

Karina Antero Rosa Ribeiro

***Análise molecular do gene RHCE e suas
variantes na população brasileira***

Campinas, 2005

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

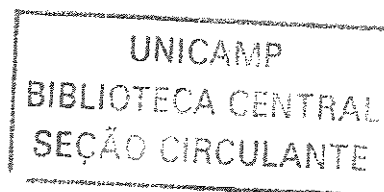
Karina Antero Rosa Ribeiro

***Análise molecular do gene RHCE e suas
variantes na população brasileira***

Dissertação apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas.

Orientação: Profa. Dra. Lílian Maria de Castilho

Campinas, 2005



UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
R354a
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 64794
PROC 16-P00086-05
C 2
PREÇO 11,00
DATA 20/04/05
Nº CPD _____

Bib. id. 358543

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R354a Ribeiro, Karina Antero Rosa
Análise molecular do gene RHCE e suas variantes na população
brasileira / Karina Antero Rosa Ribeiro. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Lílían Maria de Castilho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antígenos. 2. Anticorpos. 3. Gene. * I. Castilho, Lílían Maria
de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

*Gene substituído por :
genética de populações (G.P.)
Anticorpos por :
Imunoglobulinas.*

**“Jamais acharemos a verdade se nos
contentarmos com o que já existe.”**

Gilbert de Tournai, teólogo francês

Agradecimentos

À **Deus**, por me conceder saúde para viver.

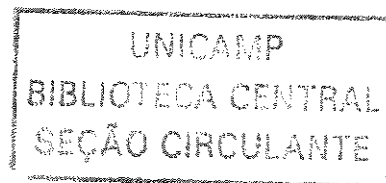
Aos **meus queridos pais Sérgio e Teresinha**, que dispuseram suas vidas a favor da minha, incentivando-me e estando sempre ao meu lado em todos os momentos, fossem eles de alegria ou de tristeza.

À **Profa. Dra. Lillian Maria de Castilho**, por ter me aceito como aluna, quando nem ao menos me conhecia. Por toda amizade dedicada, generosidade e disposição em me orientar neste e em outros trabalhos, que sempre foram conduzidos com liberdade de escolhas e guiados de forma a estimular meu crescimento profissional e acadêmico.

Ao meu amado **Rodrigo**, meu melhor amigo, fonte de carinho, respeito, confiança, apoio e amor.

Ao meu irmão **Bruno** pelo seu amor, carinho e amizade.

A **Dra. Marion Reid** e a **Kim Hue-Roy** (New York Blood Center), pela atenção e disposição em analisarem meus dados e ajudar-me a melhorá-los.

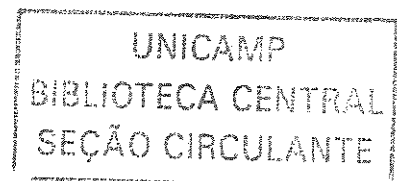


A colaboração do Hemocentro de Curitiba, em especial ao **Dr. Túlio** e sua equipe.

As minhas amigas/o e companheiras/o de laboratório: **Lidiane, Thaís, Fernanda, Alessandra, Lili e Gabriel**, pela amizade sempre presente, capaz de ouvir quando necessário e apoiar sempre que preciso.

A todos os funcionários e alunos de diversos setores do Hemocentro que dispuseram seu precioso tempo a meu favor, seja através do auxílio no desenvolvimento de técnicas, coleta de dados, conselhos ou dicas: **Magda, Maria de Fátima Locateli** (Imunohematologia), **Fernanda Pereira** (Citometria), **Dulcinéia, Heloísa, Ângela, Dilmara e Camila Oresco** (Biologia Molecular), amigos do Laboratório de Controle de qualidade, Citogenética, **Leonardo** (Informática), **Dr. Jordão Pellegrino Jr., Dr. Fernando Costa, Dra. Simone Gilli** e as demais pessoas que porventura indiretamente também estiveram presentes e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores que participaram da banca de qualificação desta dissertação: **Dra. Nicola Caran, Dra. Maria de Lourdes Borjas Castro** e ao **Dr. Vagner de Castro**.



*Trabalho realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp,
com auxílio financeiro da FAPESP (Processo 02/08930-2)*

Sumário

	<i>Página</i>
RESUMO.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
A. Material.....	24
1. Amostras.....	24
2. Anti-soros.....	24
3. Cartões Gel.....	25
4. Tampão LISS.....	25
5. Suspensão de hemácias.....	26
6. Diluição dos anti-soros.....	26
7. Easy DNA Kit	26
8. Gene Star Kit.....	26
9. Taq DNA Polimerase.....	27
10. DNTP.....	27
11. Primers.....	27
12. Enzimas de restrição.....	27
13. Trizol.....	28
14. Big Dye.....	28
15. SNAP Miniprep Kit.....	28

16. SuperScript II Kit.....	28
17. Concert rapid gel extraction system.....	28
18. Concert rapid PCR purification system.....	29
19. Sure Clone Kit de Clonagem.....	29
20. Marcadores Moleculares.....	29
21. Marcador de peso molecular Low Mass.....	29
22. Tampão Tris-Borato (TEB) 10x.....	29
23. Tampão Tris-Borato (TEB) 1x.....	30
24. Gel de agarose (1%, 1,5% e 2%).....	30
25. Gel de poliacrilamida 12%.....	30
B. Métodos.....	31
1. Fenotipagem eritrocitária Rh.....	32
2. Extração de DNA.....	32
3. Extração do RNA.....	34
4. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	34
5. Análise dos fragmentos de PCR após digestão enzimática.....	34
6. Genotipagem <i>RH Ee</i>	35
7. Genotipagem <i>RH Cc</i>	35
8. Seqüenciamento direto do DNA genômico.....	37
9. Síntese, amplificação e seqüenciamento de cDNAs.....	37
10. Subclonagem.....	37
11. Citometria de Fluxo.....	38
12. Cálculos de freqüências gênicas, ocorrência dos alelos RH e combinações alélicas.....	38

4. RESULTADOS.....	43
A. Resultados da genotipagem <i>RH Cc</i>	44
1. Comparação entre os resultados da fenotipagem e genotipagem <i>RH Cc</i> pela técnica de PCR multiplex.....	45
2. Comparação entre os resultados da fenotipagem e genotipagem <i>RH Cc</i> pela técnica de PCR-RFLP.....	46
B. Resultados da genotipagem <i>RH Ee</i>	47
C. Frequências gênicas dos alelos <i>RH Cc</i> e <i>RH Ee</i>	49
D. Caracterização molecular do antígeno JAL (RH48).....	50
E. Caracterização molecular do raro fenótipo Rh _{null}	52
5. DISCUSSÃO.....	57
A. Genotipagem <i>RH Cc</i>	58
B. Genotipagem <i>RH Ee</i>	60
C. Frequência gênica, combinações alélicas e ocorrência dos alelos <i>RH Cc</i> e <i>RH Ee</i>	62
D. Caracterização molecular do antígeno JAL (RH48).....	64
E. Caracterização molecular do raro antígeno RH _{null}	66
6. CONCLUSÕES.....	69
7. SUMMARY.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
9. ANEXOS.....	98

.....

X

Figura 20	Heredograma familiar Rh _{null}	53
Figura 21	Citometria de Fluxo em amostras controles e em amostra Rh _{null}	55
Figura 22	Porção relevante do eletroferograma do exon 7 do gene <i>RHce</i>	56
Figura 23	Seqüência de aminoácidos da proteína Rhce truncada - Rh _{null}	56

Lista de Tabelas

	<i>Página</i>
Tabela 1 Genotipagem <i>RHC/c</i> Multiplex.....	40
Tabela 2 Genotipagem <i>RHC/c</i> RFLP.....	40
Tabela 3 Genotipagem <i>RHE/e</i>	40
Tabela 4 Seqüenciamento <i>RHCE</i>	41
Tabela 5 Protocolos de amplificação.....	42
Tabela 6 Resultados de fenotipagem e genotipagem para os alelos <i>RH Cc</i> pela técnica de PCR-multiplex.....	45
Tabela 7 Resultados de fenotipagem e genotipagem para os alelos <i>RH Cc</i> pela técnica de PCR-RFLP.....	47
Tabela 8 Resultados de fenotipagem e genotipagem para os alelos <i>RH Ee</i>	48
Tabela 9 Frequência alélica do gene <i>RHCE</i>	49
Tabela 10 Combinações alélicas do gene <i>RHCE</i>	50
Tabela 11 Resultados de hemaglutinação da Família Rh _{null}	54
Tabela 12 Ocorrência dos alelos Rh em diferentes populações.....	63
Tabela 13 Prevalência dos alelos <i>RHCE</i> em diferentes populações.....	64
Tabela 14 Bases Moleculares do fenótipo Rh _{null} tipo amorfo com <i>RHD</i> deletado..	67

Lista de Abreviaturas

Rh	Sistema Rh
RhC	Antígeno RhC
Rhc	Antígeno Rhc
RhE	Antígeno RhE
Rhe	Antígeno Rhe
<i>RHCE</i>	Gene <i>RHCE</i>
RhCE	Proteína RhCE
Rh	Proteína Rh
RhD	Proteína RhD
<i>RHD</i>	Gene <i>RHD</i>
D	Polipeptídeo D
CE	Polipeptídeo CE
RH	Gene <i>RH</i>
<i>RHAG</i>	Gene <i>RHAG</i>
RhAG	Proteína RhAG
RhCC	Fenótipo RhCC
RhEE	Fenótipo RhEE
RhCc	Fenótipo RhCc
RhEe	Fenótipo RhEe
RHcc	Fenótipo Rhcc
Rhee	Fenótipo Rhee
Rh30	Proteínas RhD e RhCE
Rh50	Glicoproteína RhAG
Rh_{null}	Fenótipo Rh _{null} (ausência dos antígenos Rh)
Exon	Região codificante do DNA
<i>SMP1</i>	Gene <i>SMP1</i>
VS	Antígeno VS
V	Antígeno V

(<i>RHD-CE-D^S</i>)	Gene <i>RHD</i> híbrido
<i>Cde^S</i>	gene híbrido denominado <i>Cde^S</i>
<i>C^X</i>	Antígeno <i>C^X</i>
<i>C^W</i>	Antígeno <i>C^W</i>
<i>ce^S</i>	Variante do gene <i>RHce ce^S</i>
<i>ceMO</i>	Variante do gene <i>RHce ceMO</i>
<i>ceAR</i>	Variante do gene <i>RHce ceAR</i>
JAL	Antígeno JAL (RH48)
TEB	Tris EDTA Borato
LISS	Low ionic strength salt solution
GEL-LISS	Técnica de hemaglutinação em gel
anti-Rh	Soro anti antígeno Rh
anti-LW	Soro anti antígeno LW
anti-RhAG	Soro anti glicoproteína RhAG
anti-CD47	Soro anti antígeno CD47
anti-s	Soro anti antígeno s
anti-U	Soro anti antígeno U
uL	Microlitro
mL	Mililitro
ng	Nanogramas
pmol	Picomol
nmol	Nanomol
ug	microgramas
g	Giros
kb	mil pares de base
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Primers	Seqüência de oligonucleotídeos sintéticos
DNA	Ácido desoxirribonucléico (fita de nucleotídeos)
RNA	Ácido ribonucléico (fita de nucleotídeos)
cDNA	Fita de DNA transcrita à partir do RNA
RT-PCR	Técnica de PCR executada com amostra de cDNA

PCR-ASP	Técnica de PCR alelo específica
PCR-RFLP	Técnica de PCR seguida por digestão enzimática
<i>SSp I</i>	Enzima de restrição
<i>Mnl I</i>	Enzima de restrição
SNPs	Substituições de um único nucleotídeo
Cys	Aminoácido cisteína
Trp	Aminoácido triptofano
Ile	Aminoácido isoleucina
Ser	Aminoácido serina
Asn	Aminoácido aspartato
Pro	Aminoácido prolina
Gly	Aminoácido glicina
Val	Aminoácido valina
C-terminal	Região carboxila terminal da proteína
Códon	Trinca de bases do DNA
C	Nucleotídeo citosina
G	Nucleotídeo guanina
A	Nucleotídeo adenina
T	Nucleotídeo timina

O sistema Rh representa atualmente um dos sistemas de grupos sanguíneos de maior interesse devido a sua importância na clínica transfusional e na medicina materno-fetal.

Os antígenos do sistema Rh são codificados por dois genes altamente homólogos, *RHD* que produz o antígeno D e o gene *RHCE* (alelos *RH Ce*, *RH cE*, *RH ce* e *RH CE*), que produz dois pares de antígenos antitéticos, C/c e E/e.

Variantes que apresentam expressão parcial ou ausência total dos produtos do gene *RHCE* são relativamente freqüentes e suas bases moleculares têm sido motivo de diversas pesquisas, pois permitem correlacionar os genótipos com os fenótipos e esclarecer a perda de expressão de alguns antígenos Rh comuns, aumentando assim a segurança transfusional de pacientes politransfundidos e facilitando a seleção adequada de sangue a ser transfundido.

Até o momento, poucos estudos moleculares das variantes deste gene foram realizados na população brasileira, o que tem dificultado a elaboração de protocolos de genotipagem seguros para aplicação na clínica transfusional e materno-fetal.

Baseados nestas informações, nossos objetivos foram: estabelecer protocolos eficientes de genotipagem *RHCE* na população brasileira; calcular as freqüências gênicas (porcentagem de ocorrência) e as taxas de combinações alélicas dos alelos *RHCE* em nossa população e caracterizar molecularmente variantes do gene *RHCE* responsáveis por alterações na expressão dos antígenos Rh.

Foram estudadas 358 amostras de sangue de doadores voluntários, 5 amostras de sangue de uma família portadora do fenótipo Rhnull e 2 amostras de sangue de indivíduos portadores da rara variante do gene *Rhce* denominada *JAL*.

A genotipagem *RH Cc* foi realizada através de duas técnicas de PCR: uma técnica de PCR-RFLP, onde o índice de discrepância entre os resultados da fenotipagem e genotipagem foi de 26% e uma técnica de PCR-ASP, onde a discrepância entre os resultados da fenotipagem e genotipagem foi de 0,28%.

A discrepância observada na técnica de PCR-ASP ocorreu em virtude da presença da variante híbrida *RHD (D-CE-D)* denominada r^s , responsável pela fraca expressão do antígeno *RH C* em indivíduos de origem Africana.

A genotipagem *RH Ee* foi realizada através de uma técnica de PCR-RFLP em todas as amostras de sangue dos doadores e apresentou apenas 1 discrepância (0,28%) em relação ao resultado da fenotipagem.

A análise molecular desta amostra discrepante evidenciou a presença da mutação da mutação 48G>C no exon 1 e das mutações G667T e 733G no exon 5 do gene *RHce*, responsáveis pela diminuição da expressão do antígeno *Rhe*, caracterizando assim a discrepância observada.

As freqüências do gene *RHCE* observadas em nosso estudo variaram entre as diferentes populações analisadas, sugerindo assim o processo de miscigenação ocorrido na nossa população.

Os indivíduos portadores da rara variante JAL foram fenotipados como VS-V+ JAL+. O seqüenciamento direto dos 10 exons do gene *RHCE* em ambas as amostras identificou as mutações C733G (L245V) no exon 5 responsável pelo antígeno VS, e a mutação A1060C (N354A) no exon 7 que silencia o alelo VS, ambas em heterozigose.

As amostras de sangue da família Rh_{null} foram fenotipadas, submetidas a análises de expressão dos antígenos Rh (citometria de fluxo), genotipadas, clonadas e seqüenciadas para os 10 exons do gene *RHce*. Os propósitos Rh_{null} apresentaram ausência na expressão dos antígenos Rh, o que caracterizou o fenótipo como Rh_{null} tipo amorfo. A genotipagem Rh revelou um gene *RHD* deletado e o genótipo *RHce*. O seqüenciamento do gene *RHce* identificou a deleção de um nucleotídeo entre os nucleotídeos 960 e 963 do exon 7, o que gerou um stop codon prematuro e a produção de uma proteína *RHce* truncada, responsável pelo fenótipo Rh_{null} do tipo amorfo nestes indivíduos.

1. Introdução

O sistema Rh é o maior e mais complexo sistema de grupos sanguíneos, compreendendo atualmente 48 antígenos (**DANIELS et al, 2003**). Representa um dos sistemas de maior interesse clínico, por seu envolvimento na Doença Hemolítica Peri-natal, nas Reações Transfusionais Hemolíticas e nas Anemias Hemolíticas Auto-Imunes.

Descoberto em 1939 por **LEVINE e STETSON** tornou-se o sistema de grupo sanguíneo com maior grau de polimorfismo entre os marcadores conhecidos da membrana eritrocitária. Os antígenos Rh são codificados por 2 genes altamente homólogos localizados no braço curto do cromossomo 1: o gene *RHD*, produzindo o antígeno D e o gene *RHCE* (alelos *RH Ce*, *RH cE*, *RH ce* e *RH CE*), produzindo dois pares de antígenos antitéticos, C/c e E/e.

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

Os estudos genéticos e bioquímicos deste sistema têm sido caracterizados por controvérsias, debates e a co-existência de distintas nomenclaturas.

A natureza hidrofóbica das proteínas Rh dificultou os estudos bioquímicos deste sistema e o isolamento das proteínas só ocorreu após 1980 (AGRE et al., 1987).

Os antígenos Rh são polipeptídeos não glicosilados, denominados RhD e RhCE (deVETTEN e AGRE, 1988). Estes polipeptídeos atravessam a membrana eritrocitária 12 vezes e apresentam os segmentos amino-terminal e carboxi-terminal voltados para o meio intracelular (**Figura 1**). Os polipeptídeos, D e CE, apresentam um único resíduo externo cisteína na quinta alça extracelular possivelmente relacionado com a expressão antigênica.

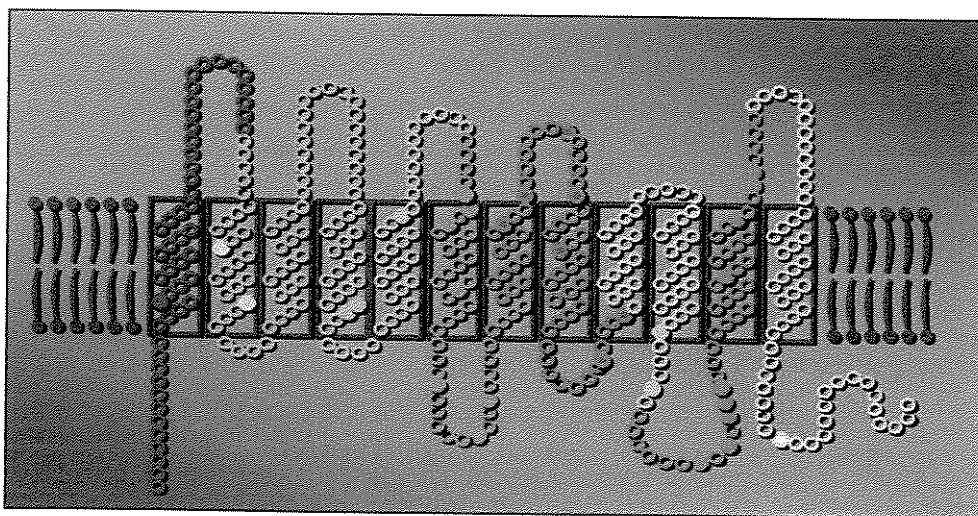


Figura 1. Modelo de distribuição das proteínas Rh na membrana eritrocitária

A associação dos antígenos RhD e RhCE (Rh30) com a glicoproteína RhAG (Rh50) origina a família de proteínas Rh (**Figura 2**). Esta associação

baseia-se no fato de ambas as proteínas apresentarem aproximadamente 38% de homologia na sequência genômica (WESTHOFF, 2004), 50% de identidade nas 12 α - hélices transmembranares (HUANG et al., 1997) e, principalmente devido ao fato da glicoproteína RhAG ser responsável pela expressão de todos os antígenos Rh na membrana eritrocitária (HUANG et al., 1998). Alterações nesta glicoproteína podem levar a deficiência de expressão ou até mesmo a ausência total dos antígenos Rh (fenótipo Rh_{null}) (AVENT e REID, 2000).

RhAG não é polimórfica, não transporta antígeno de grupo sanguíneo (WESTHOFF, 2004) e é expressa ainda durante a diferenciação eritróide, podendo ser detectada em células progenitoras CD34+, enquanto que, RhCE aparece tardiamente, seguida de RhD (SOUTHCOTT et al., 1999).

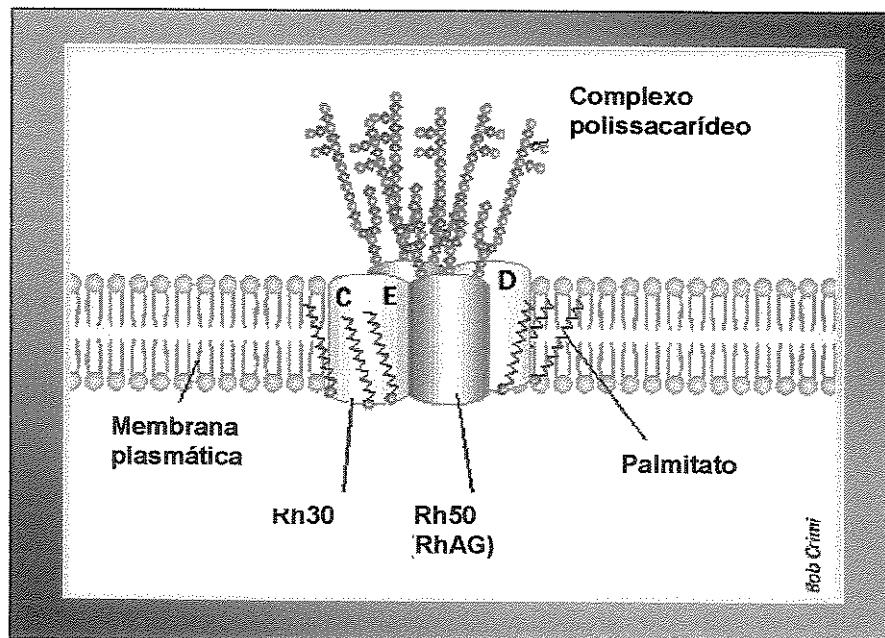


Figura 2. Tetrâmero das proteínas Rh50 (2 moléculas) e Rh30 (RhD e RhCE) – Família de proteínas Rh

A família Rh (**Figura 3**) encontra-se firmemente ligada ao citoesqueleto e está fisicamente associada, sob a forma de um complexo molecular, com outras proteínas codificadas por genes independentes (LW, CD47, GPB, Duffy) que não são necessárias para a expressão dos antígenos Rh.

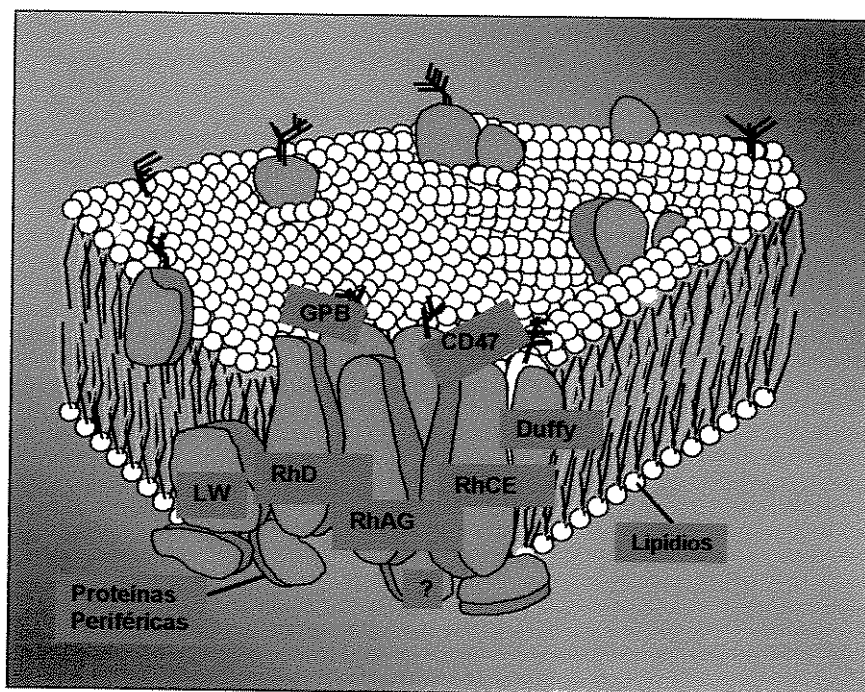


Figura 3. Distribuição do Complexo Rh na membrana eritrocitária (adaptado de HUANG et al., 1997)

A primeira clonagem dos genes do sistema Rh ocorreu em 1990 (CHÉRIF-ZAHAR et al., 1990) e serviu como bomba propulsora no entendimento deste complexo sistema de grupo sanguíneo.

