Fabio Augusto Abreu de Almeida

**Estratégias de busca de genótipos variantes do gene *RHCE*
em doadores de sangue afrodescendentes**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical
de São Paulo da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientadora: Dr^a. Carla Luana Dinardo

**São Paulo
2019**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Fabio Augusto Abreu de

Estratégias de busca de genótipos variantes do gene RHCE em doadores de sangue afrodescendentes / Fabio Augusto Abreu de Almeida. – São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Carla Luana Dinardo

Descritores: 1. GRUPOS SANGUÍNEOS. 2. BIOLOGIA MOLECULAR. 3. POLIMORFISMO. 4. GENÉTICA. 5. DOADORES DE SANGUE. 6. AFRODESCENDENTES.

USP/IMTSP/BIB-14/2019.

Este trabalho é dedicado:

Primeiramente a **Deus**, que foi um verdadeiro guia nessa jornada. Sem a sua infinita sabedoria, jamais teria conseguido.

Aos meus pais, **Israel de Almeida** e **Maxima Abreu de Almeida**, que sempre estiveram ao meu lado e são os meus maiores exemplos de vida.

À minha esposa, **Renata Damiana de Jesus**, que sempre foi uma grande companheira e parceira de todas as horas, me apoiou e me deu força para vencer as dificuldades durante a realização deste trabalho. Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Dr^a. Carla Luana Dinardo**, por acreditar em mim, pela orientação prestada, pelo incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. É um exemplo de ser humano, além de ser uma excelente e competente profissional e pesquisadora.

À minha co-orientadora, **Dr^a. Marcia Regina Dezan**, pela paciência, disponibilidade e orientação prestada. Seus conselhos e sugestões contribuíram para o meu crescimento profissional e para o desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Ao **Dr. Alfredo Mendrone-Junior** e ao **Prof Dr. Vanderson Rocha**, pela oportunidade da realização deste estudo.

Aos meus amigos, **Adriana Lucia de Oliveira Silva, Valeria Oliveira Brito, Ingrid Helena Ribeiro e Fabio Luz**, pela amizade, confiança, incentivo e ajuda.

A todos os colaboradores e alunos do **Laboratório de Imunohematologia Avançada da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo**, pelo auxílio nas técnicas moleculares, pelas valiosas sugestões e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

À equipe do **Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) do Instituto do Coração (InCor)**, em especial a Mariana L. Peres de Carvalho, pela ajuda na etapa do sequenciamento.

A toda equipe dos **Laboratórios de Imunohematologia do Hospital Municipal Vila Santa Catarina e do Hospital Israelita Albert Einstein**, pelo apoio, incentivo, solidariedade e amizades compartilhadas todo esse tempo. Em especial, agradeço a Maria Giselda Aravechia, Dr^a. Carolina Bonet Bub e ao Thiago Henrique Costa, pelo aprendizado e pelas valiosas sugestões.

Ao **Dr. Paulo Caleb Junior de Lima Santos** e a **Dr^a. Carolina Bonet Bub (de novo!)**, pela importante contribuição na etapa de qualificação desta dissertação.

À **Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo**, por possibilitar a realização do estudo e a todos os doadores que gentilmente concordaram em participar desta pesquisa.

Enfim, a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

Almeida FAA. Estratégias de busca de genótipos variantes do gene *RHCE* em doadores de sangue afrodescendentes (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: O sistema Rh é o maior e mais complexo sistema de grupos sanguíneos, sendo composto por 55 antígenos codificados pelos genes *RHD* e *RHCE* (lócus *RH*), que são altamente homólogos e pleomórficos. O lócus *RH* apresenta alta prevalência de rearranjos gênicos e mutações de ponto em população de ancestralidade africana, que é representada, na prática transfusional, principalmente pelos pacientes portadores da doença falciforme. Essas variações gênicas originam os alelos variantes de *RH*, que podem levar, entre outros efeitos, à expressão de antígenos parciais, com perda de epítomos imunogênicos, e à perda de expressão de antígenos de alta frequência do sistema Rh, predispondo os pacientes à aloimunização com eventual necessidade de transfusão de unidades provenientes de doadores raros com fenótipos Rh variantes ou Rh nulo. **Objetivos:**

1) Padronizar estratégia de rastreamento das variantes do gene *RHCE* mais frequentemente identificadas em população com doença falciforme dentre doadores de sangue brasileiros autodeclarados negros, visando a atender aos pacientes aloimunizados que necessitem de transfusões de unidades variante-idênticas ou negativas para antígenos de alta frequência do sistema Rh e 2) Avaliar se a inclusão do genótipo nulo do sistema Duffy (*FY*02N.01/FY*02N.01*) na seleção de doadores aumenta a eficácia de identificação de genótipos *RH* variantes.

Metodologia: Foram selecionados 217 doadores de sangue autodeclarados negros com os fenótipos R_{1r} e R_{0r} . Em 214 amostras foi realizada a genotipagem do polimorfismo c.-67T>C da região promotora do gene *FY* (alelo *FY*02N.01*), que é informativo de ancestralidade africana e que, em homozigose, configura o genótipo Duffy nulo. Em seguida, foi realizada a amplificação e sequenciamento direto (método de Sanger) dos éxons 1, 5, 6 e 7 do gene *RHCE*, que contêm mutações chaves para as seguintes variantes: *RHCE*ce.01*, *RHCE*ceVS.01*, *RHCE*ceVS.02*, *RHCE*ceVS.03*, *RHCE*ceVS.05*, *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceEK*, *RHCE*ceMO*, *RHCE*ceCF*, *RHCE*ceTI* e *RHCE*ceSM*. Os doadores portadores dos alelos *RHCE*ceVS.03* ou *RHCE*ceVS.05* foram submetidos a PCR multiplex para detecção do haplótipo híbrido (C)*ce*^S. **Resultados:** Do total de doadores inclusos (n=217), 140 (140/217, 64,5%) apresentaram ao menos um alelo *RHCE* mutado. Os

alelos variantes mais comuns foram: *RHCE*ce.01* (55/434, 12,7%) e *RHCE*ceVS.01* (54/434, 12,4%). Foram identificados 47 doadores (47/217, 21,6%) com genótipos *RHCE* de relevância clínica (codificando antígenos parciais ou ausência de antígenos de alta frequência) e, destes, doze doadores (12/217, 5,5%) apresentaram ausência de antígenos de alta frequência do sistema Rh (hr^B ou hr^S). Oito doadores (8/12, 66,6%) que apresentaram ausência de antígenos de alta frequência possuíam o genótipo Duffy nulo. **Conclusões:** A estratégia de selecionar doadores autodeclarados negros e com os fenótipos R_1r e R_0r mostrou-se viável e eficaz para identificar genótipos variantes de *RHCE* na população brasileira. A inclusão do genótipo Duffy nulo como critério de seleção dos doadores mostrou ser boa alternativa para a busca de genótipos que levam à perda de expressão de antígenos de alta frequência. Os doadores variantes de *RHCE* identificados poderão atender a demanda transfusional dos pacientes aloimunizados que necessitem de transfusões de unidades variante-idênticas ou negativas para antígenos de alta frequência do sistema Rh.

Descritores: Grupos Sanguíneos, Biologia Molecular, Polimorfismo, Genética, Doadores de Sangue, Afrodescendentes.

ABSTRACT

Almeida FAA. Search strategy for variant *RHCE* genotypes gene in African descent blood donors (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Background: Rh system is the largest and most complex blood group system, comprising 55 antigens encoded by the highly homologous and pleomorphic *RHD* and *RHCE* genes (*RH* locus). The *RH* locus has a high prevalence of gene rearrangements and point mutations among people of African descent, represented, in transfusion practice, mainly by patients with sickle cell disease. These gene variations give rise to *RH* variant alleles, which can lead, among other effects, to partial antigens, exhibiting loss of immunogenic epitopes; or to the loss of Rh high frequency antigens, predisposing patients to alloimmunization and to the possible need of red blood cell (RBC) units from rare donors with Rh variants or Rh null phenotype. **Objectives:** 1) Standardize a screening strategy for the most frequently identified *RHCE* gene variants among Brazilian blood donors self-reported as black, aiming to meet the transfusion needs of alloimmunized patients who require RBC units with variant Rh phenotype and 2) Evaluate whether the inclusion of the Duffy null genotype (*FY*02N.01/FY*02N.01*) as selection criteria increases the effectiveness of the screening protocol. **Methodology:** 217 blood donors self-reported as black and presenting R_1r and R_0r phenotypes were selected. Genotyping of the c.-67T>C polymorphism of the promoter region of the *FY* gene (*FY*02N.01* allele), which is informative of African ancestry and which, in homozygosity, configures the Duffy null genotype, was performed in 214 samples. Sequencing (Sanger's method) of exons 1, 5, 6 and 7 of the *RHCE* gene was performed. These *RHCE* exons comprise key mutations for the following variants: *RHCE*ce.01*, *RHCE*ceVS.01*, *RHCE*ceVS.02*, *RHCE*ceVS.03*, *RHCE*ceVS.05*, *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceEK*, *RHCE*ceMO*, *RHCE*ceCF*, *RHCE*ceTI* and *RHCE*ceSM*. Donors carrying the *RHCE*ceVS.03* or *RHCE*ceVS.05* alleles underwent multiplex PCR to detect the (C)*ce*^S hybrid haplotype. **Results:** From the total donors included (n=217), 140 (140/217, 64.5%) had at least one mutated *RHCE* allele. The most common variant alleles were: *RHCE*ce.01* (55/434, 12.7%) and *RHCE*ceVS.01* (54/434, 12.4%). Forty-seven donors (47/217, 21.6%) with clinically relevant *RHCE* genotypes (coding partial antigens or absence of high frequency antigens) were identified, and of these, twelve donors (12/217, 5.5%) had

absence of high frequency Rh antigens (hr^B or hr^S). Eight donors (8/12, 66.6%) who lacked high frequency antigens had the Duffy null genotype. **Conclusions:** The strategy of selecting self-declared black donors with R_1r and R_0r phenotypes proved to be viable and effective in identifying variant *RHCE* genotypes in Brazilian population. The inclusion of the Duffy null genotype as a donor selection criterion proved to be an effective alternative for the search for genotypes that lead to the loss of Rh high frequency antigens. The identified *RHCE* variant donors will compose a virtual bank of rare donors and will potentially meet the transfusion needs of alloimmunized patients requiring variant-identical RBC units.

Descriptors: Blood Groups, Molecular Biology, Polymorphism, Genetics, Blood Donors, African-descent.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Representação das proteínas RhD e RhCE na membrana eritrocitária com os seis segmentos extracelulares, doze transmembranares e sete intracelulares. Os dois terminais da proteína são intracelulares. A coloração rosa destaca a região de vestíbulo. Os círculos amarelos evidenciam os aminoácidos que são idênticos nas duas proteínas já os círculos vermelhos são aqueles que diferem. Os círculos verdes representam os locais de troca de aminoácidos que leva a expressão do antígeno RhC e o círculo azul é a o local de substituição de aminoácido que faz com que ocorra a expressão do antígeno RhE. Adaptado: Daniels⁶28
- Figura 2 - Representação da organização dos genes do sistema Rh. Na imagem acima temos a presença do gene *RHD*, na orientação 5'-3' e *RHCE* na orientação 3'-5', os dois estão separados pelo gene *TMEM50A*. Na imagem abaixo não temos o gene *RHD*, caracterizado pela caixa Rhesus híbrida. Os retângulos vermelhos e azuis representam os 10 éxons de cada gene. Adaptado: Daniels⁶29
- Figura 3 - Modelo do locus *RH* proposto por Flegel²⁹. A) Os genes *RH* estão em orientações opostas, quando o cromossomo se dobra os dois genes ficam adjacentes formando uma estrutura de *hairpin*, favorecendo a conversão gênica entre eles. B) Como resultado da conversão gênica, parte de um gene *RH* é substituído pelo segmento correspondente do outro gene. C) Se a transcrição continua com o molde errado, há a formação de alelos variantes.30
- Figura 4 - Estrutura alterada da proteína RhD na membrana eritrocitária: os círculos vermelhos são exemplos de substituições de aminoácidos nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína que leva à fraca expressão do antígeno D com menor chance de desenvolver aloanticorpos anti-D. Adaptado: Wagner *et al*³².31
- Figura 5 - Estrutura alterada da proteína RhD na membrana eritrocitária: os círculos vermelhos são exemplos de substituições de aminoácidos no segmento extracelular da proteína, levando à perda de epítomos de RhD, com maior possibilidade de desenvolver aloanticorpos anti-D. Adaptado: Wagner *et al*³²32
- Figura 6 - Representação dos alelos *FY*A*, *FY*B* e *FY*Null*. Região promotora com o polimorfismo c.-67T>C (*FY*Null*). Em azul, regiões de éxons com as substituições de nucleotídeos e aminoácidos que determina a expressão de *FY*A* ou *FY*B*. Adaptado: Daniels⁶41

- Figura 7 - PCR-RFLP para genotipagem do alelo *FY*02N.01*. Coluna 1: Marcador molecular 50pb. Coluna 2: PCR sem realização da digestão pela enzima de restrição. Coluna 3: Amostra com genótipo homozigoto mutado (MM). Coluna 4: Amostra com genótipo homozigoto selvagem (WW). Coluna 5: Amostra com genótipo heterozigoto (MW).....50
- Figura 8 - PCR-SSP para amplificação dos éxons 1, 5, 6 e 7 do gene *RHCE*.
PCR 1: *RHCE* éxon 1 (1457pb). PCR 2: *RHCE* éxon 5 (1635pb). PCR 3: *RHCE* éxon 6 (416pb). PCR 4: *RHCE* éxon 7 (665pb).52
- Figura 9 - PCR-SSP para amplificação dos éxons 2, 3, 4, 5, 6 e 7 do gene *RHD*.
PCR 1: *RHD* éxon 2 (1602pb). PCR 2: *RHD* éxon 3 (219pb). PCR 3: *RHD* éxon 4 (378pb). PCR 4: *RHD* éxon 5 (1458pb). PCR 5: *RHD* éxon 7 (405pb). PCR 6: *RHD* éxon 8 (708pb).54
- Figura 10 -PCR multiplex RhC/ Rhc/ éxon 3 *RHD-RHCE*. Coluna 1: Marcador molecular de 100pb. Coluna 2: Amostra com ausência do antígeno RhC e presença do antígeno Rhc e do éxon 3 híbrido *RHD-CE*. Coluna 3: Amostra com ausência do antígeno Rhc e do éxon 3 híbrido e presença do antígeno RhC. Coluna 4: Amostra com ausência do éxon 3 híbrido e presença dos antígenos RhC e Rhc. Demais bandas inespecíficas.58
- Figura 11 -Distribuição dos genótipos *RHCE* variantes de relevância clínica dentre os grupos MM, MW e WW.....76
- Figura 12 -Fluxograma 1 – Estratégia de Busca de doadores *RHCE* variantes com base na presença do polimorfismo c.733C>G.84
- Figura 13 -Fluxograma 2 – Estratégia ampliada de busca de doadores *RHCE* variantes.....85
- Figura 14 -Fluxograma 3 – Estratégia de busca de doadores *RHCE* variantes com base no polimorfismo c.-67T>C, GATA-box.86

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Sistemas de grupos sanguíneos	25
Tabela 2 - Frequência dos haplótipos do sistema Rh (% de ocorrência) em diferentes etnias.	27
Tabela 3 - Variantes do gene <i>RHCE</i> de relevância transfusional para os pacientes com anemia falciforme.	39
Tabela 4 - Frequência dos fenótipos do sistema Duffy (% de ocorrência) em diferentes etnias.	40
Tabela 5 - Frequência dos fenótipos do sistema Rh (% de ocorrência) em diferentes raças.	45
Tabela 6 - <i>Primers</i> utilizados para genotipagem do polimorfismo c.-67T>C na região promotora (GATA-box) do alelo <i>FY*B (FY*02N.01)</i> do sistema Duffy..	50
Tabela 7 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos éxons do gene <i>RHCE</i>	51
Tabela 8 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos éxons do gene <i>RHD</i>	54
Tabela 9 - Descrição dos reagentes necessários para reação de sequenciamento.....	55
Tabela 10 - <i>Primers</i> utilizados para PCR multiplex RhC/ Rhc/ éxon 3 de <i>RHD-RHCE</i>	58
Tabela 11 - Representação da média por dia de doadores afrodescendentes com os fenótipos R ₀ r e R ₁ r.	60
Tabela 12 - Alelos do gene <i>RHCE</i> identificados em população de doadores de sangue auto-declarados como negros e com os fenótipos R ₁ r e R ₀ r....	61
Tabela 13 - Genótipos do gene <i>RHCE</i> identificados em população de doadores de sangue autodeclarados negros com os fenótipos R ₁ r e R ₀ r.	64
Tabela 14 - Genótipos do gene <i>RHCE</i> dos doadores portadores de pelo menos um alelo <i>RHCE</i> alterado.....	65
Tabela 15 - Genótipos do gene <i>RHCE</i> que codifica fenótipos variantes.	66
Tabela 16 - Genótipos do gene <i>RHCE</i> que codifica fenótipos variantes de relevância clínica.	67
Tabela 17 - Genótipos do gene <i>RHCE</i> que não codifica antígenos de alta frequência do sistema Rh.....	67

Tabela 18 - Alelos do gene <i>RHD</i> identificados nos doadores que apresentaram os seguintes alelos variantes de <i>RHCE</i> : <i>RHCE*ceAR</i> , <i>RHCE*ceEK</i> , <i>RHCE*ceMO</i> , <i>RHCE*ceTI</i> , <i>RHCE*ceVS.03</i> e <i>RHCE*ceVS.05</i> e <i>RHCE*ceSM</i>	68
Tabela 19 - Haplótipo <i>RH</i> dos doadores que apresentaram alelos variantes de <i>RHCE</i> (<i>RHCE*ceAR</i> , <i>RHCE*ceEK</i> , <i>RHCE*ceMO</i> , <i>RHCE*ceTI</i> , <i>RHCE*ceVS.03</i> e <i>RHCE*ceVS.05</i> e <i>RHCE*ceSM</i>).	70
Tabela 20 - Representação dos haplótipos <i>RH</i> dos doadores que apresentaram o alelo <i>RHCE*ce^S</i> (<i>RHCE*ceVS.03</i> ou <i>RHCE*ceVS.05</i>).....	712
Tabela 21 - Diversidade alélica do gene <i>RHCE</i> na população de doadores que foram genotipados para o alelo <i>FY*02N.01</i>	74
Tabela 22 - Diversidade genotípica do gene <i>RHCE</i> na população de doadores que foram genotipados para o alelo <i>FY*02N.01</i>	745
Tabela 23 - Distribuição dos indivíduos com genótipos <i>RHCE</i> variantes que não codificam antígenos de alta frequência do sistema Rh dentre os grupos MM, MW e WW.	76
Tabela 24 - Relação parcial dos custos para realização do estudo.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABO	Sistema grupo sanguíneo ABO
M	Antígeno M (MNS:1)
N	Antígeno N (MNS:2)
P ₁	Antígeno P ₁ (P ₁ PK:1)
LW	Antígeno LW
DHFRN	Doença Hemolítica do Feto e do Recém-nascido
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-SSP	<i>Sequence Specif Primed</i>
PCR-RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
qPCR	<i>Real Time PCR</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
Microarray	Microarranjo de DNA
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Éxon	Região do gene que codifica aminoácidos
SLC14A1	Gene <i>SLC14A1</i> (Sistema Kidd)
RHD	Gene <i>RHD</i> (Sistema Rh)
RHCE	Gene <i>RHCE</i> (Sistema Rh)
GYPC	Gene <i>GYPC</i> (Sistema Gerbich)
Ls ^a	Antígeno Ls ^a (GE: 6)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Rh	Sistema Rh
RTHT	Reação transfusional hemolítica tardia
AHAI	Anemia hemolítica autoimune
RhD	Proteína RhD
RhC	Antígeno C (RH:2)
RhE	Antígeno E (RH:3)
Rhc	Antígeno c (RH:4)
Rhe	Antígeno e (RH:5)
RH	Gene <i>RH</i> (<i>RHD</i> + <i>RHCE</i>)
RhCE	Proteína RhCE
RHAG	Gene <i>RHAG</i>
RhAG	Proteína RhAG
kb	Mil pares de bases

pb	Pares de bases
<i>THEM50A</i>	Gene <i>THEM50A</i>
V	Antígeno V (RH:10)
VS	Antígeno VS (RH:20)
Crawford	Antígeno Crawford (RH:43)
hr ^B	Antígeno hr ^B (RH:31)
hr ^S	Antígeno hr ^S (RH:19)
CELO	Antígeno CELO (RH:58)
Hr	Antígeno Hr (RH:18)
Hr ^B	Antígeno Hr ^B (RH:34)
R ₁ r	Fenótipo DCcee
R ₀ r	Fenótipo Dccee
DF	Doença Falciforme
DNA-array	Técnicas de sequenciamento em larga escala (microarray)
CNSR	Cadastro Nacional de Sangue Raro
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
A	Adenina
<i>FY</i>	Gene <i>FY</i> (Sistema Duffy)
Fy ^a	Antígeno Fy ^a (Sistema Duffy)
Fy ^b	Antígeno Fy ^b (Sistema Duffy)
<i>FY*A</i>	Alelo <i>FYA</i> - codifica antígeno Fy ^a
<i>FY*B</i>	Alelo <i>FYB</i> – codifica antígeno Fy ^b
Duffy nulo	Ausência de expressão dos antígenos do sistema Duffy
Gata-box	Região promotora do alelo <i>FY*B</i>
<i>FY*02N.01</i>	Alelo mutado pela presença do polimorfismo c.-67T>C
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>Primers</i>	Sequencia de oligonucleotídeos sintéticos
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<i>Taq</i>	Enzima DNA polimerase termoestável
<i>Styl</i>	Enzima de restrição
MM	Mutado/Mutado - polimorfismo c.-67T>C em homozigose

MW	Mutado/Selvagem - polimorfismo c.-67T>C em heterozigose
WW	Selvagem/Selvagem – sem a presença do polimorfismo c.-67T>C
PCR-SSP	<i>Sequence specif primed</i>
ddNTPS	Didesoxirribonucleótidos trifosfatados
NNR	Número Necessário para Rastrear
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>

LISTA DE SÍMBOLOS OU FÓRMULAS

rpm	rotação por minuto
μl	microlitro
g	força gravitacional da Terra
ml	mililitro
°C	graus Celsius
ng	nanograma
nm	nanômetro
≅	aproximadamente igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Antígenos eritrocitários.....	21
1.2 Sistema Rh.....	26
1.2.1 Variantes do gene <i>RHD</i>	30
1.2.2 Variantes do gene <i>RHCE</i>	32
1.3 Aloimunização eritrocitária em pacientes com doença falciforme	34
1.4 Busca de genótipo <i>RH</i> variante em doadores de sangue	36
1.5 Genótipo Duffy nulo.....	40
1.6 Justificativa para o projeto.....	41
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo primário	43
2.2 Objetivos secundários	43
3 METODOLOGIA	44
3.1 Casuística	44
3.1.1 Critérios de Inclusão	44
3.1.2 Aspectos Éticos	45
3.2 Métodos	46
3.2.1 Fenotipagem eritrocitária	46
3.2.2 Extração de DNA	47
3.2.3 Genotipagem do alelo <i>FY*02N.01</i> do sistema Duffy	49
3.2.4 Amplificação de éxons selecionados do gene <i>RHCE</i>	50
3.2.5 Amplificação de éxons selecionados do gene <i>RHD</i>	52
3.2.6 Sequenciamento dos éxons selecionados dos genes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> pela metodologia de Sanger.....	55
3.2.7 Reação de detecção do haplótipo <i>(C)ce^S</i>	56
3.2.8 Análise estatística	59
4 RESULTADOS	60
4.1 Inclusão dos doadores	60
4.2 Alelos e genótipos variantes do gene <i>RHCE</i>	60
4.3 Alelos e genótipos variantes do gene <i>RHD</i>	68
4.4 Busca do haplótipo <i>(C)ce^S</i>	70
4.5 Genotipagem do polimorfismo c.-67T>C do gene <i>FY</i>	723
4.6 Impacto da genotipagem do alelo <i>FY*02N.01</i> para identificação de doadores <i>RHCE</i> variantes	723

5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES.....	100
ANEXOS	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antígenos eritrocitários

Os antígenos de grupos sanguíneos são definidos como determinantes antigênicos presentes na superfície das hemácias que podem induzir resposta imune¹. Na membrana eritrocitária, os antígenos participam de importantes processos biológicos para a célula como: manutenção da estrutura celular, formação de canais de transporte e participação na sinalização celular através de moléculas receptoras, sendo que um antígeno eritrocitário pode apresentar mais que uma função².

Os antígenos eritrocitários foram descritos primeiramente por Karl Landsteiner no início do século XX, que observou padrões diferentes de aglutinação quando o soro de alguns indivíduos era colocado em contato com hemácias de outros indivíduos³. Através deste experimento, Landsteiner mostrou que o sangue de pessoas saudáveis não era, como se acreditava anteriormente, idêntico em todas elas e que as diferenças interindividuais observadas não eram decorrentes de doenças⁴.

Os padrões distintos de aglutinação observados por Landsteiner eram causadas pelas interações entre antígenos e anticorpos naturais do sistema de grupo sanguíneo ABO. A partir desta observação, os indivíduos começaram a ser classificados em tipos sanguíneos (A, B e O) e as transfusões começaram a ser compatibilizadas para os antígenos ABO, caracterizando o fim da fase de transfusões empíricas na hemoterapia. Como consequência, houve diminuição das taxas de reações fatais atribuídas às transfusões ABO incompatíveis⁴.

