	299189-036	RAS	DA	R0r	D	RHccee
228	45518008	299201-034	DAC	A	rr	Neg	RHccee
229	74486012	299203-003	AAA	C	R1r	D	RHCcee
230	19502013	299204-017	AAS	C	R1r	D	RHCcee
231	91316010	299207-001	LCF	DA	R0r	D	RHccee
232	159283008	299208-008	CJP	C	R1r	D	RHCcee
233	255461-005	299183-005	AAS	DA	R0r	D	RHccee
234	131929-007	299183-058	RAA	C	R0r	D	RHccee
235	69012-012	299196-013	NSJ	C	R0r	D	RHccee
236	41886-014	299173-021	JCF	C	R0r	D	RHccee
237	228075-004	299197-029	OG	C	R0r	D	RHccee
238	31556019	298343-017	PNOS	C	rr	Neg	RHccee
239	74300009	298293-027	RRS	C	R0r	D	RHccee
240	74486011	298337-006	AAA	C	R1r	D	RHCcee
241	170970-011	299221-046	CCV	C	R0r	D	RHccee
242	67182-007	298218-022	VDSF	C	R0r	D	RHccee
243	154792004	299182-005	FB	C	R1r	D	RHCcee
244	44678012	299172-026	CHG	C	R1r	D	RHCcee
245	157990007	299172-034	CLP	C	R0r	D	RHccee
246	158862-002	29812-002	AAC	C	R0r	D	RHccee
247	235839004	398316-030	RAL	C	R1R1	D	RHCcee
248	223888005	398310-042	OG	C	R1R1	D	RHCcee
249	15411016	298356-002	LCL	C	R1r	D	RHCcee
250	92784-008	298191-002	LA	C	R0r	D	RHccee

Tabela 12: Resultados da caracterização molecular das variantes *RHD* em 131 amostras de DNA de pacientes falciformes

Pacientes				Genotipagem
n°	Identificação DNA	Iniciais	HC	<i>RHD</i>
1	1-A	EBS	263735-4	D normal
2	2-A	RS	263737-2	<i>RHD</i> ψ
3	3-A	RS	263736-8	DAR
4	4-A	LA		DAR
5	5-A	DC	272777-3	D normal
6	6-A	FSM	229393-2	D normal
7	8-A	MIFS	191149-0	DAR
8	9-A	SAPF	096016-3	D normal
9	13-A	DPC	060474-3	D normal
10	14-A	SSE	219727-9	D normal
11	15-A	CRD	279214-0	D ^{IIIa} / DAR
12	16-A	MFFS	043689-5	D normal
13	17-A	LMS	089038-4	D normal
14	18-A	FSA	147114-7	D normal
15	19-A	AAN	119607-4	D ^{Va}
16	20-A	MÊS	019983-7	D ^{Va}
17	21-A	TDS	284037-3	D ^{Va}
18	22-A	JEC	083256-6	D normal
19	24-A	DL	006053-9	D normal
20	25-A	MCA	027003-7	D normal
21	26-A	ZBSS	322542-5	D normal
22	27-A	MAG	253771-0	<i>RHD</i> ψ
23	30-A	MFD	486925-6	D normal
24	32-A	CBS	624657-7	<i>RHD-CE-D^s</i>
25	33-A	CSA	323891-1	D normal
26	34-A	COS	021338-8	D normal
27	36-A	MISA	236179-1	<i>RHD</i> ψ
28	37-A	RS	037625-9	D normal
29	38-A	EJS	028618-5	D ^{Va}
30	40-A	ESA	279518-4	D normal
31	41-A	JDJ	340362-5	<i>RHD</i> ψ
32	42-A	MLS	422698-9	D normal
33	43-A	LGV		D ^{IIIa} / DAR

**Tabela 12: Resultados da caracterização molecular das variantes
RHD em 131 amostras de DNA de pacientes falciformes (cont.)**

Pacientes				Genotipagem <i>RHD</i>
n°	Identificação DNA	Iniciais	HC	
34	45-A	JCC	263446-5	D normal
35	49-A	JQ	163410-7	D normal
36	50-A	MHVS	346670-2	D normal
37	51-A	MLS	373542-2	<i>RHD</i> ψ
38	53-A	FJLP	571819-1	D normal
39	54-A	IMS	163828-8	D normal
40	55-A	SPG	194262-9	D normal
41	56-A	AMLO	121637-1	D normal
42	57-A	AVS	381447-0	<i>RHD</i> ψ
43	58-A	RRS	398654-2	D normal
44	59-A	JPA	358850-6	D normal
45	60-A	AS	372321-9	D ^{IIIa} / DAR
46	61-A	JPS	404282-4	D normal
47	62-A	EBL	399387-8	D negativo
48	63-A	CCS	400764-4	D normal
49	64-A	JCS	197741-6	D normal
50	65-A	MAO	319936-1	DAR
51	67-A	MCG	407632-4	D normal
52	68-A	MNJ	597364-0	<i>RHD</i> ψ
53	69-A	SBC	162351-3	D normal
54	70-A	APS	112867-7	D normal
55	71-A	AFS	385165-2	D normal
56	72-A	VB	454897-5	D normal
57	73-A	RSL	465706-5	<i>RHD</i> ψ
58	74-A	ISA	443325-7	D normal
59	75-A	MAM	045228-1	D normal
60	76-A	AMJ	286435-5	D normal
61	77-A	RCC	417591-5	D normal
62	78-A	ISJ	480772-5	D ^{IIIa} / DAR
63	79-A	MSC	350261-3	D normal
64	80-A	MJS	478565-8	<i>RHD</i> ψ
65	81-A	CBS	248772-1	D normal
66	82-A	CAM	488993-7	D normal