A superfamília do gene *RH* humano é constituída pelos genes *RH* (*RHD* e *RHCE*), *RHAG* (*RH50*), *RHBG* e *RHGK* (*RHCG*) (HUANG e LIU, 2001).

Os genes que codificam as proteínas Rh diferem na sua localização cromossômica. Os genes *RHD* e *RHCE* estão localizados no cromossomo 1p36.13-34.3 organizados em 10 exons dentro de uma sequência genômica de aproximadamente 60kb. O gene *RHAG* que codifica a glicoproteína RhAG reside na região 6p11-21 e parece estar distribuído nos 10 exons correspondentes aos genes *RHD* e *RHCE* (CHÉRIF-ZAHAR et al., 1994) (Figura 4).

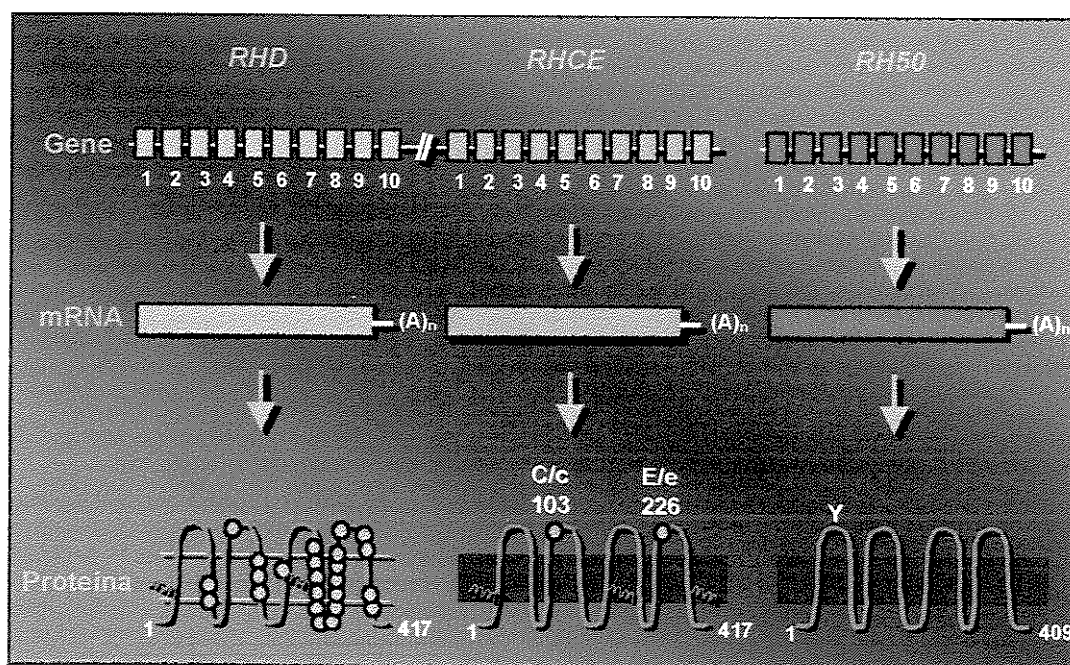


Figura 4. Genes *RH30* e *RHAG* e proteínas que eles codificam (HUANG et al., 1997)

Segundo o modelo do locus Rh proposto por WAGNER e FLEGEL (2000), os genes *RHD* e *RHCE* possuem orientações opostas e encontram-se separados por um terceiro gene denominado *SMP1* com aproximadamente 30.000 pb, a mesma orientação do gene *RHD* e com função no locus Rh ainda desconhecida. Neste modelo, o gene *RHD* está flanqueado por dois segmentos

de DNA, denominados “caixas Rhesus”, com um comprimento de aproximadamente 9.000 pb, apresentando 98% de homologia e orientação idêntica (**Figura 5**).

A comparação das seqüências de cDNA dos genes *RHD* e *RHCE* indica que as principais diferenças entre estes genes estão na deleção de 600pb no intron 4 do gene *RHD* quando comparado ao *RHCE* e na região do exon 10, com um total de apenas 40 nucleotídeos diferentes, o que resulta em proteínas que diferem somente de 32 a 35 aminoácidos (**WESTHOFF, 2004**) entre todos os 417 aminoácidos existentes (**PETZ, 1996**). Estas alterações estão restritas às α -hélices 3, 4 e 6 das proteínas (**FLEGEL e WAGNER, 2002**).

Estas poucas diferenças entre *RHD* e *RHCE* conferem elevado grau de homologia (97%) a estes genes (**HEITMAN e AGRE, 2000, OKUDA et al., 2000, WESTHOFF, 2004**), o que leva a acreditar que eles tiveram origem da duplicação de um gene ancestral comum (**SUTO et al, 2000**). A idéia da existência de um gene ancestral também se fundamenta no fato de genes similares aos da superfamília *RH* humana já terem sido encontrados em outras espécies de primatas dentro da linha evolutiva (**CARTRON, 1994**).

O gene *RHD* está ausente em indivíduos classificados como D-negativo, provavelmente como resultado de uma deleção (**COLIN et al., 1991**). De acordo com **WAGNER e FLEGEL (2000)**, a “caixa Rhesus” conteria a deleção do gene *RHD* com 1463 pb de extensão e estaria presente na maioria dos indivíduos Caucasianos RhD-negativo (**Figura 5**). No entanto, outros mecanismos moleculares que explicam o fenótipo RhD-negativo também foram descritos (**WAGNER et al, 2001**).

SINGLETON et al. (2000) demonstraram que em 66% dos indivíduos Africanos existe uma duplicação de 37 pb na região limite entre o intron 3 e o exon 4 do gene *RHD* que introduz um códon de terminação na posição 210 e uma alteração no quadro de leitura, que leva a produção de uma proteína que não é expressa na membrana eritrocitária. Observaram ainda a presença de um gene *RHD* híbrido (*RHD-CE-D^S*) associado ao fenótipo VS+V-, que possui os exons de 4 a 8 do gene *RHCE*, levando a produção de uma proteína alterada com fraca expressão do antígeno RhC e nenhuma expressão do antígeno RhD.

O gene *RHCE* é encontrado tanto no fenótipo RhD-positivo quanto RhD-negativo, e sua deleção completa no locus Rh ainda não foi descrita (**NOIZAT-PIRENNE et al., 2000**).

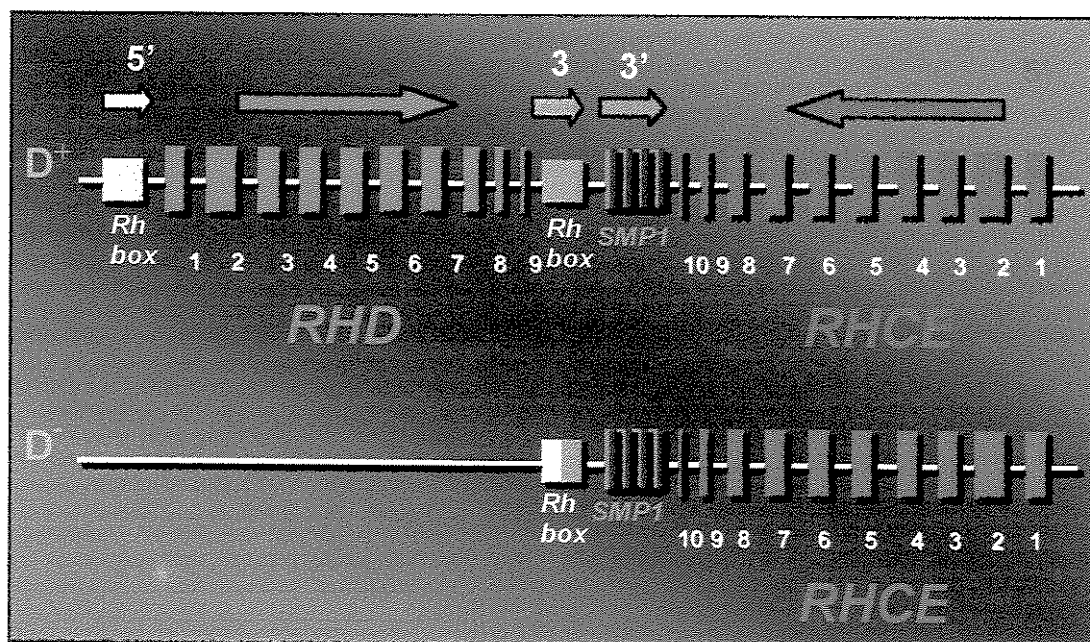


Figura 5. Modelo do locus RH representando os fenótipos Rh positivo e Rh negativo (Adaptado de COLIN et al., 1991)

A caracterização de diversas isoformas transcritas do gene *RHCE* sugere que os antígenos C/c são coexpressos em conjunto com os antígenos E/e, e suas expressões dependem do splicing alternativo do RNA codificado pelo gene *RHCE* (LE VAN KIM et al., 1992; MOURO et al., 1993).

Os quatro principais alelos do gene *RHCE*: *ce*, *Ce*, *CE* e *cE*, apresentam 6 substituições de um único nucleotídeo (SNPs) nos exons 1 e 2 (MOURO et al., 1993; SIMSEK et al., 1994), com conseqüente troca de quatro aminoácidos (Cys16Trp; Ile60Leu; Ser68Asn; Ser103Pro) (Figura 6), porém somente a alteração T/C que substitui Ser/Pro na posição 103 (exon 2) é responsável pelo polimorfismo que determina a presença dos antígenos C ou c (HYLAND et al., 1994; SALVIGNOL et al., 1995; WESTHOF et al., 2000) e está estreitamente relacionada com a antigenicidade destes antígenos (AVENT e REID, 2000).

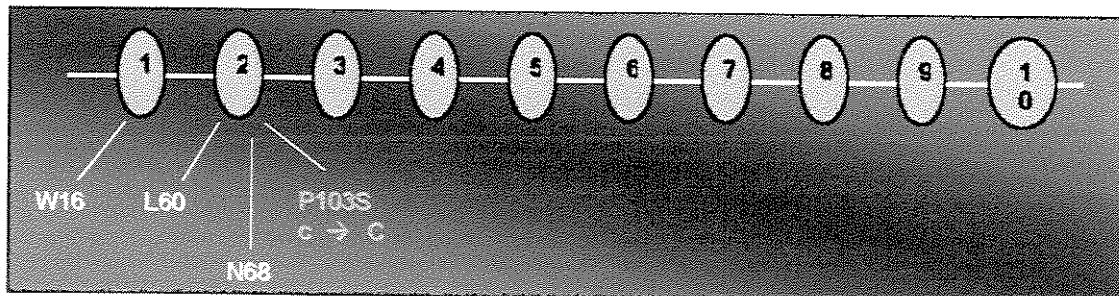


Figura 6. Polimorfismos do gene *RHCE* que codificam os alelos *RHC* e *RHc*

No entanto, a existência de Pro102 também parece ser crítica para a expressão do antígeno c (MOURO et al. 1993, SIMSEK et al. 1994, BLANCHER e SOCHA, 1997; WESTHOFF et al., 1998).

Com base nestes polimorfismos, provavelmente *RHce* representou o primeiro locus Rh e *RHCE* derivou deste ancestral através de um processo de conversão gênica com o exon 2 do gene *RHD* (WESTHOFF, 2004), visto que *RHD* e *RHCE* possuem o exon 2 idênticos.

O polimorfismo E/e ocorre em função de uma única substituição de nucleotídeo (SNP) C/G, no exon 5 do gene *RHCE*, resultando na troca Pro/Ala na posição 226 da quarta α -hélice extracelular do polipeptídeo RhCE (MOURO et al., 1993) (Figura 7).

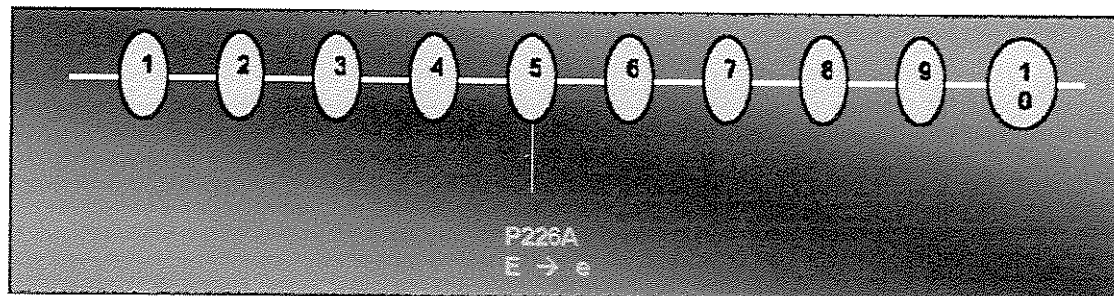


Figura 7. Polimorfismo do gene *RHCE* que codifica os alelos *RHE* e *RHe*

A expressão dos epítomos RhCE pode ser alterada por mudanças de aminoácidos em qualquer parte da proteína, incluindo as regiões transmembranares (BLUNT et al., 1994; CHÉRIF-ZAHAR et al., 1994; HUANG et al., 1996; MOURO et al., 1996; NOIZAT-PIRENNE et al., 1996; ROUILLAC et al., 1996; FAAS et al., 1997; NOIZAT-PIRENNE et al., 2000).

Variantes que apresentam expressão parcial dos produtos do gene *RHCE* são relativamente freqüentes e suas bases moleculares têm sido motivo

de diversas pesquisas (MOURO et al., 1995; ROUILLAC et al., 1996; NOIZAT-PIRENNE et al., 1996, 1998).

A ocorrência natural dos diversos fenótipos variantes pode apresentar alterações qualitativas ou quantitativas na expressão dos antígenos Rh, o que contribui ainda mais para aumentar a complexidade deste sistema (HUANG et al., 2000).

As variações genômicas para a evolução e formação dos alelos polimórficos e as diversas recombinações observadas após o seqüenciamento completo dos introns dos genes do sistema Rh, somadas ao alto grau de homologia entre os genes *RHCE* e *RHD* são importantes fatores para o entendimento da evolução de ambos os genes e de suas numerosas formas variantes (OKUDA et al., 1999; OKUDA e KAJII, 2002) (Figura 8).

Dentre estes fenótipos variantes, inúmeros rearranjos gênicos (totais ou parciais) entre os exons dos genes *RHD* e *RHCE* (NOIZAT-PIRENNE et al., 2001) têm sido descritos nos últimos anos (REID e LOMAS-FRANCIS, 2003), e levam à formação de genes híbridos. Estes fenótipos são caracterizados pela falta expressão dos antígenos C, c, E, e (ROUILLAC et al., 1996; BECKERS et al., 1996; MOURO et al., 1996; NOIZAT-PIRENNE et al., 1998; NOIZAT-PIRENNE et al., 2002; HEMKER et al., 1999).

SNPs ($C^X, C^W, V+VS, RH:26, E$ cat I), deleções e rearranjos no gene *RHCE* associados ou não a fenótipos com deleção parcial ($D---$, $D-$, $Dc-$, r^G , Rh32, Rh33, E cat II e E cat III) que codificam proteínas híbridas, também são mecanismos moleculares freqüentemente encontrados entre os haplótipos Rh (CARRIT, 1997) e como as demais mutações, podem modificar a qualidade e

quantidade desses antígenos na membrana eritrocitária. (HUANG et al., 1996; MOURO et al., 1996; FAAS et al., 1997; HUANG et al., 1997; NOIZAT-PIRENNE et al., 1998; NOIZAT-PIRENNE et al., 1999; AVENT e REID, 2000; KASHIWASE et al., 2001; NOIZAT-PIRENNE, 2001).

Variantes da expressão do antígeno Rhe têm sido descritas (ISSITT, 1991) e as bases moleculares para alguns destes fenótipos já são conhecidas (AVENT e REID, 2000; HUANG et al., 2000).

Indivíduos homozigotos para o gene *RHce* e que codificam variantes do antígeno Rhe, freqüentemente são fenotipados como e+, mas produzem antígenos Rhe alterados. Muitos destes antígenos não são investigados molecularmente devido à falta de cuidado na classificação de sua fraca expressão durante a fenotipagem. Alguns destes antígenos são clinicamente significantes e podem levar ao desenvolvimento de aloanticorpos e assim causar reações transfusionais hemolíticas. Algumas das variantes capazes de levar ao desenvolvimento destes aloanticorpos são os haplótipos: *ce^S*, *ceAR*, *ceMO*, *ceEK* e *ceBI* (NOIZAT-PIRENNE et al., 2002) que apresentam alterações no exon 5 do gene *Rhce*.

A presença da mutação 733G codifica o aminoácido valina na posição 245 e é responsável pela expressão do antígeno VS (245 Val). Este antígeno do sistema Rh, de baixa incidência em Caucasianos, porém freqüente em Africanos (mais de 30% da população) (WESTHOFF, 2004), está associado a fraca expressão do antígeno Rhe nas hemácias (FAAS et al., 1997).

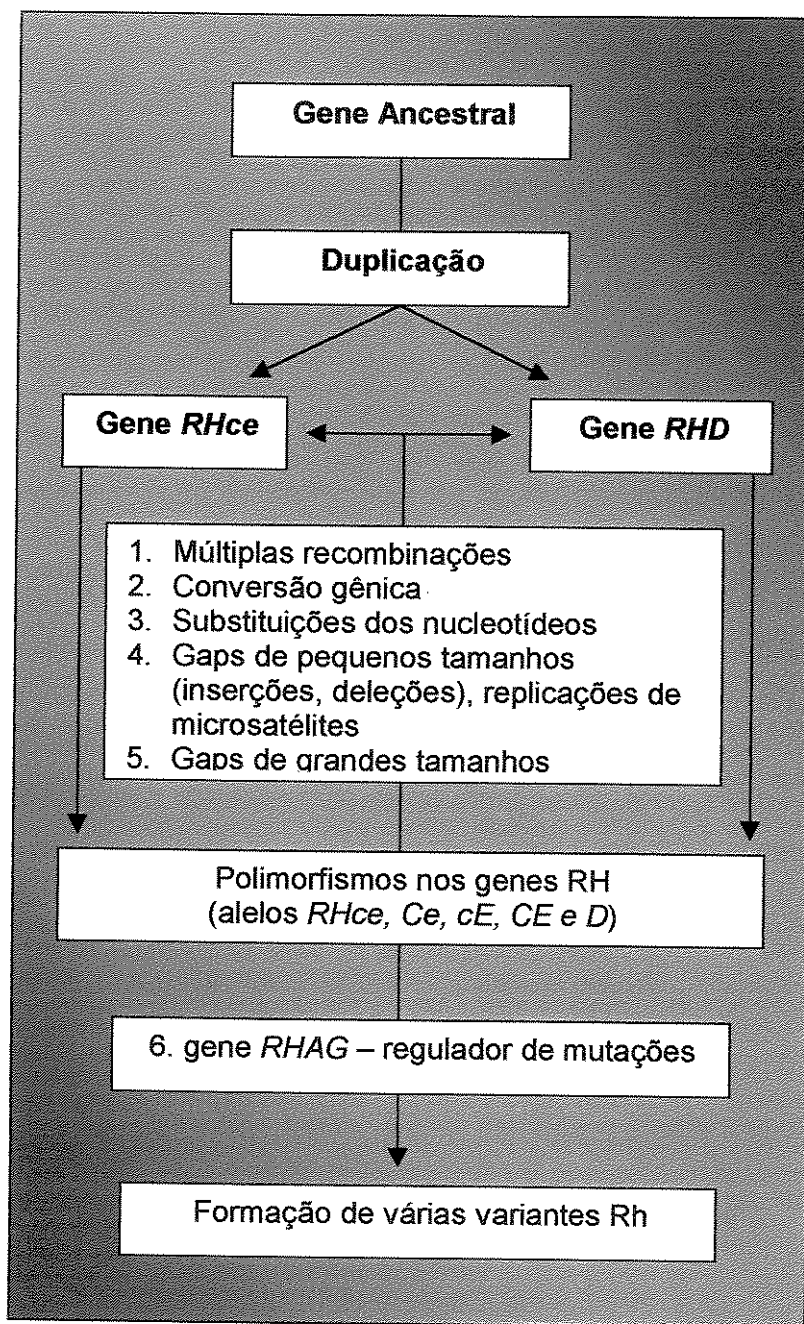


Figura 8. Mecanismos de formação dos genes *RH* e suas variantes

Assim como o antígeno VS, o antígeno V também é expresso em função da substituição Leu245Val. Ambos estão localizados no oitavo segmento transmembranar de *Rhce* (FAAS et al., 1997) e causam alterações na conformação da proteína. O haplótipo que codifica 245Val e leva à expressão dos antígenos V e VS é denominado *ce^S*. A perda da expressão de V (fenótipo V-VS+) resulta da substituição Gly336Cys (DANIELS et al., 1998), enquanto que a perda da expressão do antígeno VS (fenótipo V+VS-) está associada a mudanças adicionais de aminoácidos que caracterizam a variante *ceAR* (HEMKER et al., 1999).

WESTHOFF et al., 2001 descreveram uma outra variante do antígeno Rhe associada ao alelo *RHce*. A presença de uma mutação de ponto no nucleotídeo 48 G>C no exon 1 do gene *RHCE*, leva a substituição do aminoácido triptofano (Trp) pelo aminoácido cisteína (Cys) na posição 16 (Figura 10). Quando o aminoácido Cys16 está associado ao alelo *RHce*, a expressão do antígeno Rhe fica alterada e esta variante pode então não ser reconhecida por alguns anticorpos monoclonais.

A diminuição da expressão do antígeno Rhe na membrana eritrocitária também está freqüentemente associada à perda do antígeno *hr^S* (ISSIT, 1991), resultando em muitas formas variantes nos indivíduos descendentes de Africanos, tal como a variante *ceMO*, cujo alelo *RHce* apresenta uma mutação de ponto G667T no exon 5, responsável pela substituição Val223Phe na proteína. A existência do alelo *ceMO* em homozigose produz uma proteína considerada como uma variante potencialmente capaz de desenvolver anticorpos (NOIZAT-PIRENNE et al., 2001).

Estudos sorológicos e moleculares das variantes RhE indicaram que o antígeno RhE é um mosaico composto por 4 epítomos classificados em: epE1, epE2, epE3 e epE4, com variantes classificadas em quatro categorias, (cat EI ao EIV) (Figura 9).