Após a descrição do sistema ABO, os antígenos M, N, P1 e LW foram descobertos a partir de experimentos envolvendo a imunização de animais. Outros antígenos foram descritos a seguir em decorrência de eventos clínicos associados à presença de aloanticorpos, principalmente doença hemolítica do feto e recém-nascido (DHFRN) (anti-D, anti-K e anti-Jk^a) e aloimunizações pós transfusionais (anti-c, anti-e e anti-Fy^a)¹.

A partir de 1945, houve intensificação na descoberta de antígenos eritrocitários devido ao advento do soro de antiglobulina humana, um anticorpo IgG com capacidade de se ligar a anticorpos anti-eritrocitários também de classe IgG que estejam sensibilizando eritrócitos, causando aglutinação^{5,6}. O soro de antiglobulina humana possibilitou a caracterização de um maior número de antígenos eritrocitários, prevenindo os pacientes contra eventos adversos como doença hemolítica do feto e do recém-nascido e a aloimunização eritrocitária^{5,6}.

Até o início dos anos 90, os antígenos eritrocitários eram caracterizados somente pela técnica sorológica de hemaglutinação, sendo este o método preferencial para determinação do fenótipo eritrocitário de pacientes e doadores de sangue. A partir desta data, houve avanço significativo das técnicas de biologia molecular para genotipagem de antígenos de sistemas de grupos sanguíneos, sendo que, atualmente, a presunção do fenótipo eritrocitário a partir da genotipagem dos alelos codificantes dos antígenos eritrocitários mais imunogênicos é o método preferencial para guiar a terapia transfusional de pacientes cronicamente transfundidos¹.

As técnicas de biologia molecular disponíveis para genotipagem de grupos sanguíneos podem ser divididas em duas categorias: de baixo a médio rendimento e de alto rendimento⁷. Os protocolos de baixo e médio rendimento englobam as técnicas de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR): PCR alelo-específico (*Sequence Specific Primed* – PCR-SSP), PCR seguido por

análises dos fragmentos com enzimas de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - PCR-RFLP) e PCR em tempo real (*Real Time* – qPCR). Essas técnicas são caracterizadas por baixa capacidade de produtividade, necessitando, na maioria das vezes de um ensaio para cada polimorfismo^{8,9}.

Os protocolos de alto rendimento englobam técnicas de sequenciamento do DNA como: Sequenciamento de Sanger, Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) e Microarranjo de DNA (*DNA microarrays*)^{8,10,11}. Essas técnicas permitem a caracterização de múltiplos alelos de grupos sanguíneos em um único ensaio, viabilizando a organização de um grupo de doadores genotipados para vários sistemas de grupos sanguíneos, que possam atender as necessidades transfusionais de pacientes com múltiplos anticorpos ou com anticorpos direcionados contra antígenos de alta frequência¹²⁻¹⁹.

As técnicas de genotipagem de grupos sanguíneos possibilitaram um melhor entendimento sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela expressão dos antígenos eritrocitários e também permitiu a classificação destes antígenos em sistemas de grupos sanguíneos¹.

Para que seja considerado que um determinado antígeno eritrocitário pertença a um sistema de grupo sanguíneo é necessário que esse antígeno seja codificado por um único gene ou por um conjunto de genes estreitamente ligados e homólogos com pouca ou nenhuma recombinação entre eles^{5,20}. Muitos antígenos eritrocitários bem definidos não estão inseridos em sistemas, visto que as suas bases moleculares não estão definidas^{5,20}.

No momento, temos mais de 300 antígenos eritrocitários descritos, que estão distribuídos em 38 sistemas de grupos sanguíneos (Tabela 1) reconhecidos pela Sociedade Internacional de Transusão de Sangue (*International Society of Blood Transfusion* - ISBT)²¹.

A expressão dos antígenos eritrocitários se deve, principalmente, a polimorfismos de nucleotídeo único ou *single nucleotide polymorphism* (SNPs). A perda de expressão de antígenos ou a expressão de antígenos variantes (com baixa expressão ou perda de epítomos imunogênicos) se devem, principalmente, a deleções (ex., fenótipo Kidd nulo, resultante de deleções dos éxons 3 e 4 do gene *SLC14A1*), inserções (ex., fenótipo Colton nulo), conversões gênicas (ex., troca de material genético entre os genes *RHD* e *RHCE* durante *crossing over*) e duplicações (ex., duplicação éxon 3 do gene *GYPC* codifica o antígeno Ls^a do sistema Gerbich)^{1,6}.

Tabela 1 - Sistemas de grupos sanguíneos.

Nº ISBT	Nome e Símbolo	Gene	Localização cromossômica	Nº total de antígenos
001	ABO	<i>ABO</i>	9q34.2	4
002	MNS	<i>GYPA, GTPB, (GYPE)</i>	4q31.21	49
003	P1PK	<i>A4GALT</i>	22q13.2	3
004	Rh	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11	55
005	Lutheran (LU)	<i>BCAM</i>	19q13.2	25
006	Kell (KEL)	<i>KEL</i>	7q33	36
007	Lewis (LE)	<i>FUT3</i>	19p13.3	6
008	Duffy (FY)	<i>ACKR1</i>	1q21-q22	5
009	Kidd (JK)	<i>SLC14A1</i>	18q11-q12	3
010	Diego (DI)	<i>SLC4A1</i>	17q21.31	22
011	Yt (YT)	<i>ACHE</i>	7q22	5
012	Xg (XG)	<i>XG, MIC2</i>	Xp22.32	2
013	Scianna (SC)	<i>ERMAP</i>	1p34.2	7
014	Dombrock (DO)	<i>ART4</i>	12p13-p12	10
015	Colton (CO)	<i>AQP1</i>	7p14	4
016	Landsteiner-Weiner (LW)	<i>ICAM4</i>	19p13.2	3
017	Chido/Rodgers (CH/RG)	<i>C4A, C4B</i>	6p21.3	9
018	H	<i>FUT1</i>	19q13.33	1
019	Kx (XK)	<i>XK</i>	Xp21.1	1
020	Gerbich (GE)	<i>GYPC</i>	2q14-q21	11
021	Cromer (CROM)	<i>CD55</i>	1q32	20
022	Knops (KN)	<i>CR1</i>	1q32.2	9
023	Indian (IN)	<i>CD44</i>	11p13	6
024	Ok (OK)	<i>BSG</i>	19p13.3	3
025	Raph (RAPH)	<i>CD151</i>	11p15.5	1
026	John Milton Hagen (JMH)	<i>SEMA7A</i>	15q22.3-q23	6
027	I	<i>GCNT2</i>	6p24.2	1
028	Globoside (GLOB)	<i>B3GALNT1</i>	3q25	2
029	Gill (GIL)	<i>AQP3</i>	9p13	1
030	Glicoproteína Rh-associado (RHAG)	<i>RHAG</i>	6p12.3	3
031	FORS	<i>GBGT1</i>	9q34.13-q34.3	1
032	JR	<i>ABCG2</i>	4q22.1	1
033	LAN	<i>ABCB6</i>	2q36	1
034	Vel (VEL)	<i>SMIM1</i>	1p36.32	1
035	CD59	<i>CD59</i>	11p13	1
036	Augustine (AUG)	<i>SLC29A1</i>	6p21.1	4
037	KANNO(KANNO)	<i>PRNP</i>	20p13	1
038	Sid(SID)	<i>B4GALNT2</i>	17q21.32	1

Adaptado: ISBT - Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue²².

1.2 Sistema Rh

O sistema de grupo sanguíneo Rh contém 55 antígenos reconhecidos pela ISBT⁹. Ele possui a maior complexidade dentro dos 38 sistemas de grupos sanguíneos e é o segundo mais importante na medicina transfusional, sendo que o primeiro é representado pelo sistema ABO²³.

O sistema Rh apresenta um grande interesse clínico pelo fato de os anticorpos direcionados contra seus antígenos poderem causar hemólise imuno-mediada de intensidade moderada a grave, representada clinicamente pela DHFRN, reação transfusional hemolítica tardia (RTHT) e anemia hemolítica autoimune (AHAI)^{24,25}.

A primeira descrição de anticorpo anti-eritrocitário contra antígenos do sistema Rh foi relatada por Levine e Stetson em 1939, após investigação de reação transfusional hemolítica de uma puérpera que recebera sangue ABO compatível de seu marido após dar a luz a um natimorto. O soro da amostra da mulher aglutinava com o sangue do seu marido e também com 80% dos doadores caucasianos ABO compatíveis. Demonstrou-se que este anticorpo era independente do sistema ABO, sugerindo que a mulher foi imunizada provavelmente por um antígeno fetal de origem paterna²⁶.

Dentre os 55 antígenos do sistema Rh já descritos, o antígeno D (RH1) é o mais imunogênico, sendo que sua presença ou ausência é o que determina se o indivíduo é considerado como 'Rh' positivo ou negativo na rotina de bancos de sangue²⁷.

Os antígenos C (RH2), E (RH3), c(RH4), e e (RH5) são, após o D, os responsáveis pela maioria dos anticorpos clinicamente significantes do sistema Rh. Esses antígenos formam sete complexos gênicos, conhecidos como haplótipos *RH*

(*CDe*, *ce*, *cDE*, *cDe*, *cE*, *Ce*, *CDE*), sendo que a distribuição e as combinações destes antígenos variam de acordo com a população estudada¹ (Tabela 2). O gene *RHD* codifica o antígeno RhD enquanto o gene *RHCE* (alelos *RHCe*, *RHcE*, *RHce* e *RHCE*) codifica basicamente os antígenos C/c e E/e²⁸.

Tabela 2 – Frequência dos haplótipos do sistema Rh (% de ocorrência) em diferentes etnias.

Haplótipos	Brancos	Negros	Americanos Nativos	Amarelos
DCe (R₁)	42	17	44	70
Ce (r')	2	2	2	2
DcE (R₂)	14	11	34	21
cE (r'')	1	0	6	0
Dce (R₀)	4	44	2	3
ce (r)	37	26	6	3
DCE (R_Z)	0	0	6	1

Adaptado: Castilho *et al*.¹

O sistema Rh é uma família de proteínas constituída pelos polipeptídios RhD e RhCE, codificadas pelos genes *RHD* e *RHCE* e pela glicoproteína RhAG, codificada pelo gene *RHAG* localizado no cromossomo 6. Os antígenos Rh somente são expressos na superfície eritrocitária quando a glicoproteína RhAG funcional está presente, na sua ausência temos fenótipo Rh nulo, não havendo expressão de nenhum antígeno do sistema Rh em superfície eritrocitária²⁹.

As proteínas RhD e RhCE são compostas por 417 aminoácidos que se distribuem em seis segmentos extracelulares (passíveis de induzir resposta imune), doze transmembranares e sete intracelulares, sendo que as porções carboxi-terminal e amino-terminal estão localizadas na face intracelular. As proteínas RhD e RhCE possuem homologia de 92% e se diferenciam apenas por 35 ou 36 aminoácidos, dependendo do haplótipo considerado²⁸.

O modelo estrutural prevê a presença de uma região de vestíbulo entre o sexto, sétimo e oitavo segmento, permitindo acesso de anticorpos IgG³⁰⁻³².

Os antígenos C/c e E/e são antitéticos e suas expressões são determinadas por substituições de aminoácidos na cadeia polipeptídica. As expressões dos antígenos RhC e Rhc diferem pela substituição de quatro aminoácidos, muito embora, apenas a substituição da Serina (C) na posição 103 (segunda alça extracelular) para uma Prolina(c) parece ser crítica para o polimorfismo C/c^{33,34}.

A expressão E/e resulta da substituição de um único aminoácido, na quarta alça extracelular, com a substituição de uma Prolina (E) na posição 226 para uma Alanina (e)^{33,35}. As proteínas RhD e RhCE estão representadas pela Figura 1.

Figura 1 - Representação das proteínas RhD e RhCE na membrana eritrocitária com os seis segmentos extracelulares, doze transmembranares e sete intracelulares. Os dois terminais da proteína são intracelulares. A coloração rosa destaca a região de vestíbulo. Os círculos amarelos evidenciam os aminoácidos que são idênticos nas duas proteínas já os círculos vermelhos são aqueles que diferem. Os círculos verdes representam os locais de troca de aminoácidos que leva a expressão do antígeno RhC e o círculo azul é a o local de substituição de aminoácido que faz com que ocorra a expressão do antígeno RhE. Adaptado: Daniels⁶.

Os genes *RHD* e *RHCE* são altamente homólogos (93,8% de homologia), estão localizados no braço curto do cromossomo 1 e são organizados em 10 éxons dentro de uma sequência genômica de aproximadamente 60kb⁶.

A estrutura molecular do locus *RH* foi estabelecida por Wagner e Flegel³⁶, que demonstraram que os dois genes *RHD* e *RHCE* estão em orientações opostas e separados por 30.000pb. Nessa região, encontra-se outro gene denominado *TMEM50A*, que tem a mesma orientação do gene *RHD* e cuja função ainda não está totalmente esclarecida. O gene *RHD* está flanqueado por dois segmentos de DNA denominados de caixas Rhesus, com um comprimento de aproximadamente 9.000pb, apresentando 98% de homologia e orientação idêntica (Figura 2).

Figura 2 - Representação da organização dos genes do sistema Rh. Na imagem acima temos a presença do gene *RHD*, na orientação 5'-3' e *RHCE* na orientação 3'-5', os dois estão separados pelo gene *TMEM50A*. Na imagem abaixo não temos o gene *RHD*, caracterizado pela caixa Rhesus híbrida. Os retângulos vermelhos e azuis representam os 10 éxons de cada gene. Adaptado: Daniels⁶.

Os genes *RHD* e *RHCE* estão predispostos a rearranjos gênicos, polimorfismos de nucleotídeo único, supressões e inserções que podem dar origem a um grande número de proteínas RhD e RhCE variantes^{37,38}. A orientação oposta e a proximidade entre os genes facilita a ocorrência de conversão gênica em *cis* durante os rearranjos gênicos, levando a formação de alelos híbridos, responsáveis por algumas variantes do sistema Rh³⁹ (Figura 3).

Figura 3 - Modelo do locus *RH* proposto por Flegel⁴⁰. A) Os genes *RH* estão em orientações opostas, quando o cromossomo se dobra os dois genes ficam adjacentes formando uma estrutura de *hairpin*, favorecendo a conversão gênica entre eles. B) Como resultado da conversão gênica, parte de um gene *RH* é substituído pelo segmento correspondente do outro gene. C) Se a transcrição continua com o molde errado, há a formação de alelos variantes.

Atualmente, temos mais de 200 alelos variantes de *RHD* e 80 de *RHCE*⁴¹ causados por estes mecanismos gênicos anteriormente citados. Os alelos alterados podem levar a fraca expressão de alguns antígenos (fenótipo fraco) ou à perda de epítomos imunogênicos (fenótipo parcial). Podem ainda levar à presença de antígenos de baixa frequência (V, VS e Crawford) e a falta de antígenos de alta frequência (hr^B , hr^S , CELO, Hr e Hr^B), contribuindo para aloimunização Rh⁴².

1.2.1 Variantes do gene *RHD*

Os alelos variantes do gene *RHD* podem causar fraca expressão do antígeno D na membrana eritrocitária (fenótipo RhD-fraco) ou codificar antígenos com perda de epítomos imunogênicos (fenótipo RhD-parcial)^{43,44}.

A fraca expressão do antígeno RhD pode ser decorrente de mutações de ponto *missenses* em diferentes éxons do gene *RHD*, que leva a substituições de aminoácidos nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína RhD

(Figura 4). A maioria dos indivíduos com a fraca expressão do antígeno RhD não desenvolvem aloanticorpos anti-D quando expostos ao antígeno RhD normal por gestação ou transfusão^{43,45}.

A proteína RhD alterada pode estar associada à perda da expressão de certos epítopos de RhD, devido às mutações de ponto *missenses* no gene *RHD* ou a rearranjos gênicos entre os genes *RHD* e *RHCE*. Essas alterações ocorrem nos segmentos extracelulares da proteína RhD (Figura 5), mudando a sua conformação e a exposição dos epítopos de RhD. Indivíduos com este fenótipo têm possibilidade de desenvolver aloanticorpos anti-D ao entrarem em contato com hemácias RhD positivo inalteradas^{36,46-51}.

Figura 4 - Estrutura alterada da proteína RhD na membrana eritrocitária: os círculos vermelhos são exemplos de substituições de aminoácidos nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína que leva à fraca expressão do antígeno D com menor chance de desenvolver aloanticorpos anti-D. Adaptado: Wagner *et al*⁴⁵.

Figura 5 - Estrutura alterada da proteína RhD na membrana eritrocitária: os círculos vermelhos são exemplos de substituições de aminoácidos no segmento extracelular da proteína, levando à perda de epítopos de RhD, com maior possibilidade de desenvolver aloanticorpos anti-D. Adaptado: Wagner *et al*⁴⁵.

1.2.2 Variantes do gene *RHCE*

Os alelos variantes do gene *RHCE* também podem apresentar alterações quantitativas (fenótipo fraco) ou qualitativas (fenótipo parcial) na expressão dos antígenos da proteína RhCE, principalmente devido às substituições de nucleotídeos e aos rearranjos gênicos entre os éxons de *RHD* e *RHCE*⁶².

As substituições de nucleotídeos representam o principal mecanismo de origem dos alelos variantes de *RHCE*. Como exemplo, a troca do nucleotídeo c.733C>G no éxon 5 que leva à expressão parcial dos antígenos c/e, ausência do antígeno de alta frequência hr^B e presença dos antígenos de baixa frequência V e VS. Os antígenos V e VS possuem uma frequência de 30% nos indivíduos de ancestralidade africana^{53,54}.

Os alelos híbridos oriundos de rearranjo gênico entre os genes *RHD* e *RHCE* estão presentes em 25% dos indivíduos de ancestralidade africana. Esses

alelos podem codificar expressões alteradas dos antígenos (D, C, c, e), e ausência ou fraca expressão dos antígenos de alta frequência hr^B e hr^S ⁵⁵.

Os antígenos hr^B e hr^S estão presentes em 98% da população e alguns alelos variantes levam à perda de expressão destes antígenos, normalmente associados aos fenótipos R_0r e R_{1r} (híbrido *RHD-CE-D*). Indivíduos com genótipo *RHCE* variante também podem não expressar os antígenos de alta frequência Hr e Hr^B presentes em virtualmente 100% da população. Portadores dessas variantes, quando expostos a transfusão e/ou gestação incompatíveis, podem desenvolver anticorpos complexos de difícil identificação de classe IgG com capacidade de causar reação hemolítica e DHFRN^{39,56,57}.

Os alelos variantes de *RHD* e *RHCE* estão presentes com maior frequência em indivíduos de ancestralidade africana, representados, na prática transfusional, principalmente pelos pacientes portadores de doença falciforme (DF), que são cronicamente transfundidos⁵⁸⁻⁶⁰.

Em 2013, Chou *et al*⁶⁸ publicaram um estudo de busca de alelos variantes dos genes *RHD* e *RHCE* em 226 pacientes portadores de DF e identificaram que 196 (196/226, 86,7%) apresentavam genótipo *RH* que codificava variantes antigênicas, sendo os alelos mais comuns envolvendo o gene *RHCE*: *RHCE*ce.01* e *RHCE*ceVS.01*. Este trabalho confirmou a grande variabilidade do locus *RH* dentro a população de pacientes com DF.

Em 2015, Sippert *et al*⁶¹ publicaram um estudo de rastreamento de alelos *RH* variantes por técnicas de sequenciamento de larga escala (*DNA-array*) em 48 pacientes portadores de DF aloimunizados contra antígenos do sistema Rh. O estudo identificou que 31 (31/48, 65%) pacientes apresentavam alelos variantes dos genes *RHD* e *RHCE*, sendo que 28 (28/31, 90,3%) apresentavam alelos variantes somente para o gene *RHCE*, sendo *RHCE*ce^S*, *RHCE*ce.01*, *RHCE*ceVS.01*, *RHCE*ceAR* e *RHCE*ceTI* os mais comuns.

Em 2016, Gaspardi *et al*⁶² publicaram um estudo de rastreamento de alelos *RHCE* variantes por *DNA-array* em 168 pacientes portadores de DF, em 73 (73/168, 43,5%), foram identificados alelos alterados, os mais comuns para *RHCE* sendo: *RHCE*ceVS.02* (21/146, 14,3%), *RHCE*ceVS.01* (19/146, 13%) e *RHCE*ceAR* (11/146, 7,5%).

No mesmo estudo, foram identificados 6 pacientes (6/168, 3,5%) com genótipos que resultavam na ausência dos antígenos de alta frequência hr^B (2-*RHCE*ceVS.02/RHCE*ceVS.03* e 1-*RHCE*ceVS.02/RHCE*ceVS.02*) e hr^S (2-*RHCE*ceAR/RHCE*ceE* e 1-*RHCE*ceAR/RHCE*ceAR*), sendo que três destes pacientes já apresentam anticorpos contra estes antígenos.

Em 2017, Dezan *et al*⁶³ publicaram um estudo de rastreamento de alelos variantes de *RHCE* por sequenciamento de nova geração em 35 pacientes portadores de DF com anticorpos não esperados contra antígenos do sistema Rh e reportaram 33 alelos (33/70, 47%) *RHCE* variantes, sendo os mais comuns: *RHCE*ce.01* (10/33, 30%), *RHCE*ceAR* (5/33, 15%), *RHCE*ceVS.01* (2/33, 6%) e *RHCE*ceVS.02* (2/33, 6%).

Finalmente, em 2018, Chou *et al*⁶⁰ identificaram uma taxa de 30% (257/857, 30%) de alelos *RHD* variantes e 54% (463/857, 54%) de alelos *RHCE* variantes distribuídos em 857 pacientes com DF. Neste estudo, os alelos *RHCE* mais comumente identificados foram: *RHCE*ce.01*, *RHCE*ceVS.01* e *RHCE*ceVS.02*.

1.3 Aloimunização eritrocitária em pacientes com doença falciforme

A DF é a doença hereditária mais comum no Brasil e afeta cerca de 30.000 pacientes, com aproximadamente 3.500 novos casos por ano. Cerca de 50% dos pacientes são cronicamente transfundidos e a aloimunização é uma complicação

grave, pois pode levar a formação de anticorpos de especificidades complexas principalmente do sistema Rh, presença de reações transfusionais hemolíticas tardias e síndrome de hiperhemólise, representando um grande desafio na prática transfusional⁶⁴.

As taxas de aloimunização nos pacientes falciformes variam de 7% a 62%, sendo dependente dos seguintes fatores: quantidade de transfusões recebidas ao longo da vida, imunogenicidade do antígeno eritrocitário envolvido e estado de inflamação do paciente receptor no momento da transfusão⁶⁵⁻⁶⁷. Anticorpos do sistema Rh estão presentes em torno de 12,5% a 88% dos pacientes aloimunizados, representando o principal sistema de grupo sanguíneo envolvido na aloimunização eritrocitária^{58,60,61,65}.

O melhor método para a prevenção da aloimunização consiste no fornecimento prospectivo de unidades de sangue com o fenótipo eritrocitário mais compatível possível com o paciente. Entretanto, esta estratégia não é completamente eficaz, principalmente devido à presença de alelos variantes de *RHD* e *RHCE*, que não são detectados pelas técnicas sorológicas convencionais^{6,39}, e à ocorrência de transfusões em serviços externos ao de origem dos pacientes, não adeptos à seleção de unidades fenótipo-idênticas para a transfusão⁶⁵.

Diante das altas taxas de aloimunização e da alta prevalência de alelos *RHCE* variantes dentre pacientes com DF, torna-se importante desenvolver uma estratégia de busca de doadores também com variantes proteicas de RhCE, visto que parte dos pacientes, a depender do genótipo, precisará receber unidades de hemácias variante-idêntica quando sensibilizados.

1.4 Busca de genótipo *RH* variante em doadores de sangue

Os doadores de sangue que apresentam alelos variantes do sistema Rh que levem à ausência de antígenos de alta frequência são considerados doadores raros. A ISBT recomenda que todo país possua um programa nacional de busca de doadores raros. Nos Estados Unidos, este programa existe desde 1998 e atualmente fornece 1800 unidades de sangue por ano^{68,69}.

No Brasil, alguns hemocentros realizam busca de doadores raros por métodos sorológicos e/ou moleculares. Desde 2013 existe um Cadastro Nacional de Sangue Raro (CNSR), mantido sob supervisão da Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde, que ainda carece de doadores com genótipos *RH* variantes. A alta miscigenação da população brasileira e a falta de recursos financeiros levam a dificuldades para implantação de programa de busca de doadores raros, principalmente voltado as variantes do sistema Rh^{70,71}.

Em literatura, encontram-se alguns estudos de rastreamento de doadores *RH* variantes, principalmente na população afrodescendente europeia e americana^{60,72-74}. Em populações miscigenadas como a brasileira, poucos trabalhos foram publicados, sendo que, nestas, a raça autodeclarada pode ser imprecisa e outros critérios de seleção de doadores sejam necessários para determinação de ancestralidade africana^{62,75,76}.

Os estudos supracitados desenvolveram estratégias de busca de doadores *RH* variantes baseando-se nos alelos variantes mais comuns e de maior interesse clínico encontrados em pacientes portadores de DF, destacando-se os seguintes alelos variantes do gene *RHCE*: *RHCE*ce.01*, *RHCE*ceVS*, *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceEK*, *RHCE*ceCF*, *RHCE*ceMO* e *RHCE*ceTI*. Esses alelos descritos

serão rastreados na nossa população de doadores de sangue e estão representados na Tabela 3.

O alelo *RHCE*ce.01* apresenta troca de nucleotídeo c.48G>C no éxon 1, resultando em baixa expressão do antígeno e, que pode não reagir com alguns soros monoclonais. Ainda não está claro em literatura se esta alteração é capaz de levar a aloimunização pós transfusional ou pós gestacional nos indivíduos que apresentam este polimorfismo em homozigose^{39,77}.