Tabela 12: Resultados da caracterização molecular das variantes *RHD* em 131 amostras de DNA de pacientes falciformes (cont.)

Pacientes				Genotipagem <i>RHD</i>
n°	Identificação DNA	Iniciais	HC	
67	83-A	DS	521614-5	<i>RHD</i> ψ
68	84-A	MS	540010-2	D normal
69	85-A	AAM	337078-7	D normal
70	86-A	EBM	250078-5	D normal
71	87-A	VLPP	522125-5	D normal
72	88-A	AA	393701-6	<i>RHD</i> ψ
73	89-A	CLS	255483-9	D normal
74	90-A	VLSO	540927-9	D normal
75	91-A	SAM	676178-5	D normal
76	92-A	GNBS	545602-6	D normal
77	93-A	MP	209830-4	<i>RHD</i> ψ
78	94-A	RRV	378886-1	D normal
79	95-A	MHNM	540315-0	D normal
80	97-A	AAP	595659-9	D normal
81	98-A	SAA	449770-8	D normal
82	99-A	JS	631290-2	D normal
83	100-A	JVS	562133-0	D normal
84	101-A	WICS	603040-5	D normal
85	102-A	RAN	318867-5	D normal
86	103-A	MJF	564999-6	<i>RHD-CE-D^s</i>
87	104-A	LHV	186158-8	D normal
88	105-A	WS	268581-6	D ^{IIIa}
89	106-A	IJS	584924-7	D normal
90	107-A	SSP	575037-0	<i>RHD</i> ψ
91	108-A	RCO	568787-9	D ^{IIIa} / DAR
92	109-A	JPS	124287-3	D normal
93	110-A	JAC	526725-5	D normal
94	111-A	MPA	519518-3	D ^{IIIa} / DAR
95	112-A	AFS	634846-8	D normal
96	113-A	DPA	651703-5	D normal
97	114-A	ZES	463706-5	D normal
98	115-A	GCSA	355826-4	D ^{IIIa} / DAR
99	116-A	EMSS	573901-0	D normal

Tabela 12: Resultados da caracterização molecular das variantes *RHD* em 131 amostras de DNA de pacientes falciformes (cont.)

Pacientes				Genotipagem <i>RHD</i>
n°	Identificação DNA	Iniciais	HC	
100	118-A	EJS	649427-1	<i>RHD</i> ψ
101	119-A	ZTF	674758-7	D normal
102	120-A	APS	585175-5	D normal
103	121-A	JMS	677963-5	<i>RHD</i> ψ
104	122-A	GBS	694288-8	D normal
105	123-A	MK	690357-7	D normal
106	124-A	HFS		D normal
107	125-A	JFF	689512-4	D ^{IIIa}
108	126-A	VAMN	694044-0	D normal
109	127-A	ASC	702286-3	D ^{IIIa}
110	128-A	ARP	676388-2	D ^{IIIa} / DAR
111	129-A	JPM	702666-7	D ^{IIIa} / DAR
112	130-A	LFBC	337983-6	D normal
113	131-A	GDBC	702214-0	D normal
114	132-A	FEN	475798-6	<i>RHD</i> ψ
115	133-A	JCFM	619600-1	D ^{IIIa} / DAR
116	134-A	DPSS	716287-3	D normal
117	135-A	TMNS	619384-9	<i>RHD</i> ψ
118	136-A	CAO	723422-2	D normal
119	137-A	DRS	711457-2	D negativo
120	138-A	DAS	725132-3	D normal
121	139-A	AIS	709106-6	D normal
122	140-A	AS	722985-9	D ^{IIIa} / DAR
123	141-A	PRR	649701-5	D normal
124	142-A	JCRP	125458-1	<i>RHD</i> ψ
125	143-A	AA	739217-5	D normal
126	144-A	MNS	542139-8	D normal
127	145-A	CJO	520947-3	D ^{IIIa} / DAR
128	146-A	APSB	736067-7	D normal
129	147-A	JMS	718112-6	D negativo
130	148-A	JDB	749083-0	D ^{IIIa} / DAR
131	149-A	MTNS	657519-4	D ^{IIIa} / DAR

Tabela 13: Resultados da determinação das variantes associadas ao antígeno R_he em 58 amostras de DNA de pacientes falciformes com o alelo *RH ce*