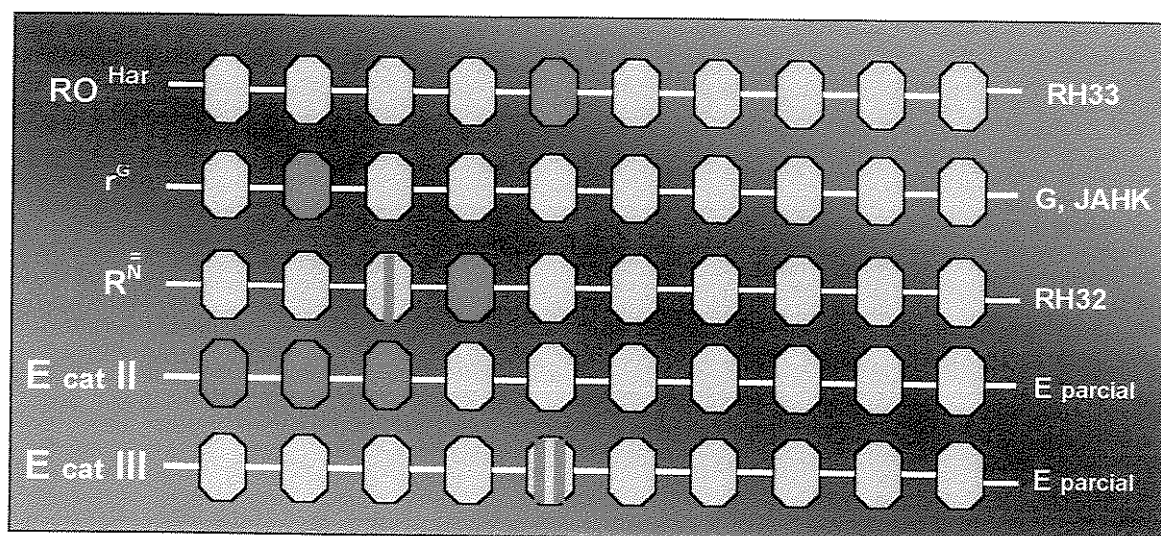


Figura 9. Variantes do gene *RHCE* (amarelo= exons *RHCE*, laranja= exons *RHD* inseridos em *RHCE*)

A análise molecular dos transcritos e do DNA genômico das variantes das categorias EI, EII e EIII apontaram três distintas alterações genéticas, sendo que algumas destas variantes relacionam-se ainda com a fraca expressão do antígeno RhC (NOIZAT-PIRRENE et al., 1998).

Os antígenos de baixa incidência C^W e C^X, são caracterizadas por SNPs no exon 1 (MOURO et al., 1995), respectivamente A122G e G106A (NOIZAT-PIRENNE et al., 1996), que resultam em substituições de aminoácidos na

primeira alça extracelular da proteína RhCE e conseqüentemente a uma fraca expressão do antígeno C (**WESTHOFF, 2004**).

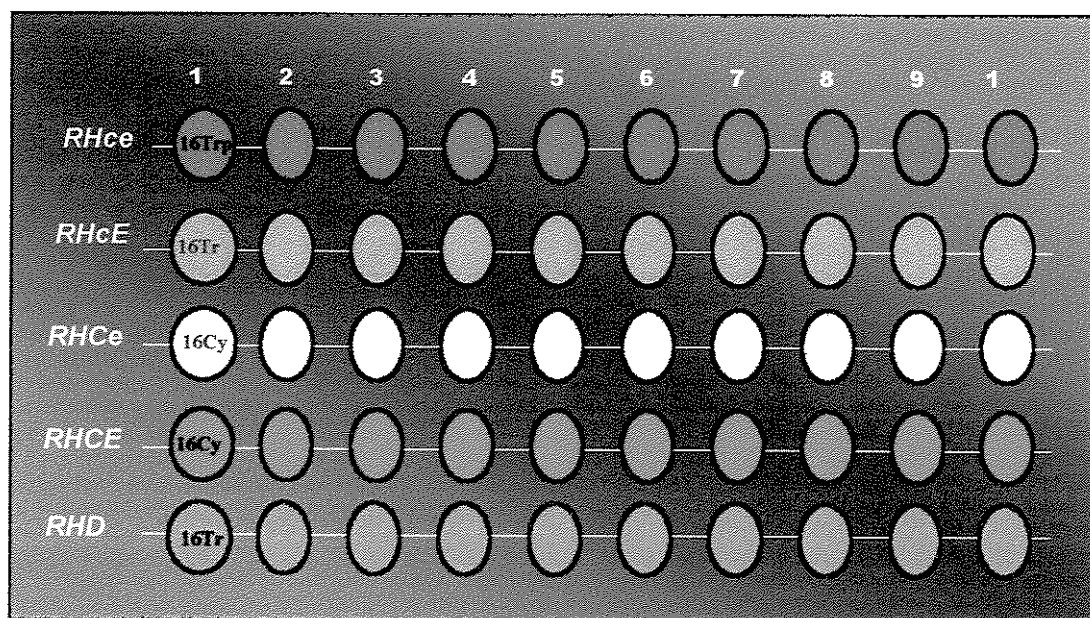


Figura 10. Aminoácidos codificados no exon 1 dos genes *RHCE* e *RHD*

Inúmeros trabalhos têm sido realizados para um melhor entendimento das funções da família Rh (**AVENT, 2001; LUDEWIG, 2001; WESTHOFF et al., 2002; VERLANDER et al., 2003**) e diversas atividades funcionais tem sido relacionadas ao sistema Rh.

MARINI et al. em **1997** revelaram grande similaridade da seqüência genômica da família Rh humana com famílias responsáveis pelo transporte de amônia em fungos. Recentemente uma proteína similar à família de proteínas Rh foi também encontrada em algas verdes, exercendo função de transporte de CO₂ (**SOUPENE et al., 2002**).

No entanto, até o presente momento estas funções da família Rh humana ainda não estão totalmente esclarecidas, mas, já é sabido que os polipeptídeos Rh possuem grande importância no desenvolvimento e manutenção da integridade da membrana eritrocitária (**CARTRON, 1994; CHÉRIF-ZAHAR et al., 1994**), com evidências de associação entre o complexo Rh, banda 3, integrinas e proteína 4.2, componentes do esqueleto da membrana eritrocitária (**MOURO-CHANTELOUP et al., 2003**).

A relação dos antígenos do sistema Rh com o desenvolvimento fisiológico dos eritrócitos pode ser facilmente observada através do raro fenótipo Rh_{null} (aproximadamente 1 em 6x10⁶ indivíduos) (**SEIDL et al., 1972**), associado à anemia hemolítica crônica de origem não imune e a múltiplas anormalidades fenotípicas (**SCHMIDT e VOS, 1967; STURGEON, 1970**), que na maioria dos casos, tem origem em famílias com histórico de casamentos consanguíneos (**AVENT e REID, 2000**).

A esferomatocitose, os aumentos da fragilidade osmótica e da permeabilidade a cátions observados neste fenótipo causam alterações na expressão dos antígenos do complexo Rh e uma distribuição anormal dos fosfolipídios na bicamada da membrana eritrocitária (**HUANG et al., 2000; TIPPETT, 1990; AGREE e CARTRON, 1991; WAGNER et al., 1999; CHÉRIF-ZAHAR et al., 1996; DAHR et al., 1987; MILLER et al., 1987**).

De acordo com as alterações moleculares presentes, o fenótipo Rh_{null} é classificado em: tipo regulador, ocasionado por mutações em homozigose no gene autossômico supressor (*RHAG*), e tipo amorfo ou silenciado, mais raro,

caracterizado pela ausência do gene *RHD* (CHÉRIF-ZAHAR et al., 1993; CARRITT et al., 1993) e defeitos moleculares em homozigose no gene *RHCE*. (CARTRON, 1999). Diferentes mecanismos moleculares têm sido relacionados com o fenótipo Rh_{null} tipo regulador, entretanto, pouco se conhece a respeito das mutações que envolvem o tipo amorfo.

Apenas três alterações moleculares no gene *RHCE* foram descritas como responsáveis pelo fenótipo Rh_{null} tipo amorfo: mutações no sítio de splicing do intron 4 (CHÉRIF-ZAHAR et al., 1998), deleção no exon 1 (KATO-YAMAZAKI et al., 2000) e mutações no exon 7 (HUANG et al., 1999; CHÉRIF-ZAHAR et al., 1998b).

A determinação do genótipo *RHCE* é importante na medicina transfusional e materno-fetal uma vez que a incorreta fenotipagem dos antígenos Rh C, c, E, e, pode levar a aloimunização e a potenciais reações hemolíticas (NOIZAT-PIRENNE et al., 2002).

Diante destas informações, a especificidade atribui a genotipagem *RHCE* significativa importância nos procedimentos de transfusão no que diz respeito à validação de dados sorológicos como a determinação do fenótipo (OKUDA e KAJII, 2002) e identificação de variantes dos antígenos Rh.

A elucidação das bases moleculares das variantes do gene *RHCE* em diferentes populações tem permitido, correlacionar os genótipos com os fenótipos e esclarecer a perda de expressão de alguns antígenos Rh comuns. Conseqüentemente, a segurança transfusional de pacientes politransfundidos

tem aumentado pela maior facilidade de selecionar adequadamente o sangue a ser transfundido.

Em função do importante significado clínico do sistema Rh, as informações obtidas através dos estudos moleculares têm sido rapidamente traduzidas para a aplicação diagnóstica (LEGLER et al., 1999; RIOS et al., 1999; REID et al., 2000; ROZMAN et al., 2000; CASTILHO et al., 2001).

Diversas técnicas moleculares têm sido aplicadas e aprimoradas para a detecção e identificação dos antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos, com a finalidade de complementar os testes sorológicos e aumentar a segurança transfusional.

O fato destas técnicas terem sido desenvolvidas em países onde a miscigenação não ocorreu de forma tão intensa quanto no Brasil, nos obriga a comprovar sua eficácia na população brasileira. As regiões de introns (que muitas vezes compõem os primers) podem não ter se preservado da mesma forma que nas populações homogêneas onde estes primers foram desenvolvidos devido aos inúmeros rearranjos gênicos ocorridos entre os genes *RHD* e *RHCE* (YAMAMOTO et al., 1990; CARTRON, 1994; OLIVÈS et al., 1997).

Até o momento, poucos estudos moleculares das variantes do gene *RHCE* na população brasileira foram realizados, o que tem dificultado a elaboração de protocolos de genotipagem seguros para aplicação na clínica transfusional e materno-fetal.

A detecção das variantes RhC/c e RhE/e bem como a elucidação de suas bases moleculares em nossa população poderá contribuir para o

entendimento da estrutura dos epítomos e da resposta imune destes antígenos, e eventualmente explicar o complexo modelo sorológico e a grande heterogeneidade dos anticorpos Rh em nossa população.

Este estudo poderá, ainda, auxiliar diretamente na prevenção da aloimunização, uma vez que a aplicação da genotipagem Rh em casos de difícil resolução sorológica pode diminuir os efeitos de potenciais reações hemolíticas em pacientes politransfundidos.

2. Objetivos

Diante da importância do Sistema Rh na medicina transfusional e materno-fetal e da ausência de informações referente às frequências do gene *RHCE* e suas variantes na população brasileira, os objetivos deste estudo foram:

- Estabelecer protocolos eficientes de genotipagem *RHCE* na população brasileira;
- Calcular as frequências gênicas e as taxas de combinações alélicas do gene *RHCE* em nossa população e comparar com as frequências observadas em outras populações;
- Caracterizar molecularmente variantes do gene *RHCE* responsáveis por alterações na expressão dos antígenos Rh.

3. Material e Métodos

A. MATERIAL

1. Amostras de sangue

Após consentimento informado, foram coletadas 358 amostras de sangue anticoaguladas com EDTA, de doadores voluntários de sangue de Campinas e região atendidos no Hemocentro da UNICAMP, durante o período de maio de 2003 a dezembro de 2004.

Neste período, foram também encaminhadas ao nosso laboratório amostras de sangue de 5 indivíduos de uma família Rh_{null} atendidos no Hemocentro de Curitiba e amostras de sangue de 2 indivíduos de uma família portadora do antígeno JAL atendidos na Colsan, São Paulo.

Todas as amostras foram previamente fenotipadas para os antígenos RhC, Rhc, RhE e Rhe.

2. Anti-soros

Os anti-soros empregados na determinação dos antígenos do complexo Rh foram:

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

- anti-E (lote EM10, Gamma Biologicals Inc. ®, Houston, TX)
- anti-e (lote eM217, Gamma Biologicals Inc. ®, Houston, TX)
- anti-LW (Serum Cell and Rare Fluids, SCARF)
- anti-S (lote Gamma Biologicals Inc. ®, Houston, TX)
- anti-s (lote Gamma Biologicals Inc. ®, Houston, TX)
- anti-U (Serum Cell and Rare Fluids, SCARF)
- anti-RhAG (clones 2D10 e MIMA-77, New York Blood Center, NY, USA)
- anti-CD47 (clone B6H12, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)

3. Cartões Gel (ID-Micro Typing Cards)

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

4. Tampão LISS Modificado (Diluyente 2)

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

5. Suspensão de hemácias a 0,8%

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

6. Diluição dos Anti-soros

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

7. Easy DNA Kit

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

8. GeneStar Kit

O GeneStar Kit utilizado na extração do DNA de leucócitos do sangue periférico foram obtidos da empresa Biossystems®.

9. Taq DNA Polimerase

As enzimas Taq DNA polimerase, utilizadas nas reações de PCR, foram obtidas da Invitrogen®, Carlsbad, CA. O Kit contendo 5 unidades/ μ l desta enzima, incluía 1 ml de tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH8.4) e 500 mM de KCl e 1 ml de $MgCl_2$ 50mM.

10. dNTP 10mM

As dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) foram obtidas da empresa Invitrogen®, Carlsbad, CA. Para as reações de amplificação foram utilizados dNTPs na concentração de 10 mM (diluição de 20 μ l de cada nucleotídeo em 120 μ L de água deionizada).

11. Primers

Os primers utilizados neste trabalho (Invitrogen®, Carlsbad, CA e Imprint do Brasil LTDA.) estão descritos nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

12. Enzimas de restrição

As enzimas *Mnl I*, *Ssp I* (MBI Fermentas®, Amherst, NY) foram utilizadas para digestão dos produtos de PCR de acordo com o produto estudado.

13. Trizol

Este reagente foi utilizado na extração do RNA de reticulócitos, segundo as orientações do fabricante (Invitrogen ®, Carlsbad, CA).

14. Big Dye

Este reagente (BD Half-term, GenPak, Perkin Elmer Biosystems) foi utilizado no preparo das reações para o seqüenciamento automático de DNA.

15. SNAP Miniprep Kit

Kit SNAP Miniprep (Invitrogen, CA, Califórnia) utilizado para isolamento e purificação dos plasmídeos utilizados no processo de clonagem.

16. Superscript II Kit

Kit utilizado na transcrição do mRNA e preparo do cDNA, obtido da Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD.

17. Concert rapid gel extraction system

Este kit foi utilizado na extração e purificação do DNA contido em gel de agarose para subsequente reação de seqüenciamento de DNA (Invitrogen ®, Carlsbad, CA).

18. Concert rapid PCR purification system

Kit utilizado na purificação da reação de PCR para subsequente reação de seqüenciamento de DNA . Foi obtido da Invitrogen ®, Carlsbad, CA.

19. Sure Clone (Kit de clonagem)

Kit utilizado para clonagem dos fragmentos de DNA de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen ®, Califórnia, CA).

20. Marcadores moleculares

Marcadores de 100 pb e 1 kb (Invitrogen ®, Carlsbad, CA e MBI Fermentas ®, Amherst, NY), utilizados na análise do tamanho dos fragmentos de DNA.

21. Marcador de peso Molecular Low Mass

O marcador de peso molecular Low Mass (Invitrogen ®, Carlsbad, CA) foi utilizado na análise do peso molecular dos fragmentos designados para seqüenciamento.

22. Tampão Tris-Borato (TEB) 10x

Este tampão foi preparado, dissolvendo-se 108 g de Tris (Sigma Chemical CO), 55 g de ácido bórico (Sigma Chemical CO) e 40 ml de EDTA 0,5 M pH 8.0 (Sigma Chemical CO), em 1000 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

23. Tampão Tris-Borato (TEB) 1x

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

24. Gel de agarose (1%, 1,5% e 2%)

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

25. Gel de poliacrilamida 12%

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

A. MÉTODOS

O seguinte protocolo foi estabelecido para análise das amostras:

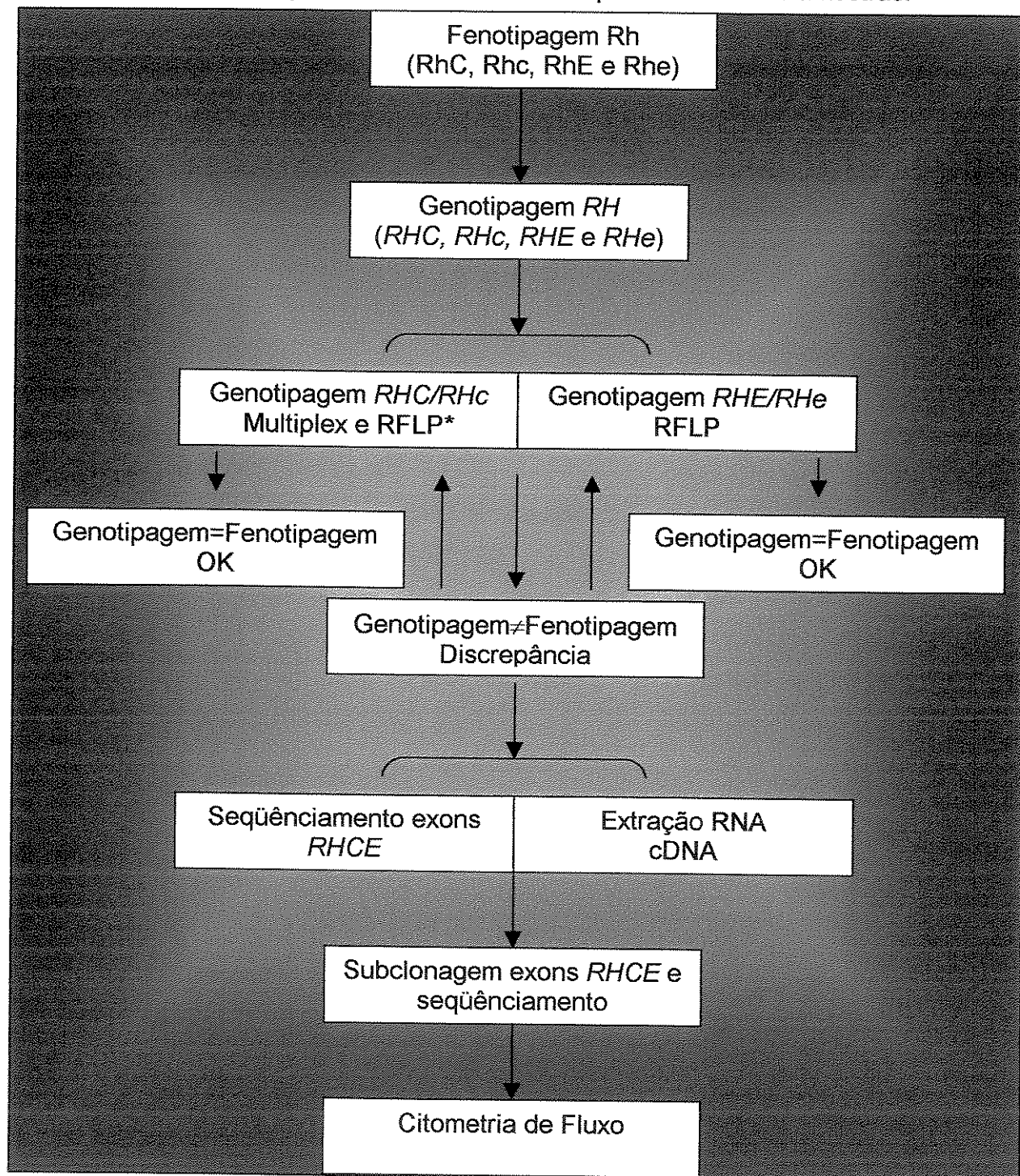


Figura 11. Protocolo utilizado para análise das amostras

1. Fenotipagem eritrocitária dos antígenos do complexo Rh

A fenotipagem dos antígenos Rh, LW, CD47, S, s e U foi realizada pelo teste de hemaglutinação em gel, utilizando-se cartões ID-Liss/Coombs. Após identificação dos cartões, 50 µl das hemácias em teste a 0,8% em Diluente 2, foram adicionadas aos microtubos contendo gel e soro antiglobulina humana. Após, 25 µl do anti-soro diluído, contendo anticorpos específicos ao antígeno a ser estudado, eram adicionados ao mesmo tubo. Após incubação a 37°C durante 15 minutos, os cartões foram centrifugados a 70 g por 10 minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação do gel teste (**Figura 12**).

2. Extração de DNA

O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico utilizando-se o Easy DNA Kit e o GeneStar Kit, de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes.

A concentração e a qualidade do DNA foi analisada somente quando não foi possível realizar a amplificação do DNA através dos métodos convencionais. Quando necessário, a qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1%) e sua concentração determinada pela medida da densidade ótica em espectrofotômetro a 260 nm.

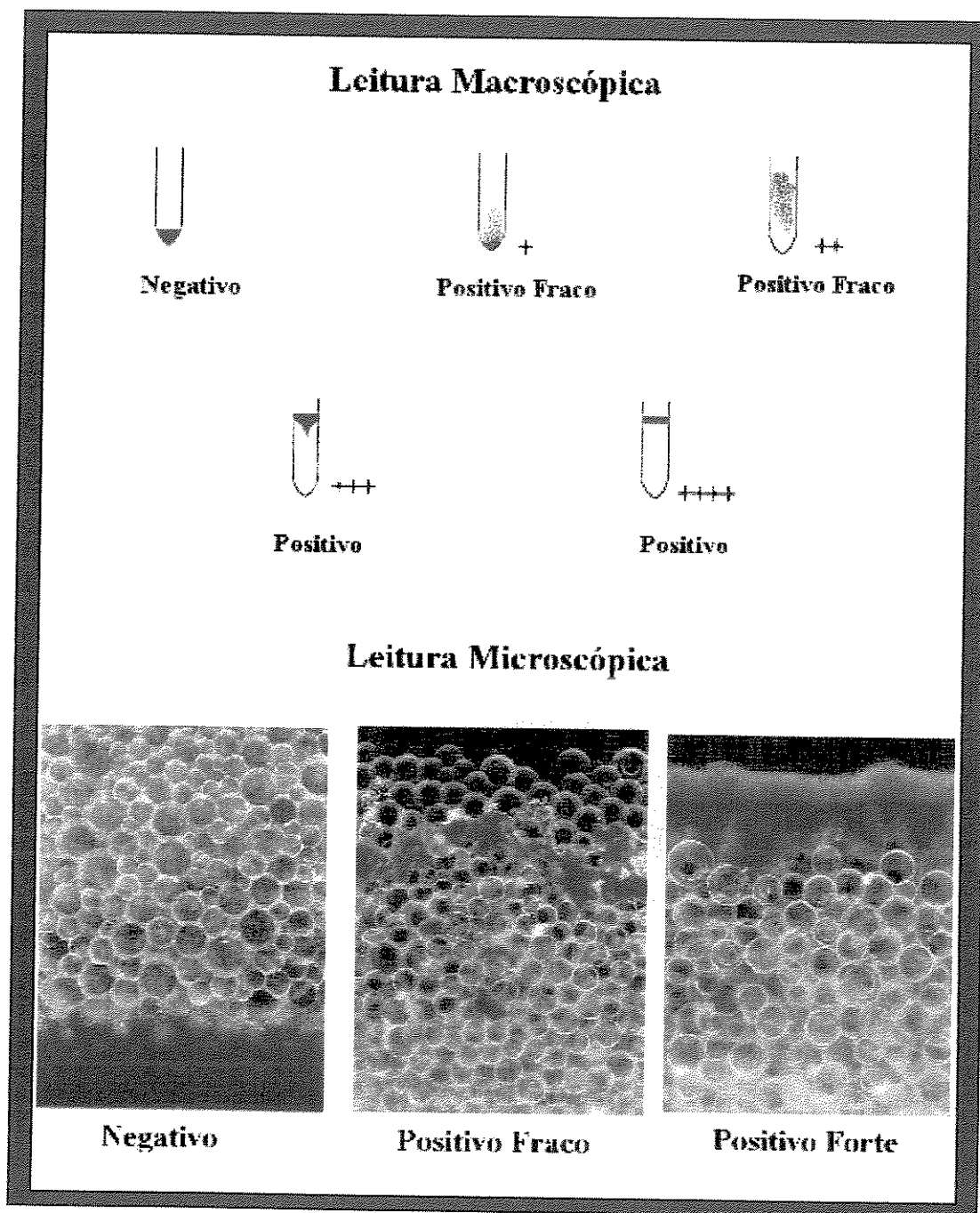


Figura 12. Interpretação das Reações de Aglutinação em Gel.