O alelo *RHCE*ceVS* engloba 5 tipos: *RHCE*ceVS.01*, *RHCE*ceVS.02*, *RHCE*ceVS.03*, *RHCE*ceVS.04* e *RHCE*ceVS.05*. Em todos, existe a troca do nucleotídeo c.733C>G no éxon 5 e também podem possuir mutações de ponto em outros éxons, causando a expressão de antígenos c e e parciais, presença ou ausência dos antígenos de baixa frequência V/VS e ausência do antígeno de alta frequência hr^B. As variantes *RHCE*ceVS.03* e *RHCE*ceVS.05* também são denominadas de *RHCE*ce^S* e estão associadas, na maioria das vezes, com o haplótipo híbrido (C)ce^S, que possui uma frequência de 25% na população de ancestralidade africana⁶.

Em 1997, Fass *et al*⁷⁸ descreveram as características moleculares do haplótipo (C)ce^S que contém dois genes alterados: um gene híbrido *RHD-CE-D*, resultante de uma conversão gênica favorecida pela orientação oposta dos genes *RHD* e *RHCE*, e um alelo *RHCE*ce^S* do gene *RHCE*.

Atualmente existem dois tipos de bases moleculares para o haplótipo (C)ce^S. O tipo 1 consiste na presença do gene híbrido *RHD-CE-D*, que apresenta os éxons 1, 2, 3 (parcial), 8, 9, e 10 de *RHD* e o restante do éxon 3, 4 e 7 de *RHCE*. No tipo 2, o híbrido *RHD-CE-D* apresenta os éxons 1, 2, 3, 8, 9 e 10 de *RHD* e os éxons 4 a 7 de *RHCE*. O haplótipo (C)ce^S pode codificar os antígenos D, C, c, e parciais, presença do antígeno de baixa frequência VS e ausência dos antígenos de alta frequência hr^B e Hr^B⁷⁸.

O alelo *RHCE*ceAR* apresenta o polimorfismo c.48G>C no éxon 1, em associação aos polimorfismos c.712A>G, c.733C>G, c.787A>G, c.800T>A no éxon 5 e ao c.916A>G no éxon 6, resultando nos antígenos c e e parciais, fraca expressão do antígeno de baixa frequência V e perda de expressão do antígeno de alta frequência hr^S³⁴.

O alelo *RHCE*ceEK* apresenta os polimorfismos c.48G>C no éxon 1, e os polimorfismos c.712A>G, c.787A>G e c.800T>A no éxon 5, sendo muito parecido com *RHCE*ceAR* e também não expressando hr^S⁷⁹.

A presença do antígeno de baixa frequência Crawford, que possui epítomos muito parecidos com antígeno D, se dá pelo alelo *RHCE*ceCF* que possui os polimorfismos c.48G>C no éxon 1, c.697C>G e c.733C>G no éxon 5. Esse alelo variante codifica antígenos c e e parciais e ausência dos antígenos de alta frequência hr^B, hr^S e CELO (antitético ao Crawford)⁸⁰.

O alelo variante *RHCE*ceMO* possui os polimorfismos c.48G>C no éxon 1 e c.667C>G no éxon 5, codificando os antígenos c e e parciais, além da perda de expressão dos antígenos de alta frequência hr^B e hr^S⁸¹.

O alelo *RHCE*ceTI* possui os polimorfismos c.48G>C no éxon 1 em associação ao c.1025C>T no éxon 7, codificando antígenos c e e parciais⁸².

O alelo *RHCE*ceTI tipo 2 (RHCE*ceVS.04)* apresenta os polimorfismos c.48G>C no éxon 1, c.733C>G no éxon 5 e c.1025C>T no éxon 7. Esse alelo variante codifica o antígeno e parcial, a presença dos antígenos de baixa frequência V e VS e ausência do antígeno de alta frequência hr^B⁷⁹.

Por fim, o alelo variante *RHCE*ceSM* apresenta os polimorfismos c.48G>C no éxon 1, c.712A>G no éxon 5 e c.818C>T no éxon 6. A presença desse alelo leva a fraca expressão do antígeno de baixa frequência STEM e ausência do antígeno de alta frequência hr^S⁸³.

Tabela 3 - Variantes do gene *RHCE* de relevância transfusional para os pacientes com anemia falciforme.

Variantes de <i>RHCE</i>	Éxons	Nucleotídeos	Aminoácido	Fenótipos Deduzidos
<i>RHCE*ce.01</i>	1	c.48G>C	p.Trp16Cys	e fraco
<i>RHCE*ceVS.01</i>	5	c.733C>G	p.Leu245Val	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}
<i>RHCE*ceVS.02</i>	1	c.48G>C	p.Trp16Cys	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}
	5	c.733C>G	p.Leu245Val	
<i>RHCE*ceVS.03</i>	1	c.48G>C	p.Trp16Cys	c parcial, e parcial, VS+, hr ^{B-}
	5	c.733C>G	p.Leu245Val	
	7	c.1006G>T	p.Gly336Cys	
<i>RHCE*ceVS.05</i>	5	c.733C>G	p.Leu245Val	e parcial, VS+, hr ^{B-}
	7	c.1006G>T	p.Gly336Cys	
<i>RHCE*ceAR</i>	1	c.48G>C	p.Trp16Cys	c parcial, e parcial, V+ ^w , hr ^{S-}
	5	c.712A>G	p.Met238Val	
	5	c.733C>G	p.Leu245Val	
	5	c.787A>G	p.Arg263Gly	
	5	c.800T>A	p.Met267Lys	
<i>RHCE*ceEK</i>	6	c.916A>G	p.Ile306Val	c parcial, e parcial, hr ^{S-}
	1	c.48G>C	p.Trp16Cys	
	5	c.712A>G	p.Met238Val	
	5	c.787A>G	p.Arg263Gly	
	5	c.800T>A	p.Met267Lys	
<i>RHCE*ceCF</i>	1	c.48G>C	p.Trp16Cys	c parcial, e parcial, hr ^{S+/-} , VS+, hr ^{B-} , Crawford+, CELO-
	5	c.697C>G	p.Gln233Glu	
	5	c.733C>G	p.Leu245Val	
<i>RHCE*ceMO</i>	1	c.48G>C	p.Trp16Cys	c parcial, e parcial, hr ^{S-} , hr ^{B-}
	5	c.667G>T	p.Val223Phe	
<i>RHCE*ceTI</i>	1	c.48G>C	p.Trp16Cys	c parcial, e parcial
	7	c.1025C>T	p.Thr342Ile	
<i>RHCE*ceTI tipo 2 (RHCE*ceVS.04)</i>	1	c.48G>C	p.Trp16Cys	e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}
	5	c.733C>G	p.Leu245Val	
	7	c.1025C>T	p.Thr342Ile	
<i>RHCE*ceSM</i>	1	c.48G>C	p.Trp16Cys	e+/-, hr ^{S-} , STEM+ ^w
	5	c.712A>G	p.Met238Val	
	6	c.818C>T	p.Ala273Val	

Adaptado: ISBT – Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue⁷⁹.

Alguns alelos variantes do gene *RHCE* podem se associar a variações do gene *RHD* em *cis*. São exemplos: alelo *RHCE*ceTI* com *RHD*DIVa*⁸², alelos *RHCE*ceAR* ou *RHCE*ceEK* com *RHD*DAR*⁸⁴, alelo *RHCE*ceMO* com *RHD*DAU0*⁸¹, *RHCE*ce^S* com *RHD*DIlla* ou *RHD*DIlla-CE(4-7)-D*³⁹ e *RHCE*ceSM* com *RHD*DOL*⁸³.

1.5 Genótipo Duffy nulo

O sistema de grupo sanguíneo Duffy apresenta dois antígenos antitéticos (Fy^a e Fy^b) e três antígenos de alta frequência (Fy^3 , Fy^5 , Fy^6), que são codificados pelo gene *FY* que está localizado no cromossomo 1¹.

Os antígenos Duffy são carregados por proteínas integrais da membrana de eritrócitos, sendo também conhecida como receptor de antígeno Duffy para quimiocinas, cujo papel é atrair elementos leucocitários aos sítios de inflamação^{85,86}.

Os antígenos Fy^a e Fy^b são os principais do sistema Duffy e são produtos de seus respectivos alelos *FY*A* e *FY*B*⁶. A distribuição e combinação dos antígenos Fy^a e Fy^b variam de acordo com a população estudada, sendo que os fenótipos $Fy(a+b-)$, $Fy(a+b+)$ e $Fy(a-b+)$ são mais comuns em caucasianos, já o fenótipo $Fy(a-b-)$, resultante do genótipo Duffy nulo, está presente em torno de 70% dos afrodescendentes¹ (Tabela 4), chegando a 96% na população do continente africano⁸⁷. O fenótipo $Fy(a-b-)$ ou Duffy nulo confere resistência contra a infecção do *Plasmodium vivax*, conferido uma vantagem seletiva contra a malária⁶.

Tabela 4 - Frequência dos fenótipos do sistema Duffy (% de ocorrência) em diferentes etnias.

Fenótipo	Caucasianos	Negros	Chineses	Japoneses	Tailandeses
Fy(a+b-)	17	9	90,8	81,5	69
Fy(a-b+)	34	22	0,3	0,9	3
Fy(a+b+)	49	1	8,9	17,6	28
Fy(a-b-)	muito raro	68	0	0	0

Adaptado: Castilho L *et al*¹.

O fenótipo Fy(a-b-) em negros se deve principalmente à presença, em homozigose, do polimorfismo c.-67T>C na região promotora denominada de GATA-box do alelo *FY*B* (alelo *FY*02N.01*) (Figura 6). Esta variação genética leva a uma interrupção no fator de transcrição eritróide GATA-1 apenas nos eritrócitos, não alterando a expressão dessa proteína em outros tecidos⁸⁸⁻⁹⁰.

O alelo *FY*02N.01* pode ser utilizado como um marcador informativo de ancestralidade Africana⁶⁵. A inclusão do genótipo Duffy nulo (*FY*02N.01*/*FY*02N.01*) para seleção de doadores negros para a pesquisa de variantes *RH* pode refinar o dado de raça autodeclarada em populações miscigenadas.

Figura 6 - Representação dos alelos *FY*A*, *FY*B* e *FY*Null*. Região promotora com o polimorfismo c.-67T>C (*FY*Null* / *FY*02N.01*). Em azul, regiões de éxons com as substituições de nucleotídeos e aminoácidos, que determina a expressão de *FY*A* ou *FY*B*. Adaptado: Daniels⁶.

1.6 Justificativa para o projeto

Os pacientes com doença falciforme apresentam altas taxas de aloimunização, principalmente contra os antígenos do sistema Rh, em parte devido à presença de alelos mutados de *RHCE* que podem levar à expressão de antígenos

parciais ou à perda da expressão de antígenos de alta frequência populacional, predispondo à formação pós-transfusional ou pós-gestação de anticorpos complexos do sistema Rh. Eventualmente, os pacientes com variantes antigênicas de Rh necessitam receber transfusões de unidades variante-idênticas, sob risco de reações hemolíticas pós-transfusionais potencialmente muito graves. A identificação de doadores *RH* variantes é de fundamental importância para a disponibilidade de transfusões para esses pacientes, aumentando a segurança transfusional. A literatura ainda é escassa em relação a estratégias de busca de variantes *RH* dentre doadores de sangue oriundos de populações miscigenadas, em que a raça autodeclarada pode ser pouco acurada na seleção de indivíduos afrodescendentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Padronizar estratégia de rastreamento das variantes do gene *RHCE* mais frequentemente identificadas em população com doença falciforme dentre doadores de sangue brasileiros autodeclarados negros com fenótipos R_1r e R_0r , visando a atender aos pacientes aloimunizados que necessitem de transfusões de unidades variante-idênticas ou negativas para antígenos de alta frequência do sistema Rh.

2.2 Objetivos secundários

- a) Avaliar se a inclusão do genótipo nulo do sistema Duffy (*FY*02N.01/FY*02N.01*) na seleção de doadores aumenta a eficácia de identificação de genótipos *RH* variantes;
- b) Avaliar o custo parcial do protocolo de rastreamento de doadores portadores de alelos variantes do sistema Rh;
- c) Criar um banco de doadores de sangue raro cujo fenótipo demonstra ausência de antígenos de alta frequência do sistema Rh.

3 METODOLOGIA

3.1 Casuística

3.1.1 Critérios de Inclusão

Foram recrutados 2.500 doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, no período entre agosto e setembro de 2017, para potencial participação no estudo. Dentre este grupo, foram selecionados para participar do estudo os doadores que preenchessem os seguintes critérios de inclusão: 1) Raça autodeclarada negra; 2) Fenótipo Rh: R_1r (DCcee) ou R_0r (Dccee) e 3) Tipo sanguíneo ABO: O.

Os doadores autodeclarados negros foram submetidos à análise de suas fotos do sistema informatizado, sendo selecionados somente os doadores classificados pelos investigadores como de raça preta com base na cor de pele ^{*1}.

O fenótipo R_0r foi escolhido como critério de inclusão por ser o fenótipo mais comum em indivíduos da raça preta (Tabela 5) e também por contemplar as principais variantes do gene *RHCE* (*RHCE*ceVS.01*, *RHCE*ceVS.02*, *RHCE*ceVS.03*, *RHCE*ceVS.05*, *RHCE*ceTI*, *RHCE*ceMO*, *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceSM*, *RHCE*ceCF* e *RHCE*ceEK*).

O fenótipo R_1r foi selecionado com o objetivo de identificar indivíduos com o haplótipo *RHCE(C)ce^S* (*RHCE*ceVS.03* ou *RHCE*ceVS.05* em *cis* com *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D*), importante variante na população de pacientes com DF.

¹ Nomenclatura em concordância com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Tabela 5 - Frequência dos fenótipos do sistema Rh (% de ocorrência) em diferentes raças.

Fenótipos	Brancos	Negros	Amarelos
R₁R₁ (CCDee)	18,5	2	51,8
R₂R₂ (ccDEE)	2,3	0,2	4,4
R₁r (CcDee)	34,9	21	8,5
R₂r (ccDEe)	11,8	18,6	2,5
R₀r (ccDee)	2,1	45,8	0,3
R₁R₂ (CcDEe)	13,3	4	30
R₂R₂ (CcDEE)	0,1	Raro	0,4
R₂R₂ (CCDEE)	0,01	Raro	Raro
R₁R₂ (CCDEe)	0,2	Raro	1,4

Adaptado: Castilho *et al*¹.

3.1.2 Aspectos Éticos

Todos os participantes foram incluídos na pesquisa após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Doação de Sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (Anexo A). O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical (número: 69015217.2.0000.0065) com isenção de aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) específico para a pesquisa.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Doação de Sangue foi apresentado aos doadores de sangue durante o processo de triagem clínica da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. O voluntário deveria ler o termo e, após concordar em realizar a doação, assiná-lo. Após a assinatura, foi coletada a bolsa de sangue do doador e os tubos para realização dos testes sorológicos e moleculares.

3.2 Métodos

3.2.1 Fenotipagem eritrocitária

Os doadores foram fenotipados para antígenos do sistema ABO e Rh (antígenos RhD, RhC, Rhc, RhE e Rhe) utilizando a técnica de hemaglutinação em microplaca no equipamento automatizado (NEO, Immucor, Norcross, GA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

Para a reação da fenotipagem foi utilizada uma amostra de sangue contendo EDTA, que foi inicialmente submetida a uma centrifugação de 3.400rpm por 5 minutos para a separação das frações plasmáticas e celular. Após a centrifugação, as amostras foram inseridas no equipamento com identificação por código de barras.

Para a realização da tipagem ABO direta, houve inicialmente a pipetagem, em microplaca de 96 poços fundo U, de 10µL dos reagentes anti-A, anti-B, anti-A₁B, anti-D IgM, anti-D IgM+IgG e controle Rh. Em seguida, foram pipetadas 55µL de hemácias dos doadores diluídas em uma concentração de 1% (313µL do diluente + 3µL da amostra). Para a tipagem ABO reversa foram pipetados 12µL das hemácias comerciais A₁ e B com 50µL do plasma do doador.

Em seguida, a microplaca foi incubada a 20°C por 6 minutos e centrifugada por três velocidades diferentes: 1ª centrifugação de 80 x *g* por 30 segundos, 2ª centrifugação de 170 x *g* por 30 segundos e 3ª centrifugação de 15 x *g* por 20 segundos. Após as centrifugações o equipamento realizou a leitura da microplaca e houve elaboração de resultado de acordo com o grau de aglutinação em cruces (w, 1+, 2+, 3+ e 4+).

Para a realização da fenotipagem Rh, houve inicialmente a pipetagem, em microplaca de 96 poços fundo U, de 10µL dos reagentes anti-C, anti-c, anti-E, anti-e e controle Rh. Em seguida, pipetou-se 45µL de hemácias dos doadores diluídas em uma concentração de 1% (314µL do diluente + 4µL da amostra). Após a etapa de pipetagem, a placa foi incubada a 20°C por 5 minutos e centrifugada por três velocidades diferentes: 1ª centrifugação de 80 x g por 30 segundos, 2ª centrifugação de 170 x g por 30 segundos e 3ª centrifugação de 15 x g por 20 segundos. Após as centrifugações, o equipamento realizou a leitura da microplaca e houve elaboração de resultado de acordo com o grau de aglutinação em cruzes (w, 1+, 2+, 3+ e 4+).

Os soros comerciais utilizados para tipagem ABO/RhD foram da marca NOVACLONE®, de classe IgM, derivados de linhagens celulares de hibridoma de murinos e envolviam os seguintes clones: anti-A (F98 7C6), anti-B (F84 3D6 e F97 2D6) e anti-A₁B (F98 7C6, F84 3D6, F97 2D6 e F125 7B6). Os soros anti-D IgM e anti-D IgM+IgG da NOVACLONE® eram de origem humana e possuíam os seguintes clones: anti-D IgM (RUM-1) e anti-D IgM+IgG (D175 + D415).

Os soros comerciais utilizados para fenotipagem Rh eram da marca NOVACLONE®, de classe IgM derivados de linhagem humana e envolviam os seguintes clones: anti-C (MS-24 e MS-273) , anti-c (MS-33 e MS-35), anti-E (MS-80, MS-258, MS-12 e MS-260) e anti-e (MS16, MS-21, MS-63, MS-62 e MS69).

3.2.2 Extração de DNA

As amostras utilizadas foram coletadas em tubos de EDTA de 5mL e o DNA foi extraído da camada leucocitária (*buffy coat*) do sangue periférico anticoagulado,

pela técnica manual, utilizado o método de coluna do kit Genomic PureLink® (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o descrito a seguir.

Em um microtubo de 2,0mL, foram pipetados 200µL da amostra de sangue, 20µL da Protease Invitrogen® e 20µL da RNase Invitrogen®. Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado em agitador de bancada e incubado por 2 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 200µL da solução de lise PureLink®, sendo a mistura final homogeneizada novamente e incubada a 55°C por 10 minutos. Em seguida, foi acrescentado 200µL de etanol ao tubo, seguido por nova homogeneização.

O conteúdo final (em torno de 640µl) foi transferido para a coluna PureLink® que estava acoplada ao tubo coletor de 2mL, que foi centrifugado em velocidade de 10.000 x *g* por 1 minuto. Após a centrifugação, o tubo coletor foi removido e substituído por um novo. Foram adicionado à coluna 500µL da solução de lavagem 1 e, a seguir, foi realizada centrifugação 10.000 x *g* por 1 minuto. O tubo coletor da coluna foi novamente removido e substituído por outro limpo. A coluna foi aberta para adição de 500µL da solução de lavagem 2, sendo, a seguir, centrifugada a 20.000 x *g* por 3 minutos. Após a centrifugação, a coluna foi colocada sobre um microtubo de 1,5mL e foram pipetados, no centro da coluna, 100µL da solução de eluição. O conteúdo foi incubado em temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, centrifugado a 10.000 x *g* por 1 minuto. Por fim, o conteúdo presente no microtubo de 1,5mL correspondeu ao DNA eluído da coluna.

Após a extração, o DNA foi quantificado em equipamento de espectrofotometria (Nanodrop®1000, Espectrofotômetro, Wilmington, DE, EUA) e diluído com água até concentração de 100ng/µL.

A qualidade do DNA foi analisada também pelo equipamento de espectrofotometria, utilizado a relação de absorbância de 260nm e 280nm. Valores

iguais ou maiores que 1,8 demonstravam que o DNA estava puro, valores menores que 1,6 indicavam contaminação com fenol ou proteínas.

3.2.3 Genotipagem do alelo *FY*02N.01* do sistema Duffy

A genotipagem do polimorfismo c.-67T>C na região promotora (GATA-box) do alelo *FY*B* (*FY*02N.01*) do sistema de grupo sanguíneo Duffy foi realizada em 214 das amostras estudadas (214/217, 98,6%). Em três amostras não havia DNA suficiente para realização do ensaio. Para genotipagem em questão foi realizado protocolo de PCR-RFLP.

Para a reação da PCR, utilizaram-se 5µL de DNA, 2µL do pool de *primers* (sense e anti-sense) descritos por Rios *et al*⁹¹ (Tabela 6), 1µL de dNTP (mix), 0,3µL da *Taq* DNA polimerase, tampão, água e magnésio em um volume total de 50µL. Os ciclos de amplificação consistiram em: desnaturação 95°C por 15 minutos, seguido por 40 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.

Os produtos da PCR foram digeridos *overnight* pela enzima de restrição *StyI* e a análise do tamanho dos fragmentos após a digestão foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em corrida de 100 volts por 50 minutos com marcador molecular de 50pb.

Os resultados foram interpretados da seguinte forma: 108pb e 81pb (selvagem), 108pb e 61pb (homozigoto) e 108pb, 81pb e 61pb (heterozigoto), representado pela Figura 7.

Para análise foram considerados três grupos: mutado/mutado (MM), mutado/selvagem (MW) e selvagem/selvagem (WW).

Tabela 6 - *Primers* utilizados para genotipagem do polimorfismo c.-67T>C na região promotora (GATA-box) do alelo *FY*B* (*FY*02N.01*) do sistema Duffy.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
FYN1	5'-CAAGGCCAGTGACCCCCATA-3'
FYN2	5'-CATGGCACCGTTTGGTTCAG-3'

Adaptado: Rios *et al*^{β1}.

Figura 7 - PCR-RFLP para genotipagem do alelo *FY*02N.01*. Coluna 1: Marcador molecular 50pb. Coluna 2: PCR sem realização da digestão pela enzima de restrição. Coluna 3: Amostra com genótipo homozigoto mutado (MM). Coluna 4: Amostra com genótipo homozigoto selvagem (WW). Coluna 5: Amostra com genótipo heterozigoto (MW).

3.2.4 Amplificação de éxons selecionados do gene *RHCE*

Para a busca dos alelos variantes do gene *RHCE*, foi realizada PCR-SSP para amplificações dos éxons 1, 5, 6 e 7 de cada amostra.

Para todos éxons, utilizaram-se 3μL do DNA extraído, 2μL do pool de *primers* (sense e anti-sense), 0,3μL *Taq* DNA polimerase, tampão, água e magnésio em um volume total de 50μL.

A Tabela 7 descreve os *primers* utilizados para amplificação dos éxons do gene *RHCE*. O *primer* do éxon 1 foi adaptado do artigo de Wagner *et al*^{β2} e os

demais *primers* foram baseados em protocolo interno do serviço HÉMAC-QUÉBEC, localizado no Canadá, cidade de Montreal, gentilmente cedidos para nosso grupo de pesquisa. Os *primers* selecionados foram previamente validados e são gene-específico para *RHCE*, evitando amplificação de regiões homólogas do gene *RHD*.

Para o éxon 1, utilizou-se o seguinte protocolo de amplificação: desnaturação 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 60 segundos a 60°C, 120 segundos a 72°C e uma extensão de 5 minutos a 72°C.

Para amplificação dos éxons 5, 6 e 7 foram necessários dois protocolos de amplificação: 1) 10 ciclos de 30 segundos a 95°C, 90 segundos a 65°C e 90 segundos a 72°C; 2) 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 60 segundos a 61°C, 120 segundos a 72°C e uma extensão de 5 minutos a 72°C.

A análise final dos produtos da PCR obtidos foi realizada por eletroforese em gel de agarose de 1,5% em corrida de 100 volts por 40 minutos, com uso de marcador molecular de 100pb.

Os resultados foram interpretados da seguinte forma: éxon 1 (1457pb), éxon 5 (1635pb), éxon 6 (416pb) e éxon 7 (665pb) (Figura 8).

Tabela 7 - *Primers* utilizados para amplificação dos éxons do gene *RHCE*.

Primers	Sequências
<i>RHCE</i> Exon 1-s	5' -ACTTTCCACCTTCCACTTCCCTGT- 3'
<i>RHCE</i> Exon 1-as	5' -ACACTGTTGGTGAATTTTCGGTGC-3'
<i>RHCE</i> Exons 4+5-s	5' -AAGGACCATCAGGGCTTTCCCCTGG- 3'
<i>RHCE</i> Exons 4+5-as	5' -CCCCTGTGACCACCCAGCATTCTT-3'
<i>RHCE</i> Exon 6-s	5' -AGGCAGTAGTGAGCTGGCCCACCG-3'
<i>RHCE</i> Exon 6-as	5' -GCACTGCACAGTGGCCCATCAGGTCC-3'
<i>RHCE</i> Exon 7-s	5' -CTCTTCATTTCAACAACTCCCCAT-3'
<i>RHCE</i> Exon 7-as	5' -TGGGAGCACGTCCACAGCAAAG- 3'

Adaptado: Wagner *et al*⁸² e de dados não publicados do hemocentro HÉMAC-QUÉBEC.

Figura 8 - PCR-SSP para amplificação dos éxons 1, 5, 6 e 7 do gene *RHCE*. PCR 1: *RHCE* éxon 1 (1457pb). PCR 2: *RHCE* éxon 5 (1635pb). PCR 3: *RHCE* éxon 6 (416pb). PCR 4: *RHCE* éxon 7 (665pb).