Pacientes				Fenotipagem	Genotipagem	
n°	Identificação DNA	Iniciais	HC		Mutação 733G (VS)	Mutação 48C (Cys16)
1	15-A	CRD	279214-0	R0r VS+	Presente	Presente
2	21-A	TDS	284037-3	R0 r VS-	Ausente	Ausente
3	90-A	VLSO	540927-9	R0 r VS-	Ausente	Ausente
4	91-A	SAM	676178-5	R0 r VS+	Presente	Presente
5	92-A	GNBS	545602-6	r r VS+	Presente	Presente
6	93-A	MP	209830-4	R0 r VS+	Presente	Presente
7	97-A	AAP	595659-9	R0 r VS+	Presente	Presente
8	98-A	SAA	449770-8	R0 r VS+	Presente	Presente
9	99-A	JS	631290-2	R0 r VS+	Presente	Presente
10	100-A	JVS	562133-0	R0 r VS+	Presente	Presente
11	101-A	WICS	603040-5	R0 r VS+	Presente	Presente
12	102-A	RAN	318867-5	R0 r VS-	Ausente	Ausente
13	103-A	MJF	564999-6	R0 r VS-	Ausente	Presente
14	104-A	LHV	186158-8	R0 r VS+	Presente	Presente
15	105-A	WS	268581-6	R0 r VS+	Presente	Presente
16	106-A	IJS	584924-7	R0 r VS+	Presente	Presente
17	107-A	SSP	575037-0	R0 r VS-	Ausente	Presente
18	108-A	RCO	568787-9	R0 r VS+	Presente	Presente
19	109-A	JSP	124287-3	R0 r VS+	Presente	Presente
20	110-A	JAC	526725-5	R0 r VS+	Presente	Presente
21	111-A	MPA	519518-3	R0 r VS+	Presente	Presente
22	112-A	AFS	634846-8	R0 r VS+	Presente	Presente
23	113-A	DPA	651703-5	R0 r VS+	Presente	Presente
24	114-A	ZES	463706-5	R0 r VS+	Presente	Presente
25	115-A	GCSA	355826-4	R0 r VS-	Ausente	Presente
26	116-A	EMSS	573901-0	R0 r VS-	Ausente	Presente
27	118-A	EJS	649427-1	R0 r VS-	Ausente	Presente
28	119-A	ZTF	674758-7	R0 r VS-	Ausente	Presente
29	120-A	APS	585175-5	R0 r VS+	Presente	Presente

Tabela 13: Resultados da determinação das variantes associadas ao antígeno Rhe em 58 amostras de DNA de pacientes falciformes com o alelo *RH ce* (cont.)

Pacientes				Fenotipagem	Genotipagem	
n°	Identificação DNA	Iniciais	HC		Mutação 733G (VS)	Mutação 48C (Cys16)
30	121-A	JMS	677963-5	R0 r VS+	Presente	Presente
31	122-A	GBS	694288-8	R0 r VS+	Presente	Presente
32	123-A	MK	690357-7	R0 r VS+	Presente	Presente
33	124-A	HFS		R0 r VS+	Presente	Presente
34	125-A	JFF	689512-4	R0 r VS+	Presente	Presente
35	126-A	VAMN	694044-0	R0 r VS+	Presente	Presente
36	127-A	ASC	702286-3	R0 r VS+	Presente	Presente
37	128-A	ARP	676388-2	R0 r VS+	Presente	Presente
38	129-A	JPM	702666-7	R0 r VS+	Presente	Presente
39	130-A	LFBC	337983-6	R0 r VS+	Presente	Presente
40	131-A	GDBC	702214-0	R0 r VS+	Presente	Presente
41	132-A	FEN	475798-6	R0 r VS+	Presente	Presente
42	133-A	JCFM	619600-1	R0 r VS+	Presente	Presente
43	134-A	DPSS	716287-3	R0 r VS+	Presente	Presente
44	135-A	TMNS	619384-9	R0 r VS+	Presente	Presente
45	136-A	CAO	723422-2	R0 r VS+	Presente	Presente
46	137-A	DRS	711457-2	r r VS+	Presente	Presente
47	138-A	DAS	725132-3	R0 r VS+	Presente	Presente
48	139-A	AIS	709106-6	R0 r VS+	Presente	Presente
49	140-A	AS	722985-9	R0 r VS+	Presente	Presente
50	141-A	PRR	649701-5	R0 r VS+	Presente	Presente
51	142-A	JCRP	125458-1	R0 r VS+	Presente	Presente
52	143-A	AA	739217-5	R0 r VS+	Presente	Presente
53	144-A	MNS	542139-8	R0 r VS+	Presente	Presente
54	145-A	CJO	520947-3	R0 r VS+	Presente	Presente
55	146-A	APSB	736067-7	R0 r VS+	Presente	Presente
56	147-A	JMS	718112-6	r r VS+	Presente	Presente
57	148-A	JDB	749083-0	R0 r VS+	Presente	Presente
58	149-A	MTNS	657519-4	R0 r VS+	Presente	Presente