3. Extração do RNA

O RNA foi isolado de reticulócitos de sangue periférico utilizando-se o reagente Trizol, de acordo com o recomendado pelo fabricante (Invitrogen®, Carlsbad, CA).

4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As reações em cadeia da Polimerase (PCR), utilizaram 200 ng de DNA, 50 pmol de cada primer, 2 nmol de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase e tampão em um volume final de 30 μ l.

Todos os ciclos de amplificação foram realizados em um termo-ciclador Perkin Elmer 9700 (Foster City, CA). Os protocolos de amplificação variaram de acordo com o produto amplificado (**Tabela 5**).

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

Os produtos de PCR amplificados foram digeridos *overnight* com as enzimas de restrição apropriadas (MBI Fermentas®, Amherst, NY) em um volume final de 15 μ l, utilizando 8 μ l do produto de PCR e, 7 μ l da mistura de enzima/tampão. A análise do tamanho dos fragmentos obtidos com a digestão enzimática foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 2% ou gel de poliacrilamida a 12% (de acordo com o tamanho dos fragmentos da digestão).

6. Genotipagem *RH Ee*

A genotipagem *RH Ee* (**Figura 13**) foi realizada através do método de PCR-RFLP. Os produtos obtidos (amplicons), foram digeridos com a enzima de restrição *Mnl I* (RIOS et al, 1999; REID et al, 2000). A análise dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% ou em gel de poliacrilamida a 12%.

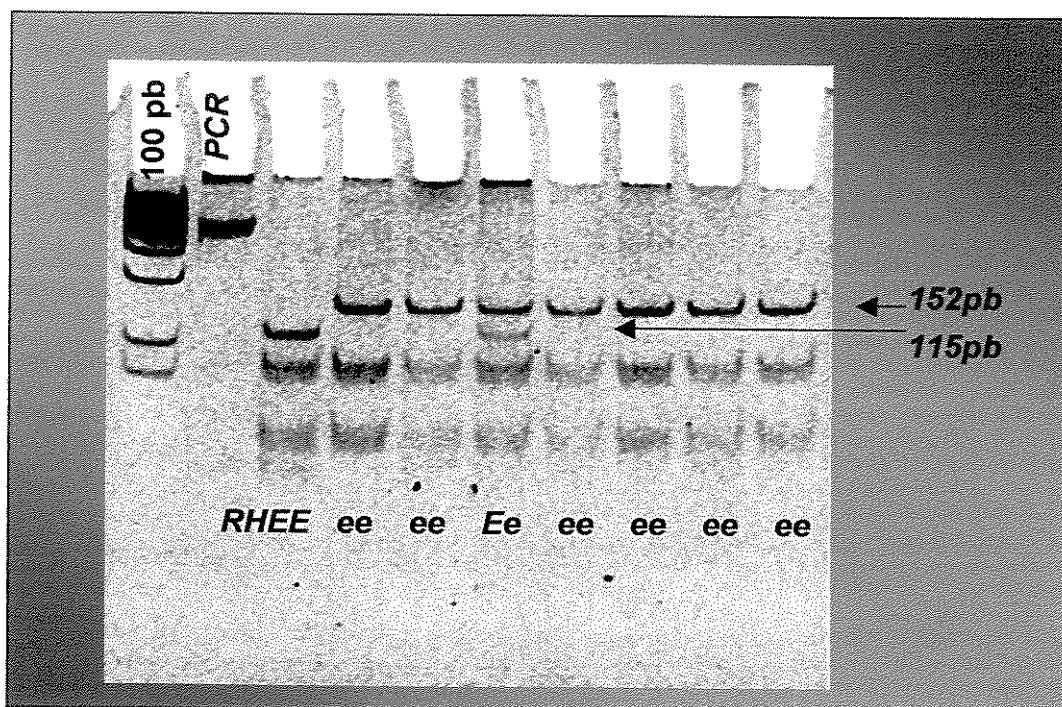


Figura 13. Genotipagem *RHE/E* através de PCR-RFLP

7. Genotipagem *RH Cc*

A genotipagem *RH Cc* foi realizada utilizando-se duas técnicas de PCR. Uma técnica de PCR multiplex descrita por SINGLETON et al, 2000 modificada (**Figura 14**), e uma técnica de PCR-RFLP descrita por TANAKA et al, 2001 que

permite a diferenciação dos alelos *RH Cc* através da digestão enzimática do produto amplificado com a enzima *Ssp I* (**FIGURA 15**). As análises dos produtos de PCR obtidos foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% e dos fragmentos gerados por digestão através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% ou agarose 2%.

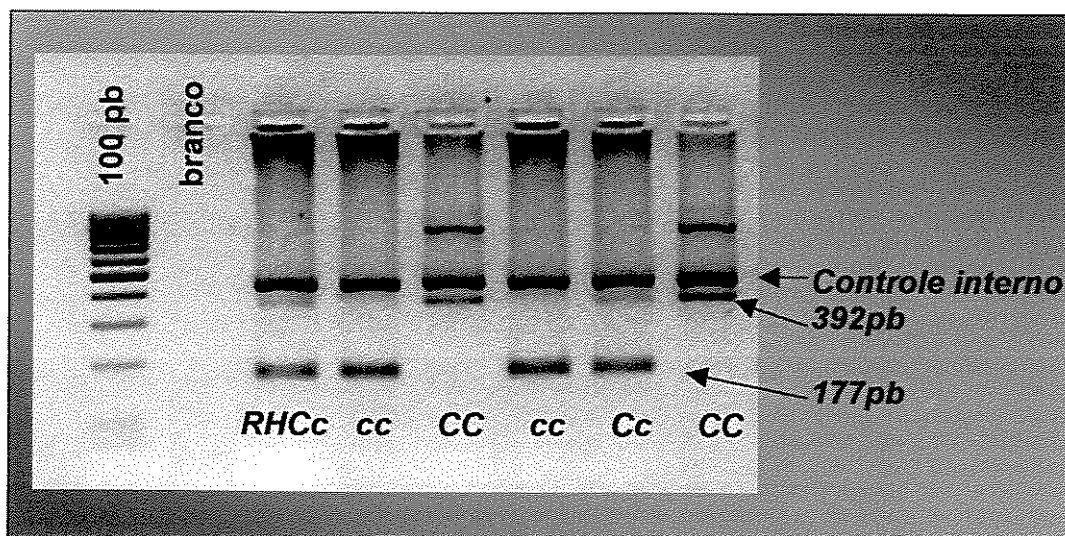


Figura 14. PCR multiplex para genotipagem *RHC/c*

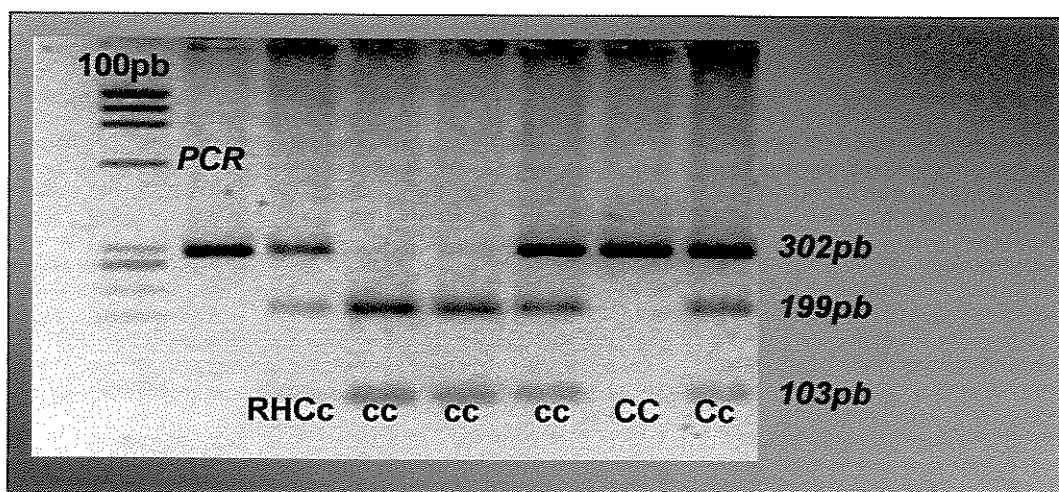


Figura 15. PCR-RFLP (*SspI*) para genotipagem *RHC/c*

8. Seqüenciamento direto de DNA genômico

Os produtos de PCR foram eluídos do gel de agarose a 1% utilizando-se o Kit de extração Concert rapid gel extraction system ou purificados direto do tubo de PCR com o auxílio do Concert rapid PCR purification system e seqüenciados diretamente em ambas direções com o reagente Big Dye, em um seqüenciador automático ABI 373XL (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA, USA).

9. Síntese, amplificação e seqüenciamento de cDNAs

Transcrição reversa (RT-PCR) proveniente de RNA de reticulócitos foi realizada nas amostras dos indivíduos que apresentaram fenótipos variantes, de acordo com o descrito por **HUANG et al, 1995, 1996**. Os cDNAs foram obtidos com a utilização do Kit Superscript II Rev. Transc., de acordo com o recomendado pelo fabricante (Invitrogen ®, Carlsbad, CA).

10. Subclonagem

A técnica de subclonagem foi utilizada para evidenciar mutações homozigotas e/ou heterozigotas em diferentes alelos (**SAMBROOCK et al, 1989**). Os produtos de PCR foram ligados em um vetor puc18 utilizando-se o Kit Sure Clone (Invitrogen, Califórnia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Após transformação com bactérias DH5 α , os clones (colônias brancas) foram selecionados em um meio contendo X-Gal e penicilina. As colônias brancas foram incubadas overnight a 37°C em um meio contendo penicilina (50 μ g/ml) e o

plasmídeo foi isolado e purificado com o Kit SNAP Miniprep (Invitrogen, CA, Califórnia).

11. Citometria de Fluxo

A expressão dos antígenos Rh variantes foi verificada por Citometria de Fluxo no aparelho FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA), utilizando anticorpos monoclonais IgG anti-D, anti-C, anti-c, anti-E, anti-e e anti-RhAG. Os anticorpos secundários utilizados foram IgG anti-humano e IgG anti-camundongo produzidos em cabra, fragmentos Fab, conjugados com fluoresceína (FITC) (Interlab; Jackson ImmunoResearch, Hamburg, Germany). Amostras controles positivas e negativas foram utilizadas para todos os parâmetros analisados.

12. Cálculos de freqüências gênicas, ocorrência dos alelos *RH* e combinações alélicas.

Os cálculos das freqüências gênicas foram realizados de acordo com o descrito por BEIGUELMAN (2003). Para o cálculo de freqüência gênica as seguintes fórmulas foram utilizadas:

$$C = \frac{CC + (Cc/2)}{N}$$

$$E = \frac{EE + (Ee/2)}{N}$$

A taxa de combinação dos alelos foi calculada pela multiplicação das frequências isoladas dos alelos.

Tabela 1. Genotipagem *RHC/c* (SINGLETON et al, 2000)

Primers	Seqüências
C/for	5'CAG GGC CAC CAC CAT TTG AA 3'
C/rev	5'GAA CAT GCC ACT TCA CTC CAG 3'
c/for	5'TCG GCC AAG ATC TGA CCG 3'
C/rev	5'TGA TGA CCA CCT TCC CAG G 3'

Tabela 2. Genotipagem *RHC/c* (TANAKA et al, 2001)

Primers	Seqüências
CEPR01	5'CTGTGTA ACTATGAGGAGTCAA 3'
CEPR03R	5'AGAGGGCATTCTATTCTTTGA 3'

Tabela 3. Genotipagem *RHE/e* (RIOS et al, 1999; REID et al, 2000)

Primers	Seqüências
CEI4	5'GGC AAC AGA GCA AGA GTC CA 3'
CEX5	5'CTG ATC TTC CTT TGG GGG TG 3'

Tabela 4. Seqüenciamento *RHCE* (STROBEL et al, 2004)

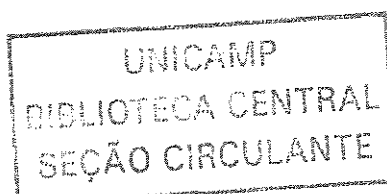
Primers	Seqüências
Exon 1S Exon 1R	5'CATAGACAGGCCAGCACAG* 3' 5'CCTGCTATCTGCTCCTGTGA 3'
Exon 2 CS Exon 2 CR	5'CTCGTCCTTCTCGCCATCT 3' 5'GGATTCCTTGTGATACACGGAGTA 3'
Exon 2 cS Exon 2 cR	5'CTCCTCCTTCTCACCATCT 3' 5'GGATTCCTTGTGGTACACAGAGTA 3'
Exon 3S Exon 3R	5'ATCCTGGCTCTCCTTCTCA 3' 5'CAAGTGATCTTCCCTCCTCAA 3'
Exon 4S Exon 4R	5'TGAACTTTCTCCAAGGACCAT 3' 5'AATTTAGCAACACTACTCAAAGAAG 3'
Exon 5S Exon 5R	5'TGGAGCAGGAGTGTGATTCT 3' 5'GTGACCACCCAGCATTCTT 3'
Exon 6S Exon 6R	5'AGAGGTGGTTTCAGGATCAG 3' 5'AGCCAAAGCAGAGAGCATTAA 3'
Exon 7S Exon 7R	5'CCATTGATGTGAGTACACATT 3' 5'GTAGGGGCTGGACAATT 3'
Exon 8S Exon 8R	5'AGCCAGGGAGAGGACCCTTG 3' 5'GGGAAGGAGATGGGGCAAATAG 3'
Exon 9S Exon 9R	5'AAGGATTTCTGTTGAGACACT 3' 5'AGCAAGTCAACATATATACCCA 3'
Exon 10S Exon 10R	5'CCCAGGGAGGTGCAGTATAA 3' 5'GCGTTTCTCACGTACAAATGC 3'

* Os nucleotídeos sublinhados representam especificidade para o gene *RHCE*

Tabela 5. Protocolos de amplificação (PCR)

PCR	Reação da PCR				
RH	Desnat.	Desnat.	Anelam.	Extensão	Extensão
	Primária	secundária	primers	fragmento	final
Cc	95° C	94° C	60° C	72° C	72° C
ASP	5:00´	1:00´	1:00´	1:00´	7´
Cc	95° C	95° C	50,5° C	72° C	72° C
RFLP	5:00´	0:50´	1:50´	1:45´	10´
Ee	95° C	94° C	62,0° C	72° C	72° C
RFLP	5:00´	0:20´	0:20´	0:20´	10´
Exons	94° C	94° C	55° C	72° C	72° C
1 a 6 RHCE	5:00´	0:30´	0:30´	0:45´	10´
Exon 7 RHCE	94° C	94° C	50° C	72° C	72° C
	5:00´	0:30´	0:30´	0:45´	10´
Exon 8 RHCE	94° C	94° C	60° C	72° C	72° C
	5:00´	0:30´	0:30´	0:45´	10´
Exon 9 RHCE	94° C	94° C	50° C	72° C	72° C
	5:00´	0:30´	0:30´	0:45´	10´
Exon 10 RHCE	94° C	94° C	56° C	72° C	72° C
	5:00´	0:30´	0:30´	0:45´	10´
Reação	96° C	96° C	57° C	60° C	60° C
seqüenciamento	1:00´	0:10´´	0:05´´	0:04´	10´

4. Resultados



A. RESULTADOS DA GENOTIPAGEM *RH Cc*

Com o objetivo inicial de padronizar as técnicas moleculares de genotipagem *RH Cc*, comparamos os resultados obtidos na genotipagem dos alelos *RH Cc* com os resultados da fenotipagem RhCc.

A genotipagem *RH Cc* é difícil de ser padronizada, devido a sua falta de especificidade, uma vez que os alelos *RHC* e *RHD* apresentam alta homologia e as diferenças entre *RHC* e *RHc* se resumem a substituições de 3 aminoácidos na região promotora (TANAKA et al, 2001), a inserção de 109pb no intron 2 de *RHC* (TAX et al, 2002), ao polimorfismo C48 no exon 1 (FASS et al, 1997) e a uma mutação de ponto no exon 2. Estas seqüências podem variar ainda de acordo com a etnia da população analisada (TAX et al, 2002).

Para a validação da genotipagem dos alelos *RH Cc*, empregamos duas técnicas moleculares: uma PCR Multiplex que utiliza a diferença entre *RH Cc* no intron e exon 2 de *RHCE* (SINGLETON et al, 2000) e uma PCR-RFLP que detecta as diferenças existentes na região promotora e também o polimorfismo C48 no exon 1 do gene *RHCE* (TANAKA et al, 2001).

1. Comparação entre os resultados da fenotipagem e genotipagem *RH Cc* pela técnica de PCR multiplex

A técnica de PCR multiplex descrita por Singleton et al, 2000 foi realizada em 358 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue previamente fenotipados para os antígenos RhCc e que apresentavam antecedentes étnicos diversos.

Houve concordância entre os resultados da fenotipagem e da genotipagem em 357 amostras e, discordância em 1 amostra (0,28%). Esta amostra foi fenotipada como RhCc e genotipada como *RH cc*. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 6**.

Tabela 6. Resultados de fenotipagem e genotipagem para os alelos *RH Cc* pela técnica de PCR-multiplex.

Genótipo	Fenótipo		
	RhCC	RhCc	Rhcc
<i>RH CC</i>	47	0	0
<i>RH Cc</i>	0	171	0
<i>RH cc</i>	0	1	138

Quando analisamos esta amostra discrepante, verificamos que a mesma era portadora do alelo $r's$, considerado uma variante *RHCE* híbrida que apresenta os exons 1, 2, 8, 9, 10 e parte do exon 3 do gene *RHD* (**Figura 16**).

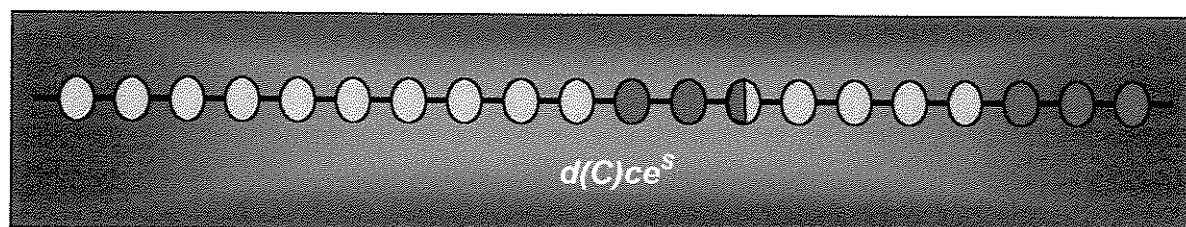


Figura 16. Representação esquemática da variante $r's$

2. Comparação entre os resultados da fenotipagem e genotipagem *RH Cc* pela técnica de PCR-RFLP

A técnica de PCR-RFLP descrita por **TANAKA et al, 2001**, foi realizada em 138 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue previamente fenotipados para os antígenos RhCc e que apresentavam antecedentes étnicos diversos.

Houve concordância entre os resultados de fenotipagem e de genotipagem em 102 (74%) amostras e, discordância em 36 (26%) amostras. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 7**.

Tabela 7. Resultados de fenotipagem e genotipagem para os alelos *RH Cc* pela técnica de PCR-RFLP

Genótipo	Fenótipo		
	RhCC	RhCc	Rhcc
<i>RH CC</i>	22	6	5
<i>RH Cc</i>	3	70	22
<i>RH cc</i>	0	0	10

Todas as amostras que apresentaram resultados discrepantes entre a genotipagem e a fenotipagem tiveram inicialmente o intron 2 e o exon 2 específicos para os alelos *RHC* e *RHc* seqüenciados, e quando necessário, os demais exons também foram seqüenciados. Os resultados do seqüenciamento foram concordantes com os resultados da fenotipagem, demonstrando que a técnica de PCR-RFLP não é adequada a nossa população.

B. RESULTADOS DA GENOTIPAGEM *RH Ee*

A genotipagem *RH E/e* foi realizada em 358 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue através de uma técnica de PCR-RFLP já padronizada em nosso laboratório (CASTILHO et al, 2002). Houve concordância entre os resultados de fenotipagem e de genotipagem em 357 amostras e, discordância em 1 amostra (0,28%). Esta amostra foi fenotipada como RhEE e genotipada como *RH Ee*. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados de fenotipagem e genotipagem para os alelos *RH Ee*

Genótipo	Fenótipo		
	RhEE	RhEe	Rhee
<i>RH EE</i>	16	0	0
<i>RH Ee</i>	1	83	0
<i>RH ee</i>	0	0	257

A discrepância encontrada entre os resultados dos fenótipos e genótipos *RH Ee* foi investigada através do seqüenciamento do gene *RHCE*. Os resultados obtidos no seqüenciamento dos 10 exons do gene *RHCE* demonstraram a presença da mutação 733G no exon 5 que leva a expressão do antígeno VS+, da mutação 48G>C no exon 1, expressando Cys16 e a mutação de ponto G667T no exon 5 (**Figura 17**), responsável pela substituição Val223Phe, que leva a expressão da variante *ceMO*. Estas mutações encontradas em heterozigose foram as responsáveis pelo enfraquecimento do antígeno Rhe nas hemácias da amostra discrepante.

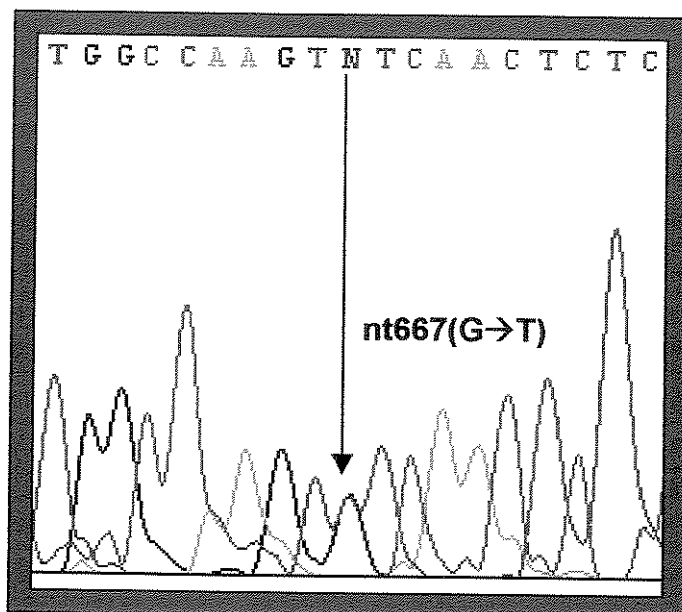


Figura 17. Exon 5 da amostra *RH ce* variante *ceMO*

C. FREQUÊNCIAS GÊNICAS DOS ALELOS *RH Cc* E *RH Ee*

A partir dos fenótipos e genótipos obtidos nas 358 amostras de sangue e DNA de doadores voluntários de sangue foi possível calcular a frequência gênica dos alelos *RH Cc* e *RH Ee* em nossa população (**Tabelas 9 e 10**).

Tabela 9. Frequência alélica do gene *RHCE*

Alelo	Frequência
<i>C</i>	0,3724
<i>c</i>	0,6273
<i>E</i>	0,1638
<i>e</i>	0,8360

Tabela 10. Combinações alélicas do gene *RHCE*

Alelo	Combinações alélicas
<i>RH^{Ce}</i>	0,31
<i>RH^{cE}</i>	0,10
<i>RH^{ce}</i>	0,52
<i>RH^{CE}</i>	0,06

D. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ANTÍGENO JAL (RH48)

Com o objetivo de determinar o mecanismo molecular responsável pelo raro antígeno JAL (RH48), foram realizados testes sorológicos e moleculares incluindo o seqüenciamento dos 10 exons do gene *RHCE* nas amostras de sangue e DNA dos 2 indivíduos que apresentaram o antígeno JAL (mãe e filho). Os resultados da fenotipagem Rh previamente realizada nos demais membros da família e a nós encaminhados com as amostras, possibilitaram construir um heredograma familiar (**Figura 18**) que permitiu deduzir a transmissão hereditária do alelo JAL+.