3.2.5 Amplificação de éxons selecionados do gene *RHD*

Alguns alelos variantes do gene *RHCE* podem estar associados a variações do gene *RHD* em *cis*. São exemplos: alelo *RHCE*ceTI* com *RHD*DIVa*⁸², alelos *RHCE*ceAR* ou *RHCE*ceEK* com *RHD*DAR*⁸⁴, alelo *RHCE*ceMO* com *RHD*DAU0*⁸¹, *RHCE*ce^S* com *RHD*DIIla* ou *RHD*DIIla-CE(4-7)-D*³⁹ e *RHCE*ceSM* com *RHD*DOL*⁸³.

Para caracterizar as variantes do gene *RHD* citadas acima, foi realizada uma PCR-SSP para amplificação dos éxons 2, 3, 4, 5, 7 e 8 do gene *RHD* nos

doadores que apresentaram os seguintes alelos variantes do gene *RHCE*: *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceEK*, *RHCE*ceMO*, *RHCE*ceTI*, *RHCE*ce^S* (*RHCE*ceVS.03* e *RHCE*ceVS.05*) e *RHCE*ceSM*.

Para todos éxons, utilizaram-se 3µL do DNA extraído, 2µL do pool de *primers* (sense e anti-sense), 0,3µL *Taq* DNA polimerase, tampão, água e magnésio em um volume total de 50µL. Para a reação foi utilizado *primers* gene-específico para *RHD*, descritos por Legler *et al*⁹³ e estão representados na Tabela 8.

Para os éxons 2, 3, 4, 7 e 8, utilizou-se o seguinte protocolo de amplificação: desnaturação 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 20 segundos a 92°C, 30 segundos a 64°C, 90 segundos a 68°C e uma extensão de 5 minutos a 72°C.

Para o éxon 5, utilizou-se o seguinte protocolo de amplificação: desnaturação 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 20 segundos a 92°C, 30 segundos a 60°C, 90 segundos a 68°C e uma extensão de 5 minutos a 72°C.

A análise final dos produtos da PCR obtidos foi realizada por eletroforese em gel de agarose de 1,5% em corrida de 100 volts por 50 minutos, com uso de marcador molecular de 100pb.

Os resultados foram interpretados da seguinte forma: éxon 2 (1602pb), éxon 3 (219pb), éxon 4 (378pb), éxon 5 (1458pb), éxon 7 (405pb) e éxon 8 (708pb) (Figura 9).

Tabela 8 - Primers utilizados para amplificação dos éxons do gene *RHD*.

Primers	Sequências
Ds2-s	5' -GACGAGTGAAACTCTATCTCGAT- 3'
Ds2-as	5' -GGCATGTCTATTTCTCTCTGTCTAAT- 3'
Ds2-seq	5' -CCTGGATTTCCTTGTGATACACG- 3'
Ds3-s	5' -GTCGTCCTGGCTCTCCCTCTCT- 3'
Ds3-as	5' -CTTTTCTCCCAGGTCCCTCCT- 3'
Ds3-seq	5' -GGTCCCTCCTCCCAGCAC- 3'
Ds4-s	5' -GCCGACACTCACTGCTCTTAC- 3'
Ds4-as	5' -TGAACCTGCTCTGTGAAGTGC- 3'
Ds4-seq	5 -GGGAGATTTTTTCAGCCAG- 3'
Ds5-s	5' -TACCTTTGAATTAAGCACTTCACAG- 3'
Ds5-as	5' -TTATTGGCTACTTGGTGCC- 3'
Ds5-seq	5' -AGACCTTTGGAGCAGGAGTG- 3'
Ds7-s	5' -CATCCCCCTTTGGTGGCC- 3'
Ds7-as	5' -AAGGTAGGGGCTGGACAG- 3'
Ds7-seq	5' -GTCTCACCTGCCAATCTGCT- 3'
Ds8-s	5' -GGTCAGGAGTTTCGAGATCAC- 3'
Ds8-as	5' -TGGCAATGGTGAAGAAAGG- 3'
Ds8-seq	5' -AGTCCTTTTTGTCCCTGATGACC- 3'

Adaptado: Legler *et al*⁹³. **Figura 9** - PCR-SSP para amplificação dos éxons 2, 3, 4, 5, 6 e 7 do gene *RHD*. PCR 1: *RHD* éxon 2 (1602pb). PCR 2: *RHD* éxon 3 (219pb). PCR 3: *RHD* éxon 4 (378pb). PCR 4: *RHD* éxon 5 (1458pb). PCR 5: *RHD* éxon 7 (405pb). PCR 6: *RHD* éxon 8 (708pb).

3.2.6 Sequenciamento dos éxons selecionados dos genes *RHD* e *RHCE* pela metodologia de Sanger

Os produtos da PCR da amplificação dos éxons dos genes *RHD* e *RHCE* foram submetidos à reação de purificação para retirada de excesso de *primers* e nucleotídeos, utilizando o reagente ExoSAP da Applied Biosystems®. Para a reação, foram pipetados 5µL da PCR e 2µL do ExoSAP® em microtubos de 0,2mL. Em seguida, a reação foi inserida no termociclador Mastercycler gradient (Perkin-Elmer®, Foster City, CA, USA) com protocolo de 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos.

Após a purificação, a reação de sequenciamento foi preparada em uma placa de 96 com a seguinte composição: BigDye (dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl₂ e tampão Tris-HCl) da Applied Biosystems®, *primers*, DNA purificado e água, totalizando um volume total de 11µL em cada poço (Tabela 9). Os *primers* para sequenciamento de *RHCE* foram os mesmos utilizados na etapa de amplificação, enquanto que, para o sequenciamento de *RHD*, os *primers* utilizados estão identificados como “seq” na Tabela 8, todos em concentração de 50ng/µL.

Tabela 9 - Descrição dos reagentes necessários para reação de sequenciamento.

Reação de sequenciamento por amostra	
Reagentes	Quantidade
BigDye®	1µl
<i>Primer</i>	1µl
Buffer®	3µl
H ₂ O	3µl
PCR purificado	3µl
Total	11µl

A placa foi inserida no termociclador Mastercycler gradient (Perkin-Elmer®, Foster City, CA, USA) com protocolo de 25 ciclos de amplificação de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Durante a reação de PCR, os dNTPs e ddNTPs foram incorporados na cadeia de DNA.

Na etapa seguinte (purificação), 40µL de etanol a 70% foram inseridos em cada amostra para retirada de reagentes que não foram incorporados, tais como: dNTPs, ddNTPs, *primers* e enzimas. Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, sob proteção de luz, as placas foram centrifugadas a 4.000rpm por 50 minutos. Posteriormente, a placa foi invertida sobre papel absorvente e foi realizada nova centrifugação com a placa invertida a 700rpm por 1 minuto. Em seguida, a placa foi inserida no termociclador Mastercycler gradient (Perkin-Elmer®, Foster City, CA, USA) com protocolo de 95°C por 10 minutos, para retirada de resíduos de etanol.

Por fim, as amostras na placa foram ressuspensas em 10µL de formamida e desnaturadas a 95°C por 5 minutos, seguida em imersão de gelo por 2 minutos. A leitura dos resultados foi feita pelo sequenciador automático ABI 3500xl da Life Technologies® e os resultados foram analisados pelo software Sequencer®, que compara as sequências de nucleotídeos geradas de cada éxon, com as sequências padrões inseridas do GenBank® para *RHCE* (NG_009208) e *RHD* (NG_007494).

3.2.7 Reação de detecção do haplótipo (C)ce^S

Os doadores portadores do alelo *RHCE**ce^S (*RHCE**ceVS.03 ou *RHCE**ceVS.05) foram submetidos a reação de PCR multiplex com *primers* descritos por Tax et al⁴ (Tabela 10) que detectam regiões do gene *RHCE* que

codificam os antígenos RhC / Rhc e também o éxon 3 híbrido *RHD-RHCE*, comum em indivíduos de ancestralidade africana.

Para a reação, utilizaram-se 3 μ L do DNA extraído, 2 μ L do pool de *primers* (sense e anti-sense) para C/c e 4 μ L do pool de *primers* para o éxon 3 *RHD-RHCE*, 0,5 μ L *Taq* DNA polimerase, tampão, água e magnésio em um volume total de 30 μ L.

Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Mastercycler gradient (Perkin-Elmer®, Foster City, CA, USA) e consistiram de: desnaturação 95°C por 15 minutos, seguido por 32 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 62°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão de 10 minutos a 72°C. O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose de 2%, em corrida de 100 volts por 50 minutos com marcador molecular de 100pb.

Os resultados foram interpretados da seguinte forma: RhC+ se presença de banda de 320pb; Rhc+ se presença de banda de 177pb; Éxon 3 de *RHD-RHCE* presente se presença de banda de 111pb (Figura 10).

A ausência da banda de 320pb e a presença da banda 111pb nos doadores R₁r com alelo *RHCE*ce^S* é indicativo da associação em *cis* com o alelo híbrido *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D*. Neste alelo, os éxons 1, 2 e parte do 3 são derivados de *RHD*, bem como os éxons 8, 9 e 10, mas toda a região entre eles é derivada de *RHCE*, codificando os antígenos D e C parciais.

Tabela 10 - Primers utilizados para PCR multiplex RhC/ Rhc/ éxon 3 de *RHD-RHCE*.

Primers	Sequências
C/rev	5' -GAACATGCCACTTCACTCCAG- 3'
C/for	5' -CAGGGCCACCACCATTGAA- 3'
c/rev	5' -TGATGACCACCTTCCCAGG- 3'
c/for	5' -TCGGCCAAGATCTGACCG- 3'
R364 <i>RHD</i> (éxon 3)	5' -TCGGTGCTGATCTCAGTGGA- 3'
R474mmC <i>RHCE</i> (éxon3)	5' -ACTGATGACCATCCTCATGG- 3'

Adaptado: Tax *et al*³⁴.

Figura 10 - PCR multiplex RhC/ Rhc/ éxon 3 *RHD-RHCE*. Coluna 1: Marcador molecular de 100pb. Coluna 2: Amostra com ausência do antígeno RhC e presença do antígeno Rhc e do éxon 3 híbrido *RHD-CE*. Coluna 3: Amostra com ausência do antígeno Rhc e do éxon 3 híbrido e presença do antígeno RhC. Coluna 4: Amostra com ausência do éxon 3 híbrido e presença dos antígenos RhC e Rhc. Demais bandas inespecíficas.

3.2.8 Análise estatística

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo c.-67T>C (alelo *FY*02N.01*) foram obtidas por contagem direta em planilhas do programa Excel (Microsoft® Office Excel 2007).

A variável “Número Necessário para Rastrear (NNR)” foi calculada para expressar quantos doadores teriam que ser selecionados (com base em um determinado critério) para identificar um indivíduo com genótipo *RH* variante.

Os grupos MM, MW e WW, identificados a partir da genotipagem para alelo *FY*02N.01*, foram comparados em termos de número de doadores com genótipo *RH* variante usando o teste de Qui-quadrado realizado no software *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM SPSS®, Chicago, IL, USA) versão 20. Um valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Inclusão dos doadores

Dos 2.500 doadores selecionados para o estudo, 217 foram incluídos por preencher os critérios de inclusão. Destes, 117 (54%) tinham fenótipo R_1r e 100 (46%) tinham fenótipo R_0r . Todos os doadores se autodeclararam como sendo da raça negra.

As amostras foram separadas de acordo com a quantidade de doadores aptos por dia da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. A Tabela 11 representa a média por dia de doadores aptos e, destes, quais se autodeclararam negros e quais são fenotipados como R_0r e R_1r . Todos os doadores são do grupo sanguíneo ABO/RhD:O+.

Tabela 11 - Representação da média por dia de doadores afrodescendentes com os fenótipos R_0r e R_1r .

Média por dia	Quantidade
Nº total de doadores	340 (100%)
Nº total de doadores autodeclarados negros (O+)	30 (8,9%)
Nº de doadores de raça preta R_0r (O+)	15 (50%)
Nº de doadores de raça preta R_1r (O+)	6 (20%)

4.2 Alelos e genótipos variantes do gene *RHCE*

Os 434 alelos de *RHCE* dos 217 doadores genotipados estão discriminados na Tabela 12. De todos os alelos estudados, 264 (264/434, 61%) não codificavam antígenos variantes, sendo denominados convencionais, e 170 (170/434, 39%) codificavam antígenos variantes (antígenos fracos, antígenos parciais, perda de

antígenos de alta frequência ou neo-antígenos de baixa frequência). Os alelos variantes mais frequentes foram: *RHCE*ce.01* (55/434, 12,7%), *RHCE*ceVS.01* (54/434, 12,4%), *RHCE*ceVS.02* (23/434, 5,3%) e *RHCE*ceAR* (15/434, 3,5%) (Tabela 12).

Foram identificados 91 alelos variantes que levavam à ausência da expressão do antígeno de alta frequência hr^B (91/434, 20,9%): *RHCE*ceVS.01* (54/434, 12,4%), *RHCE*ceVS.02* (23/434, 5,3%), *RHCE*ceVS.05* (9/434, 2,1%), *RHCE*ceVS.03* (3/434, 0,7%), *RHCE*ceMO* (1/434, 0,2%) e *RHCE*ceTI tipo2-like* (1/434, 0,2%). Foram detectados 19 alelos que levavam à perda de expressão do antígeno de alta frequência hr^S (18/434, 4,31%): *RHCE*ceAR* (15/434, 3,5%), *RHCE*ceEK* (2/434, 0,5%), *RHCE*ceMO* (1/434, 0,2 %) e *RHCE*ceSM* (1/434, 0,2%).

Tabela 12 - Alelos do gene *RHCE* identificados em população de doadores de sangue autodeclarados como negros e com os fenótipos R_1r e R_0r .

Alelos <i>RHCE</i>	Quantidade	Fenótipo deduzido
<i>RHCE*ce</i>	156 (36%)	c+, e+
<i>RHCE*Ce</i>	108 (25%)	C+, e+
<i>RHCE*ce.01</i>	55 (12,7%)	e fraco
<i>RHCE*ceVS.01</i>	54 (12,4%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr^B -
<i>RHCE*ceVS.02</i>	23 (5,3%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr^B -
<i>RHCE*ceAR</i>	15 (3,4%)	c parcial, e parcial, $V+^W$, VS-, hr^S -
<i>RHCE*ceVS.05</i>	9 (2,1%)	e parcial, V-, VS+, hr^B -
<i>RHCE*ceTI</i>	5 (1,1%)	c parcial, e parcial
<i>RHCE*ceVS.03</i>	3 (0,7%)	c parcial, e parcial, V-, VS+, hr^B -
<i>RHCE*ceEK</i>	2 (0,5%)	c parcial, e parcial, hr^S -
<i>RHCE*ceSM</i>	1 (0,2%)	e+/-, hr^S -, STEM+ ^W
<i>RHCE*ceMO</i>	1 (0,2%)	c parcial, e parcial, hr^S -, hr^B -
<i>RHCE*ceTI tipo 2 like</i>	1 (0,2%)	e parcial, V+, VS+, hr^B -
<i>RHCE*Ce.30</i>	1 (0,2%)	V+, VS+
TOTAL:	434 (100%)	

Os genótipos *RHCE* dos 217 doadores estudados estão representados na Tabela 13. Os genótipos mais frequentes foram: *RHCE*Ce/RHCE*ce* (57/217, 26,3%), *RHCE*Ce/RHCE*ce.01* (21/217, 9,6%) e *RHCE*ce/RHCE*ce* (20/217, 9,3%), todos codificando fenótipos RhCE convencionais. Foram identificados 140 doadores (140/217, 64,5%) portadores de pelo menos um alelo *RHCE* alterado (Tabela 14), sendo os mais comuns: *RHCE*Ce/RHCE*ce.01* (21/217, 9,6%), *RHCE*ceVS.01/RHCE*ce* (19/217, 8,7%) e *RHCE*ceVS.01/RHCE*Ce* (19/217, 8,7%).

Foram identificados 107 doadores (107/217, 49,3%) cujo genótipo final predizia fenótipos variantes, quer pela presença de ambos os alelos mutados, quer pela presença de um alelo mutado em *trans* com o alelo *RHCE*Ce* ou pela presença de ao menos um alelo codificando neo-antígenos de baixa frequência populacional (Tabela 15). Os genótipos *RHCE* variantes mais frequentes foram: *RHCE*ceVS.01/RHCE*ce* (19/217, 8,7%), *RHCE*ceVS.01/RHCE*Ce* (19/217, 8,7%) e *RHCE*ceVS.02/RHCE*ce* (15/217, 6,9%), sendo que estes três genótipos codificam a presença dos antígenos de baixa frequência V e VS.

Dos 107 doadores com fenótipo RhCE predito como variante, 47 (47/217, 21,6%) apresentavam fenótipo RhCE clinicamente relevante (presença de antígenos parciais ou falta de antígenos de alta frequência) (Tabela 16). Estes doadores apresentavam importantes genótipos para atender aos pacientes aloimunizados que necessitassem de transfusão genótipo *RH* variante idêntico. Neste grupo de doadores observamos que os genótipos mais frequentes foram: *RHCE*ceVS.01/RHCE*Ce* (19/217, 8,7%), *RHCE*ceVS.02/RHCE*Ce* (4/217, 1,9%) e *RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.01* (4/217, 1,9%), os três codificando o antígeno c parcial, sendo que o ultimo (*RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.01*) também codificava o antígeno e parcial e ausência do antígeno de alta frequência hr^B.

O antígeno de alta frequência hr^B estava ausente em 11 (11/217, 5,0%) doadores e o antígeno hr^S estava ausente em 1 doador (1/217, 0,5%), os genótipos desses doadores estão representados na Tabela 17. Esses genótipos também podem não expressar os antígenos Hr^B (hr^B -) e Hr (hr^S -) que estão presentes em 100% dos indivíduos portadores de alelos convencionais de *RHCE*. Anticorpos contra os antígenos hr^B , hr^S , Hr^B e Hr podem ser encontrados em pacientes com doença falciforme e, nesta situação, doadores compatíveis são raros, porém imprescindíveis.

Selecionado doadores baseado em raça autodeclarada negra e fenótipo Rh, o número necessário para rastrear (NNR) para identificar um doador hr^B - e um doador hr^S - foram 19,7 e 217, respectivamente.

Tabela 13 - Genótipos do gene *RHCE* identificados em população de doadores de sangue autodeclarados negros com os fenótipos R₁r e R₀r.

Genótipos <i>RHCE</i>	Quantidade	Fenótipos Deduzidos	Fenótipo Rh
<i>RHCE*Ce/RHCE*ce</i>	57 (26,3%)	C+, c+, e+	R ₁ r
<i>RHCE*Ce/RHCE*ce.01</i>	21 (9,6%)	C+, c+, e+	
<i>RHCE*ce/RHCE*ce</i>	20 (9,3%)	c+, e+	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ce</i>	19 (8,7%)	V+, VS+	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*Ce</i>	19 (8,7%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ce</i>	15 (6,9%)	V+, VS+	R ₀ r
<i>RHCE*ce.01/RHCE*ce</i>	10 (4,6%)	c+, e+	
<i>RHCE*ce.01/RHCE*ce.01</i>	8 (3,6%)	e fraco	
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce</i>	7 (3,2%)	V+ ^W	
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*Ce</i>	4 (1,9%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.01</i>	4 (1,9%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^B -	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.05</i>	3 (1,3%)	C parcial*, e parcial, V+, VS+, hr ^B -	R ₁ r
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce.01</i>	3 (1,3%)	e variante, V+ ^W	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.03</i>	2 (0,9%)	C parcial* c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^B -	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*ce</i>	2 (0,9%)	C parcial*, V-, VS+	
<i>RHCE*ceTI/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial	
<i>RHCE*ceTI/RHCE*ce.01</i>	2 (0,9%)	e variante	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ce.01</i>	2 (0,9%)	e variante, V+, VS+	
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ceVS.01</i>	2 (0,9%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^B -	
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial, V-, VS+	
<i>RHCE*ceAR/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial, V+ ^W	R ₁ r
<i>RHCE*ceEK/RHCE*Ce</i>	1 (0,5%)	c parcial	
<i>RHCE*ceVS.03/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	C parcial*, V-, VS+	
<i>RHCE*ceEK/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	c+, e+	
<i>RHCE*ceTI/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	c+, e+	R ₀ r
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceAR</i>	1 (0,5%)	c parcial, e parcial, V+ ^W , VS-, hr ^S -	
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceVS.01</i>	1 (0,5%)	c parcial, e parcial, V+, VS+	
<i>RHCE*ceSM/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	STEM+ ^W	
<i>RHCE*ceTI tipo 2 like/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	V+, VS+	
<i>RHCE*ceMO/RHCE*ce.01</i>	1 (0,5%)	e variante	
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce.30</i>	1 (0,5%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	V-, VS+	R ₀ r
TOTAL:	217 (100%)	TOTAL:	R ₀ r-100(46%) R ₁ r-117(54%)

* C parcial - *RHCE*ceVS.03* ou *RHCE*ceVS.05* em cis com *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D*.

Tabela 14 - Genótipos do gene *RHCE* dos doadores portadores de pelo menos um alelo *RHCE* alterado.

Genótipos <i>RHCE</i>	Quantidade	Fenótipos Deduzidos	Fenótipo Rh
<i>RHCE*Ce/RHCE*ce.01</i>	21 (9,7%)	C+, c+, e+	
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ce</i>	19 (8,7%)	V+, VS+	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*Ce</i>	19 (8,7%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ce</i>	15 (6,9%)	V+, VS+	R ₀ r
<i>RHCE*ce.01/RHCE*ce</i>	10 (4,6%)	c+, e+	
<i>RHCE*ce.01/RHCE*ce.01</i>	8 (3,6%)	e fraco	
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce</i>	7 (3,2%)	V+ ^w	
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*Ce</i>	4 (1,9%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.01</i>	4 (1,9%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.05</i>	3 (1,3%)	C parcial*, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	R ₁ r
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce.01</i>	3 (1,3%)	e variante, V+ ^w	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.03</i>	2 (0,9%)	C parcial* c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*ce</i>	2 (0,9%)	C parcial*, V-, VS+	
<i>RHCE*ceTI/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial	
<i>RHCE*ceTI/RHCE*ce.01</i>	2 (0,9%)	e variante	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ce.01</i>	2 (0,9%)	e variante, V+, VS+	
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ceVS.01</i>	2 (0,9%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial, V-, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceAR/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial, V+ ^w	
<i>RHCE*ceEK/RHCE*Ce</i>	1 (0,5%)	c parcial	
<i>RHCE*ceVS.03/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	C parcial*, V-, VS+	
<i>RHCE*ceEK/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	c+, e+	R ₀ r
<i>RHCE*ceTI/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	c+, e+	
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceAR</i>	1 (0,5%)	c parcial, e parcial, V+ ^w , VS-, hr ^{S-}	
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceVS.01</i>	1 (0,5%)	c parcial, e parcial, V+, VS+	
<i>RHCE*ceSM/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	STEM+ ^w	
<i>RHCE*ceTI tipo 2 like/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	V+, VS+	
<i>RHCE*ceMO/RHCE*ce.01</i>	1 (0,5%)	e variante	
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce.30</i>	1 (0,5%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	V-, VS+	R ₀ r
TOTAL:	140 (64,5%)	TOTAL:	R ₀ r-80(36,8%) R ₁ r-60(27,6%)

* C parcial - *RHCE*ceVS.03* ou *RHCE*ceVS.05* em cis com *RHD*DIIfa-CE(4-7)-D*.

Tabela 15 - Genótipos do gene *RHCE* que codifica fenótipos variantes.

Genótipos <i>RHCE</i>	Quantidade	Fenótipos Deduzidos	Fenótipo Rh
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ce</i>	19 (8,7%)	V+, VS+	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*Ce</i>	19 (8,7%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ce</i>	15 (6,9%)	V+, VS+	R ₀ r
<i>RHCE*ce.01/RHCE*ce.01</i>	8 (3,7%)	e fraco	
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce</i>	7 (3,2%)	V+ ^W	
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*Ce</i>	4 (1,9%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.01</i>	4 (1,9%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.05</i>	3 (1,3%)	C parcial*, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	R ₁ r
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce.01</i>	3 (1,3%)	e variante, V+ ^W	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.03</i>	2 (0,9%)	C parcial* c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*ce</i>	2 (0,9%)	C parcial*, V-, VS+	
<i>RHCE*ceTI/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial	
<i>RHCE*ceTI/RHCE*ce.01</i>	2 (0,9%)	e variante	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ce.01</i>	2 (0,9%)	e variante, V+, VS+	
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ceVS.01</i>	2 (0,9%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial, V-, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceAR/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial, V+ ^W	
<i>RHCE*ceEK/RHCE*Ce</i>	1 (0,5%)	c parcial	
<i>RHCE*ceVS.03/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	C parcial*, V-, VS+	
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceAR</i>	1 (0,5%)	c parcial, e parcial, V+ ^W , VS-, hr ^{S-}	R ₀ r
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceVS.01</i>	1 (0,5%)	c parcial, e parcial, V+, VS+	
<i>RHCE*ceSM/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	STEM+ ^W	
<i>RHCE*ceTI tipo 2 like/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	V+, VS+	
<i>RHCE*ceMO/RHCE*ce.01</i>	1 (0,5%)	e variante	
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce.30</i>	1 (0,5%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	V-, VS+	R ₀ r
TOTAL:	107(49,3%)	TOTAL:	R ₀ r-68(31,3%) R ₁ r-39(17,9%)

* C parcial - *RHCE*ceVS.03* ou *RHCE*ceVS.05* em cis com *RHD*DIlla-CE(4-7)-D*.

Tabela 16 - Genótipos do gene *RHCE* que codifica fenótipos variantes de relevância clínica.