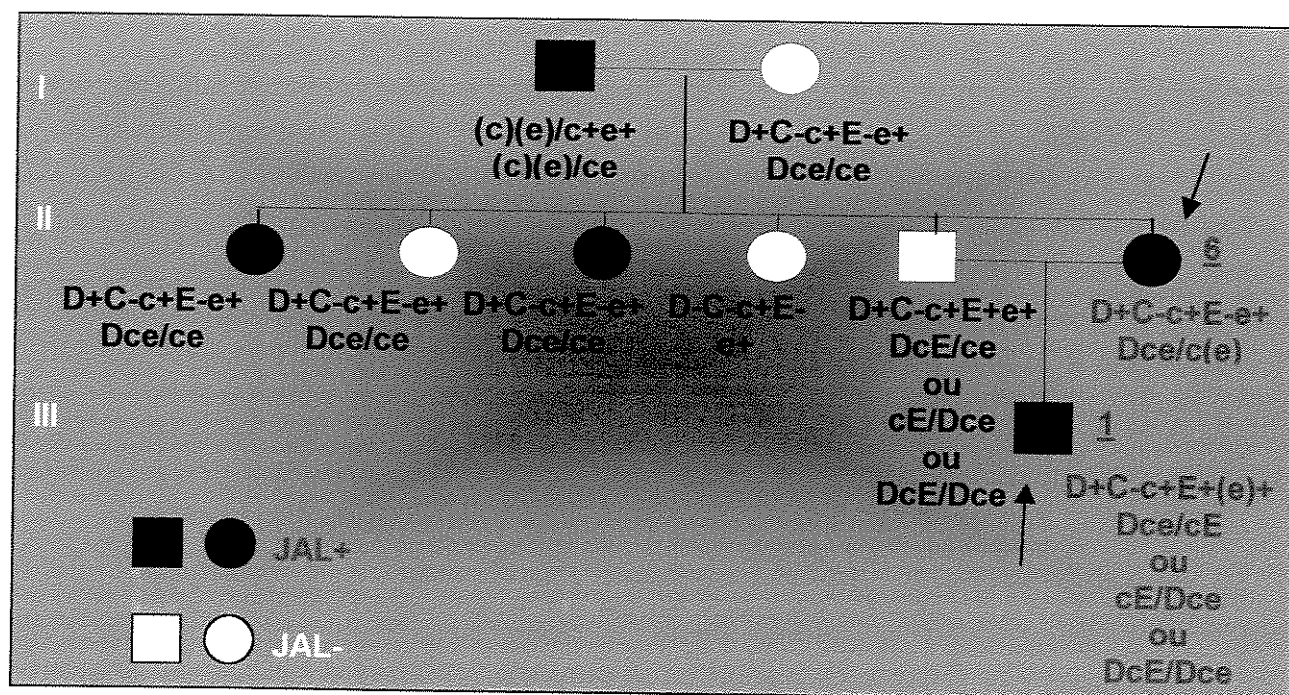


Figura 18. Heredograma familiar dos indivíduos JAL+

Os indivíduos II-6 (mãe) e III-1 (filho) foram também fenotipados como VS-V+ JAL+. Os resultados da genotipagem demonstraram que o propótipo II-6 era *RHD+*, *RHCE* cc ee enquanto o propótipo III-1 era *RHD+*, *RHCE* cc E(e).

O seqüenciamento direto dos 10 exons do gene *RHCE* em ambas as amostras identificou as mutações C733G (L245V) no exon 5 responsável pelo antígeno VS, e a mutação A1060C (N354A) no exon 7 que silencia o alelo VS, ambas em heterozigose (Figura 19).

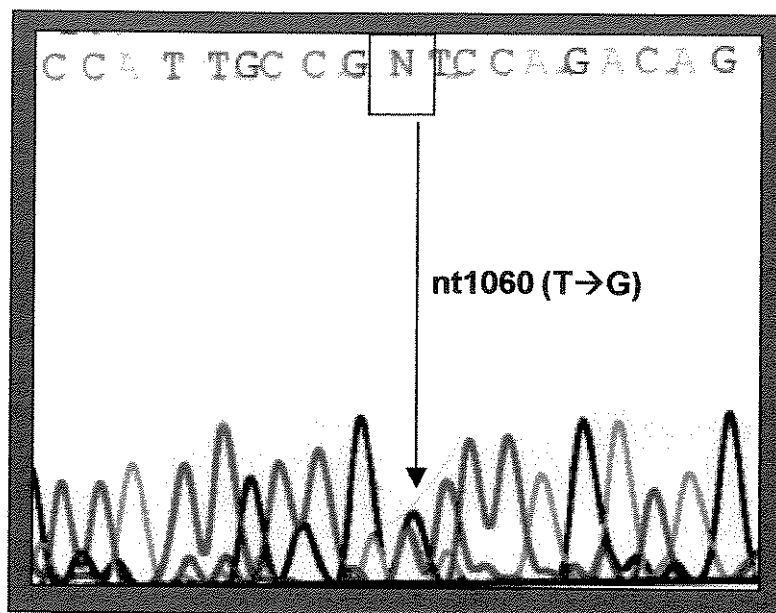


Figura 19. Seqüenciamento exon 7 - JAL+

O indivíduo III-1 apresentou ainda a substituição 48G>C em homozigose no exon 1 (Cys16).

E. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO RARO FENÓTIPO Rh_{null}

Durante a realização de testes pré-transfusionais, foi detectado o raro fenótipo Rh_{null} em dois membros de uma família da cidade de Curitiba-PR. Amostras de sangue de todos os indivíduos da família foram coletadas e analisadas para o sistema Rh (**Figura 20**).

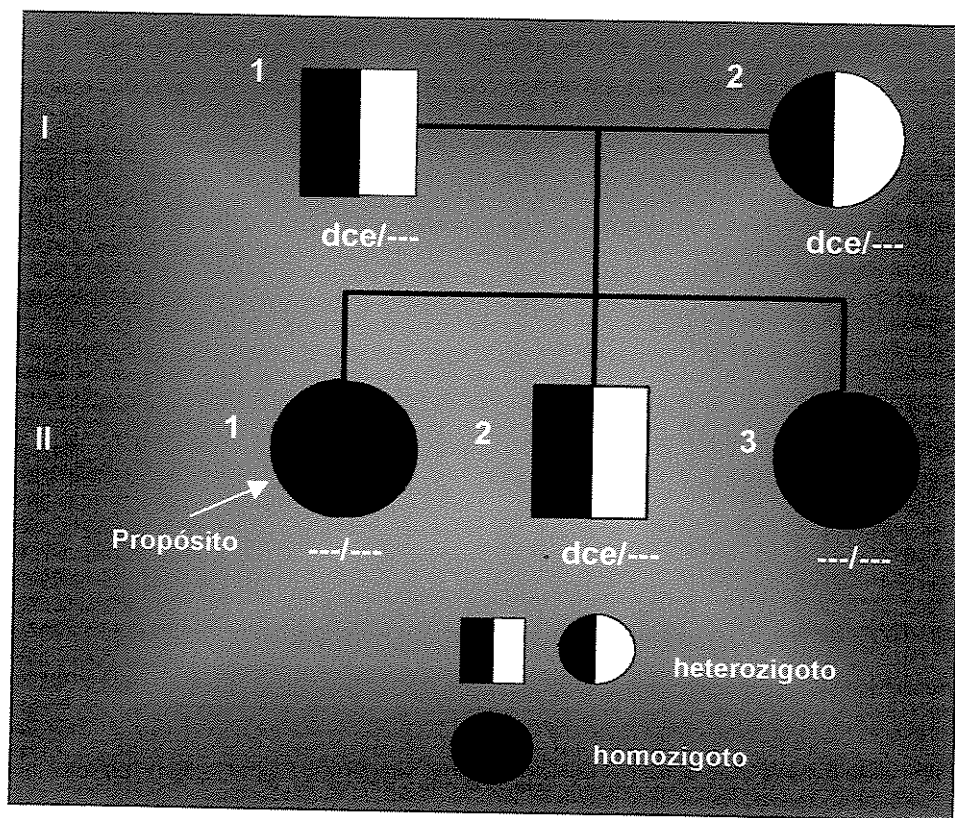


Figura 20. Heredograma familiar Rh_{null}

Os resultados das fenotipagens realizadas em todos os membros da família encontram-se na **Tabela 11**. Os propósitos II-1 e II-3 não reagiram com anti-Rh e anti-LW e reagiram fracamente com anti-RhAG, anti-CD47, anti-s e anti-U, o que demonstra que estes indivíduos apresentam o raro fenótipo Rh_{null} do tipo amorfo.

Tabela 11. Resultados de hemaglutinação da Família Rh_{null}

	-D	-C	-E	-c	-e	-LW	-S	-s	-U	RhAG	-CD47
I-1	0	0	0	4+	4+	4+	0	3+	3+	NT	3+
I-2	0	0	0	4+	4+	4+	3+	3+	3+	NT	3+
II-1	0	0	0	0	0	0	2+	2+	2+	2+	Fraco
II-2	0	0	0	4+	4+	4+	3+	3+	3+	NT	3+
II-3	0	0	0	0	0	0	0	2+	2+	2+	fraco
Ctl Pos	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	4+	3+

Estes resultados foram confirmados através de citometria de fluxo, utilizando amostras controle positivas e negativas para os antígenos estudados (Figura 21).

A genotipagem RH demonstrou a presença do gene alelo *RH ce* e ausência do gene *RHD* em todos os indivíduos.

O seqüenciamento direto dos 10 exons do gene *RH ce* revelou a deleção de um nucleotídeo entre os nucleotídeos 960 e 963 do exon 7 (Figura 22), em homozigose nos propósitos e, em heterozigose nos demais membros da família.

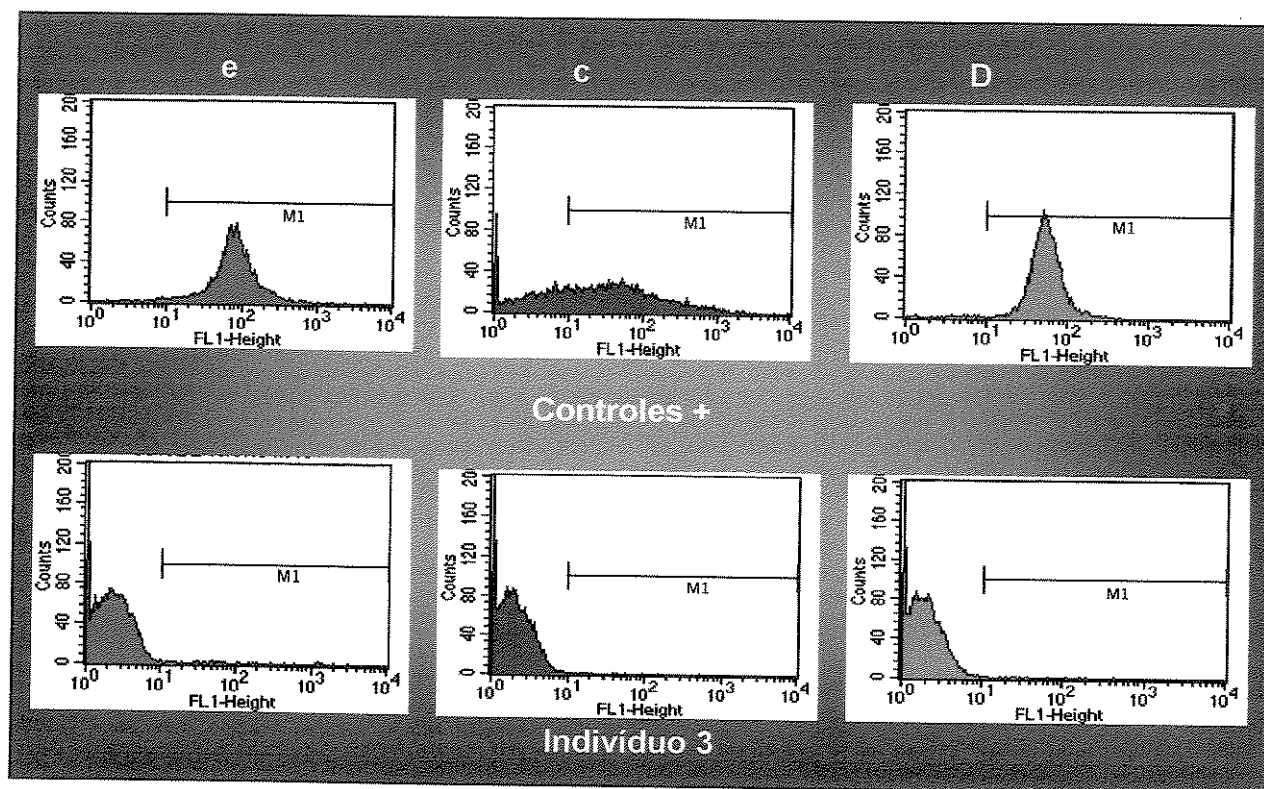


Figura 21. Citometria de Fluxo em amostras controles e em amostra Rh_{null}

Através da clonagem e subsequente seqüenciamento do exon 7 foi possível comprovar a presença da mutação em homozigose nos propósitos II-1 e II-3 e em heterozigose nos demais indivíduos.

Esta mutação no exon 7 do gene *RHce* é a responsável pelo raro fenótipo Rh_{null} nesta família, através da introdução de um códon de terminação prematuro no aminoácido 357 da proteína RhCE, que leva a uma alteração no quadro de leitura após o aminoácido Gly321 com conseqüente produção de uma proteína truncada, cuja região C-terminal difere em 36 aminoácidos da proteína Rhce normal (Figura 23).

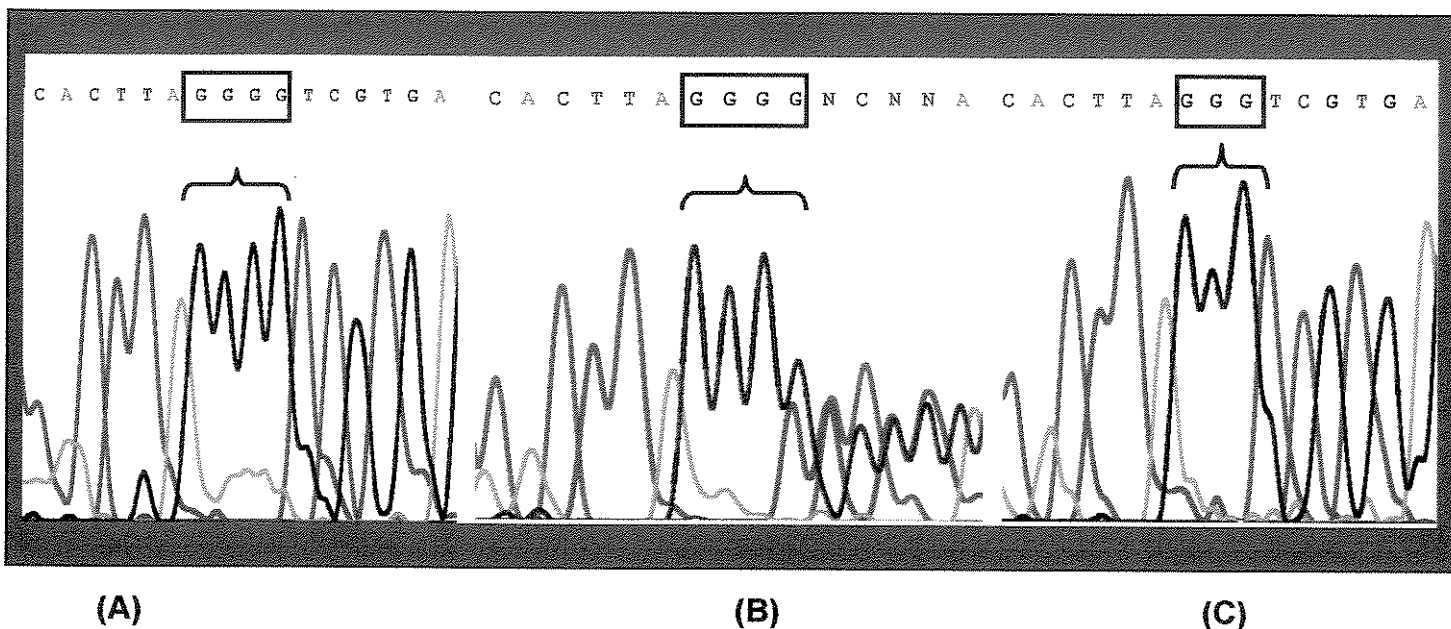
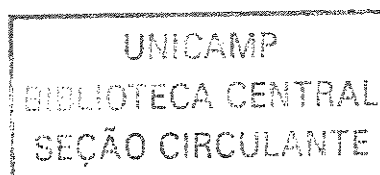


Figura 22. Porção relevante do eletroferograma do exon 7 do gene *RHce*. A: Clone de alelo normal de indivíduo heterozigoto para a mutação. B: Alteração no eletroferograma de indivíduo heterozigoto evidenciando a mutação (GGGG → GGG). C: Mutação presente em ambos os alelos *RHce* nos indivíduos homozigotos para o fenótipo *Rh_{null}*.

Proteína Rhce			
Normal	TAISGSSLAH PQRKISMTYV HSAVLAGGVA VGTSCHLIPS PWLAMVLGLV	300	
Amorfa	TAISGSSLAH PQRKISMTYV HSAVLAGGVA VGTSCHLIPS PWLAMVLGLV	300	
Normal	AGLISIGGAK CLPVCCNRVL GIPHSSIMHS IFSLLGLLGE ITYIVLLVLH	350	
Amorfa	AGLISIGGAK CLPVCCNRVL GETTSPSCTP SSACWVCLER SPTLCCWCFI	350	
Normal	TVGAGNGMIG FQVLLSIGEL SLAIVIALTS GLLTGLLLNL KIWKAPHEAK	400	
Amorfa	LSGTAMA Stop codon prematuro	357	
Normal	YFDDQVFWKF PHLAVGF	417	

Figura 23. Sequência de aminoácidos da proteína Rhce truncada - *Rh_{null}*

5. Discussão



A. Genotipagem *RH Cc*

Apesar de vários autores (POULTER et al., 1996; SINGLETON et al., 2000; TANAKA et al., 2001; TAX et al., 2002) terem publicado seqüências de primers para realização da genotipagem dos alelos *RH C* e *RH c*, a alta homologia existente entre os exons 1 e 2 dos genes *RHCE* e *RHD* tem dificultado o desenho destes primers (CHERIF-ZAHAR et al., 1994; FAAS, et al., 1995) e conseqüentemente, a seleção adequada da técnica a ser utilizada na rotina.

A escolha das técnicas de genotipagem *RH Cc* utilizadas neste trabalho baseou-se na busca da relação custo-benefício, ou seja, baixo custo, alta sensibilidade e fácil execução. Desta forma, duas técnicas para genotipagem *RH Cc* se encaixaram no perfil desejado: uma técnica de PCR-Multiplex modificada (SINGLETON et al., 2000) e uma técnica de PCR-RFLP (TANAKA et al., 2001).

Para que estas técnicas pudessem ser seguramente aplicadas na clínica, procuramos ainda estabelecer protocolos eficientes de genotipagem do gene *RHCE* na população brasileira através de um estudo de comparação entre os resultados da fenotipagem e genotipagem em amostras de sangue e DNA de doadores voluntários de sangue.

A análise dos resultados da genotipagem *RH Cc* obtidos através das técnicas selecionadas e subsequente comparação com os resultados das

fenotipagens RhCc, demonstrou que a técnica de PCR-Multiplex modificada de **SINGLETON et al., 2000** apresenta maior eficiência e confiabilidade para a realização da genotipagem *RH Cc* em populações com alto índice de miscigenação, como a população brasileira.

A única discrepância encontrada entre os resultados da genotipagem *RH Cc* e fenotipagem RhCc quando utilizamos esta técnica, ocorreu devido a presença do alelo híbrido *r's*, o qual apresenta uma frequência de 0,4% em brancos e aproximadamente 40% em negros (**TAX et al., 2002**). Estudos prévios demonstraram que indivíduos com descendência Africana e que apresentam este alelo são geralmente genotipados como *RH cc* e expressam fracamente o antígeno RhC nas hemácias. Como esta variante híbrida *RHD (D-CE-D)*, possui os exons 1 e 2 e parte do exon 3 do gene *RHD* e, os demais exons do gene *RHCE* (**SINGLETON et al., 2000**) uma correlação apropriada entre fenótipo e genótipo *RH Cc* em populações de descendência Africana deve incluir a análise do exon 3 (**TAX et al., 2002**).

Devido ao fato das técnicas de genotipagem *RH Cc* utilizadas na rotina incluírem apenas primers que amplificam o exon 1, intron e exon 2 do gene *RHCE*, discrepâncias entre fenótipo e genótipo podem ocorrer. A técnica de PCR-multiplex por nós utilizada não foi capaz de detectar o alelo *RHC*, uma vez que o exon 1, o intron 2 e exon 2 do alelo mutado são de *RHD* e não de *RHCE*, foi necessário seqüenciar o exon 3 do gene *RHCE* para detectarmos esta variante, *r's*. Assim, para a realização segura da genotipagem *RH Cc* na população

brasileira recomendamos a utilização da técnica modificada de **Singleton et al., 2000** incluindo a análise do exon 3.

O alto índice de discrepâncias (26,08%) encontrado entre os resultados de fenotipagem RhCc e genotipagem *RH Cc* pela técnica de PCR-RFLP (**TANAKA et al., 2001**) por nós utilizada, levanta dúvidas sobre a qualidade da mesma (regiões do gene mal escolhidas ou primers com seqüências duvidosas - instáveis) e sobre a possibilidade de nossa população apresentar polimorfismos em regiões de introns dos genes *RH* em relação às populações homogêneas, tal como a japonesa, onde esta técnica foi desenvolvida e padronizada. Isto é aceitável, uma vez que o Brasil sofreu um intenso processo de miscigenação racial.

De acordo com os nossos resultados, a técnica de PCR-RFLP descrita por **TANAKA et al., 2001** não é recomendada para realização da genotipagem *RH Cc* na população brasileira.

B. Genotipagem *RH Ee*

A técnica de PCR-RFLP (**RIOS et al., 1999; REID et al., 2000**) selecionada para a genotipagem dos alelos *RH Ee* mostrou-se eficiente e apropriada para a população brasileira e, portanto adequada para utilização na rotina.

Esta técnica, aplicada de forma criteriosa pode ser uma poderosa ferramenta no auxílio à resolução de problemas nos resultados de fenotipagem em

amostras que apresentam fraca expressão dos antígenos RhE e Rhe e que portanto, são de difícil caracterização sorológica.

O alelo *ceMO* encontrado na amostra que apresentou resultados discrepantes entre a fenotipagem RhEe e a genotipagem *RH Ee*, é característico de descendentes de Africanos e, decorrente da mutação G667T no exon 5 do gene *RHce*, resultando na substituição Val223Phe na quarta alça extracelular que leva a fraca expressão do antígeno Rhe (**NOIZAT-PIRENNE et al., 2001**). Além disto, esta amostra apresentava a troca Trp16Cys conseqüente da mutação de ponto 48G>C no exon 1 do gene *Rhce* associada ao fenótipo VS que também levam ao enfraquecimento da expressão do antígeno Rhe (**WESTHOFF et al., 2001**) nas hemácias. A presença do alelo *ceMO* associado a Cys16 e VS contribuiu significativamente na redução da expressão do antígeno Rhe na membrana eritrocitária e por esta razão este antígeno não foi detectado na fenotipagem.

Se considerarmos que os anti-soros anti-e utilizados na rotina de fenotipagem, não detectaram o antígeno Rhe, pacientes portadores deste alelo ou de outras variantes do antígeno Rhe podem ser classificados erroneamente como Rhe-negativo. Este resultado levaria a uma diminuição considerável na disponibilidade de sangue para estes indivíduos, uma vez que o fenótipo Rhe-negativo ocorre na frequência de 1/50 em nossa população.

Além disto, a presença do alelo *ceMO* em homozigose tem sido freqüentemente associada à perda da expressão do antígeno de alta freqüência

hr^S e ao desenvolvimento de anticorpos públicos clinicamente significantes. Assim, a caracterização molecular das variantes Rhe deve ser recomendada em pacientes dependentes de transfusão, pois permite a seleção correta do sangue a ser transfundido. Auxilia ainda, na prevenção da aloimunização, podendo diminuir os efeitos de potenciais reações hemolíticas.

C. Frequência gênica, combinações alélicas e ocorrência dos alelos *RH Cc* e *RH Ee*

As frequências fenotípicas e genotípicas do sistema Rh podem diferir entre populações como uma consequência da miscigenação entre os indivíduos de diferentes grupos raciais (BEIGUELMAN, 2003).

O intenso processo de miscigenação que ocorreu no Brasil desde o período de sua colonização, atribuiu a população brasileira um antecedente étnico único, devido ao grande fluxo gênico de indivíduos Africanos, Europeus e Asiáticos entre a nossa população. Isto pode ser facilmente visualizado na região sudeste do Brasil, que possui um alto índice de densidade populacional e tem continuamente recebido imigrantes de outras partes do país e do mundo. Assim, doadores desta região constituem amostra representativa de uma população miscigenada.

A genotipagem *RH Cc* e *RH Ee* por nós realizada em doadores de sangue permitiu determinar as frequências gênicas, equivalente a ocorrência destes alelos

em nossa população, e as taxas de combinações possíveis entre eles, bem como estabelecer as relações destes valores com os de outras populações.

A ocorrência do alelo *RHC* (Tabela 12) em nossa população (37%) mostrou-se similar à encontrada em indivíduos de origem Africana (27%), mas diferiu da frequência alélica observada nos indivíduos de origem Asiática (93%) e Caucasiana (68%). Para o alelo *RHc* não foi verificada co-relação entre os valores observados nas diferentes populações descritas. Em nosso estudo, verificamos também que a ocorrência do alelo *RHE* (16%) foi similar à frequência observada em Africanos (22%) enquanto que a frequência do alelo *RHe* foi inferior à observada nas demais populações. As diferenças encontradas podem ser explicadas pelo processo de miscigenação ocorrido na nossa região.

Tabela 12. Ocorrência dos alelos *RH* isolados em diferentes populações

Alelos RH	Ocorrência (%)			
	Asiáticos*	Caucasianos*	Africanos*	Brasileiros
C	93	68	27	37
c	47	80	96	62
E	39	29	22	16
e	96	98	98	83

* Reid e Lomas-Francis, 2002

Os valores das taxas de combinações alélicas Rh em nossa população, ao contrário da porcentagem de ocorrência individual desses alelos, demonstram flutuações de similaridade com a população Africana e Caucasiana e diferem substancialmente das taxas de combinações *RHCE* observadas na população Asiática (**Tabela 13**). Estes resultados confirmam os efeitos da miscigenação entre os doadores de sangue Africanos e Caucasianos.

Tabela 13. Prevalência dos alelos *RHCE* em diferentes populações

% de Prevalência				
Alelos	Caucasianos*	Africanos*	Asiáticos*	Brasileiros
<i>RHce</i>	44	19	72	31
<i>RHcE</i>	15	11	21	10
<i>RHce</i>	41	70	6	52
<i>RHCE</i>	0	0	1	1

* fonte: www.bioc.aecom.yu.edu/bgmut/hr_common.htm

D. Caracterização molecular do antígeno JAL (RH48)

O antígeno de baixa incidência, JAL, foi observado pela primeira vez em 1990 por LOMAS et al. e POOLE et al., quando então, foi caracterizado por apresentar acentuada redução na expressão dos antígenos RhC ou RHc e Rhe, e expressão normal do antígeno RhD.

Em indivíduos de origem Africana, o antígeno JAL está relacionado à fraca expressão dos antígenos Rhc e Rhe enquanto que em indivíduos Caucasianos o antígeno JAL é caracterizado pela fraca expressão dos antígenos RhC e Rhe (LOMAS et al., 1990).

Desde a descoberta do fenótipo RH48, tornou-se claro que o anticorpo produzido contra o antígeno JAL podia causar severas reações hemolíticas, no entanto, as alterações moleculares responsáveis pela expressão deste antígeno ainda continuavam desconhecidas. Até o presente momento, este trabalho foi o único que estudou as bases moleculares do fenótipo JAL.

Através de amostras de sangue de dois indivíduos de uma mesma família (mãe e filho), que apresentavam o fenótipo RH48 acompanhado de reduzida expressão do antígeno Rhe, foi possível caracterizar as alterações moleculares responsáveis pela presença do antígeno JAL nesta família brasileira de origem Africana.

O seqüenciamento direto dos 10 exons do gene *RHCE* em ambas as amostras identificou as mutações C733G (L245V) no exon 5 responsável pelo antígeno VS, e a mutação A1060C (N354A) no exon 7 que silencia o alelo VS, ambas em heterozigose. Nas amostras do propósito II-6 (mãe) foi também identificada a mutação 48C em homozigose que leva a substituição Trp16Cys.

Embora estas amostras tenham sido fenotipadas como VS+, estes resultados explicam a razão pela qual o antígeno VS não foi detectado na

fenotipagem, uma vez que a presença da mutação A1060C (N354A) no exon 7 silencia a expressão do antígeno VS.

Além disto, pudemos constatar que a fraca expressão do antígeno Rhe em indivíduos portadores do antígeno JAL não é decorrente da presença de Cys16 pelo fato de um dos indivíduos estudados (III-1) não apresentar esta alteração.

É possível que a associação das duas mutações (733G no exon 5 que leva a expressão do antígeno VS e a mutação A1060C no exon 7), em um único alelo, desencadeie modificações estruturais na proteína Rh, alterando assim a exposição do antígeno Rhe na membrana eritrocitária e conseqüente redução da expressão deste antígeno.

A presença do antígeno JAL é um dos exemplos nos quais a genotipagem pode auxiliar na seleção adequada de sangue para as transfusões, pois o fato de um doador possuir apenas um alelo responsável pela expressão do antígeno JAL já o torna potencialmente capaz de induzir a aloimunização.

E. Caracterização molecular do raro fenótipo Rh_{null}

Diversas alterações moleculares já foram descritas como sendo responsáveis pelo fenótipo Rh_{null} regulador (Cartron, 1999), no entanto, pouco se sabe sobre as bases moleculares responsáveis pelo fenótipo Rh_{null} do tipo amorfo.

Este estudo determinou o quarto mecanismo molecular responsável pelo fenótipo Rh_{null} tipo amorfo (Tabela 14) e, foi o primeiro estudo a caracterizar

molecularmente este fenótipo em uma família brasileira. A deleção de um nucleotídeo (G) entre os nucleotídeos 960 a 963 do exon 7 do gene *Rhce* em duas irmãs desta família foi a responsável pela presença deste raro fenótipo.

Esta única mutação, posicionada em *cis* e em *trans*, causou a perda do fenótipo Rh funcional nos indivíduos homozigotos para a mutação (II-1 e II-3), pois a proteína sintetizada possui uma região C-terminal que difere em 36 aminoácidos da proteína *Rhce* normal, tornando-a instável.

Tabela 14. Bases Moleculares do fenótipo Rh_{null} tipo amorfo

Alterações	Propósitos	Autores
<i>RHCe</i> - TCA>C; Pro323; mudança no quadro de leitura → Stop codon G398	Alemanha (DR)	Huang et al., 1999
<i>RHce</i> - intron 4, 5' mutação no sítio de splice gt>tt	Espanha (DAA)	Chérif-Zahar et al., 1999
<i>RHce</i> - del TCTTC no exon 1 → Stop codon Leu31	Japonês	Kato-Yamazaki et al., 2000
<i>RHce</i> - del G (nt entre 960-963) exon 7; mudança no quadro de leitura → stop codon Gly321	Brasil (II-1, II-3)	Presente Trabalho

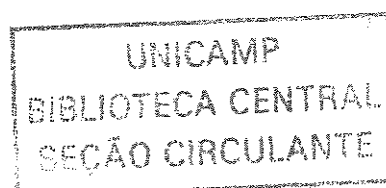
Acreditamos que a instabilidade gerada na proteína Rh mutada afete sua interação com outras proteínas de membrana, o que faz com que seja a responsável pela perda ou diminuição da expressão de diversos antígenos

eritrocitários situados próximos aos antígenos Rh, tal como as proteínas LW, Fy5, CD47, s e U. Em nosso estudo, esta alteração foi comprovada através das análises sorológicas e de citometria de fluxo, que demonstraram ausência de reatividade destes antígenos com anticorpos específicos nas amostras de sangue dos indivíduos homozigotos para a mutação (II-1 e II-3) estudadas.

Estes dados nos permitem estabelecer relações de causa e efeito nos portadores do fenótipo Rh_{null}, pois diante dos estudos moleculares e de expressão dos antígenos, se torna evidente os motivos que desencadeiam o aumento da fragilidade osmótica, maior permeabilidade a alguns íons, esferomatocitose e a anemia hemolítica compensada nesses pacientes, uma vez que a integridade da membrana eritrocitária é afetada pela presença de uma proteína Rh desestruturada.

Este é o segundo caso em que o fenótipo Rh_{null} do tipo amorfo ocorreu por mutações que atingem uma pequena região do exon 7 do gene *RHce* entre os nucleotídeos 965-968 (HUANG et al., 1998), responsáveis pela síntese de aminoácidos localizados na quinta alça intracelular na proteína (aminoácidos 322 e 323). Estes resultados levantam a hipótese de que esta possa ser uma região de alta instabilidade no gene *RHce*, altamente susceptível ao desenvolvimento de substituições que desencadeiam alterações no quadro de leitura dos aminoácidos e conseqüentes codons de terminação prematuros na proteína Rh.

6. Conclusões



Considerando os objetivos do presente trabalho e as condições em que foram realizadas as análises moleculares do gene *RHCE* e suas variantes na população brasileira, podemos concluir que:

1. A técnica de PCR-Multiplex descrita por *Singleton et al, 2000* para detecção do polimorfismo *RH Cc* é mais eficaz do que a técnica de PCR-RFLP proposta por *Tanaka et al, 2001* em populações com alta diversidade étnica como a população Brasileira;

2. A eficiência da genotipagem *RH Cc* aumenta quando além do exon 2 são pesquisados os exons 1, intron 2 e exon 3 do gene *RHCE* em populações miscigenadas;

3. A técnica de PCR-RFLP para determinação do polimorfismo *RH Ee* analisada neste trabalho é eficiente para a realização da genotipagem *RH Ee*;

4. As frequências alélicas isoladas e combinadas do gene *RHCE* da população Brasileira quando comparadas às frequências observadas em

populações com etnias homogêneas nos permitem observar o processo de miscigenação que ocorreu em nossa região;

5. Neste estudo foi possível definir o mecanismo molecular responsável pelo fenótipo JAL em descendentes de Africanos e observar que o fenótipo JAL+ somente poderá ser detectado através das técnicas de fenotipagem se as alterações moleculares responsáveis por este fenótipo estiverem em estado de homozigose *RHee* ou heterozigose *RHEe*;

6. Neste trabalho descrevemos uma nova mutação responsável pelo fenótipo Rh_{null} tipo amorfo, observado em uma família brasileira. Este é o segundo caso em que o fenótipo Rh_{null} do tipo amorfo ocorreu por mutações que atingem uma pequena região do exon 7 do gene *RHce* entre os nucleotídeos 965-968, responsáveis pela síntese de aminoácidos localizados na quinta alça intracelular na proteína (aminoácidos 322 e 323). Estes resultados levantam a hipótese de que esta possa ser uma região de alta instabilidade no gene *RHce*, altamente susceptível ao desenvolvimento de substituições que desencadeiam alterações no quadro de leitura dos aminoácidos e conseqüentes codons de terminação prematuros na proteína Rh;

7. A genotipagem deve ser recomendada para identificação de variantes do gene *RHCE* que se expressam fracamente uma vez que estes antígenos não são detectados pela fenotipagem. A caracterização molecular de variantes Rh em

pacientes politransfundidos permite uma seleção mais adequada do sangue a ser transfundido. Auxilia ainda, na prevenção da aloimunização, podendo diminuir os efeitos de potenciais reações hemolíticas.

7. Summary

Rh is a highly complex red cell blood group system, consisting of 48 antigens. The RH locus is composed of two highly homologous genes, the *RHD* gene, which encodes for the D protein and the *RHCE* gene, which encodes the protein carrying the C/c and E/e antigens. Four main *RHCE* alleles have been characterized: *ce*, *Ce*, *CE* and *cE*. Six nucleotide (nt) substitutions within exons 1 and 2 have been reported to determine C/c polymorphism, however only a T/C nt substitution (determining the Ser/Pro polymorphism at position 103) strictly correlates to the C/c polymorphism. The E/e polymorphism is caused by a single nt substitution (C/G), resulting in a Pro/Ala amino acid exchange at position 226.

A plethora of *RHCE* variants have been identified at molecular level, although the requirements for expression of the RhCE antigens are not fully understood. There are few studies of the *RHCE* gene and these variants in the Brazilian population and little is known about them in such population.

Based on this knowledge, the purpose of this study was to investigate the presence of the *RHCE* alleles and their frequencies, to establish protocols for *RHCE* genotyping and to identify at molecular level *RHCE* variants responsible for weak expression of the RhCE antigens in the Brazilian population.

Blood and DNA samples from 358 blood donors were tested for RH Cc by two different techniques (one multiplex PCR and one PCR-RFLP) and for RH Ee for a PCR-RFLP technique. The RhCE variants were identified and confirmed by sequencing of the 10 exons of the *RHCE* gene.

The multiplex PCR used for RHCc genotyping was better than the PCR-RFLP. Only one discrepancy between phenotype and genotype was found

associated with the r's phenotype when the multiplex was used while 36 discrepant results were obtained by using the PCR-RFLP.

Phenotype and genotype results agreed in 99.7% of the cases for RhEe, indicating that the molecular genotyping protocol used can be effectively applied to populations with a highly diverse genetic background. Only one discrepancy was found associated with the *ceMO* allele responsible for a very weak expression of the Rhe antigen.

The allelic frequency of the *RHC* found in the Brazilian population was similar to the frequency found in the African population. For the other alleles they were between the frequencies found in Caucasian and Africans.

We also investigated variants of the *RHCE* in a family with the JAL antigen and in another family with the Rh_{null} amorph phenotype.

Molecular analyses of the *RHCE* gene from the JAL individuals showed a point mutation in exon 5: 733 C>G (L245V) and in exon 7: 1060A>C (N354A). These changes in the amino acids sequences probably give rise to abnormal expression of c and e antigens and to the low incidence antigen JAL as a result of conformational changes in the RhCE protein

Molecular analyses of the *RHCE* gene from the Rhnull amorph type family studied showed a deletion of the nucleotide 963 in exon 7 of the *RHce* gene [GGG(Glu₃₂₁→GG)] in addition to a deletion of the *RHD* gene. This new deletion in exon 7 introduced a frameshift after Glu321 and a premature stop codon, resulting in a shorter predicted protein with 359 aminoacids, including a new C-terminal sequence that is likely to alter the protein conformation and impair the Rh complex assembly.

8. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

AGRE, P.; CARTRON, J.P. Molecular Biology of the Rh antigen. **Blood**, 78:551-63, 1991

AVENT, N.D.; LIU, W.; WARNER, K.M.; MAWBY, W.J.; JONES, J.W.; RIDGWELL, K.; TANNER, M.J.A. Immunochemical analysis of the human erythrocyte Rh polypeptides. **J Biol Chem**, 271:14233-9, 1996

AVENT, N.D. Human erythrocyte antigen expression: its molecular basis. **Br J Biomed Sci**, 54:16-37, 1997

AVENT, N.D; REID, M.E. The Rh Blood group system: a review. **Blood**, 95:375-87, 2000

AVENT, N.D. Molecular biology of the Rh blood group system. **J Pediat Hematol Oncol**, 23:394-402, 2001

BECKERS, E.A.M.; FAAS, B.H.W.; SIMSEK, S.; OVERBEEKER, M.A.M; VAN RHERNEN, D.J. The genetic basic of a new partial D antigen: DDBT. **British Journal of Haematology** , 93:720-7, 1996

BEIGUELMAN, B. O sistema Rh. In: BEIGUELMAN, B. **Os sistemas sangüíneos eritrocitários**. 3ed, Ribeirão Preto: Funpec Editora, 2003.p.107-49

BLANCHER, A.; SOCHA, W.W. The Rhesus system. In: Blancher, A.; Klein, J.; Socha, W.W.; eds. **Molecular Biology and Evolution of the Blood Group and MHC Antigens in Primates**. **Springer-Verlag**, 147-218, 1997

BLUNT, T.; DANIELS, G.; CARRIT, B. Serotype switching in a partially detected RHD gene. **Vox Sang**, 67:397, 1994

CARRITT, B.; KEMP, T.J.; POULTER, M. Evolution of the human Rh(Rhesus) blood group genes: A 50 year old prediction (partially) fulfilled. **Human Molecular Genetic**, 6:843-50, 1997

CARTRON, J.P. Defining the blood group antigen: biochemistry and molecular genetics. **Blood Reviews**, 8:211, 1994

CARTRON, J.P. RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. Review. **Baillieres Best Pract Res Clin Haematol**, 12:655-89, 1999.

CASTILHO, L.M.; SILVA, R.C.; MILARE, M.S.; PELLEGRINO, J.Jr.
Distribution of phenotypes and gene frequencies within the Rh system in blood donors (abstract). **Revista Paulista de Medicina**, 110:IH33, 1992

CASTILHO, L.; RIOS, M.; VIOLATI, R.G.; PESSOA, C.; PELLEGRINO, J.J.R.; COSTA, F.F. Prenatal determination of fetal RhD by molecular analysis of maternal plasma [abstract]. **Transfusion Clinique et Biologique**, 8(Suppl 1):32, 2001

CASTILHO, L. **Bloof Group Genotyping**. In: Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics, 2004

CHÉRIF-ZAHAR, B.; BLOY, C.; LE VAN KIM, C.; BLANCHARD, D.; BAILLY, P.; HERMAND, P.; SALMON, C.; CARTRON, J.P.; COLIN, Y. Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. **Proc Natl Acad Sci USA**, 87:6243, 1990

CHÉRIF-ZAHAR, B.; MATTEI, M.G.; LE VAN KIM, C.; BAILLY, P.; CARTRON, J.P. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. **Human Genetics**, 86:398-400, 1991

CHÉRIF-ZAHAR, B.; LE VAN KIM, C.; ROUILLAC, C.; RAYNAL, V.; CARTRON, J.P.; COLIN Y. Organization of the gene (RHCE) encoding the human blood group RhCcEe antigens and characterization of the promoter region. **Genomics**, 19:68-74, 1994

CHÉRIF-ZAHAR, B.; RAYNAL, V.; GANE, P.; MATTEI, M.G.; BAILLY, P.; GIBBS, B.; COLIN, Y.; CARTRON, J.P. Candidate gene acting as a supressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. **Nat Genet**, 12:168-73, 1996

CHÉRIF-ZAHAR, B.; MATASSI, G.; RAYNAL, V.; GANE, P.; MAMPEL, W.; PEREZ, C.; CARTRON, J.P. Molecular defects of the RHCE gene in Rh-deficient individuals of the amorph type. **Blood**, 92:639-46, 1998

CHÉRIF-ZAHAR, B.; MATTEI, M.G.; RAYNAL, V. Rh-deficiency of the regulator tipe caused by splicing mutation in the human RH50 gene. **Blood**, 92: 2535-40, 1998b

COLIN, Y.; CHERIF-ZAHAR, B.; LE VAN KIM, C.; VAN HUFFEL, R.; CARTRON, J.P. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. **Blood**; 78:2747-52, 1991

DAHR, W.; KORDOWICZ, M.; MOUDS, J.; GEILEN, W.; LEBECK, L.; KRÜGER, J. Characterization of the Ss sialo-glycoprotein and its antigens in Rhnull erythrocytes. **Blut**, 54:13-24, 1987

DANIELS, G.L.; ANSTEE, D.J.; CARTRON, J.P.; DAHR, W. et al. Blood group Terminology. **Vox Sang**, 69:265-79, 1995

DANIELS, G.; FAAS, B.H.W.; GREEN, C.A.; SMART, E.; MAASKANT-VAN, WIJK P.A.; AVENT, N.D.; ZONDERVAN, HA; VON DEM BORNE, AEGKR; VAN DER SCHOOT, C.E. The VS and V blood group polymorphisms in Africans : a serologic and molecular analysis. **Transfusion**, 38:951-8, 1998

DANIELS, G. **Human Blood Groups**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2002

DE VETTEN, M.P.; AGRE, P. The Rh polypeptide is a major fatty acid acylated erythrocytes membrane protein. **J Biol Chem**, 263:18193-6, 1998

EYERS, A.S.; RIDGWELL, K.; MAWBY, W.J.; TANNER M.J. Topology and organization of human Rh (Rhesus) blood group-related polypeptides. **J Biol Chem**, 269: 6417-23, 1994

FAAS, B.H.W.; SIMSEK, S.; BLEEKER, P.M.M.; OVERBEEKE, M.A.M.; CUIJERS, H.T.H.M.; VON DEM BORNE, A.; SCHOOT, C.E. RhE/e genotyping by allele-specific primer amplification. **Blood**, 85:829-32, 1995

FAAS, B.H.W.; BECKERS, E.A.M.; WILDOER, P.; LIGHTART, P.C.; OVERBEEKE, M.A.M.; ZONDERVAN, H.Á.; VON DEM BORNE, A.; VAN DER SCHOOT, CE. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. **Transfusion**, 37:38-44, 1997

FISHER, R.A. In RACE, R.R. An incomplete antibody in human serum. **Nature**, 153:771-2, 1944

FLEGEL, W.A.; WAGNER, F.F. RHD epitope density profiles of RHD variant red cells analysed by flow cytometry. **Transf Clin Biol**, 3:429-31, 1996.

GARRATTY, G. Blood Group and Disease: A historical perspective. **Transfusion Medicine**. San Diego CA, Academic Press, 2000

GEIFMAN-HOTZMAN, O.; WOJTOWYCZ, M.; KOSMAS, E.; ARTAL, R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. **Obstet Gynecol**, 89:272-5, 1997

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

GIRELLO, L.A; KÜHN, I.B.B.T. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. São Paulo: Editora Senac, 2002

GREEN, C.; COGHLAN, G.; BIZOT, M; KASULKE, D.; BAMBAIL-GIRARD, M.; WALLACE, M.; LOMAS-FRANCIS, C.; DANIELS, G. JAHK: a low frequency antigen associated with the r^G complex of the Rh blood group system. **Transfusion Medicine**, 12:55-61, 2002

HEITMAN, J.; AGRE, P. A new face of the Rhesus antigen. **Nat Genet**, 26(3):258-9, 2000

HEMKER, M.B.; LIGTHART, P.C.; BERGER, L.; VAN RHENEN, D.J.; VAN DER SCHOOT, C.E.; MAASKANT-VAN, WIJK P.A. DAR, a new RhD variant involving exon 4,5 and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African Black. **Blood**, 94:4337-42, 1999

HOELTGE, G.A.; DOMEN, R.E.; RYBICKI, L.A.; SCHAFFER, P.A. Multiple red cell transfusions and alloimmunization: experience with 6996 antibodies detected

in a total of 159,262 patients from 1985 to 1993. **Arch Pathol Lab Med**, 119:42-, 1995.