Genótipos <i>RHCE</i>	Quantidade	Fenótipos Deduzidos	Fenótipo Rh
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*Ce</i>	19 (8,6%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*Ce</i>	4 (1,9%)	c parcial, V+, VS+	
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.01</i>	4 (1,9%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.05</i>	3 (1,3%)	C parcial*, e parcial, V+ VS+, hr ^{B-}	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.03</i>	2 (0,9%)	C parcial* c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*ce</i>	2 (0,9%)	C parcial*, V-, VS+	
<i>RHCE*ceTI/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial	
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ceVS.01</i>	2 (0,9%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial, V-, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceAR/RHCE*Ce</i>	2 (0,9%)	c parcial, V+ ^w	
<i>RHCE*ceEK/RHCE*Ce</i>	1 (0,5%)	c parcial	
<i>RHCE*ceVS.03/RHCE*ce</i>	1 (0,5%)	C parcial*, V-, VS+	
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceAR</i>	1 (0,5%)	c parcial, e parcial, V+ ^w , VS-, hr ^{S-}	R ₀ r
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceVS.01</i>	1 (0,5%)	c parcial, e parcial, V+, VS+	
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce.30</i>	1 (0,5%)	c parcial, V+, VS+	R ₁ r
TOTAL:		47 (21,6%)	R0r-14(6,4%) R1r-39(17,9%)

* C parcial - *RHCE*ceVS.03* ou *RHCE*ceVS.05* em *cis* com *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D*.

Tabela 17 - Genótipos do gene *RHCE* que não codifica antígenos de alta frequência do sistema Rh.

Genótipos <i>RHCE</i>	Quantidade	Fenótipos Deduzidos	Fenótipo Rh
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.01</i>	4 (1,9%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.05</i>	3 (1,3%)	C parcial*, e parcial, V+ VS+, hr ^{B-}	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.03</i>	2 (0,9%)	C parcial* c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ceVS.01</i>	2 (0,9%)	c parcial, e parcial, V+, VS+, hr ^{B-}	R ₀ r
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceAR</i>	1 (0,5%)	c parcial, e parcial, V+ ^w , VS-, hr ^{S-}	
TOTAL:		12 (5,5%)	R0r -7(3,2%) R1r- 5 (2,3%)

* C parcial - *RHCE*ceVS.03* ou *RHCE*ceVS.05* em *cis* com *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D*.

4.3 Alelos e genótipos variantes do gene *RHD*

Foi realizada a genotipagem do gene *RHD* em 36 doadores (36/217, 16,6%), tendo sido selecionados aqueles que apresentaram os seguintes alelos variantes de *RHCE*: *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceEK*, *RHCE*ceMO*, *RHCE*ceTI*, *RHCE*ce^S* (*RHCE*ceVS.03* e *RHCE*ceVS.05*) e *RHCE*ceSM*. Os alelos de *RHD* mais frequentes foram: *RHD*01* (31/72, 43%), *RHD*DAR* (15/72, 20,8%) e *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D* (11/72, 15,3%). Os alelos de *RHD* identificados neste estudo estão representados na Tabela 18.

Tabela 18 - Alelos do gene *RHD* identificados nos doadores que apresentaram os seguintes alelos variantes de *RHCE*: *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceEK*, *RHCE*ceMO*, *RHCE*ceTI*, *RHCE*ceVS.03* e *RHCE*ceVS.05* e *RHCE*ceSM*.

Alelos	Quantidade de alelos identificados	Fenótipo deduzido
<i>RHD*01</i>	31 (43%)	D positivo
<i>RHD*DAR</i>	15 (20,8%)	D parcial, DAK+
<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D</i>	11 (15,3%)	D negativo, C parcial
<i>RHD*Deleção</i>	8 (11,1%)	D negativo
<i>RHD*DIVa</i>	3 (4,2%)	D parcial, Goa+
<i>RHD*DAU0</i>	1 (1,4%)	D parcial
<i>RHD*DIIIa</i>	1 (1,4%)	D parcial, DAK+
<i>RHD*DV</i>	1 (1,4%)	D parcial
<i>RHD*DOL1</i>	1 (1,4%)	D parcial

Os alelos variantes *RHCE*ceAR* e *RHCE*ceEK* estão frequentemente associados com *RHD*DAR*. No nosso estudo observamos que os 15 alelos (15/434, 3,4%) *RHCE*ceAR* estavam em *cis* com *RHD*DAR*, destacando-se um doador (1/217, 0,4%) que apresentou o haplótipo *RHD*DAR/RHCE*ceAR* em homozigose, codificando os antígenos D, c, e e parciais com ausência do antígeno hr^S. Os dois alelos *RHCE*ceEK* estavam em *cis* com *RHD*01*.

Os alelos *RHCE*ceMO* e *RHCE*ceSM* estão frequentemente associados em *cis* com *RHD*DAU0* e *RHD*DOL1*. Esta associação foi observada nos alelos *RHCE*ceMO* (1/434, 0,2%) e *RHCE*ceSM* (1/434, 0,2%) identificados no estudo.

O alelo *RHCE*ceTI* normalmente está associado em *cis* com *RHD*DIVa*. No presente estudo, dos 5 alelos *RHCE*ceTI* identificados (5/434 1,1%), 3 alelos (3/434, 0,7%) apresentavam-se associados a *RHD*DIVa* e 2 alelos (2/434, 0,4%) estavam associados a *RHD*01*. O alelo *RHCE*ceTI like tipo 2* estava em *cis* com *RHD*DV*, sendo que não há relatos prévios desta associação.

O alelo *RHCE*ce^S* (*RHCE*ceVS.03* e *RHCE*ce.VS05*) está comumente associado com os alelos *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D* e *RHD*DIIIa*. Dos 12 doadores que apresentaram o alelo *RHCE*ce^S* (12/434, 2,8%), 11 exibiam *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D* em *cis* (11/434, 2,5%) e 1 (1/434, 0,2%) *RHD*DIIIa* em *cis*.

Por fim, 8 doadores (8/217, 3,7%) apresentaram genótipos que codificam antígeno RhD parcial, com capacidade de aloimunização caso haja exposição, por transfusão ou gestação, a hemácias RhD positivo.

A Tabela 19 mostra os haplótipos *RH* identificados no estudo.

Tabela 19 - Haplótipo *RH* dos doadores que apresentaram alelos variantes de *RHCE* (*RHCE*ceAR*, *RHCE*ceEK*, *RHCE*ceMO*, *RHCE*ceTI*, *RHCE*ceVS.03* e *RHCE*ceVS.05* e *RHCE*ceSM*).

Nº Doadores	Haplótipo <i>RH</i>			
	<i>RHD</i>		<i>RHCE</i>	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
5	<i>RHD*DAR</i>	<i>RHD*Deletado</i>	<i>RHCE*ceAR</i>	<i>RHCE*ce</i>
3	<i>RHD*DAR</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceAR</i>	<i>RHCE*ce.01</i>
3	<i>RHD*DIlla-CE(4-7)-D</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceVS.05</i>	<i>RHCE*ceVS.01</i>
2	<i>RHD*DAR</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceAR</i>	<i>RHCE*ce</i>
2	<i>RHD*DAR</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceAR</i>	<i>RHCE*Ce</i>
2	<i>RHD*DIlla-CE(4-7)-D</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceVS.03</i>	<i>RHCE*ceVS.01</i>
2	<i>RHD*DIlla-CE(4-7)-D</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceVS.05</i>	<i>RHCE*ce</i>
2	<i>RHD*DIlla-CE(4-7)-D</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceVS.05</i>	<i>RHCE*Ce</i>
1	<i>RHD*DIlla-CE(4-7)-D</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceVS.05</i>	<i>RHCE*Ce.30</i>
1	<i>RHD*DIlla</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceVS.05</i>	<i>RHCE*ce</i>
1	<i>RHD*DIlla-CE(4-7)-D</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceVS.03</i>	<i>RHCE*ce</i>
1	<i>RHD*DAR</i>	<i>RHD*DAR</i>	<i>RHCE*ceAR</i>	<i>RHCE*ceAR</i>
1	<i>RHD*DAR</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceAR</i>	<i>RHCE*ceVS.01</i>
1	<i>RHD*01</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceEK</i>	<i>RHCE*ce</i>
1	<i>RHD*01</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceEK</i>	<i>RHCE*Ce</i>
1	<i>RHD*DIVa</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceTI</i>	<i>RHCE*Ce</i>
1	<i>RHD*01</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceTI</i>	<i>RHCE*Ce</i>
1	<i>RHD*DIVa</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceTI</i>	<i>RHCE*ce</i>
1	<i>RHD*DIVa</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceTI</i>	<i>RHCE*ce.01</i>
1	<i>RHD*01</i>	<i>RHD*01</i>	<i>RHCE*ceTI</i>	<i>RHCE*ce.01</i>
1	<i>RHD*DV</i>	<i>RHD*Deletado</i>	<i>RHCE*ceTI tipo 2 like</i>	<i>RHCE*ce</i>
1	<i>RHD*DAU0</i>	<i>RHD*Deletado</i>	<i>RHCE*ceMO</i>	<i>RHCE*ce.01</i>
1	<i>RHD*DOL1</i>	<i>RHD*Deletado</i>	<i>RHCE*ceSM</i>	<i>RHCE*ce.01</i>

4.4 Busca do haplótipo (C)ce^S

A reação de PCR multiplex C/ c/ éxon3 *RHD-RHCE* foi realizada em 12 (12/217, 5,5%) doadores que apresentaram o alelo *RHCE*ce^S* (*RHCE*ceVS.03* ou *RHCE*ceVS.05*), sendo 11 doadores (11/217, 5,0%) com o fenótipo R₁r e 1 doador (1/217, 0,5%) com o fenótipo R₀r, com o objetivo de verificar a presença do haplótipo (C)ce^S, comum em indivíduos de ancestralidade africana. A Tabela 20 mostra os resultados destes 12 doadores.

Foram identificados 8 doadores (8/217, 3,7%) fenotipados como R₁r que apresentaram discrepância entre a fenotipagem e genotipagem para o antígeno C. Estes doadores foram fenotipados como C positivo e genotipados como C negativo com a presença da banda de 111pb (c.455A>C éxon 3 híbrido *RHD-RHCE*), indicando a existência do gene híbrido *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D* que codifica o antígeno C parcial. Esses doadores apresentam o haplótipo (C)ce^S, devido ao alelo *RHCE*ce^S* estar em *cis* com *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D*.

Destes 8 doadores, 5 doadores (5/217, 2,4%) também apresentaram os antígenos c e e com expressões parciais e ausência do antígeno de alta frequência hr^B, devido a presença de um alelo *RHCE*ce^S* em *trans* com *RHCE*ceVS.01*, sendo potenciais doadores para pacientes aloimunizados que necessitem de transfusões *RHCE* variantes.

O alelo *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D* estava em *cis* com *RHCE*ce^S* em 3 doadores R₁r (3/217, 1,4%) que apresentaram a expressão normal do antígeno C, devido a presença em *trans* do alelo *RHCE*Ce*. Destaca-se um doador (identificado como 110 - Tabela 20) que apresentou o raro alelo *RHCE*Ce.30* (c.733C>G) pouco descrito na literatura.

Por fim, o doador 211 fenotipado como R₀r apresentou o alelo *RHCE*ce^S* em *cis* com *RHD*DIIIa*, que codifica antígeno D parcial.

Tabela 20 - Representação dos haplótipos *RH* dos doadores que apresentaram o alelo *RHCE*ce^S* (*RHCE*ceVS.03* ou *RHCE*ceVS.05*).

Doador	Fenótipo Rh	c.48G>C (Éxon 1 <i>RHCE</i>)	RHc	RHC	c.410C>T (Éxon3 <i>RHD</i>)	c.455A>C (Éxon 3 híbrido <i>RHD-CE</i>)	c.602C>G (Éxon 4 <i>RHD</i>)	c.733C>G (Éxon 5 <i>RHCE</i>)	c.1006G>T (Éxon 7 <i>RHCE</i>)	Haplótipos <i>RH</i>		Fenótipo Deduzido
										<i>RHD</i>	<i>RHCE</i>	
9	DCcee	G/C	+	-	C/T	+	C	C/G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.03 ce</i>	C parcial, V-,VS+
14	DCcee	G	+	-	C/T	+	C	C/G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.05 ce</i>	C parcial, V-,VS+
64	DCcee	G/C	+	+	C/T	+	C	C/G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.05 Ce</i>	c parcial, V-,VS+
67	DCcee	G/C	+	-	C/T	+	C	G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.03 ceVS.01</i>	C/c/e parciais, hr ^B - V+, VS+
69	DCcee	G	+	-	C/T	+	C	G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.05 ceVS.01</i>	C/c/e parciais, hr ^B - V+, VS+
88	DCcee	G	+	-	C/T	+	C	C/G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.05 ce</i>	C parcial, V-,VS+
93	DCcee	G/C	+	+	C/T	+	C	C/G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.05 Ce</i>	c parcial, V-,VS+
100	DCcee	G	+	-	C/T	+	C	G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.05 ceVS.01</i>	C/c/e parciais, hr ^B - V+, VS+
110	DCcee	G/C	+	+	C/T	+	C	G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.05 Ce.30</i>	c parcial, V+,VS+
179	DCcee	G/C	+	-	C/T	+	C	G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.03 ceVS.01</i>	C/c/e parciais, hr ^B - V+, VS+
180	DCcee	G	+	-	C/T	+	C	G	G/T	<i>DIIIa-CE(4-7)-D RHD.01</i>	<i>ceVS.05 ceVS.01</i>	C/c/e parciais, hr ^B - V+, VS+
211	Dcee	G	+	-	C/T	+	C/G	C/G	G/T	<i>DIIIa RHD.01</i>	<i>ceVS.05 ce</i>	V-, VS+, DAK+

4.5 Genotipagem do polimorfismo c.-67T>C do gene *FY*

Foi realizada a busca do polimorfismo c.-67T>C na região promotora do gene *FY* (alelo *FY*02N.01*), o GATA-box, que pertence ao sistema sanguíneo Duffy, em 214 (214/217, 98,6%) doadores de sangue. Este polimorfismo está associada a não expressão eritróide do alelo *FY*B* e ao fenótipo nulo do sistema Duffy, Fy(a-b-), comum em indivíduos de ancestralidade africana.

A mutação estava presente em heterozigose (mutado/selvagem-MW) em 93 doadores (93/214, 43%) e em homozigose (mutado/mutado –MM) em 64 doadores (64/214, 30%) totalizando 157 amostras mutadas (157/214, 73%). O alelo selvagem/selvagem (WW) estava presente em 57 doadores (57/214, 27%).

O cálculo de frequência alélica revelou taxa de 0,484 para o alelo selvagem (c.-67T) e de 0,516 para o alelo mutado (c.-67C).

4.6 Impacto da genotipagem do alelo *FY*02N.01* para identificação de doadores *RHCE* variantes

A diversidade alélica e genotípica do gene *RHCE* foi semelhante entre os grupos MM, MW e WW (Tabelas 21 e 22). Da mesma forma, foi verificada distribuição homogênea de doadores com genótipos variantes de *RHCE* dentre os grupos MM (33/64, 51,56%), MW (47/93, 50,5%) e WW (27/57, 47,37%), conforme demonstrado na Figura 11, com valor de $p=0,89$.

Se considerarmos genótipos *RHCE* variantes clinicamente relevantes, ou seja, codificando antígenos parciais ou ausência de antígenos de alta frequência, a distribuição entre os grupos também foi homogênea: MM (18/64, 28,1%); MW (19/93, 20,4%) e WW (10/57, 17,5%) ($p=0,5$) (Figura 11).

Tabela 21 - Diversidade alélica do gene *RHCE* na população de doadores que foram genotipados para o alelo *FY*02N.01*.

Alelos <i>RHCE</i> (% de alelos)					
MM (128 alelos)		MW (186 alelos)		WW (114 alelos)	
Alelo <i>RHCE</i>	Quantidade	Alelos <i>RHCE</i>	Quantidade	Alelos <i>RHCE</i>	Quantidade
<i>RHCE*ce</i>	45 (35,2%)	<i>RHCE*ce</i>	66 (35,5%)	<i>RHCE*ce</i>	42 (36,8%)
<i>RHCE*Ce</i>	25 (19,5%)	<i>RHCE*Ce</i>	50 (26,9%)	<i>RHCE*Ce</i>	31 (27,2%)
<i>RHCE*ce.01</i>	17 (13,3%)	<i>RHCE*ce.01</i>	23 (13,4%)	<i>RHCE*ce.01</i>	14 (12,3%)
<i>RHCE*ceVS.01</i>	15 (11,7%)	<i>RHCE*ceVS.01</i>	25 (12,4%)	<i>RHCE*ceVS.01</i>	14 (12,3%)
<i>RHCE*ceVS.02</i>	9 (7%)	<i>RHCE*ceVS.02</i>	11 (6%)	<i>RHCE*ceAR</i>	6 (5,3%)
<i>RHCE*ceVS.05</i>	5 (3,9%)	<i>RHCE*ceAR</i>	4 (2,2%)	<i>RHCE*ceVS.02</i>	3 (2,6%)
<i>RHCE*ceAR</i>	5 (3,9%)	<i>RHCE*ceVS.05</i>	3 (1,6%)	<i>RHCE*ceTI</i>	2 (1,7%)
<i>RHCE*ceTI</i>	3 (2,3%)	<i>RHCE*ceVS.03</i>	1 (0,5%)	<i>RHCE*ceVS.05</i>	1 (0,9%)
<i>RHCE*ceVS.03</i>	2 (1,6%)	<i>RHCE*ceSM</i>	1 (0,5%)	<i>RHCE*ceMO</i>	1 (0,9%)
<i>RHCE*ceEK</i>	1 (0,8%)	<i>RHCE*ceTI tipo 2 like</i>	1 (0,5%)		
<i>RHCE*Ce.30</i>	1 (0,8%)	<i>RHCE*ceEK</i>	1 (0,5%)		

Tabela 22 - Diversidade genotípica do gene *RHCE* na população de doadores que foram genotipados para o alelo *FY*02N.01*.

Genótipos <i>RHCE</i> (% de indivíduos)					
MM (64 doadores)		MW (93 doadores)		WW (57 doadores)	
Genótipos <i>RHCE</i>	Quantidade	Genótipos <i>RHCE</i>	Quantidade	Genótipos <i>RHCE</i>	Quantidade
<i>RHCE*Ce/RHCE*ce</i>	12 (18,8%)	<i>RHCE*Ce/RHCE*ce</i>	26 (27,9%)	<i>RHCE*Ce/RHCE*ce</i>	18 (31,6%)
<i>RHCE*ce/RHCE*ce</i>	7 (10,9%)	<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ce</i>	10 (10,8%)	<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*Ce</i>	7 (12,3%)
<i>RHCE*Ce/RHCE*ce.01</i>	7 (10,9%)	<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*Ce</i>	10 (10,8%)	<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ce</i>	6 (10,5%)
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ce</i>	7 (10,9%)	<i>RHCE*Ce/RHCE*ce.01</i>	9 (9,7%)	<i>RHCE*ce/RHCE*ce</i>	5 (8,8%)
<i>RHCE*ce.01/RHCE*ce</i>	5 (7,8%)	<i>RHCE*ce/RHCE*ce</i>	7 (7,5%)	<i>RHCE*Ce/RHCE*ce.01</i>	4 (7%)
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ce</i>	3 (4,7%)	<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ce</i>	6 (6,4%)	<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce</i>	3 (5,3%)
<i>RHCE*ce.01/RHCE*ce.01</i>	2 (3,1%)	<i>RHCE*ce.01/RHCE*ce.01</i>	4 (4,3%)	<i>RHCE*ce/RHCE*ce.01</i>	2 (3,5%)
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.03</i>	2 (3,1%)	<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*Ce</i>	3 (3,2%)	<i>RHCE*ce.01/RHCE*ce.01</i>	2 (3,5%)
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.01</i>	2 (3,1%)	<i>RHCE*ce/RHCE*ce.01</i>	3 (3,2%)	<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce.01</i>	2 (3,5%)
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce</i>	2 (3,1%)	<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce</i>	2 (2,1%)	<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ce</i>	2 (3,5%)
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*Ce</i>	2 (3,1%)	<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.01</i>	2 (2,1%)	<i>RHCE*ceTI/RHCE*ce</i>	1 (1,75%)
<i>RHCE*ceTI/RHCE*Ce</i>	2 (3,1%)	<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ce.01</i>	2 (2,1%)	<i>RHCE*ceTI/RHCE*ce.01</i>	1 (1,75%)
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*ce</i>	2 (3,1%)	<i>RHCE*ceEK/RHCE*ce</i>	1 (1,1%)	<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.05</i>	1 (1,75%)
<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*ceVS.01</i>	2 (3,1%)	<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*ce</i>	1 (1,1%)	<i>RHCE*ceMO/RHCE*ce.01</i>	1 (1,75%)
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceVS.01</i>	1 (1,6%)	<i>RHCE*ceSM/RHCE*ce</i>	1 (1,1%)	<i>RHCE*ceAR/RHCE*Ce</i>	1 (1,75%)
<i>RHCE*ceAR/RHCE*ceAR</i>	1 (1,6%)	<i>RHCE*ceVS.03/RHCE*ce</i>	1 (1,1%)	<i>RHCE*ceVS.02/RHCE*Ce</i>	1 (1,75%)
<i>RHCE*ceEK/RHCE*Ce</i>	1 (1,6%)	<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.05</i>	1 (1,1%)		
<i>RHCE*ceVS.01/RHCE*ceVS.05</i>	1 (1,6%)	<i>RHCE*ceTI tipo 2 like/RHCE*ce</i>	1 (1,1%)		
<i>RHCE*ceTI/RHCE*ce.01</i>	1 (1,6%)	<i>RHCE*ceAR/RHCE*Ce</i>	1 (1,1%)		
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce</i>	1 (1,6%)	<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce</i>	1 (1,1%)		
<i>RHCE*ceVS.05/RHCE*Ce.30</i>	1 (1,6%)	<i>RHCE*ceAR/RHCE*ce.01</i>	1 (1,1%)

Figura 11 - Distribuição dos genótipos *RHCE* variantes de relevância clínica dentre os grupos MM, MW e WW.

Observou-se que a frequência de indivíduos cujo fenótipo predito apresentava ausência dos antígenos de alta prevalência hr^B ou hr^S diferiu significativamente entre os grupos: 66,7% foram identificados no grupo MM (8/12), 25% foram identificados no grupo MW (3/12) e 8,3% foram identificados no grupo WW (1/12) ($p=0,0076$). A Tabela 23 mostra a distribuição dos genótipos que levam a ausência dos antígenos de alta frequência nos grupos MM, MW e WW.

Tabela 23 - Distribuição dos indivíduos com genótipos *RHCE* variantes que não codificam antígenos de alta frequência do sistema Rh dentre os grupos MM, MW e WW.

Alelo <i>FY*02N.01</i>	Genótipos <i>RHCE</i> que leva ausência de antígenos de alta frequência do sistema Rh
MM	8 (66,7%)
MW	3 (25%)
WW	1 (8,3%)

Aplicando a ferramenta estatística Número Necessário para Rastrear (NNR), verificamos que para identificar um indivíduo com genótipo *RHCE* variante que codificasse fenótipos de interesse clínico (utilizando como critério de seleção raça autodeclarada, fenótipo Rh e genótipo c.-67T>C) seria necessário rastrear 3,5 doadores no grupo MM, 4,8 doadores no grupo MW e 5,7 doadores no grupo WW. No entanto, o NNR para identificar um doador sem um antígeno de alta frequência (hr^B ou hr^S) foi 8 no grupo MM, 31 no grupo MW e 57 no grupo WW. Este resultado demonstra ser interessante realizar a busca de doadores com ausência de antígenos de alta frequência nos indivíduos com genótipo Duffy nulo / MM (*FY*02N.01/ FY*02N.01*) ou sorologicamente Fy(a-b-).

A proporção de amostras nas quais os alelos que codificam a falta de antígenos de alta frequência (*RHCE*ceVS.01*, *RHCE*ceVS.02*, *RHCE*ceVS.03*, *RHCE*ceVS.05* e *RHCE*ceAR*) estavam em *trans* com alelo *RHCE* não alterado ou com um alelo alterado que não leva a ausência de antígenos de alta frequência foi maior nos grupos MW e WW (92,7% e 95,7%) em relação ao grupo MM (70,4%) ($p=0,01$).

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo padronizar uma estratégia de rastreamento de doadores de sangue autodeclarados de raça negra para alelos variantes do gene *RHCE*, utilizado como critério de seleção a raça autodeclarada e o fenótipo Rh (R_{1r} e R_{0r}). Foram identificados 170 alelos (170/434, 39%) variantes de *RHCE*, sendo os mais frequentes: *RHCE***ce.01* (55/434, 12,7%), *RHCE***ceVS.01* (54/434, 12,4%), *RHCE***ceVS.02* (23/434, 5,3%) e *RHCE***ceAR* (15/434, 3,5%).

Neste estudo foi observado que 64,5% dos doadores selecionados (140/217) apresentaram pelo menos um alelo *RHCE* alterado; 49,3% (107/217) apresentaram genótipos que codificam fenótipos Rh variantes; e 21,6% (47/217) apresentaram genótipos que codificam fenótipos Rh variantes de relevância clínica (antígenos parciais e/ ou ausência de antígenos de alta frequência). Aplicando os critérios de seleção raça autodeclarada e fenótipo Rh, o Número Necessário para Rastrear (NNR), para encontrar um doador com fenótipo RhCE variante de relevância clínica foi de 4.

Foram identificados 47 doadores (47/217, 21,6%) cujo genótipo *RH* predizia fenótipos de relevância clínica e, dentre estes, 11 (11/217, 5%) doadores não expressariam o antígeno de alta frequência hr^B e 1 doador (1/217, 0,5%) não expressaria o antígeno hr^S .