HUANG, C.H.; BLUMENFELD, O.O. MNSs blood groups and major glycoproteins: molecular basis for allelic variation. In: Cartron JP; Rouger P, editors. Molecular basis of human blood group antigens. New York: **Plenum**, 153-88, 1995

HUANG, C.H.; CHEN, Y.; REID, M.E.; GHOSH, S. Genetic recombination at the human RH locus: a family study of the red cell Evans phenotype reveals a transfer of exons 2-6 from the to the RHCE gene. **Am J Gen**, 59:825-33, 1996.

HUANG, C.H. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. **Current Opinion in Hematology**, 4:94-103, 1997

HUANG, C.H.; CHEN, Y.; REID, M.E.; SEIDI, C. Rhnull disease: the amorph type results from a novel double mutation in RhCe gene on D-Negative background. **Blood**, 92:664-71, 1998

HUANG, C.H.; CHENG, G.; REID, M.E.; CHEN, Y. Rh(mod) syndrome: a family study of the translation-initiator mutation in the Rh50 glycoprotein gene. **Am J Hum Genet**, 64:108-17, 1999

HUANG, C.H.; PHILLIP, Z.; CHENG, Y. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. **Seminars in Hematology**, 37:150-65, 2000

HUANG, C.H.; LIU, P.Z. New insights into the Rh superfamily of genes and proteins in erythroid cells and nonerythroid tissues. **Blood Cells Mol Dis**, 27:90-101, 2001

HYLAND, C.A.; WOLTER, L.C.; SAUL. Three unrelated RhD gene polymorphisms identified among blood donors with Rhesus Ccee (r'r') phenotypes. **Blood**, 84:321, 1994

ISSIT, P.D. An invited review: The Rh antigen e its variants, and some closely related serological observation . **Immunohematology**, 7:29-36, 1991

ISSIT, P.D; ANSTEE, D.J. Applied Blood Group serology, Durhan NC, **Montgomery Scientific Publications**, 1998

KASHIWASE, K.; ISHIKAWA, Y.; HYODO, H. et al. E variants found in Japanese and c antigenicity alteration without substitution in the second extracellular loop. **Transfusion**, 41:1408-12, 2001

KATO-YAMAZAKI, M.; OKUDA, H.; KAWANO, M. et al. Molecular genetic analysis of the Japanese amorph Rh_{null} phenotype. **Transfusion**, 40:617-18, 2000

LANDSTEINER, K.; WIENER, A. S. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. **Proc Soc Exp Biol**, 43:233, 1940

LANDSTEINER, K.; WIENER, A. S. Studies on an agglutininogen (Rh) in human blood reacting with anti-rhesus sera and with human antibodies. **J Exp Med**, 74:309-20, 1941

LE VAN KIM C.; MOURO I.; CHERIF-ZAHAR B. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. **Proc Natl Acad Sci USA**, 89:925-9, 1992

LEGLER, T.J.; EBER, S.W.; LAKOMER, M.; LYNEM, R.; MAAS, J.H.; PEKRUM, A.; REPAS-HUMPE, M.; SCHROTER, W.; KOHLER, M. Application of RHD and RHCE genotyping for correct blood group determination in chronically transfused patients. **Transfusion**, 39:852-5, 1999

LEVINE, P.; STETSON, R.E. Na unusual case of intragroup agglutination. **J A M A**, 113:126-7, 1939

LOMAS, C.; POOLE, J.; SALARU, N. et al. A low-incidence red cell antigen JAL associated with two unusual Rh gene complexes. **Vox Sang**, 59:39-43, 1990

MARINI, A.M.; SOUSSI-BOUDEKOU, S.; VISSERS, S.; ANDRE, B. **Mol Cel Biol**, 17: 4282-93, 1997

MARSH, W.L.; CHAGANTI, R.S.K.; GARDNER, F.G.; MAYER K., NOWELL P.C.; GERMAN, J. Mapping human autossomes: Evidence supporting assignment of the Rhesus to the short arm of chromossome 1. **Science**, 184:966-8, 1974

MILLER, Y.E.; DANIELS, G.L.; JONES, C.; PALMER, D.K. Identification of a cell-surface antigen produced by a gene human chromossome 3 (cen-q22) and not expressed by Rh (null) cells. **Am J Hum Genet**, 41:1061, 1987

MOLLINSSON, P.L.; ENGELFRIET, C.P.; CONTRERARS, M. Blood Transfusion in Clinical Medicine. Oxford, **Blackwell Scientif Publications**, 1988

MOURANT, A.E.; KOPEC, A.C.; DOMANIEWSKA-SOBCZAK, K. The distribution of the hu8man blood groups and the other polymorphisms. 2 ed. **Oxford University Press**, London, 1976

MOURO, I.; COLIN, Y.; CHÉRIF-ZAHAR, B.; CARTRON, J.P.; LE VAN KIM, C. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. **Nature Genetics**, 5:62-5, 1993

MOURO, I.; COLIN, Y.; SISTONEN, P.; LE PENNEC, P.E.; CARTRON, J.P.; LE VAN KIM, C. Molecular Basis of the RhCW (Rh8) and RhCX (Rh9) blood group specificities. **Blood**, v.86(3):1196-201, 1995

MOURO-CHANTELOUP, I.; COLIN, Y.; GANE, P. Molecular analysis of blood group Rh transcripts from a r^G r variant. **Br J Haematol**, 93:472-4, 1996

MOURO-CHANTELOUP, I.; DELAUNAY, J.; GANE, P.; NICOLAS, V.; JOHANSEN, M.; BROWN, E.J.; PETERS, LL; LE VAN KIM, C; CARTRON, JP; COLIN, Y. Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47. **Blood**, 101:338-44, 2003

NOIZAT-PIRENNE, F.; MOURO, I.; GANE, P.; OKUBO, Y.; HORI, Y.; ROUGER, P.; LE PENNER, P.Y.; CARTRON, J.P. A qualitative RhE variant encoded by a RhcE-D-Ce hybrid gene. **Transf Clin Biol**, 3:35s (PIC9), 1996

NOIZAT-PIRENNE, F.; MOURO, I.; GANE, P.; OKUBO, Y.; HORI, Y.; ROUGER, P. et al. Heterogeneity of blood group RhE variants revealed by serological

analysis and molecular alteration of the RHCE gene and transcript. **Br J Haematol**, 103:429–36, 1998

NOIZAT-PIRENNE, F.; MOURO, I.; LE PENNEC, P.Y. Evidence that serine at position 103 is not sufficient for complete C antigen expression. **Transfusion**, 39(Suppl):103S, 1999

NOIZAT-PIRENNE, F.; MOURO, I.; LE PENNEC, P.Y.; ANSART-PIRENNE, H.; JUSCZAK, G.; PATEREAU, C.; VERDIER, M.; BABINET, J.; ROUSSEL, M.; ROUGER, P.; CARTRON, JP. Two new alleles of the RHCE gene in Black individuals: the RHce allele ceMO and RHcE allele cEMI. **Br J Haematol**, 113:672-9, 2000

NOIZAT-PIRENNE, F.; MOURO, I.; LE PENNEC, P.Y. et al. Two new alleles of the *RHCE* gene in Black individuals: the *RHce* allele ceMO and the *RHcE* allele cEMI. **Br J Haematol**, 113:672-9, 2001

NOIZAT-PIRENNE, F.; LE PENNEC, PY; MOURO, I; ROUZAUD, AM; JUSZCZARK, G; ROUSSEL, M; LAUROUA, P; KRAUSE, C; ROUGER, P; CARTRON, JP; ANSART-PIRENNE, H. Molecular background of D(C)(e) haplotypes within the white population. **Transfusion**, 42:627-33, 2002

OKUDA, H; SUGANUMA, H; TSUDO, N; OMI, T; IWAMOTO, S; KAJII, E.
Sequence analysis of the Spacer Region between the RHD and RHCE genes.
Biochem Biophys Res Commun, 263:378-83, 1999

OKUDA, H; FUJIWARA, H; OMI, T; IWAMOTO, S; KAWANO, M; ISHIDA, T;
NOMURA, S; FUKUHARA, S; NAGAI, A; OHYA, I; KAJII, E. A japanese
propositus with D- - phenotype characterized by the deletion of both the RHCE
gene and D1S80 locus situated in chromosome 1p and the existence of a new
CE-D-CE hybrid gene. **Jpn Hum Genet**, 45:142-53, 2000a

OKUDA, H.; SUGANUMA, H.; KAMESAKI, T.; KUMADA, M.; TSUDO, N.; OMI, T.;
IWAMOTO, S.; KAJII, E. The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and
recombination events between RHD and RHCE genes through complete
sequencing. **Biochem Biophys Res Commun**, 274:670-83, 2000b

OKUDA, H; KAJII, E. The evolution and formation of RH genes. **Legal Medicine**,
4:139-55, 2002

OLIVÉS B.; MERRIAN, M.; BAILLY, P. et al. The molecular basis of the Kidd
blood group polymorphism and its lack of association with type 1 diabetes
susceptibility. **Hum Mol Genet**, 6:1017-20, 1997

PELLEGRINO, Jr. J. **Biologia Molecular de grupos sanguíneos aplicada a medicina transfusional** – Campinas, 2001. (Tese – Doutorado - Universidade Estadual de Campinas.

PETZ, LD; GARRATY, G. **Acquired Immune Hemolytic Anemias**. Churchill Livingstone, New York, 1980.

PETZ, L.D.; SWISHER, S.N.; KLEINMAN S. Blood groups. **Clinical Practice in Transfusion Medicine**, 3 ed, New York ,96-116, 1996

POOLE, J.; HUSTINX, H.; GERBER, H. et al. The red cell antigen JAL in the Swiss population: family studies showing that JAL is an Rh antigen (RH48). **Vox Sang**, 59:44-7, 1990

POULTER, M.; KEMP, T.; CARRITT, B. DNA-based Rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHD status using the polymerase chain reaction. **Vox Sang**, 70:164-8, 1996

REID, M.E.; RIOS, M. Applications of molecular genotyping to immunohaematology. **Br J Biomed Sci**, 56:145-52, 1999

REID, M.E.; RIOS, M.; POWELL, V.I. et al. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. **Transfusion**, 40:48-53, 2000a

REID, M.E.; RIOS, M.; YAZDANBAKHSH, K. Application of molecular biology techniques to transfusion medicine. **Seminars Hematology**, 37:166-76, 2000b

REID, M.E.; LOMAS-FRANCIS, C. The Blood Group Antigens Facts Book. San Diego: CA, **Academic Press**, 2003

RIOS, M.; CASH, K.; STRUPP, A.; UEHLINGER, J.; REID, M.E. DNA from urine sediment or buccal cells can be used for blood group molecular genotyping. **Immunohematology**, 15:61-5, 1999

RIOS, M.; BIANCO, C. The role of blood group antigens in infectious diseases. **Sem Hematol**, 37:177-85, 2000

ROUILLAC, C.; GANE, P.; CARTRON, J.P.; LE PENNEC, P.Y.; COLIN, Y. Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D and RhC/e in phenotype. **Blood**, 87:4853-61, 1996

ROZMAN, P.; DOVAN, T.; GASSNER, C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK and FY blood groups genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients whos have recently received multiple transfusion. **Transfusion**, 40:936-42, 2000

SALVIGNOL, I.; CALVAS, P.; SOCHA, W.W.; COLIN, Y.; LE VAN KIM, C.; BAILLY, P.; RUFFIE, J.; CARTRON, J.P.; BLANCHER, A. Structure analysis of the RH-like blood group gene products in nonhuman primates. **Immunogenetics**, 41:271-81, 1995

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2 ed. New York: Coldspring Harbor Laboratory Press, 1989

SCHMIDT, P.J.; LOSTUMBO, M.M.; ENGLISH, C.T.; HUNTER, O.B. Aberrant U blood group accompanying Rh_{null}. **Transfusion**, 7:33-4, 1967

SCOTT, M.L. The complexities of the Rh system. **Vox Sang**, 87(Suppl.1):58-62, 2004

SIEDL, S.; SPIELMAN, W.; MARTIN, H. Two siblings with Rhnull disease. **Vox Sang**, 23:182-6, 1972

SIMSEK, S.; JONG, C.A.M.; CUIJPERS, H.T.M.; BLEEKER, P.M.M.M.; WESTERS, T.M.; OVERBEEKER, M.A.M.; GOLDSCHIMEDING, R.; VAN DER S., VON DEM BORNE; A.E.G. Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNA coding for Rh polypeptides demonstration of E/e and C/c polymorphism. **Vox Sanguinis**, 67:203-09, 1994

SINGLETON, B.K.; GREEN, C.A.; AVENT, N.D.; MARTIN, P.G.; SMART, E.; DAKA, A.; NARTER-OLAGA, E.G.; HAWTHORNE, L.M.; DANIELS, G. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. **Blood**, 95:12-18, 2000

SOUPENE, E.; KING, N.; FIELD, E. et al. Rhesus expression in a green alga is regulated by CO(2). **Proc Natl Acad Sci USA**, 99:7769-73, 2002

SOUTHCOTT, M.J.G.; TANNER, M.J.A.; ANSTEE, D.J. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. **Blood**, 93:4425-35, 1999

STROBEL, E.; NOIZAT-PIRENNE, F.; HOFMANN S.; CARTRON, J.P.; BAUER, M.F. The molecular basis of the Rhesus antigen E^w. **Transfusion**, 44:407-9, 2004

STURGEON, P. Hematological observations on the anemia associated with blood type Rh. **Blood**, 36:310, 1970

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**, 106:164-71, 2000

TANAKA, M.; YAMASHITA, N.; TAQKAHASHI, J.; HIRAYAMA, F.; KAJII, E.; TANI, Y. RHC/c genotyping based on polymorphism in the promoter region of the RHCE gene. **Legal Medicine**, 3:205-12, 2001

TAX, M.G.H.M.; VAN der SCHOOT, E.; VAN DOOR, R.; DOUGLAS-BERGER, L.; VAN RHENER, D.J.; MAASKANT-VAN, P.A.W. RHC and RHc genotyping ethnic groups. **Transfusion**, 42:634-44, 2002

TIPPETT, P. Serologically defined Rh determinants. **J Immunogenet**, 17:247, 1990

VERLANDER, J.M.; MILLER, R.T.; FRANK, A.E. et al. Localization of the ammonium transporter proteins RhBG and RhCG in mouse kidney. **Am J Physiol**, 284:323-37, 2003

YAMAMOTO, F.; CLAUSEN, H.; WHITE, T. et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. **Nature**, 345:229-33, 1990

WAGNER, F.F.; GASSNER, C.; SMULLER, T.H.; SCHONITZER, D.; SCHUNTER, F.; FLEGEL, W.A. Molecular of weak D phenotypes. **Blood**, 93:385-93, 1999

WAGNER, F.F.; FLEGEL, W.A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. **Blood**, 95:3662-8, 2000

WAGNER, F.F.; FROHMAGER, A.; FLEGEL, W.A. RHD positive haplotypes in negative Europeans. **BMC Genetics**, 2(10), 2001

WESTHOFF, C.M.; SILBERSTEIN, L.E.; SIPHERD, B. et al. Altered "e" antigen expression associated with 16Cys in exon 1 of the RHce gene [abstract]. **Transfusion**, 38(suppl), 1998

WESTHOFF, C.M.; SILBERSTEIN, L.E.; WYLIE, D.E. Evidence supporting the requeriment for two proline residues for expression of c. **Transfusion**, 40:321-4, 2000

WESTHOFF, C.M.; SILBERSTEIN, L.E.; WYLIE, D.E.; SKAVDAHL, M.; REID, M.E. 16 Cys encoded by the RHce gene is associated with altered expression of the e antigen is frequent in the Ro haplotype. **Br J Haematol**, 113:666-71, 2001

WESTHOFF, C.M.; FERRERI-JACOBIA, M.; MAK, D.O.D; FOSKETT, J.K. Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. **J Biol Chem**, 277:12499-502, 2002

WESTHOFF, C.M. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. **Transfusion**, 44:1663-72, 2004

Homepage institucional

Blood Group Antigen Gene Mutation Base. Disponível em:

<http://www.bioc.aecom.yu.edu/bgmuthr_common.htm>. Acesso em 26 de maio de 2004.

9. Anexos

Resultados de Fenotipagem para os antígenos, Rh E, Rh e, Rh C e Rh c, e Genotipagem RHCE em amostras de sangue e DNA de 358 doadores voluntários de sangue:

Nº	Nº Doador	Iniciais	Nº Doação	Fenótipo	Genótipo
1	0379294-002	CCL	0103145-060	R1Rz	RHCCEe
2	0169118-002	JR	0103146-006	R2r	RHccEe
3	0384499-002	LCC	0103146-010	R2r	RHccEe
4	0327313-006	SEM	0103147-045	R2r	RHccEe
5	0364510-003	RAG	0103147-116	R1r	RHCcee
6	0324922-005	DLC	0103148-062	R1R1	RHCCEe
7	0342463-005	CGOP	0103148-077	rr	RHccce
8	0362458-003	MMCS	0103149-013	R1r	RHCcee
9	0368288-003	MFCS	0103149-036	rr	RHccEe
10	0351056-007	RRV	0103151-036	R1r	RHCcee
11	0103151-042	CG	0103151-042	R1R1	RHCCEe
12	0324873-006	RCK	0103151-038	R1r	RHccce
13	0159763-007	AAC	0103152-044	R1r	RHCcee
14	0131218-014	MFR	0103153-035	R1R2	RHCcEe
15	0386891-002	CSO	0103154-015	R2r	RHccEe
16	0360574-004	CNS	0103154-034	R2R2	RHccEe
17	0349195-004	SFS	0103154-051	R1r	RHCcee
18	0104779-005	SRP	0103156-031	R1R1	RHCCEe
19	0350954-003	MJB	0103157-027	R1R2	RHCcEe
20	0358571-005	JS	0103158-039	R1r	RHCcee
21	0337935-004	RMG	0103159-006	R2R2	RHccEE
22	0330970-003	ELA	0103160-004	rr	RHccce
23	0097273-028	AFRT	0103160-050	R1r	RHCcee
24	0354455-007	MDM	0103161-045	R1R2	RHCcEe
25	0340036-007	AVC	0103161-095	rr	RHccce
26	0238160-010	SV	0103162-020	R1r	RHCcee
27	0381274-002	MLC	0103162-024	R1r	RHCcee
28	0347883-006	LNC	0103163-069	rr	RHccce
29	0346201-004	RSC	0103163-079	R1r	RHCcee
30	0386402-002	WM	0103164-016	R1R1	RHCCEe
31	0360868-003	AFO	0103164-091	rr	RHccce
32	0387701-002	WM	0103165-018	R1r	RHCcee
33	0329295-008	ARF	0103165-053	R2r	RHccEe
34	0385618-002	EAS	0103165-089	R1r	RHCcee
35	0280809-005	JEBF	0103166-024	R1r	RHCcee
36	0264936-010	GPC	0103166-030	R1r	RHCcEe
37	0386196-002	ROG	0103168-021	R1r	RHCcee
38	0280627-012	MRA	0103168-065	R1r	RHCcee
39	0382653-002	RCS	0103169-006	R0r	RHccce
40	0387038-002	CAS	0103169-009	R0r	RHccce

Resultados de Fenotipagem para os antígenos, Rh E, Rh e, Rh C e Rh c, e Genotipagem *RHCE* em amostras de sangue e DNA de 358 doadores voluntários de sangue (cont.):

Nº	Nº Doador	Iniciais	Nº Doação	Fenótipo	Genótipo
41	0291210-003	MJRR	0103169-015	rr	<i>RHCcee</i>
42	0165976-007	JMMS	0103170-038	rr	<i>RHccee</i>
43	0386837-002	RCRT	0103170-044	R2r	<i>RHccEe</i>
44	0316941-009	CKC	0103171-008	R1R1	<i>RHCcEe</i>
45	0261464-003	MAG	0103171-071	R1R1	<i>RHCcEe</i>
46	0243373-003	ES	0103172-046	R2R2	<i>RHccEE</i>
47	0325544-004	JPSGS	0103173-043	R1r	<i>RHCcee</i>
48	0205753-003	EFJN	0103147-031	R1r	<i>RHCcee</i>
49	0234612-003	LGMB	0103174-044	R1R1	<i>RHCcEe</i>
50	0238335-014	ESMA	0103174-051	R0r	<i>RHccee</i>
51	0050481-009	EL	0103175-006	rr	<i>RHccee</i>
52	0373110-002	AFS	0103175-046	R0r	<i>RHccee</i>
53	0125449-016	PCD	0103176-046	rr	<i>RHccee</i>
54	0354200-006	MRRF	0103176-053	R1R2	<i>RHCcEe</i>
55	0270364-009	LGMS	0103177-049	R0r	<i>RHccee</i>
56	0373608-002	FAVS	0103177-062	R1r	<i>RHCcee</i>
57	0388539-002	RRR	0103178-007	R1r	<i>RHCcee</i>
58	0388720-002	ACALJ	0103178-021	R2r	<i>RHccEe</i>
59	0316534-005	VMS	0103179-049	R2r	<i>RHccEe</i>
60	0330150-006	VS	0103178-053	rr	<i>RHccee</i>
61	0388375-002	CRS	0103180-007	rr	<i>RHccee</i>
62	0388299-002	JPO	0103180-008	R1r	<i>RHCcee</i>
63	0188779-005	WSB	003181-003	R1R2	<i>RHCcEe</i>
64	0336416-005	JFPS	0103181-007	rr	<i>RHccee</i>
65	0375557-004	DGFM	0103182-008	R1R2	<i>RHCcEe</i>
66	0143788-003	RD	0103182-022	rr	<i>RHccee</i>
67	0084752-003	CRO	0103183-018	R1r	<i>RHCcee</i>
68	0297021-005	RAVS	0103183-065	R1R1	<i>RHCcEe</i>
69	0388224-002	FLS	0103184-035	R0r	<i>RHccee</i>
70	0231846-004	VCMN	0103184-044	R1R1	<i>RHCcEe</i>
71	0165558-014	JMP	0103185-008	R1R1	<i>RHCcEe</i>
72	0356472-005	WRSJ	0103185-063	R1r	<i>RHCcee</i>
73	0115453-005	MCA	0103186-052	R1R2	<i>RHCcEe</i>
74	0378953-003	LAG	0103186-079	R1r	<i>RHCcee</i>
75	0385710-002	AP	0103187-008	R2r	<i>RHccEe</i>
76	0380084-002	LCOS	0103187-027	R1r	<i>RHCcee</i>
77	0271849-004	JSC	0103189-002	R0r	<i>RHccee</i>
78	0295051-006	DM	0103189-009	R2r	<i>RHccEe</i>
79	0369200-002	WS	0103190-027	rr	<i>RHccee</i>
80	0342535-002	KRJ	0103190-32	rr	<i>RHccee</i>

Resultados de Fenotipagem para os antígenos, Rh E, Rh e, Rh C e Rh c, e Genotipagem *RHCE* em amostras de sangue e DNA de 358 doadores voluntários de sangue (cont.):