Os antígenos hr^B e hr^S estão expressos em torno de 98% da população (não são expressos no alelo *RHCE***cE*) e a ausência destes antígenos podem levar a não expressão dos antígenos Hr^B e Hr que estão presentes virtualmente em 100% da população (expresso em todos os alelos de *RHCE*)^{6,95}.

A ausência dos antígenos de alta frequência hr^S , hr^B , Hr e Hr^B é evento não incomum dentre os pacientes portadores da doença falciforme, podendo levar ao

desenvolvimento de anticorpos complexos quando em contato com eritrócitos de doadores, dificultando o atendimento transfusional e aumentando as taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes^{96,97}.

Estudo semelhante ao nosso, que também analisou doadores de sangue com genótipo *RHCE* variante, foi realizado em 2014 por Kappler-Gratias *et al*⁷² do Instituto Nacional de Transfusão de Sangue da França. Os autores buscaram alelos variantes de *RHCE* por *DNA-array* em 316 doadores com ancestralidade africana fenotipados como Fy(a-b-) e encontraram 46 (46/316, 14,5%) doadores com pelo menos um alelo *RHCE* variante, sendo os alelos mais comuns: *RHCE*ce^S* (10/46, 21,7%), *RHCE*ceTI* (10/46, 21,7%) e *RHCE*ceMO* (9/46, 19,5%). Em dois doadores (2/316, 0,6%) foram evidenciados genótipos que levavam à perda de expressão dos antígenos de alta frequência do sistema Rh.

Em 2016, Gaspardi *et al*⁶² do Hemocentro de Campinas publicaram um estudo de rastreamento de alelos *RHCE* variantes em 280 doadores de ancestralidade africana por técnica de *DNA-array* e encontraram 35 doadores (35/280, 12,5%) com ao menos um alelo mutado, sendo que o mais frequente foi *RHCE*ceVS.02*, que estava presente em 14 amostras (14/70, 20%). Os autores evidenciaram três doadores (3/280, 1,1%) com o genótipo que levava a ausência ou fraca expressão do antígeno hr^B.

Em 2018, Chou *et al*⁶⁰ do Hospital Infantil da Filadélfia publicaram um estudo de busca de alelos *RH* variantes em 587 doadores afrodescentes por *DNA-array* e identificaram 25% de alelos *RHD* alterados e 49% de alelos *RHCE* alterados. Os alelos mais frequentemente identificados foram: *RHCE*ce01*, *RHCE*ceVS.01* e *RHCE*ceAG*.

Por fim, em 2019, Cruz *et al*⁷⁵ do Hemocentro da Universidade Federal de São Paulo buscaram alelos variantes dos genes *RHD* e *RHCE* em 198 doadores de diferentes raças usando a metodologia de Amplificação Multiplex de Sondas

Dependente de Ligação (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – MLPA) com confirmação por sequenciamento direto. O grupo identificou 50 doadores (50/198, 25,3%) com ao menos um alelo *RHCE* alterado, sendo que os alelos mais frequentes foram: *RHCE*ce.01* (22/396, 5,5%) e *RHCE*ceVS.01* (15/396, 3,7%). Genótipos que levavam a fenótipos variantes de relevância clínica foram observados em 13 doadores (13/198, 6,6%), e destes, 3 doadores (3/198, 1,5%) apresentaram ausência ou fraca expressão do antígeno de alta frequência hr^B.

Comparando nossos resultados aos da literatura, podemos concluir que a estratégia de busca de doadores com genótipo *RHCE* variante apresentada no presente estudo foi eficaz. Por exemplo, nos estudos citados de Gaspari *et al*⁶² e Kappler-Gratias *et al*⁷², verifica-se que foi necessária uma amostragem de 280 e 316 doadores afrodescendentes para encontrarem no máximo três genótipos que não expressassem antígenos de alta frequência. Nos nossos resultados apresentados, encontramos doze genótipos que não expressam os antígenos de alta frequência hr^B (11 doadores), hr^S (1 doador) e possivelmente Hr^B e Hr em um universo de 217 doadores.

Os alelos *RHCE* variantes encontrados nos estudos anteriores com foco também em doadores afrodescendentes condiz com a frequência encontrada no nosso trabalho, sendo que os alelos mais frequentes foram: *RHCE*ce01* e *RHCE*ceVS.01*.

As altas frequências de alelos e genótipos *RHCE* variantes encontradas no presente estudo mostram que a seleção de doadores com base nos critérios de raça autodeclarada e fenótipo Rh (R₁r e R₀r) foi eficaz para a identificação de variantes do sistema Rh, mesmo sendo uma população miscigenada o objeto de estudo. Aproximadamente um quarto (47/217, 21,6%) dos indivíduos de raça negra incluídos (1,9% do total de 2,500 doadores de sangue) apresentaram genótipos que codificavam fenótipos variantes de relevância clínica. Estes doadores são de

grande importância para o atendimento transfusional dos pacientes aloimunizados portadores de genótipos variantes. A taxa de genótipos *RHCE* variantes identificados (140/217, 64,5%) foi superior à descrita anteriormente em doadores de sangue afro-americanos e afro-brasileiros, provavelmente refletindo o impacto do fenótipo Rh como critério de inclusão^{60,62,76}. Comparando nossos resultados com estudos anteriores com foco também em populações miscigenadas, a frequência de fenótipos RhCE clinicamente relevante identificados foi significativamente maior: 21,6% do presente trabalho frente a 6,6% do estudo do Cruz *et al*⁷⁵ e a 1,5% do estudo da Gaspardi *et al*⁶², também refletindo o impacto da seleção dos doadores com base nos fenótipos R₁r e R₀r.

Este estudo foi o primeiro a analisar o impacto da inclusão do genótipo Duffy nulo (*FY*02N.01/ FY*02N.01*) como critério para seleção de doadores para o rastreamento de variantes de *RHCE*. O alelo *FY*02N.01* é um marcador informativo de ancestralidade africana que poderia refinar a busca por doadores de ancestralidade africana em população miscigenada como a brasileira, em que a raça autodeclarada pode ser inacurada. Observamos em nossos resultados que o grupo que apresentou o genótipo Duffy nulo (*FY*02N.01/ FY*02N.01* – MM) ou o fenótipo Fy(a-b-) esteve associado com maior frequência a genótipos *RHCE* variantes que levavam a ausência de antígenos de alta frequência, sendo a frequência de doadores com fenótipo presumido hr^B- e hr^S- oito vezes maior no grupo com genótipo Duffy nulo em comparação com o grupo sem mutação (WW).

Assim sendo, se o objetivo do rastreamento de variantes *RH* é a identificação de doadores cujo genótipo *RHCE* prediz ausência de antígenos de alta frequência (na população estudada, a maioria representada pelos alelos *RHCE*ceVS.01*, *RHCE*ceVS.02*, *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceVS.05* e *RHCE*ceVS.03*, em homozigose ou heterozigose composta), a estratégia de seleção de doadores

pelo genótipo Duffy nulo ou fenótipo Fy(a-b-), além da raça autodeclara e fenótipo Rh, parece ser vantajosa.

No nosso estudo também foi feita a pesquisa de alelos *RHD* variantes quando da presença dos seguintes alelos *RHCE* variantes: *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceEK*, *RHCE*ceMO*, *RHCE*ceTI*, *RHCE*ceVS.03*, *RHCE*ceVS.05* e *RHCE*ceSM*, dada a alta associação em literatura destes alelos com variantes de *RHD* (*RHD*DAR*, *RHD*DAU0*, *RHD*DIVa*, *RHD*DIIIa*, *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D* e *RHD*DOL*). Um estudo para verificar associação de variantes de *RHCE* com variantes *RHD* foi realizado em 2016 por Arnoni *et al*⁷⁶, que realizaram a genotipagem dos genes *RHD* e *RHCE* em 421 doadores de sangue do Estado de São Paulo que apresentavam discrepância na tipagem RhD. O grupo encontrou taxa de 53,4% de variantes do gene *RHCE* associados com variantes de *RHD*. Em literatura, algumas associações de variantes *RHCE-RHD* são bem estabelecidas: *RHCE*ceTI* com *RHD*DIVa*⁸², *RHCE*ceAR* ou *RHCE*ceEK* com *RHD*DAR*⁸⁴, *RHCE*ceMO* com *RHD*DAU0*⁸¹, *RHCE*ceSM* com *RHD*DOL*⁸³ e *RHCE*ceVS.03/RHCE*ceVS.05* com *RHD*DIIIa* ou *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D*³⁹. Os resultados do presente estudo mostraram as mesmas associações de haplótipos *RH* descritas na literatura, a única exceção foi o alelo *RHCE*ceTI like tipo 2* (*RHCE*ceVS.04*) associado com *RHD*DV*, o que não foi descrito previamente.

Este estudo utilizou como estratégia inicial para busca de doadores com genótipo *RHCE* variante o sequenciamento direto dos éxons 1, 5, 6, e 7 do gene *RHCE* pela metodologia de Sanger. No entanto, para fins de triagem, os custos associados ao sequenciamento não são atraentes. Com base nos resultados apresentados, podem-se elaborar alguns fluxogramas para busca de doadores com genótipo *RH* variante usando, para rastreamento, técnicas moleculares convencionais, com menor custo.

Nossos resultados mostram que o polimorfismo c.733C>G localizado no éxon 5 de *RHCE* está associado com a maior parte dos casos de variantes que levam a ausência dos antígenos de alta frequência. Sendo assim, uma estratégia de rastreamento de variantes *RH* utilizando técnica de PCR-RFLP para detectar o polimorfismo c.733C>G (Figura 12) permitiria a identificação dos principais alelos encontrados no estudo: *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceVS.01*, *RHCE*ceVS.02*, *RHCE*ceVS.03*, *RHCE*ceVS.05*, *RHCE*ceTI tipo 2* e *RHCE*ceCF*.

Se esta estratégia fosse aplicada na população avaliada pelo presente estudo, do total de 217 doadores, encontraríamos 14 (14/217, 6,4%) doadores com o polimorfismo c.733C>G em homozigose e, destes, 12 (12/14, 85,7%) apresentariam ausência de antígenos de alta frequência. O NNR para identificar um doador com ausência de antígenos de alta frequência seria de 18,1.

Figura 12 - Fluxograma 1 - Estratégia de Busca de doadores *RHCE* variantes com base na presença do polimorfismo c.733C>G.

No Fluxograma 2 (Figura 13), apresenta-se uma sugestão de estratégia de busca de alelos variantes de *RHCE* mais ampliada em relação ao Fluxograma 1, com detecção de alelos *RHCE* menos frequentes (*RHCE**ceEK, *RHCE**ceMO, *RHCE**ceSM, *RHCE**ceAG) que também levam à perda de expressão de antígenos de alta frequência do sistema Rh.

Por último, elaboramos uma estratégia de busca de alelos variantes de *RHCE* baseando-se na presença do genótipo Duffy nulo ou fenótipo Fy(a-b-)(Figura 14). Se este fluxograma fosse aplicado à população do estudo, seriam selecionados 64 doadores (64/214, 29,9%) com o fenótipo Fy(a-b-) ou com genótipo *FY**02N.01/

*FY*02N.01*. Dentre estes, 10 (10/64, 15,6%) apresentariam o polimorfismo c.733C>G em homozigose, e, destes, 8 (8/10, 80%) seriam classificados como não expressando antígenos de alta frequência. O NNR para encontrar um doador com ausência de antígeno de alta frequência dentre o grupo de doadores com genótipo Duffy nulo seria de 8.

Figura 13 - Fluxograma 2 - Estratégia ampliada de busca de doadores *RHCE* variantes.

Figura 14 - Fluxograma 3 - Estratégia de busca de doadores *RHCE* variantes com base no polimorfismo c.-67T>C, GATA-box.

Analisando as sugestões de fluxogramas para identificar doadores *RHCE* variantes, podemos inferir que a possibilidade de encontrar um doador com ausência de antígenos de alta frequência usando os critérios pré-estabelecidos (raça autodeclarada e fenótipo Rh) é maior nos Fluxogramas 1 e 2 (média de 18,1 doadores para encontrar 1 doador hr^B- ou hr^S-) do que no Fluxograma 3 (média de

24 doadores para encontrar 8 doadores MM e, destes, 1 doador pode ser hr^B- ou hr^S-). O fluxograma 3 é vantajoso para os serviços de hemoterapia que fenotipam os seus doadores para os antígenos Fy^a e Fy^b, pois os doadores que são Fy(a-b-) já pertencem ao grupo MM (*FY*02N.01/FY*02N.01*), podendo ir diretamente para a busca do polimorfismo c.733C>G.

Para a realização do presente trabalho tivemos custo de insumos total em torno de R\$44.201,77 e custo por amostra em torno de R\$50,38. Os materiais e reagentes utilizados e envolvidos nesta análise de custo parcial estão descritos na Tabela 24. É necessário ressaltar que esta análise não levou em consideração os custos relacionados à mão-de-obra e aos equipamentos utilizados. Em 2019, Quirino *et al*⁹⁸ publicaram um estudo comparativo de custos entre as técnicas moleculares de genotipagem (PCR-SSP, PCR-RFLP e *DNA-array*) e as técnicas convencionais de hemaglutinação. Para realização da genotipagem para os sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd utilizando a metodologia de PCR-SSP o valor chegou a U\$18.07 ($\cong$ R\$72,28) por amostra; pelo PCR-RFLP, o valor foi de U\$38,22 ($\cong$ R\$152,88) por amostra; pelo *DNA-array* o valor foi de U\$65,46 ($\cong$ R\$261,84) por amostra; e pela técnica convencional de fenotipagem, o valor foi de U\$32,45 ($\cong$ R\$130,00) por amostra. Frente a estes valores, podemos considerar que o custo por amostra do nosso estudo é atraente com grande possibilidade de implantação da nossa metodologia pelos serviços de hemoterapia.

Como síntese dos resultados, pode-se afirmar que estratégia de busca de doadores *RHCE* variantes utilizando como critério de seleção raça autodeclarada e fenótipo Rh mostrou-se ser viável principalmente em uma população miscigenada como a brasileira, sendo que os doadores identificados poderão atender a demanda transfusional de pacientes aloimunizados com genótipos *RHCE* variantes que necessitem de transfusões de unidades variante-idênticas, aumentando a

segurança transfusional. O genótipo Duffy nulo (*FY*02N.01/ FY*02N.01*) ou fenótipo Fy(a-b-) também pode ser considerado um importante critério de seleção de doadores para a busca de fenótipos que não expressem antígenos de alta frequência do sistema Rh, sendo especialmente indicado aos serviços que já realizam a fenotipagem de rotina para os antígenos do sistema Duffy.

Tabela 24 - Relação parcial dos custos para realização do estudo.

Especificação	Material	Fabricante	Número de teste	Observação	Custo	Custo unitário
Geral	Luvas Latex M (02 unid)	Supermax			R\$ 37,98	R\$ 0,17
	Luvas Nitrilica M (02 unid)	Supermax			R\$ 53,80	R\$ 0,24
	Caixa Coletora 7litros (02unid)	Descarpack			R\$ 12,30	R\$ 0,05
	Ponteiras com filtro 0,1ul a 10ul	OLEN	Média de 20 racks com 96 unidades		R\$ 458,60	R\$ 0,24
	Ponteiras com filtro 10ul a 100ul	OLEN	Média de 20 racks com 96 unidades		R\$ 454,00	R\$ 0,23
	Ponteiras com filtro 100ul a 1000ul	OLEN	Média de 12 racks com 96 unidades		R\$ 351,72	R\$ 0,31
	Microtubos 0,2ul e 1,5ul	OLEN	Média de 2 pacotes de 1000unid para cada tamanho de tubo		R\$ 662,08	R\$ 0,20
	Ponteiras sem filtro 5ul- 200ul	OLEN	Média de 3 pacotes de 1000 unidades		R\$ 26,40	R\$ 0,01
Extração DNA	Extração por Kit coluna (Pure Link™)	Invitrogen	217	Capacidade 250 extração	R\$ 2.147,85	R\$ 8,59
PCR	DNTP's	Invitrogen	1,209 (1ul por teste)	Capacidade 2500 testes	R\$ 1.479,00	R\$ 0,60
	Primers (11 sense e antisense)	Invitrogen	2,143 (1ul por teste)	Capacidade > 3000 testes	R\$ 1.100,00	R\$ 0,51
		Promega (200ul)	648 (0,3ul por teste)	Capacidade 666 testes	R\$ 1.034,00	R\$ 1,55
	Taq Polimerase	Invitrogen (200ul)	475 (0,3ul por teste)	Capacidade 666 testes	R\$ 880,00	R\$ 1,32
		Quiagen (50ul)	84 (0,5ul por teste)	Capacidade 100 testes	R\$ 623,00	R\$ 6,23
	Enzima de Restrição <i>Sty I</i>	Biolabs	214(0,5ul por amostra)	Capacidade 600 testes	R\$ 524,27	R\$ 0,87
Gel	Agarose (500g)	Sigma	971 (18 geis - 1,5g/2,0g)	Capacidade 333 geis (1,5g)	R\$ 1.981,00	R\$ 5,93
	TEB 1X (10 litros)		18 geis (100ml por gel)	Capacidade 100 geis	R\$ 172,00	R\$ 1,72
	Brometo de Etidio (10ml)	Sigma	18 geis (2ul por gel)	Capacidade 5 mil geis	R\$ 209,00	R\$ 0,04
	Ladder 100pb (100ul)	Invitrogen	72 (5ul por teste)	Capacidade 100 testes	R\$ 391,38	R\$ 3,91
	Ladder 50pb (100ul)	Invitrogen	27 (5ul por teste)	Capacidade 100 testes	R\$ 539,84	R\$ 5,39
	Poliacrilamida (500g)	Invitrogen	214 (27 geis)	Diluição 40%- capacidade 937 geis	R\$ 1.295,94	R\$ 1,38
	Temed (25ml)	Sigma	214 (2ul por gel)	Capacidade 12.500 geis	R\$ 142,00	R\$ 0,01
	APS (25g)	Sigma	214 (50 ul por gel)	Diluição 10% - 5.000 geis	R\$ 112,00	R\$ 0,02
Sequenciamento	ExoSAP-IT (2ml)	Applied Biosystems	958 (2ul por teste)	Capacidade 1000 testes	R\$ 3.942,00	R\$ 3,94
	BigDye (1600ul)	Applied Biosystems	958 (1ul por teste)	Capacidade 1600 testes	R\$ 11.070,00	R\$ 6,91
	Etanol Abslouto (1L)	Merck	958 (40ul por teste)	Diluição 70% - > 100 mil testes	R\$ 130,91	R\$ 0,01
	Reação de Sequenciamento	Applied Biosystems	958	Rede Premium USP -R\$ 15,00 por teste	R\$ 14.370,00	RS 15,00
TOTAL					R\$ 44.201,07	R\$ 50,38

6 CONCLUSÕES

Considerando os objetivos do presente trabalho, podemos concluir que:

a) A seleção de doadores para a busca de genótipo *RH* variante com base em raça autodeclarada e fenótipo Rh (R_1r e R_0r) é eficaz e representa estratégia atraente para ser implementada em populações miscigenadas. A utilização da fenotipagem Rh como critério de seleção de doadores a serem genotipados representa o diferencial do presente estudo em relação aos previamente apresentados em literatura;

b) O genótipo Duffy nulo é critério útil de seleção de doadores para busca de genótipo *RHCE* variante predizendo ausência dos antígenos de alta frequência hr^B e hr^S , podendo ser aplicado por hemocentros em que a fenotipagem de doadores para antígenos do sistema Duffy seja rotina;

c) Os doadores com genótipo *RH* variante identificados poderão atender a demanda transfusional dos pacientes brasileiros aloimunizados que necessitem de transfusões de unidades variante-idênticas ou negativas para antígenos de alta frequência do sistema Rh. A transfusão com unidades variante-idênticas potencialmente levará a diminuição nas taxas de aloimunização e de reações transfusionais hemolíticas, aumentando a segurança transfusional;

d) Os custos parciais envolvidos na aplicação da estratégia de rastreamento de doadores com genótipo *RH* variante apresentada no estudo são atraentes, tornando esta metodologia acessível para uso na rotina de outros hemocentros brasileiros.

REFERÊNCIAS

1. Castilho L, Junior PJ, Reid ME. Fundamentos de Imuno-hematologia. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2015.
2. Bonifacio SL, Novaretti MCZ. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. Rev Bras de Hematol Hemoter. 2009;31:104-111.
3. Roback JD, Combs M, Grossman BJ, Hillyer C. Technical manual of the American Association of Blood Banks. 16th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2008.
4. Girello AL, Kuhn TIBB. Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária. 2ª ed. São Paulo: Editora Senac São Paulo; 2002.
5. Daniels G, Reid ME. Blood groups: the past 50 years. Transfusion. 2010;50:281-9.
6. Daniels G. Human blood groups. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 2013.
7. Moulds JM. Future of molecular testing for red blood cell antigens. Clin Lab Med. 2010;30:419-29.
8. Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajjhala P, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, *et al*. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. Transfusion. 2005;45:680-8.
9. Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, Costa FF, Pellegrino JJr, Castilho L. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. Vox Sang. 2009;97:147-52.
10. Karpasitou K, Drago F, Crespiatico L, Paccapelo C, Truglio F, Frison S, *et al*. Blood group genotyping for Jk(a)/Jk(b), Fy(a)/Fy(b), S/s, K/k, Kp(a)/Kp(b), Js(a)/Js(b), Co(a)/Co(b), and Lu(a)/Lu(b) with microarray beads. Transfusion. 2008;48:505-12.
11. St-Louis M. Molecular blood grouping of donors. Transfus Apher Sci. 2014;50:175-82.

12. Veldhuisen B, van der Schoot CE, de Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang*. 2009;97:198-206.
13. Drago F, Karpasitou K, Poli F. Microarray Beads for Identifying Blood Group Single Nucleotide Polymorphisms. *Transfus Med Hemother*. 2009;36:157-160.
14. Jungbauer C, Hobel CM, Schwartz DW, Mayr WR. High-throughput multiplex PCR genotyping for 35 red blood cell antigens in blood donors. *Vox Sang*. 2012;102:234-42.
15. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet*. 2009;26:729-42.
16. Denomme GA, Johnson ST, Pietz BC. Mass-scale red cell genotyping of blood donors. *Transfus Apher Sci*. 2011;44:93-9.
17. Hopp K, Weber K, Bellissimo D, Johnson ST, Pietz B. High-throughput red blood cell antigen genotyping using a nanofluidic real-time polymerase chain reaction platform. *Transfusion*. 2010;50:40-6.
18. Finning K, Daniels G. Molecular blood grouping. *Transfus Apher Sci*. 2014;50:146-7.
19. Shehata N, Denomme GA, Hannach B, Banning N, Freedman J. Mass-scale high-throughput multiplex polymerase chain reaction for human platelet antigen single-nucleotide polymorphisms screening of apheresis platelet donors. *Transfusion*. 2011;51:2028-33.
20. Reid ME. Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;171-7.
21. International Society of Blood Transfusion (ISBT) -Table of blood group systems. [citado 2019 Ago 31]. Disponível em: https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Table_of_blood_group_systems_v6.0_6th_August_2019.pdf
22. International Society of Blood Transfusion (ISBT) - Table of blood group antigens. [citado 2019 Ago 31]. Disponível em: https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Table_of_blood_group_antigens_wthin_systems_v9_12th_July_2019.pdf

23. Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel WA, Garraty G, Francis CL, *et al.* International Society of blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Berlin report. *Vox Sang.* 2011;101:77-82.
24. Simsek S, Faas BH, Bleeker PM, Overbeeke MA, Cuijpers HT, Van der Schoot CE, *et al.* Rapid RhD genotyping by polymerase chain reaction-based amplification of DNA. *Blood.* 1995;29:75-80.
25. Petz LD, Garratty G. Immune hemolytic anemias. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004.
26. Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. *J Am Med Assoc.* 1939;113:126-7.
27. Urbaniak SJ, Robertson AE. A successful program of immunizing Rh-negative male volunteers for anti-D production using frozen/thawed blood. *Transfusion.* 1981;21:64.
28. Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology.* 2004;20:23-36.
29. Avent ND, Reid ME. The Rh Blood group system: a review. *Blood.* 2000;95:375-387.
30. Conroy MJ, Bullough PA, Merrick M, Avent ND. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *Br J Haematol.* 2005;131:543-551.
31. Flegel WA . Molecular genetics and clinical applications for *RH*. *Transfus Apher Sci.* 2011;44:81-91.
32. Avent ND . New insight into the Rh system: structure and function. *ISBT Sci Ser.* 2007;2:35-43.
33. Mouro I, Colin Y, Cherif-Zahar B. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nature Genetic.* 1992;5:62-65.
34. Wolter LC, Hyland CA, Saul A. Refining the DNA polymorphisms that associate with the rhesus c phenotype. *Blood.* 1994;84:985-6.

35. Simsek S, Jong CA, Cuijpers HT. Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNAs coding for Rh polypeptides and demonstration of E/e and C/c polymorphisms. *Vox Sang*. 1994;67:203-209.
36. Wagner FF, Flegel WA. *RHD* gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 2000;95(12):3662-3668.
37. Okuda H, Suganuma H, Kamesaki T, Kumada M, Tsudo N, Omi T, *et al*. The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and recombination events between *RHD* and *RHCE* genes through complete sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;274:670-683.
38. Suto Y, Ishikawa Y, Hyodo H, Uchikawa M, Juji T. Gene organization and rearrangements at the human Rhesus blood group locus revealed by fiber-FISH analysis. *Hum Genet*. 2000;106:164-171.
39. Reid M, Lomas-Francis C, Olsson M. *The Blood Group Antigen Facts Book*. 3rd ed. New York: Elsevier; 2012.
40. Flegel WA. The genetics of the rhesus blood group system. *Dtsch Arztebl*. 2007;104:651-7.
41. International Society Blood Transfusion - Blood Group Allele Tables (*RHD* e *RHCE*). [citado 2019 Ago 31]. Disponível em: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>
42. Noizat-Pirenne F, Tournamille C. Relevance of *RH* variants in transfusion of sickle cell patients. *Transfus Clin Biol*. 2011;18:527-535.
43. Muller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eichner NI, Flegel WA, Schonitzer D, *et al*. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three central European populations. *Transfusion*. 2001;41:45-52.
44. Flegel WA, Wagner FF. Molecular Biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin Lab*. 2002;48:53-9.
45. Wagner FF, Frohmayer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Müller TH, Siegel MH, *et al*. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*. 2000;95:2699-2708.

46. Hemker MB, Ligthart 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*. 1999;94:337-42.
47. 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*. 1998;91:157-68.
48. Mouro I, Le Van Kim C, Rouillac C. Rearrangements of the blood group RhD gene associated with the DVI category phenotype. *Blood*. 1994;83:1129-35.
49. Rouillac C, Colin Y, Hughes-Jones NC, Boelet MD, Ambrosio AM, Cartron JP, *et al*. Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid RhD-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood*. 1995;85:937-44.
50. Becker EAM, Faas BHW, Simser S, Overbeeker MAM, Van Rhernen DJ. The genetic basic of a new partial D antigen: DDBT. *Br J Haematol*. 1996;93:720-27.
51. Huang CH, Chen Y, Reid M. Human *DIIIa* Erythrocytes: RhD Protein is Associated With Multiple Dispersed Amino Acid Variations. *Am J Hematol*. 1997;55:139-145.
52. Hung, CH, Phillip, Z, Cheng Y. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. *Semin Hematol*. 2000;37:150-65
53. Westhoff, CM. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. *Transfusion*. 2004;44:1663-72.
54. Daniels GL, Faas BHW. Green CA, Smart E, Maaskant-vanWijk PA, Avent ND, *et al*. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion*. 1998;3:951-58.
55. Westhoff CM. The structure and function of the antigen complex. *Semin Hematol*. 2007;44:42-50.
56. Pham B-N, Peyrard T, Tourret S, Beolet M, Many H, Juszczak G, *et al*. Anti-Hr^B and anti-hr^B revisited. *Transfusion*. 2009;49:2400-05.
57. Moores P. Rh18 and hr^S Blood Groups and Antibodies. *Vox Sang*. 1994;66:225-230.

58. Chou ST, Jackson T, Vege S, Smith-Whitley K, Friedman DF, Westhoff CM. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood*. 2013;122:1062–71.
59. Reid ME, Hipsky CH, Hue-Royce K, Hoppe C. Genomic analyses of *RH* alleles to improve transfusion therapy in patients with sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2014;52:195-202.
60. Chou ST, Evans P, Vege S, Coleman SL, Friedman DF, Keller M. *RH* genotype matching for transfusion support in sickle cell disease. *Blood*. 2018;132:1198-207.
61. Sippert E, Fujita CR, Machado D, Guelsin G, Gaspardi AC, Junior JP, *et al*. Variant RH alleles and Rh immunisation in patients with sickle cell disease. *Blood Transf*. 2015;13:72-7.
62. Gaspardi AC, Sippert EA, Macedo MD, Pellegrino JJr, Costa FF, Castilho L. Clinically relevant *RHD-CE* genotypes in patients with sickle cell disease and in African Brazilian donors. *Blood Transfus*. 2016;14:449-54.
63. Dezan MR, Ribeiro IH, Oliveira VB, Vieira JB, Gomes FC, Franco LAM, *et al*. *RHD* and *RHCE* genotyping by next-generation sequencing is an effective strategy to identify molecular variants within sickle cell disease patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2017;65:8-15.
64. Murao M, Viana MB. Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38:675-82.
65. Dezan MR, Oliveira VB, Bianchi JVS, Rodrigues V, Solano JH, Gomes FC, *et al*. Effectiveness of a red cell antigen-matching transfusion protocol in sickle cell disease patients. *ISBT Sci Ser*. 2016;11:132-139.
66. Aygun B1, Padmanabhan S, Paley C, Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. *Transfusion*. 2002;42:37-43.
67. Garratty G. Severe reactions associated with transfusion of patients with sickle cell disease. *Transfusion*. 1997;37:357–361.
68. Flickinger C, Petrone T, Church A. Review: American rare donor program. *Immunohematology*. 2004;20:239–43.

69. Meny GM, Flickinger C, Marcucci C. The American Rare Donor Program. *J Crit Care*. 2013;28:110.
70. Castilho L. Rare donor program in Brazil. *Immunohematology*. 2016;32:11-12.
71. Arnoni CP, Latini FRM, Muniz JG, Person RDM, Vendrame TAP, Gazito D, *et al*. A simple approach to screen rare donos in Brazil. *Immunohematology*. 2015;31:20-23.
72. Kappler-Gratias S, Auxerre C, Dubeaux I, Beolet M, Ripaux M, Pennec PYL, *et al*. Systematic RH genotyping and variant identification in French donors of African origin. *Blood Transfusion*. 2014;12:264-72.
73. Fichou Y, Maréchal CL, Scotet V, Jamet D, Férec C. Insights into *RHCE* Molecular Analysis in Samples with Partial D Variants: the Experience of Western France. *Transfus Med Hemother*. 2015;42:372–377.
74. Pham B-N, Peyrard T, Juszczak G, Beolet M, Deram G, Stéphanie M-B, *et al*. Analysis of RhCE variants among 806 individuals in France: considerations for transfusion safety, with emphasis on patients with sickle cell disease. *Transfusion*. 2011;51:1249–60.
75. Cruz BR, Silva TCS, Castro BS, Chiba AK, Moritz E, Braga JP, *et al*. Molecular matching for patients with haematological diseases expressing altered *RHD-RHCE* genotypes. *Vox Sang*. 2019;114:605-15.
76. Arnoni CP, Muniz JG, Vendrame TAP, Person RM, Latini FRM, Castilho L. *RHCE* variants inherited with altered *RHD* alleles in Brazilian blood donors. *Transfus Med*. 2016;26:285–290.
77. Westhoff CM, Silberstein LE, Wylie DE, Skavdahl M, Reid ME. 16Cys encoded by the *Rhce* gene is associated with altered expression of e antigen and is frequent in the R0 haplotype. *Br J Haematol*. 2001;113:666-71.
78. Faas BHW, Beckers EAM, Wildoer P, Ligthart PC, Overbeeke MAM, Zondervan HA, *et al*. Molecular background of VS and weak C expression in lacks. *Transfusion*. 1997;37:38-44.
79. International Society Blood Transfusion - Blood Group Allele Tables – ISBT Number 004 (*RHCE* Blood Group System). [citado 2019 Ago 31]. Disponível em: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/004_RHCE_alleles_v4.0_180208.pdf

80. Hipsky CH, Lomas-Francis C, Fuchisawa A, Reid ME, Moulds M, Christensen J, *et al.* *RHCE*ceCF* encodes partial c and partial e but not CELO an antigen antithetical to Crawford. *Transfusion*. 2011;51:25–31.

81. Westhoff CM, Vege S, Horn T, Hue-Roye K, Lomas-Francis C, *et al.* *RHCE*ceMO* is frequently in cis to *RHD*DAU0* and encodes a hr^S- , hr^S- , RH:–61 phenotype in black persons: clinical significance. *Transfusion*. 2013;53:2983-89.

82. Westhoff CM, Vege S, Halter Hipsky C. *RHCE*ceTI* encodes partial c and partial e and is often in cis to *RHD*DIVa*. *Transfusion*. 2013; 53:741-746.

83. Roussel M, Poupel S, Nataf J, Juszczak G, Woimant G, Mailloux A, *et al.* *RHD*DOL1* and *RHD*DOL2* encode a partial D antigen and are in cis with the rare *RHCE*ceBI* allele in people of African descent. *Transfusion*. 2013;53(2):363-372.

84. Hemker MB, Ligthart PC, Berger L, Van Rhenen DJ, Van der Schoot CE, Wijk PA. *DAR*, a new RhD variant involving exons 4, 5, and 7, often in linkage with *ceAR*, a new Rhce variant frequently found in African blacks. *Blood*. 1999;94:4337-4342.

85. Horuk R, Colby TJ, Darbonne WC, Schall TJ, Neote K. The human erythrocyte inflammatory peptide (chemokine) receptor. Biochemical characterization solubilization, and development of a binding assay for the soluble receptor. *Biochemistry*. 1993;32(22):5733-8.

86. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003.

87. National Institutes of Health- US National Library of Medicine – dbSNP(Short Genetic Variations). [citado 2019 Set 05]. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2814778#frequency_tab

88. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna, V, Pogo O. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood*. 1995;85:615 621.

89. Iwamoto S, Li J, Omi T, Ikemoto S, Kajii E. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. *Blood*. 1996;87:378 385.

90. Peiper SC, Wang ZX, Neote K, Martin AW, Showell HJ, Conklyn MJ, *et al.* The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J Exp Med.* 1995;181:1311-1317.

91. Rios M, Chaudhuri A, Mallinson G, Hannon J, Rosenberger S, Reid M, *et al.* New genotypes in Fy(a- b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either *FYA* or *FYB*. *Br J Haematol.* 2000;108:448-454.

92. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Three molecular structures cause rhesus D category VI phenotypes with distinct Immunohematologic features. *Blood.* 1998;91:2157-2168.

93. Legler TJ, Maas JH, Kohler M, Wagner T, Daniels GL, Perco P, *et al.* *RHD* sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. *Transfus Med.* 2001;11:383-388.

94. Tax MG, van der Schoot CE, van Doorn R, Douglas-Berger L, van Rhenen DJ, Maaskant-vanWijk PA. RhC and Rhc genotyping in different ethnic groups. *Transfusion.* 2002;42:634-44.

95. Pham BN, Peyrard T, Tourret S, Beolet M, Many H, Juszcak G, Roussel M, *et al.* Anti-Hr^B and anti-hr^B revisited. *Transfusion.* 2009;49:2400-2405.

96. Nickel SR, Hendrickson JE, Fasano RS, Meyer EK, Winkler AN, Yee MM, *et al.* Impact of red blood cell alloimmunization on sickle cell disease mortality: a case series. *Transfusion.* 2016;56:107-14.

97. Telen MJ, Afenyi-Annan A, Garrett ME, Combs MR, Orringer EP, Ashley-Koc AE. Alloimmunization in sickle cell disease: changing antibody specificities and association with chronic pain and decreased survival. *Transfusion.* 2015;55:1378-1387.

98. Quirino MG, Colli CM, Macedo LC, Sell AM, Visentainer JEL. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2019;41:44-49.

APÊNDICES

Apêndice A: Manuscrito submetido às revistas científicas: Transfusion, Vox Sanguinis e Transfusion and Apheresis Science.

Effectiveness of strategies to screen for blood donors with *RH* variants in a mixed population

Fabio Augusto Abreu de Almeida^{1,2}, Marcia Regina Dezan¹, Valeria Brito Oliveira^{1,2}, Cecilia Salete Alencar², Fabio Luz¹, José Eduardo Krieger³, Alexandre Costa Pereira³, Ester Cerdeira Sabino², Vanderson Rocha^{4,5}, Alfredo Mendrone-Júnior², Carla Luana Dinardo^{1,2*}

1. Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brazil
2. Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, Brazil
3. Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), São Paulo, Brazil
4. Serviço de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Hospital das Clinicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil
5. Department of Hematology, Churchill Hospital, NHS BT, Oxford University, Oxford, United Kingdom

*** Corresponding author**

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155, 1st floor

Pinheiros, São Paulo, SP, Brazil

ZipCode 05403-000

carlaluana@usp.br

Word Count: 3,928

Figures: 3

Tables: 6

Running head: *RH* variants in blood donors

The authors declare no conflicts of interest

Abstract

Background: *RH* variants are a significant cause of red blood cell (RBC) alloimmunization. Not rarely Rh-alloimmunized patients should be transfused with *RH* genotype-matched units requiring screening for *RH* variants among blood donors. Strategies to identify donors with *RH* variants have not been extensively explored, especially in mixed populations. Our goal was to: 1) Screen for blood donors with relevant *RH* variants in a mixed population using self-declared race and Rh phenotype as selection criteria; and 2) Verify if including the Duffy null genotype in the screening algorithm increases its effectiveness.

Methods: Donors were included in the study if self-declared as black and phenotyped as R₀r or R₁r. All individuals were genotyped for *RHCE* exons 1, 5, 6 and 7 through Sanger sequencing. *RHD* variants were searched for in cases of altered *RHCE*. All donors were genotyped for the *FY*B* c.-67T>C polymorphism.

Results: Two hundred and seventeen blood donors were enrolled. Fifty-three (24.4%) had a predicted clinically relevant Rh phenotype (partial antigens or lack of high frequency antigens). Twelve donors (5.5%) had a predicted RhCE phenotype lacking either hr^B (11 donors) or hr^S (1 donor). Most cases with predicted lack of high frequency antigens (66.7%) occurred in donors with the Duffy null genotype.

Conclusion: Selecting blood donors based on self-declared race and Rh phenotype is a feasible and effective strategy to identify *RH* variants in a racially mixed population. Including the Duffy null genotype as selection criteria is indicated in the search of *RH* genotypes predicting lack of high frequency antigens.

Introduction

The RH system is complex and the diversity of variant *RH* alleles is high, especially among people of African ancestry [1, 2]. The RH system comprises 55 antigens of which D (RH1), C (RH2), E (RH3), c (RH4) and e (RH5) are the most immunogenic and relevant to transfusion practice. The *RH* locus is composed of two homologous genes: *RHD*, encoding the D antigen and *RHCE*, encoding the antigens C, E, c, e and the other antigens of the system. The frequency of structural variations (gene conversions, insertions and deletions) and single nucleotide polymorphisms involving *RHD* and *RHCE* are high, giving rise to a wide diversity of variant antigens. Rh antibodies are considered clinically relevant due to the association with hemolytic transfusion reactions and hemolytic disease of the fetus and newborn.

To date, more than 200 variant *RHD* and 80 *RHCE* have been described, encoding partial, weak or low frequency antigens and/or proteins lacking high frequency antigens. These are clinically relevant since their presence may justify the occurrence of post-transfusion alloimmunization and, potentially, post-transfusion hemolysis.

The frequency of red blood cell (RBC) alloimmunization among sickle cell disease (SCD) patients is high [3, 4]. The factors underlying the predisposition to alloantibody development in these patients are multiple, but are mainly due to the red blood cell (RBC) phenotype and racial mismatch between patients and blood donors; as well as the intense chronic inflammation status and high prevalence of *RH* variants among SCD patients [5-7]. It has been previously demonstrated that over 80% of SCD patients have at least one altered *RHD* or *RHCE* allele [8], justifying the development of Rh antibodies irrespective of the use of transfusion antigen (C, c, E, e; K; Fya, Fyb; Jka, Jkb; S, s) compatible RBC units. In the presence of alloantibodies formed as a result of *RH* variants, especially if directed to high frequency antigens, SCD patients may need the transfusion of *RH*-matched units. In addition,

the high prevalence of altered *RH* alleles begs the question of whether alloimmunization preventive strategies should be first-line standard of care for these individuals.

Recent evidence has shown that the *RH* allele diversity and frequency in a large US cohort of SCD patients were similar to those found in black blood donors and significantly different from those found in white donors [9]. Providing SCD patients with *RH*-compatible RBC units was proved feasible with a donor pool comprised primarily of self-declared black donors [9]. This strategy, if applied prophylactically, would mitigate RBC alloimmunization in the SCD patient population as long as extended antigen-matched units were provided. Nonetheless, the costs associated with *RH* genotyping of blood donors is a major limitation of this strategy. Literature lacks more reports of screening for *RH* variants among blood donors of different populations, especially racially mixed.

The main goal of this study was to provide empirical data reporting the results of a predefined strategy to screen for blood donors with *RH* variant genotype in a mixed population using self-declared race and Rh phenotype as selection criteria. As a secondary goal, we evaluated if including the Duffy null genotype (*FY*02N.01/FY*02N.01*) as inclusion criteria would increase the effectiveness of the screening protocol in identifying donors with clinically relevant *RH* genotype. The *FY*02N.01* allele is an ancestry-informative marker extremely prevalent among people of African descent that could possibly refine self-reported race as inclusion criteria for the screening protocol.

Methods

Donor recruitment

This study was conducted according to the Helsinki principles and approved by our local ethics committee. Two thousand five hundred blood donors registered at the reference hemocenter (Fundação Pró-Sangue São Paulo Hemocenter, São Paulo, Brazil) were selected

for the study. Of these, 217 were included in the study according to the inclusion criteria, which were: 1) Black as self-declared race; 2) Blood type O; 3) RH phenotype R_1r (DCcee) or R_0r (Dccee). R_0r was chosen as selection criteria because it is the most prevalent RH phenotype among Blacks [1, 8, 9], whereas R_1r was selected aiming to identify individuals with r'S type I genotype, an important *RH* variant in SCD patient population.

RH phenotyping

All selected donors were phenotyped for D, C, c, E, e through microplate hemagglutination method in an automated equipment (NEO, Immucor, Norcross, GA, EUA), according to the manufacturer's instructions.

DNA extraction

DNA was isolated using the Genomic PureLink kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Concentration and purity of the genomic DNA was checked through spectrophotometry (Nanodrop 1000, Wilmington, DE, USA). All DNA samples were diluted until a final concentration of 100ng/mL for the genotyping assays.

*FY*02N.01 genotyping*

Two hundred and fourteen donors were genotype for the c.-67T>C polymorphism of the *FY*B* promoter region (*FY*02N.01* allele) and classified as mutated/mutated (MM), mutated/wild type (MW) and wild-type/wild-type (WW). The RFLP genotyping protocol was described elsewhere [10].

RH genotyping

The direct sequencing of *RHCE* exons 1, 5, 6 and 7 was performed through the Sanger method for all included donors. These exons were selected because they contained the gene variations involved in the *RHCE* variants most commonly identified among SCD patients, as described in Table1 [1, 8, 11, 12].

Previously described gene-specific primers and PCR conditions were used for exon amplification [13-15]. PCR products were purified using ExoSAP (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and prepared for sequencing in the ABI 3500xl equipment (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

A multiplex reaction designed to detect *RHD* variants was performed for all samples with the following *RHCE*: *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceTI*, *RHCE*ceEK*, *RHCE*ceMO*, *RHCE*ceSM*, *RHCE*ceVS.03* and *RHCE*ceVS.05* [16]. All donors presenting the alleles *RHCE*ceVS.03* or *RHCE*ceVS.05* were checked for the presence of the *RHDIIIa-CE(4-7)-D* allele in *cis* through previously described assays [17]. *RHD* direct sequencing was performed for all cases that could not be resolved based on conventional molecular methods, as previously described [13, 14].

Statistical Analysis

The variable Number Needed to Screen (NNS) was calculated to express how many donors would have to be selected (based on a certain criteria) and *RH* genotyped to identify one individual with the desired predicted phenotype.

The groups MM, MW and WW were compared in terms of numbers of donors with clinically relevant predicted RH phenotype using the Chi-square test held on the SPSS software (20th version). A *p* value less than 0.05 was considered as significant.

Results

Donor recruitment

Two hundred and seventeen blood donors were included in the study. Of these, 117 (54%) typed as R₁r and 100 (46%) typed as R₀r. All donors self-declared as black. Two hundred and fourteen donors were genotyped for *FY*B* c.-67T>C, as, in three cases, there was no DNA left for this assay.

***RHCE* variants**

One hundred and seventy altered *RHCE* alleles were identified in the study (170/434 genotyped alleles, 39.1%) (Table2). Most variant *RHCE* listed in Table1 were identified. One donor presented the variant *RHCE*ceSM*, that was not listed in Table1. The most frequent altered *RHCE* were *RHCE*ce.01* (55/434, 12.7%), *RHCE*ceVS.01* (54/434, 12.4%), *RHCE*ceVS.02* (23/434, 5.3%) and *RHCE*ceAR* (15/434, 3.4%) (Table2). There were 91 *RHCE* alleles encoding hr^B- phenotype (91/434 studied alleles, 20.9%): *RHCE*ceVS.01* (54/434, 12.4%), *RHCE*ceVS.02* (23/434, 5.3%), *RHCE*ceVS.05* (9/434, 2.1%), *RHCE*ceVS.03* (3/434, 0.7%), *RHCE*ceMO* (1/434, 0.2%) and *RHCE*ceTI type2-like* (1/434, 0.2%). There were 19 alleles encoding hr^S- phenotype (19/434, 4.37%): *RHCE*ceAR* (15/434, 3.5%), *RHCE*ceEK* (2/434, 0.5%), *RHCE*ceMO* (1/434, 0.2%) and *RHCE*ceSM* (1/434, 0.2%).

Among the included donors, 140 (64,5%) had at least one altered *RHCE* allele and 107 (49.3%) had predicted variant RhCE phenotype (Table3). Forty seven donors (47/217, 21.6%) had a predicted clinically relevant phenotype (partial antigens or lack of high frequency antigens) and the prevalence of clinically relevant altered *RHCE* was 26.3% (114 relevant alleles / 434 total genotyped alleles). Twelve donors (5.5%) had predicted RhCE phenotype lacking either hr^B (11 donors) or hr^S (1 donor) (Table3). The number needed to screen (NNS) to identify one hr^B- and one hr^S- donor using self-declared race and Rh phenotype as inclusion criteria was 19.7 and 217, respectively.

A summary of these results is displayed in Figure1.

RHD* variants in *cis* to altered *RHCE

Thirty six donors (n=72 alleles) were genotyped for *RHD*. The most frequently identified *RHD* were: *RHD*01* (31/72, 43%), *RHD*DAR* (15/72, 20.8%) and *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D* (11/72, 15.3%) (Table4). The *RH* haplotypes present in the donors with altered *RHCE*

(*RHCE*ceAR*, *RHCE*ceTI*, *RHCE*ceEK*, *RHCE*ceMO*, *RHCE*ceSM*, *RHCE*ceVS.03* e *RHCE*ceVS.05*) are shown in Table5.

*RHD*DAR* was in *cis* to *RHCE*ceAR* in 15 alleles (15/434 genotyped alleles, 3.5%). One donor (1/217 included donors, 0.4%) had the haplotype *RHD*DAR* / *RHCE*ceAR* in homozygosity, predicting a partial D, c, e and hr^S- phenotype. The *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D*, responsible for the expression of partial C, was detected in 11 of 12 donors presenting the *RHCE*ceVS.03* and *RHCE*ceVS.05* alleles. A total of 8 donors (8/217, 3.7%) had a predicted partial D phenotype.

In one case, *RHD*DV* was presumably in *cis* to *RHCE*ceTI* type 2-like, which is unusual.

Impact of Duffy null genotype as a selection criteria for the identification of *RH* variant blood donors

Two hundred and fourteen donors were genotyped for the *FY*02N.01* allele (c.-67T>C GATA mutation of *FY*B*). There were 64 donors genotyped as mutated/mutated - MM (64/214, 30%); 93 genotyped as mutated/wild-type – MW (93/214, 43%) and 57 genotyped as wild-type/wild-type –WW (57/214, 27%). The diversity and distribution of altered *RHCE* was similar between the MM, MW and WW groups (Table6). Similarly, the frequency of individuals with altered *RHCE* genotype was homogeneous between the groups MM (33/64, 51.56%), MW (47/93, 50.5%) and WW (27/57, 47.37%) ($p=0.89$).

The frequency of individuals lacking the high prevalence antigens hrB or hrS differed significantly between the groups: 66.7% were identified in the MM group (8/12); 25% were identified in the MW group (3/12) and 8.3% were identified in the WW group (1/12) ($p=0.0076$).

The number of donors needed to screen (NNS) to identify one individual with presumed clinically relevant RhCE phenotype using self-declared race, Rh phenotype and *FYB* c.-

67T>C genotype as selection criteria was 3.5 for the MM group, 4.8 for the MW group and 5.7 for the WW group. However, the NNS to identify one donor lacking a high frequency antigen (hr^B or hr^S) was 8 in the MM group, 31 in the MW group and 57 in the WW group. The proportion of samples in which the alleles encoding the lack of high frequency antigen (*RHCE*ceVS.01*, *RHCE.ceVS.02*, *RHCE*ceVS.03*, *RHCE*ceVS.05* and *RHCE*ceAR*) was in *trans* to either a non-altered *RHCE* or to an altered allele predicting the presence of high frequency antigens was higher in the groups MW and WW (92.7% and 95.7%) in comparison to MM group (70.4%) ($p=0.01$).

A summary of these results is displayed in Figure2.

Discussion

The present study aimed to standardize a strategy to identify *RH* variants among a highly mixed donor population. It was demonstrated that: 1) By selecting donors based on self-declared race and Rh phenotype (R_1r or R_0r), 64,5% (140/217) had at least one altered *RHCE* and 49.3% (107/217) had predicted variant RhCE phenotype; 2) The number needed to screen (NNS) to identify a donor with a clinically relevant RhCE phenotype (partial antigens and/or lack of high incidence antigens) was 4.1; 3) The inclusion of the Duffy null genotype or Fy(a-b-) phenotype as selection criteria together with self-declared race and Rh phenotype increased the chances of identifying donors lacking high frequency antigens (hr^B and hr^S); 4) The most prevalent *RHCE* variants identified among the selected donor population were: *RHCE*ce.01* (12.7%), *RHCE*ceVS.01* (12.4%), *RHCE*ceVS.02* (5.3%) and *RHCE*ceAR* (3.4%).