Nº	Nº Doador	Iniciais	Nº Doação	Fenótipo	Genótipo
81	0386936-002	JS	0103191-073	R1r	<i>RHCcee</i>
82	0135235-004	PSA	0103192-015	R0r	<i>RHccee</i>
83	0384071-003	OMC	0103192-019	R1R2	<i>RHCcEe</i>
84	0340358-004	CRN	0103192-054	R0r	<i>RHccee</i>
85	0332571-002	RAA	0103192-058	R1r	<i>RHCcee</i>
86	0378793-002	ERA	0103193-021	R1r	<i>RHCcee</i>
87	0140832-003	LAP	0103193-035	R1r	<i>RHCcee</i>
88	0096713-003	ELB	0103191-031	rr	<i>RHccee</i>
89	0193337-005	DJF	0103194-014	R1r	<i>RHCcee</i>
90	0327921-007	CPFF	0103194-015	R1r	<i>RHCcee</i>
91	0327148-010	LZ	0103195-077	R1r	<i>RHCcee</i>
92	0198837-003	DMS	0103196-004	R1r	<i>RHCcee</i>
93	0242615-005	SRN	0103196-012	R1R1	<i>RHCcEe</i>
94	0308730-004	ASS	0103197-017	R1r	<i>RHCcee</i>
95	0280144-011	FC	0103198-008	R0r	<i>RHccee</i>
96	0375060-003	FRSS	0103198-017	R0r	<i>RHccee</i>
97	0285456-007	RCLR	0103199-014	R1r	<i>RHCcee</i>
98	0285409-007	MAS	0103199-084	R1R1	<i>RHCcEe</i>
99	0297748-002	CAL	0103200-050	R1r	<i>RHCcee</i>
100	0375492-002	TMS	0103200-075	R1r	<i>RHCcee</i>
101	0018481-016	ACF	0103201-059	R0r	<i>RHccee</i>
102	0364940-003	CM	0103202-001	R1r	<i>RHCcee</i>
103	0131606-004	NFO	0103202-002	R1R1	<i>RHCcEe</i>
104	0386644-003	CHFS	0103203-007	R1r	<i>RHCcee</i>
105	0396951-001	JPB	0103203-014	rr	<i>RHccee</i>
106	0392172-002	CJR	0103204-005	R2Rz	<i>RHCcEE</i>
107	0315435-002	LF	0103204-049	R1r	<i>RHCcee</i>
108	0302316-007	DZG	0103205-009	R2r	<i>RHccEe</i>
109	0189229-003	MTF	0103205-029	R1r	<i>RHCcee</i>
110	0321087-010	ALR	0103206-059	R1r	<i>RHCcee</i>
111	0330790-004	AAC	0103206-061	R1R1	<i>RHCcEe</i>
112	0285608-009	FP	0103207-032	R1r	<i>RHCcee</i>
113	0323447-003	DF	0103207-033	R0r	<i>RHccee</i>
114	0389255-002	JCD	0103208-002	R2r	<i>RHccEe</i>
115	0387169-002	ICM	0103208-010	R1r	<i>RHCcee</i>
116	0084341-008	SRS	0103209-004	R1r	<i>RHCcee</i>
117	0355450-003	TH	0103209-023	R1r	<i>RHCcee</i>
118	0047960-005	AJM	0103210-001	R1R2	<i>RHCcEe</i>
119	0392461-003	CBT	0103210-016	R1R1	<i>RHCcEe</i>
120	0229125-006	IGV	0103211-049	R1r	<i>RHCcee</i>

Resultados de Fenotipagem para os antígenos, Rh E, Rh e, Rh C e Rh c, e Genotipagem *RHCE* em amostras de sangue e DNA de 358 doadores voluntários de sangue (cont.):

Nº	Nº Doador	Iniciais	Nº Doação	Fenótipo	Genótipo
121	0384631-003	BFSR	01003211-065	π	<i>RHccee</i>
122	0376229-003	TCS	0103212-001	R1R1	<i>RHCcEe</i>
123	0315743-007	FSF	0103212-007	R0r	<i>RHccee</i>
124	0046363-021	AF	0102113-021	R0r	<i>RHccee</i>
125	0225590-018	HF	0102113-026	R1r	<i>RHCcEe</i>
126	0060701-003	MZ	0103214-042	R1r	<i>RHCcEe</i>
127	0274046-004	AM	0103214-088	R0r	<i>RHccee</i>
128	0133938-009	AC	0103212-029	R2R2	<i>RHccEE</i>
129	0351399-003	RZ	0103215-071	R1r	<i>RHCcEe</i>
130	0383053-002	ECA	0103215-072	R1R1	<i>RHCcEe</i>
131	0168034-008	CCM	0103216-010	R1R1	<i>RHCcEe</i>
132	0239052-004	MCSS	0103216-011	R1Rz	<i>RHCcEe</i>
133	0345875-002	REM	0103217-004	R2r	<i>RHccEe</i>
134	0264161-005	RFS	0103217-063	R1R2	<i>RHCcEe</i>
135	0374943-002	IGV	0103218-038	R1R1	<i>RHCcEe</i>
136	0334592-006	JAS	0103218-049	R1R2	<i>RHCcEe</i>
137	0331572-010	AMN	0103219-030	R1r	<i>RHCcEe</i>
138	0305407-007	AESB	0103219-030	R2r	<i>RhccEe</i>
139	0368062-005	AM	0103220-018	R0r	<i>RHccee</i>
140	0291996-008	RK	0103220-061	R1R1	<i>RHCcEe</i>
141	0339318-006	WCM	0103221-004	R1r	<i>RHCcEe</i>
142	0309799-004	RO	0103121-030	R0r	<i>RHccee</i>
143	0392450-003	EOJ	0103222-041	R0r	<i>RHccee</i>
144	0227752-008	JR	0103222-042	R1R2	<i>RHCcEe</i>
145	0230519-003	ESC	0103223-022	π	<i>RHccee</i>
146	0267736-003	AVD	0103223-023	R2r	<i>RHccEe</i>
147	0370177-022	JHM	0103224-043	R0r	<i>RHccee</i>
148	0175503-004	LO	0103224-049	R1r	<i>RHCcEe</i>
149	0313713-004	MLRS	0103225-010	R0r	<i>RHccee</i>
150	0394329-003	NJO	0103225-014	R1R2	<i>RHCcEe</i>
151	0393497-002	RS	0103226-006	R2Rz	<i>RHCcEE</i>
152	0363006-004	CANS	0103226-053	R2r	<i>RHccEe</i>
153	0231705-002	RLP	0103227-030	R1r	<i>RHCcEe</i>
154	0354241-008	AFS	0103227-037	R1R2	<i>RHCcEe</i>
155	0369055-004	ADA	0103228-032	R2r	<i>RHccEe</i>
156	0389217-002	APH	0103228-043	R2r	<i>RHccEe</i>
157	0350131-003	EAC	0103229-017	R1r	<i>RHCcEe</i>
158	0342924-007	BAF	0103229-046	R1r	<i>RHCcEe</i>
159	0303100-002	SSS	0103230-001	R2r	<i>RHccEe</i>
160	0243499-004	ACD	0103230-033	R0r	<i>RHccee</i>

Resultados de Fenotipagem para os antígenos, Rh E, Rh e, Rh C e Rh c, e Genotipagem *RHCE* em amostras de sangue e DNA de 358 doadores voluntários de sangue (cont.):

Nº	Nº Doador	Iniciais	Nº Doação	Fenótipo	Genótipo
161	0334866-002	RF	0103231-025	R1R2	<i>RHCcEe</i>
162	0386941-002	POV	0103231-060	R1r	<i>RHCcee</i>
163	0374381-005	ISSZ	0103232-027	R1R1	<i>RHCcEe</i>
164	0377791-004	ABR	0103233-006	R1R1	<i>RHCcEe</i>
165	0376429-003	AHMA	0103233-016	R0r	<i>RHccee</i>
166	0378631-003	MJB	0103234-015	R1r	<i>RHCcee</i>
167	0319590-003	AMRO	0103234-072	R2r	<i>RHccEe</i>
168	0384406-003	MTO	0103234-077	R1r	<i>RHCcee</i>
169	0053951-017	MLF	0103235-002	R1R2	<i>RHCcEe</i>
170	0116885-004	CP	0103235-026	R1R1	<i>RHCcEe</i>
171	0175510-009	DFMO	0103235-029	rr	<i>RHccee</i>
172	0327231-003	RCS	0103236-020	R1r	<i>RHCcee</i>
173	0036500-017	DLN	0103237-047	R1r	<i>RHCcee</i>
174	0380034-003	APOR	0103238-012	R1R2	<i>RHCcEe</i>
175	0312581-009	MCB	0103238-036	rr	<i>RHccee</i>
176	0332673-005	LAL	0103239-002	R1r	<i>RHCcee</i>
177	0184319-003	RM	0103239-024	R1r	<i>RHCcee</i>
178	0382946-003	RCF	0103240-002	R1R2	<i>RHCcEe</i>
179	0391204-002	LSS	0103240-063	R1wr	<i>RHCwcee</i>
180	0394697-002	CS	0103241-025	R1r	<i>RHCcee</i>
181	0382117-002	CEFV	0103241-045	rr	<i>RHccee</i>
182	0385173-002	AFS	0103242-022	R1R1	<i>RHCcEe</i>
183	0328530-005	RNS	0103242-027	R2r	<i>RHccEe</i>
184	0266589-004	ALAJ	0103243-049	R1r	<i>RHCcee</i>
185	0309296-008	KDP	0103243-056	R2r	<i>RHccEe</i>
186	0038897-013	ERP	0103244-013	R1r	<i>RHCcee</i>
187	0141071-002	JMM	0103244-045	R2r	<i>RHccEe</i>
188	0375570-004	VMC	0103245-004	R1r	<i>RHCcee</i>
189	0293258-006	TRS	0103245-067	R2r	<i>RHccEe</i>
190	0239190-005	MCF	0103246-025	R2Rz	<i>RHCcEE</i>
191	0202875-008	SI	0103246-050	R1wR2	<i>RHCcEe</i>
192	0199735-003	JCS	0103248-004	R2r	<i>RHccEe</i>
193	0394951-002	CRS	0103248-008	r'r''	<i>RHCcEe</i>
194	0322291-005	CAT	0103249-008	R1r	<i>RHCcee</i>
195	0323276-005	CG	0103249-019	rr	<i>RHccee</i>
196	0303372-003	ACPC	82201-9	R1r	<i>RHCcee</i>
197	0382474-002	GAS	0103250-034	R1R2	<i>RHCcEe</i>
198	0377290-002	MSR	0103250-050	R1R1	<i>RHCcEe</i>
199	0315257-005	NAR	0103251-004	R1R1	<i>RHCcEe</i>
200	02631134-003	IHM	0103251-031	R2R2	<i>RHccEE</i>

Resultados de Fenotipagem para os antígenos, Rh E, Rh e, Rh C e Rh c, e Genotipagem *RHCE* em amostras de sangue e DNA de 358 doadores voluntários de sangue (cont.):

Nº	Nº Doador	Iniciais	Nº Doação	Fenótipo	Genótipo
201	0344612-007	JFAC	0103251-077	R2r	<i>RHccEe</i>
202	0386481-002	KFB	0103252-005	R0r	<i>RHccee</i>
203	8394695-002	ESN	0103252-025	R1r	<i>RHCcee</i>
204	0394576-002	TLD	0103252-031	R1R2	<i>RHCcEe</i>
205	0379483-003	AR	0103252-048	R1r	<i>RHCcee</i>
206	0275244-005	RS	0103253-037	rr	<i>RHccee</i>
207	0278748-004	LJBO	0103253-088	R1r	<i>RHCcee</i>
208	0374895-003	AFFO	0103254-002	R1r	<i>RHCcee</i>
209	0370481-002	AAB	0103254-004	R1r	<i>RHCcee</i>
210	0370114-002	RSB	0103255-022	R1wr	<i>RHCwcee</i>
211	0355697-002	LHQ	0103255-055	R1R2	<i>RHCcEe</i>
212	0184518-003	ANS	0103256-078	R2R2	<i>RHccEE</i>
213	0373722-003	AHC	0103256-089	R1r	<i>RHCcee</i>
214	0386855-002	CNS	0103257-033	rr	<i>RHccee</i>
215	0386331-003	CALN	0103257-039	R0r	<i>RHccee</i>
216	0378874-003	AS	0103258-007	R1R2	<i>RHCcEe</i>
217	0307519-001	MAMS	0103258-020	R0r	<i>RHccee</i>
218	0301042-002	WVS	0103259-014	R1R1	<i>RHCcEe</i>
219	0224970-009	RSS	0103259-068	R0r	<i>RHccee</i>
220	0353581-006	RAFL	0103260-004	rr	<i>RHccee</i>
221	0386367-004	MAS	0103260-006	R1R1	<i>RHCcEe</i>
222	0103854-003	AWM	0103261-036	R1R1	<i>RHCcEe</i>
223	0377694-006	AHT	0103261-039	rr	<i>RHccee</i>
224	0115663-005	IMO	0103262-008	R1R1	<i>RHCcEe</i>
225	0104681-002	ST	0103262-013	R0r	<i>RHccee</i>
226	0312168-009	LHNO	0103263-025	R1r	<i>RHCcee</i>
227	0390592-002	LJO	0103263-042	R2R2	<i>RHccEE</i>
228	0382242-002	TFG	0103263-018	R2r	<i>RHccEe</i>
229	0069957-012	AJFT	0103264-019	R1R1	<i>RHCcEe</i>
230	0267148-011	GO	0103265-017	R0r	<i>RHccee</i>
231	0347749-002	ORL	0103265-036	R1r	<i>RHCcee</i>
232	0396600-002	FCL	0103266-034	R1R1	<i>RHCcEe</i>
233	0373309-006	GJS	0103267-051	R2r	<i>RHccEe</i>
234	0392156-002	NP	0103267-072	rr	<i>RHccee</i>
235	0388195-002	AAL	0103269-024	R1R2	<i>RHCcEe</i>
236	0215211-009	ABS	0103270-016	R1R2	<i>RHCcEe</i>
237	0376632-003	NAS	0103270-043	R1R1	<i>RHCcEe</i>
238	0352473-003	MDC	0103270-087	R1r	<i>RHCcee</i>
239	0386658-002	WPMC	0103271-019	R1R1	<i>RHCcEe</i>
240	0229065-016	CTM	0103272-033	R1r	<i>RHCcee</i>

Resultados de Fenotipagem para os antígenos, Rh E, Rh e, Rh C e Rh c, e Genotipagem *RHCE* em amostras de sangue e DNA de 358 doadores voluntários de sangue (cont.):

Nº	Nº Doador	Iniciais	Nº Doação	Fenótipo	Genótipo
241	0253626-016	AMMB	0103272-033	R1R2	<i>RHCcEe</i>
242	0276585-006	RMP	0103272-068	R1R1	<i>RHCcEe</i>
243	0388187-003	SM	0103273-002	R1r	<i>RHCcee</i>
244	0387268-003	BM	0103273-067	R2R2	<i>RHccEE</i>
245	0296261-006	PDC	0103274-001	rr	<i>RHccee</i>
246	0356627-004	DCCMO	0103274-003	R1r	<i>RHCcee</i>
247	0361307-004	ACMM	0103275-001	R1R2	<i>RHCcEe</i>
248	0355521-003	ACSS	0103275-016	R1r	<i>RHCcee</i>
249	0204719-003	MRDO	0103276-006	R1r	<i>RHCcee</i>
250	0378880-004	RRS	0103276-008	R0r	<i>RHCcee</i>
251	0390078-003	APM	0103277-034	R1r	<i>RHCcee</i>
252	0383602-003	CAMV	0103277-042	R1r	<i>RHCcee</i>
253	0371696-004	MAT	0103300-021	R1R2	<i>RHCcEe</i>
254	0337677-008	LFS	0103300-022	R0r	<i>RHccee</i>
255	0257088-006	LHFR	0103301-001	R1r	<i>RHCcee</i>
256	0245122-008	AODS	0103301-004	R1r	<i>RHCcee</i>
257	0290340-011	EML	0103303-023	R1R1	<i>RHCcEe</i>
258	0234350-005	ELO	0103303-029	R0r	<i>RHccee</i>
259	0242636-002	ALRF	0103304-031	R1r	<i>RHCcee</i>
260	0375120-003	VBM	0103305-003	R1r	<i>RHCcee</i>
261	0385182-004	RAS	0103305-064	R1R2	<i>RHCcEe</i>
262	0375228-005	LCM	0103306-036	R1r	<i>RHCcee</i>
263	0386967-003	JMC	0103307-032	R1r	<i>RHCcee</i>
264	0380436-003	JLS	0103308-045	R1r	<i>RHCcee</i>
265	0395683-003	EF	0103309-001	R1R1	<i>RHCcEe</i>
266	0354560-005	APO	0103309-010	R0r	<i>RHccee</i>
267	0391886-002	CFA	0103309-019	R0r	<i>RHccee</i>
268	0391886-002	TFRB	0103310-006	R1R2	<i>RHCcEe</i>
269	0227002-005	FFC	0103310-031	rr	<i>RHccee</i>
270	0394693-003	RR	0103311-020	R1r	<i>RHCcee</i>
271	0373244-005	MFS	0103312-004	R0r	<i>RHccee</i>
272	0335789-004	DAQR	0103312-013	R2R2	<i>RHccEE</i>
273	0358427-008	JPS	0103313-013	R1r	<i>RHCcee</i>
274	0210491-008	JCPL	0103313-053	rr	<i>RHccee</i>
275	0296337-005	AAP	0103314-007	R1R1	<i>RHCcEe</i>
276	0399644-002	SNS	0103314-017	R1r	<i>RHCcee</i>
277	0395460-003	ASL	0103308-072	R2R2	<i>RHccEE</i>
278	0390053-003	RGO	0103314-031	R2R2	<i>RHccEE</i>
279	0245891-002	MGR	0103315-009	R1r	<i>RHCcee</i>
280	0262813-004	LR	0103316-017	r'r	<i>RHccEe</i>

Resultados de Fenotipagem para os antígenos, Rh E, Rh e, Rh C e Rh c, e Genotipagem *RHCE* em amostras de sangue e DNA de 358 doadores voluntários de sangue (cont.):

Nº	Nº Doador	Iniciais	Nº Doação	Fenótipo	Genótipo
281	0345873-003	SAM	0103316-021	R1r	<i>RHCcee</i>
282	0330254-004	AM	0103317-010	R1r	<i>RHCcee</i>
283	0396438-003	RAS	0103317-021	R1r	<i>RHCcee</i>
284	0331690-007	LASS	0103318-025	rr	<i>RHccee</i>
285	0384100-003	SD	0103318-028	R0r	<i>RHccee</i>
286	0394690-002	TCSF	0103320-020	R2r	<i>RHccEe</i>
287	0322432-006	RLR	0103320-027	R1r	<i>RHCcee</i>
288	0307906-009	IRC	0103321-023	R2r	<i>RHCCee</i>
289	0173877-007	JBF	0103327-011	rr	<i>RHccee</i>
290	0257378-017	ASG	0103328-013	R0r	<i>RHccee</i>
291	0223007-009	LSL	0103330-017	R0r	<i>RHccee</i>
292	0378041-002	ACR	0103331-018	R1r	<i>RHCcee</i>
293	0363109-002	CPL	0103331-062	R2R2	<i>RHccEE</i>
294	0399249-002	SAC	0103332-004	R2r	<i>RHccEe</i>
295	0360195-008	JRS	0103332-053	rr	<i>RHccee</i>
296	0330399-004	CMC	0103333-019	R2r	<i>RHccEe</i>
297	0391347-002	FRC	0103333-025	R1r	<i>RHCcee</i>
298	0356700-005	JAAD	0103362-022	R1R2	<i>RHCCee</i>
299	0296000-014	MJSR	0103362-042	R0r	<i>RHccee</i>
300	0167026-004	VL	013363-002	R1r	<i>RHCcee</i>
301	0359668-002	MAS	0103363-003	R1r	<i>RHCcee</i>
302	0350248-005	ACP	0103364-001	R1r	<i>RHCcee</i>
303	0372136-002	MSS	0103364-004	R1R2	<i>RHCCee</i>
304	0358981-003	ARL	0103365-029	R1R1	<i>RHCcee</i>
305	0293976-008	EFR	0103365-071	R2r	<i>RhccEe</i>
306	0078024-005	LPS	0104002-004	rr	<i>RHccee</i>
307	0402121-002	LS	0104003-047	R1R1	<i>RHCCee</i>
308	0346141-007	AAB	0104004-004	R1r	<i>RHCcee</i>
309	0308196-010	LP	0104004-009	R1r	<i>RHCcee</i>
310	0323295-006	LBM	0104005-014	R2r	<i>RHccEe</i>
311	0066770-003	RAB	0104005-016	R1r	<i>RHCcee</i>
312	0040593-004	FL	0104006-009	R0r	<i>RHccee</i>
313	0353708-006	MDG	0104006-058	R2r	<i>RHccEe</i>
314	0260884-002	LJJ	0104007-019	rr	<i>RHccee</i>
315	0340303-002	HRB	0104007-064	R1r	<i>RHCcee</i>
316	0354719-002	CFF	0104008-005	R1R1	<i>RHCCee</i>
317	0395630-003	MAMJ	0104008-067	rr	<i>RHccee</i>
318	0324300-009	APGF	0104009-041	R1r	<i>RHCcee</i>
319	0373597-003	TP	0104009-045	rr	<i>RHccee</i>
320	0353827-002	JMS	0104010-014	R0r	<i>RHccee</i>

Resultados de Fenotipagem para os antígenos, Rh E, Rh e, Rh C e Rh c, e Genotipagem *RHCE* em amostras de sangue e DNA de 358 doadores voluntários de sangue (cont.):

Nº	Nº Doador	Iniciais	Nº Doação	Fenótipo	Genótipo
321	0369144-003	MLS	0104010-023	R1R2	<i>RHCcEe</i>
322	0248002-014	SJC	0104046-017	R2r	<i>RHccEe</i>
323	0258308-007	JWS	0104047-010	R1r	<i>RHCcee</i>
324	0404928-002	EOS	0104047-024	R2r	<i>RHccEe</i>
325	0340158-012	JBC	0104048-030	R1R2	<i>RHCcEe</i>
326	0359277-002	JMB	0104048-043	R1R2	<i>RHCcEe</i>
327	0335437-003	VER	0104049-011	R1r	<i>RHCcee</i>
328	0333837-003	MDOM	0104049-058	R1r	<i>RHCcee</i>
329	0356829-003	GPFT	0104050-037	R1r	<i>RHCcee</i>
330	0335129-012	RPF	0104051-001	R1r	<i>RHCcee</i>
331	0340710-005	CHAC	0104051-020	R1r	<i>RHCcee</i>
332	0397192-003	LPRN	0104052-031	R2r	<i>RHccEe</i>
333	0361267-006	CM	0104052-041	R1r	<i>RHCcee</i>
334	0393413-002	MFS	0104053-002	R1r	<i>RHCcee</i>
335	0325322-008	ACP	0104053-006	R1r	<i>RHCcee</i>
336	0172680-002	CAR	0104054-015	R0r	<i>RHccee</i>
337	0406513-002	EO	0104054-020	R1r	<i>RHCcee</i>
338	0115283-002	EAM	0104055-007	R1R1	<i>RHCcEe</i>
339	0363421-003	ASR	0104055-011	R1r	<i>RHCcee</i>
340	0300791-012	STM	0104064-009	r'r"	<i>RHccEE</i>
341	0348981-004	RJF	0104056-009	R1r	<i>RHCcee</i>
342	0386931-003	FSAB	0104056-028	R1r	<i>RHCcee</i>
343	0279301-003	JST	0104058-037	R1R2	<i>RHCcEe</i>
344	0273339-006	LCA	0104058-046	R2r	<i>RHccEe</i>
345	0316931-005	MAS	0104059-002	R1r	<i>RHCcee</i>
346	0388108-002	FBS	0104059-003	R1R2	<i>RHCcEe</i>
347	0389716-003	ARLS	0104060-035	rr	<i>RHccee</i>
348	0405355-003	ANF	0104060-036	R1r	<i>RHCcee</i>
349	0397544-002	LCV	0104062-001	R1R1	<i>RHCcEe</i>
350	0360311-009	NFRO	0104062-005	R1R2	<i>RHCcEe</i>
351	0329863-002	MLRT	0104062-016	rr	<i>RHccee</i>
352	0280427-003	PBS	0104063-019	R1R1	<i>RHCcEe</i>
353	0326712-010	WF	0104063-042	R1r	<i>RHCcee</i>
354	0357007-002	CEM	0104064-011	R1R2	<i>RHCcEe</i>
355	0403046-002	SPC	0104065-004	R1r	<i>RHCcee</i>
356	0349582-003	OM	0104065-012	rr	<i>RHccee</i>
357	0142313-005	AC	0104066-034	R2r	<i>RHccEe</i>
358	0383037-003	FSO	0104066-052	R1r	<i>RHCcee</i>