Previous studies have evaluated the frequency of *RH* variations among blood donors selected based on the self-declared race [9, 12]. The largest studies did not comprise racially mixed population such as Brazilian, in which there may be a significant error associated with self-referred race classification. In the present study, self-declared race and Rh phenotype were

used as selection criteria for the screening of *RHCE* altered alleles. Our results show that selecting donors based on these criteria is effective for the identification of *RH* variants in the scenario of a mixed population, as approximately one quarter (21.6%) of the included black individuals (1.9% of total pool of 2,500 blood donors) had predicted partial Rh antigens and/or lack of high frequency antigens and could be used to meet the needs of sensitized patients. The rate of altered *RHCE* alleles identified in the present study (64.7%) was superior to that previously described for both African-American and African-Brazilian donors, probably reflecting the impact of the Rh phenotype as inclusion criteria [9, 12, 18]. Comparing our results with previous studies also focusing on mixed populations, the prevalence of predicted clinically relevant altered Rh phenotype (partial antigens and/or lack of high frequency antigens) was significantly higher (21.6% versus 1.4 to 6.6%) [12, 19].

This study was the first to evaluate the impact of including the Duffy null genotype (*FY*02N.01/FY*02N.01*) as criteria for selecting donors for the search of predicted Rh variant phenotypes. The *FY*02N.01* allele is an ancestry-informative marker extremely prevalent among people of African descent. Its surrogate marker is the Fy(a-b-) phenotype, which can be easily accessed in the immunohematological routine. Our results showed that the prevalence of individuals with predicted lack of high frequency Rh antigens was eight times higher in the group presenting the Duffy null genotype in comparison to the non-mutated group of donors. As so, if the aim of the search for *RH* variant donors is to identify individuals whose genotype predicts the lack of Rh high frequency antigens (in the studied population mostly represented by *RHCE*ceVS.01*, *RHCE*ceVS.02*, *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceVS.05*, *RHCE*ceVS.03* and *RHCE*ceMO* in homozygosity or compound heterozygosity), then selecting donors based either on the Duffy null genotype or on the Fy(a-b-) phenotype, besides using the self-declared race and Rh phenotype criteria, seems advantageous.

In the present study, the initial option was to select donors based on pre-defined criteria (self-declared race and Rh phenotype) and to genotype, through direct sequencing, *RHCE* exons 1, 5, 6 and 7 to identify and accurately classify the variants most commonly found in our population of alloimmunized SCD patients. However, for screening purposes, the sequencing strategy is not very attractive. Based on the identified clinically relevant *RHCE*, a more reasonable strategy would be to test the selected donors for the c.733C>G polymorphism (using conventional molecular methods) in order to identify the homozygous individuals and, then, expand the *RH* genotyping using either DNA-array methods or direct sequencing of *RHCE* exons 1, 5 and 7. If this algorithm was applied in the present cohort of donors (n=217), 14 individuals would have been selected for extended *RH* genotyping, of whom 12 would have predicted lack of high frequency RH antigens. If only Fy(a-b-) donors were included (n=64), 10 would present the c.733C>G polymorphism in homozygosity and, of these, 8 would eventually be classified as lacking high frequency Rh antigens. The suggested workflow for screening for blood donors with clinically relevant *RH* variants in a mixed population is described in Figure3.

Finally, in this study, the distribution of *RHCE* variations among self-declared black blood donors stemming from a population of mixed origin could be determined. The most common altered *RHCE* alleles were (% of total altered alleles): *RHCE*ce.01* (12.7%), *RHCE*ceVS.01* (12.4%), *RHCE*ceVS.02* (5.3%), *RHCE*ceAR* (3.4%) and *RHCE*ceVS.05* (2.1%). The high frequency of both *RHCE*ce.01* and *RHCE*ceVS.01* alleles was in accordance with previous studies focusing on African-American blood donors [8, 9]. In our studied African-Brazilian donor population, though, the prevalence of *RHCE*ceAR* was much higher than that reported for African-American donors. Previous Brazilian cohorts of blood donors have also reported a higher frequency of *RHCE*ceAR*, suggesting this allele to be relatively frequent in our population [12, 19].

In conclusion, selecting blood donors based on self-declared race and RH phenotype is a feasible and effective alternative to screen for *RH* variants in a mixed population. The Duffy null genotype or the Fy(a-b-) phenotype is a helpful criteria to increase the likelihood of identifying donors lacking RH high frequency antigens.

References

- 1 Reid ME, Halter Hipsky C, Hue-Roye K, et al.: Genomic analyses of RH alleles to improve transfusion therapy in patients with sickle cell disease. *Blood cells, molecules & diseases* 2014; 52: 195-202.
- 2 Flegel WA: The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 2007; 5: 50-7.
- 3 Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, et al.: Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1990; 76: 1431-7.
- 4 Sakhalkar VS, Roberts K, Hawthorne LM, et al.: Allosensitization in patients receiving multiple blood transfusions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1054: 495-9.
- 5 Hendrickson JE, Hod EA, Perry JR, et al.: Alloimmunization to transfused HOD red blood cells is not increased in mice with sickle cell disease. *Transfusion* 2012; 52: 231-40.
- 6 Smith NH, Hod EA, Spitalnik SL, et al.: Transfusion in the absence of inflammation induces antigen-specific tolerance to murine RBCs. *Blood* 2012; 119: 1566-9.
- 7 M. R. Dezan VBO JVS, V. Rodrigues, J. H. Solano, F. C. Gomes, S. L. Bonifácio, J. E. Levi, S. F. M. Guallandro, J. E. Krieger, A. C. Pereira, E. C. Sabino, A. Mendrone-Júnior, C. L. Dinardo: Effectiveness of a red cell antigen-matching transfusion protocol in sickle cell disease patients. *ISBT Science Series* 2016; 11: 132-9.
- 8 Chou ST, Jackson T, Vege S, et al.: High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood* 2013; 122: 1062-71.
- 9 Chou ST, Evans P, Vege S, et al.: RH genotype matching for transfusion support in sickle cell disease. *Blood* 2018; 132: 1198-207.
- 10 Dinardo CL, Kerbaui MN, Santos TC, et al.: Duffy null genotype or Fy(a-b-) phenotype are more accurate than self-declared race for diagnosing benign ethnic neutropenia in Brazilian population. *International journal of laboratory hematology* 2017; 39: e144-e6.
- 11 Dezan MR, Ribeiro IH, Oliveira VB, et al.: RHD and RHCE genotyping by next-generation sequencing is an effective strategy to identify molecular variants within sickle cell disease patients. *Blood cells, molecules & diseases* 2017; 65: 8-15.
- 12 Gaspardi AC, Sippert EA, De Macedo MD, et al.: Clinically relevant RHD-CE genotypes in patients with sickle cell disease and in African Brazilian donors. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 2016; 14: 449-54.

- 13 Dezan MR, Guardalini LGO, Pessoa E, et al.: Evaluation of the applicability and effectiveness of a molecular strategy for identifying weak D and DEL phenotype among D- blood donors of mixed origin exhibiting high frequency of RHD*Psi. *Transfusion* 2018; 58: 317-22.
- 14 Legler TJ, Maas JH, Kohler M, et al.: RHD sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. *Transfusion medicine* 2001; 11: 383-8.
- 15 Wagner FF, Gassner C, Muller TH, et al.: Three molecular structures cause rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features. *Blood* 1998; 91: 2157-68.
- 16 Maaskant-van Wijk PA, Faas BH, de Ruijter JA, et al.: Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion* 1998; 38: 1015-21.
- 17 Tax MG, van der Schoot CE, van Doorn R, et al.: RHC and RHc genotyping in different ethnic groups. *Transfusion* 2002; 42: 634-44.
- 18 Prisco Arnoni C, Guilhem Muniz J, de Paula Vendrame TA, et al.: RHCE variants inherited with altered RHD alleles in Brazilian blood donors. *Transfusion medicine* 2016; 26: 285-90.
- 19 Cruz BR, de Souza Silva TC, de Souza Castro B, et al.: Molecular matching for patients with haematological diseases expressing altered RHD-RHCE genotypes. *Vox sanguinis* 2019.

Table1. *RHCE* variants most commonly identified among SCD patients that were selected to be screened for in the study

<i>RHCE</i>	Exons	Nucleotide Change	Aminoacid Change
<i>RHCE*ce.01</i>	1	48G>C	Trp16Cys
<i>RHCE*ceVS.01</i>	5	733C>G	Leu245Val
<i>RHCE*ceVS.02</i>	1	48G>C	Trp16Cys
	5	733C>G	Leu245Val
<i>RHCE*ceVS.03</i>	1	48G>C	Trp16Cys
	5	733C>G	Leu245Val
	7	1006G>T	Gly336Cys
<i>RHCE*ceVS.04</i>	1	48G>C	Trp16Cys
	5	733C>G	Leu245Val
	7	1025C>T	Thr342Ile
<i>RHCE*ceVS.05</i>	5	733C>G	Leu245Val
	7	1006G>T	Gly336Cys
<i>RHCE*ceAR</i>	1	48G>C	Trp16Cys
	5	712A>G	Met238Val
	5	733C>G	Leu245Val
	5	787A>G	Arg263Gly
	5	800T>A	Met267Lys
	6	916A>G	Ile306Val
<i>RHCE*ceEK</i>	1	48G>C	Trp16Cys
	5	712A>G	Met238Val
	5	787A>G	Arg263Gly
	5	800T>A	Met267Lys
<i>RHCE*ceCF</i>	1	48G>C	Trp16Cys
	5	697C>G	Gln233Glu
	5	733C>G	Leu245Val
<i>RHCE*ceMO</i>	1	48G>C	Trp16Cys
	5	667G>T	Val223Phe
<i>RHCE*ceTI</i>	1	48G>C	Trp16Cys
	7	1025C>T	Thr342Ile

Table2. *RHCE* alleles identified in the blood donor population selected using self-declared race and Rh phenotype

Alleles	Number of alleles (%)	<i>RHCE</i> predicted phenotype
<i>RHCE*ce</i>	156 (36%)	c+, e+
<i>RHCE*Ce</i>	108 (25%)	C+, e+
<i>RHCE*ce.01</i>	55 (12.7%)	weak e
<i>RHCE*ceVS.01</i>	54 (12.4%)	partial c, partial e, V+, VS+, hrB-
<i>RHCE*ceVS.02</i>	23 (5.3%)	partial c, partial e, V+, VS+, hrB-
<i>RHCE*ceAR</i>	15 (3.4%)	partial c, partial e, V+ ^w , VS-, hrS-
<i>RHCE*ceVS.05</i>	9 (2.1%)	partial e, V-, VS+, hrB-
<i>RHCE*ceTI</i>	5 (1.1%)	partial c, partial e
<i>RHCE*ceVS.03</i>	3 (0.7%)	partial c, partial e, V-, VS+, hrB-
<i>RHCE*ceEK</i>	2 (0.5%)	partial c, partial e, hrS-
<i>RHCE*ceSM</i>	1 (0.2%)	e+/-, hrS-, STEM+
<i>RHCE*ceMO</i>	1 (0.2%)	partial c, partial e, hrS-, hrB-
<i>RHCE*ceTI type2 like</i>	1 (0.2%)	partial e, V+, VS+, hrB-
<i>RHCE*Ce.30</i>	1 (0.2%)	V+, VS+

Table3. *RHCE* genotype of the blood donor population selected for the study using self-declared race and Rh phenotype

RHCE genotype	Number of Donors (%)	Presumed phenotype	Rh phenotype
<i>RHCE*Ce/*ce</i>	57 (26.3%)	C+, c+, e+	R ₁ r
<i>RHCE*Ce/*ce.01</i>	21 (9.6%)	C+, c+, e+	
<i>RHCE*ce/*ce</i>	20 (9.3%)	c+, e+	
<i>RHCE*ceVS.01/*ce</i>	19 (8.7%)	V+, VS+	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/*Ce</i>	19 (8.7%)	partial c, V+, VS+	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.02/*ce</i>	15 (6.9%)	V+, VS+	R ₀ r
<i>RHCE*ce.01/*ce</i>	10 (4.6%)	c+, e+	
<i>RHCE*ce.01/*ce.01</i>	8 (3.6%)	weak e	
<i>RHCE*ceAR/*ce</i>	7 (3.2%)	V ^W ₊	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.02/*Ce</i>	4 (1.9%)	partial c, V+, VS+	
<i>RHCE*ceVS.01/*ceVS.01</i>	4 (1.9%)	partial c, partial e, V+, VS+, hr ^B -	
<i>RHCE*ceVS.01/*ceVS.05</i>	3 (1.3%)	partial C*, partial e, V+ VS+, hr ^B -	R ₁ r
<i>RHCE*ceAR/*ce.01</i>	3 (1.3%)	variant e, V ^W ₊	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.01/*ceVS.03</i>	2 (0.9%)	partial C*, partial c, partial e, V+, VS+, hr ^B -	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.05/*ce</i>	2 (0.9%)	partial C*, V-, VS+	
<i>RHCE*ceTI/*Ce</i>	2 (0.9%)	partial c	
<i>RHCE*ceTI/*ce.01</i>	2 (0.9%)	variant e	R ₀ r
<i>RHCE*ceVS.02/*ce.01</i>	2 (0.9%)	variant e, V+, VS+	
<i>RHCE*ceVS.02/*ceVS.01</i>	2 (0.9%)	partial c, partial e, V+, VS+, hr ^B -	
<i>RHCE*ceVS.05/*Ce</i>	2 (0.9%)	partial c, V-, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceAR/*Ce</i>	2 (0.9%)	partial c, V ^W ₊	
<i>RHCE*ceEK/*Ce</i>	1 (0.5%)	partial c	
<i>RHCE*ceVS.03/*ce</i>	1 (0.5%)	partial C*, V-, VS+	R ₀ r
<i>RHCE*ceEK/*ce</i>	1 (0.5%)	c+, e+	
<i>RHCE*ceTI/*ce</i>	1 (0.5%)	c+, e+	
<i>RHCE*ceAR/*ceAR</i>	1 (0.5%)	partial c, partial e, V ^W ₊ , VS-, hr ^S -	
<i>RHCE*ceAR/*ceVS.01</i>	1 (0.5%)	partial c, partial e, V+, VS+	
<i>RHCE*ceSM/*ce</i>	1 (0.5%)	STEM ⁺ ₊ ^W	
<i>RHCE*ceTI type 2 like/*ce</i>	1 (0.5%)	V+, VS+	
<i>RHCE*ceMO/*ce.01</i>	1 (0.5%)	variant e	
<i>RHCE*ceVS.05/*Ce.30</i>	1 (0.5%)	partial c, V+, VS+	R ₁ r
<i>RHCE*ceVS.05/*ce</i>	1 (0.5%)	V-, VS+	R ₀ r

* In *cis* to *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D*

Table4. *RHD* alleles identified in the studied blood donor population

Alleles	Number of alleles (n/%)	Predicted Phenotype
<i>RHD*01</i>	31 (43%)	D
<i>RHD*DAR</i>	15 (20.8%)	partial D, DAK+
<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D</i>	11 (15.3%)	D-, C+
<i>deleted RHD</i>	8 (11.1%)	D-
<i>RHD*DIVa</i>	3 (4.2%)	partial D, Goa+
<i>RHD*DAU0</i>	1 (1.4%)	partial D
<i>RHD*DIIIa</i>	1 (1.4%)	partial D, DAK+
<i>RHD*DV</i>	1 (1.4%)	partial D
<i>RHD*DOLI</i>	1 (1.4%)	partial D

Table5. Altered *RH* haplotypes identified in the study

Number of Samples	<i>RH</i> Haplotypes			
	<i>RHD</i>		<i>RHCE</i>	
	<i>Allele1</i>	<i>Allele2</i>	<i>Allele1</i>	<i>Allele2</i>
5	<i>RHD</i> *DAR	<i>RHD</i> *Deletado	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>RHCE</i> *ce
3	<i>RHD</i> *DAR	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>RHCE</i> *ce.01
3	<i>RHD</i> *DIIIa-CE(4-7)-D	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceVS.05	<i>RHCE</i> *ceVS.01
2	<i>RHD</i> *DAR	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>RHCE</i> *ce
2	<i>RHD</i> *DAR	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>RHCE</i> *Ce
2	<i>RHD</i> *DIIIa-CE(4-7)-D	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceVS.03	<i>RHCE</i> *ceVS.01
2	<i>RHD</i> *DIIIa-CE(4-7)-D	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceVS.05	<i>RHCE</i> *ce
2	<i>RHD</i> *DIIIa-CE(4-7)-D	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceVS.05	<i>RHCE</i> *Ce
1	<i>RHD</i> *DIIIa-CE(4-7)-D	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceVS.05	<i>RHCE</i> *Ce.30
1	<i>RHD</i> *DIIIa	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceVS.05	<i>RHCE</i> *ce
1	<i>RHD</i> *DIIIa-CE(4-7)-D	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceVS.03	<i>RHCE</i> *ce
1	<i>RHD</i> *DAR	<i>RHD</i> *DAR	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>RHCE</i> *ceAR
1	<i>RHD</i> *DAR	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>RHCE</i> *ceVS.01
1	<i>RHD</i> *01	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceEK	<i>RHCE</i> *ce
1	<i>RHD</i> *01	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceEK	<i>RHCE</i> *Ce
1	<i>RHD</i> *DIVa	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceTI	<i>RHCE</i> *Ce
1	<i>RHD</i> *01	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceTI	<i>RHCE</i> *Ce
1	<i>RHD</i> *DIVa	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceTI	<i>RHCE</i> *ce
1	<i>RHD</i> *DIVa	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceTI	<i>RHCE</i> *ce.01
1	<i>RHD</i> *01	<i>RHD</i> *01	<i>RHCE</i> *ceTI	<i>RHCE</i> *ce.01
1	<i>RHD</i> *DV	<i>RHD</i> *Deleted	<i>RHCE</i> *ceTI type 2 like	<i>RHCE</i> *ce
1	<i>RHD</i> *DAU0	<i>RHD</i> *Deleted	<i>RHCE</i> *ceMO	<i>RHCE</i> *ce.01
1	<i>RHD</i> *DOLI	<i>RHD</i> *Deleted	<i>RHCE</i> *ceSM	<i>RHCE</i> *ce.01

Table 6. Distribution and diversity of RHCE alleles and genotype identified in the selected donor population according to the *FY*B* c.-67T>C genotype

RHCE genotype (% of individuals)					
MM group (n=64 donors)		MW group (n=93 donors)		WW group (n=57 donors)	
<i>RHCE*Ce/*ce</i>	12 (18.8%)	<i>RHCE*Ce/*ce</i>	26 (27.9%)	<i>RHCE*Ce/*ce</i>	18 (31.6%)
<i>RHCE*ce/*ce</i>	7 (10.9%)	<i>RHCE*ceVS.01/*Ce</i>	10 (10.8%)	<i>RHCE*ceVS.01/*Ce</i>	7 (12.3%)
<i>RHCE*Ce/*ce.01</i>	7 (10.9%)	<i>RHCE*ceVS.01/*ce</i>	10 (10.8%)	<i>RHCE*ceVS.01/*ce</i>	6 (10.5%)
<i>RHCE*ceVS.02/*ce</i>	7 (10.9%)	<i>RHCE*Ce/*ce.01</i>	9 (9.7%)	<i>RHCE*ce/*ce</i>	5 (8.8%)
<i>RHCE*ce.01/*ce</i>	5 (7.8%)	<i>RHCE*ce/*ce</i>	7 (7.5%)	<i>RHCE*Ce/*ce.01</i>	4 (7%)
<i>RHCE*ceVS.01/*ce</i>	3 (4.7%)	<i>RHCE*ceVS.02/*ce</i>	6 (6.4%)	<i>RHCE*ceAR/*ce</i>	3 (5.3%)
<i>RHCE*ce.01/*ce.01</i>	2 (3.1%)	<i>RHCE*ce.01/*ce.01</i>	4 (4.3%)	<i>RHCE*ce/*ce.01</i>	2 (3.5%)
<i>RHCE*ceVS.01/*ceVS.03</i>	2 (3.1%)	<i>RHCE*ceVS.02/*Ce</i>	3 (3.2%)	<i>RHCE*ce.01/*ce.01</i>	2 (3.5%)
<i>RHCE*ceVS.01/*ceVS.01</i>	2 (3.1%)	<i>RHCE*ce/*ce.01</i>	3 (3.2%)	<i>RHCE*ceAR/*ce.01</i>	2 (3.5%)
<i>RHCE*ceAR/*ce</i>	2 (3.1%)	<i>RHCE*ceAR/*ce</i>	2 (2.1%)	<i>RHCE*ceVS.02/*ce</i>	2 (3.5%)
<i>RHCE*ceVS.01/*Ce</i>	2 (3.1%)	<i>RHCE*ceVS.01/*ceVS.01*</i>	2 (2.1%)	<i>RHCE*ceTI/*ce</i>	1 (1.75%)
<i>RHCE*ceTI/*Ce</i>	2 (3.1%)	<i>RHCE*ceVS.02/*ce.01</i>	2 (2.1%)	<i>RHCE*ceTI/*ce.01</i>	1 (1.75%)
<i>RHCE*ceVS.05/*ce</i>	2 (3.1%)	<i>RHCE*ceEK/*ce</i>	1 (1.1%)	<i>RHCE*ceVS.01/*ceVS.05*</i>	1 (1.75%)
<i>RHCE*ceVS.02/*ceVS.01</i>	2 (3.1%)	<i>RHCE*ceVS.05/*ce</i>	1 (1.1%)	<i>RHCE*ceMO/*ce.01</i>	1 (1.75%)
<i>RHCE*ceAR/*ceVS.01</i>	1 (1.6%)	<i>RHCE*ceSM/*ce</i>	1 (1.1%)	<i>RHCE*ceAR/*Ce</i>	1 (1.75%)
<i>RHCE*ceAR/*ceAR</i>	1 (1.6%)	<i>RHCE*ceVS.03/*ce</i>	1 (1.1%)	<i>RHCE*ceVS.02/*Ce</i>	1 (1.75%)
<i>RHCE*ceEK/*Ce</i>	1 (1.6%)	<i>RHCE*ceVS.01/*ceVS.05*</i>	1 (1.1%)		
<i>RHCE*ceVS.01/*ceVS.05</i>	1 (1.6%)	<i>RHCE*ceTI type 2 like/*ce.01</i>	1 (1.1%)		
<i>RHCE*ceTI/*ce.01</i>	1 (1.6%)	<i>RHCE*ceAR/*Ce</i>	1 (1.1%)		
<i>RHCE*ceVS.05/*Ce</i>	1 (1.6%)	<i>RHCE*ceVS.05/*Ce</i>	1 (1.1%)		
<i>RHCE*ceVS.05/*Ce.30</i>	1 (1.6%)	<i>RHCE*ceAR/*ce.01</i>	1 (1.1%)		
RHCE alleles (% of alleles)					
MM group (n=128 alleles)		MW group (n=186 alleles)		WW group (n=114 alleles)	
<i>RHCE*ce</i>	45 (35.2%)	<i>RHCE*ce</i>	66 (35.5%)	<i>RHCE*ce</i>	42 (36.8%)
<i>RHCE*Ce</i>	25 (19.5%)	<i>RHCE*Ce</i>	50 (26.9%)	<i>RHCE*Ce</i>	31 (27.2%)
<i>RHCE*ce.01</i>	17 (13.3%)	<i>RHCE*ceVS.01</i>	25 (13.4%)	<i>RHCE*ce.01</i>	14 (12.3%)
<i>RHCE*ceVS.01</i>	15 (11.7%)	<i>RHCE*ce.01</i>	23 (12.4%)	<i>RHCE*ceVS.01</i>	14 (12.3%)
<i>RHCE*ceVS.02</i>	9 (7%)	<i>RHCE*ceVS.02</i>	11 (6%)	<i>RHCE*ceAR</i>	6 (5.3%)
<i>RHCE*ceVS.05</i>	5 (3.9%)	<i>RHCE*ceAR</i>	4 (2.2%)	<i>RHCE*ceVS.02</i>	3 (2.6%)
<i>RHCE*ceAR</i>	5 (3.9%)	<i>RHCE*ceVS.05</i>	3 (1.6%)	<i>RHCE*ceTI</i>	2 (1.7%)
<i>RHCE*ceTI</i>	3 (2.3%)	<i>RHCE*ceEK</i>	1 (0.5%)	<i>RHCE*ceVS.05</i>	1 (0.9%)
<i>RHCE*ceVS.03</i>	2 (1.6%)	<i>RHCE*ceVS.03</i>	1 (0.5%)	<i>RHCE*ceMO</i>	1 (0.9%)
<i>RHCE*ceEK</i>	1 (0.8%)	<i>RHCE*ceSM</i>	1 (0.5%)		
<i>RHCE*Ce.30</i>	1 (0.8%)	<i>RHCE*ceTI type 2 like</i>	1 (0.5%)

Figure1. Results of the screening of blood donors for RH variants based on self-declared race and Rh phenotype.

Figure2. Results of the screening of blood donors for RH variants based on self-declared race, Rh phenotype and Duffy null genotype.

Figure3. Suggested workflow for the screening for *RH* variants among blood donors originated from mixed population.

ANEXOS

Anexo A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Doação de Sangue

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Doação de Sangue

Declaro que:

- Entendi as questões formuladas e que as informações por mim prestadas são verdadeiras;
- Recebi informações verbais e por escrito sobre todo o processo de doação, seus efeitos adversos e orientações de como proceder;
- Tive a oportunidade de esclarecer todas as dúvidas pertinentes;
- Fui informado que no meu sangue serão realizados testes laboratoriais exigidos por lei para triagem de doenças infecto-contagiosas, os quais poderão, eventualmente, ter resultados falso-positivos. Em caso de resultados alterados nos meus exames ou nos do receptor do meu sangue, estou ciente que serei convocado para repetição dos testes. Caso não retorne, sei que minha ausência será informada à autoridade sanitária competente. Existem situações onde os exames não serão realizados, como amostra inadequada e bolsa de sangue cuja coleta não foi completada.

Permito que o meu nome seja incorporado a arquivo local ou nacional de potenciais doadores e que sejam retirados até 460 ml de

Caso meu sangue não seja utilizado para transfusão, permito sua utilização na produção, autorizada legalmente, de insumos e/ou hemoderivados.

[illegible]