

Ártemis Socorro do Nascimento Rodrigues

***CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ANTÍGENOS
RhD, (RhD FRACO e RhD PARCIAL) E SUA APLICAÇÃO
NA PRÁTICA TRANSFUSIONAL***

Orientadora: PROF.DRA. LILLIAN MARIA DE CASTILHO

CAMPINAS

2005

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

Ártemis Socorro do Nascimento Rodrigues

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ANTÍGENOS
RhD, (RhD FRACO e RhD PARCIAL) E SUA APLICAÇÃO
NA PRÁTICA TRANSFUSIONAL**

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

Orientadora: PROF.DRA. LILIAN MARIA DE CASTILHO

CAMPINAS

2005

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP
R618c
V EX
TOMBO BC 64806
P. LC 16-P.00086-05
C EX
PREÇO 11,00
DATA 20/07/05
Nº CPD Bib: d 358790

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

R618c

Rodrigues, Ártemis Socorro do Nascimento
Caracterização molecular dos antígenos RhD, (RhD fraco e RhD parcial) e sua aplicação na prática transfusional / Ártemis Socorro do Nascimento Rodrigues. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Lilian Maria de Castilho
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genes. 2. Grupos sanguíneos. 3. Sorologia. 4. Pacientes. I. Castilho, Lilian Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

*Este trabalho é dedicado à memória de
Amélia do Nascimento Rodrigues,
minha querida e amada mãe.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a *Deus, a Jesus Cristo e a Nossa Senhora*, por cada dia de minha vida.

Ao meu pai *Miguel*, aos meus irmãos *Áurea, Clésio, Adla, Célio, Alessandra*, a minha cunhada *Ivana* pelo incentivo que sempre recebi.

Aos meus sobrinhos *Nicolas, Felipe e Letícia* “meus amores” por preencherem minha vida de alegria.

À *Profa. Dra. Lillian Castilho*, por ter-me proporcionado mais esta oportunidade, por todos estes anos de ensinamentos e por ter sempre acreditado em mim.

Ao *Dr. Jordão Pellegrino Jr*, pela ajuda e atenção que sempre recebi no momento certo.

Ao *Dr. Fernando Costa*, pela sua atenção e colaboração.

À *Renata Maia*, pelo apoio, pelo carinho e por sua amizade sincera.

À *Manoela Ortega*, obrigada pela amizade, pelo carinho e pela sua preocupação comigo. Espero que à distância nunca nos separe.

À *Ângela Maria, Dulcinéia, Ana Cláudia Aléssio e Heloisa*, pela ajuda constante e principalmente pelo carinho que sempre demonstraram comigo.

Ao *Rodrigo Toledo*, à *Dra. Ana Paula Zanelli*, do Hemocentro de Ribeirão Preto, à *Dra. Maria do Carmo Oliveira*, do Hemocentro de Recife, à *Dra. Marisa Mota*, do Hospital Israelita Albert Einstein, à *Cláudia Fujita*, do Fujsan de Fortaleza e ao *Dr. Rodolfo Ramos*, do Hemocentro de Florianópolis, muito obrigada pelas amostras gentilmente cedidas.

Agradeço a todos os funcionários e alunos do Hemocentro da Unicamp que, de alguma forma, com a graça de **Deus**, contribuíram para a realização deste trabalho.

Que **Deus** nos abençoe sempre. Amém!

Ártemis.

*Aprenda como se fosse viver para sempre,
viva como se fosse morrer amanhã.*

Ghandi

Trabalho realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp com auxílio financeiro da FAPESP (Processo 02/02555-5)

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>xvi</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
A. Material.....	38
1. Amostras.....	38
2. Cartões gel (ID-micro typing cards).....	38
3. Tampão LISS modificado (Diluyente 2).....	38
4. Solução de bromelina.....	38
5. Suspensão de hemácias a 0,8%.....	38
6. Suspensão de hemácias a 3%.....	39
7. Anti-soros.....	39
8. Diluição dos anti-soros.....	40
9. Extração de DNA.....	40
10. dNTP 10mM.....	40
11. Taq DNA polymerase.....	40
12. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X.....	40
13. Tampão Tris-Borato (TEB)10X.....	41
14. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X.....	41
15. Tampão Tris-Borato (TEB)1X.....	41
16. Gel de agarose a 1.5%.....	41
17. Gel de agarose a 3%.....	41
18. Gel de poliacrilamida a 8%.....	42
19. Marcadores moleculares.....	42
20. Enzimas de restrição	42
21. Concert rapid PCR extraction system	42

22. Big Dye.....	42
B. Métodos.....	43
1. Fenotipagem eritrocitária.....	43
1.1. Fenotipagem RhD em tubo.....	43
1.2. Fenotipagem RhD em microplaca.....	43
1.3. Fenotipagem RhD em gel.....	43
2. Pesquisa do antígeno RhD fraco.....	44
3. Extração de DNA.....	44
4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	44
5. Análise dos fragmentos de PCR após digestão com enzimas de restrição (RFLP).....	45
6. Genotipagem <i>RHD</i>	45
7. Genotipagem <i>RH E/e</i>	46
8. Genotipagem <i>RH C/c</i>	47
9. Caracterização molecular dos antígenos RhD e RhD parcial HMi.....	48
10. Caracterização molecular das variantes <i>RHD</i> híbridas.....	49
11. Caracterização molecular do antígeno RhD parcial DAR.....	49
12. Sequenciamento das amostras <i>RHD</i> fraco e <i>RHD</i> parcial HMi, DAR.....	50
13. Citometria de fluxo.....	51
RESULTADOS	55
A. Padronização de técnicas moleculares para a realização da genotipagem <i>RHD</i> (<i>RHD</i> fraco e <i>RHD</i> parcial).....	56
B. Resultados da genotipagem <i>RHD</i> , <i>RHD</i> fraco e <i>RHD</i> parcial em doadores voluntários de sangue.....	57
1. Caracterização molecular dos antígenos RhD, RhD fraco e RhD parcial.....	57
2. Associação dos tipos de antígenos RhD fraco com os haplótipos RH.....	60
3. Associação dos tipos de antígenos RhD fraco com o grau de aglutinação.....	60
4. Expressão antigênica dos antígenos RhD fraco determinada por citometria de fluxo.....	61

5. Grau de aglutinação e expressão antigênica nas associações RhD fraco e RhD parcial.....	63
C. Resultado da genotipagem RhD, RhD fraco e RhD parcial em pacientes.....	64
DISCUSSÃO.....	65
A. Padronização de técnicas moleculares para a realização da genotipagem <i>RHD</i> (<i>RHD</i> fraco e <i>RHD</i> parcial).....	66
B. Genotipagem <i>RHD</i> , <i>RHD</i> fraco e <i>RHD</i> parcial em doadores voluntários de sangue.....	67
1. Caracterização molecular dos antígenos, RhD, RhD fraco e RhD parcial.....	68
2. Associação dos tipos de antígenos RhD fraco com os haplótipos RH.....	74
3. Associação dos tipos de antígenos RhD fraco com o grau de aglutinação.....	74
4. Expressão antigênica dos antígenos RhD fraco determinada por citometria de fluxo.....	75
5. Grau de aglutinação e expressão antigênica nas associações RhD fraco e RhD parcial.....	76
C. Resultados da genotipagem <i>RHD</i> , <i>RHD</i> fraco e <i>RHD</i> parcial em pacientes.....	77
D. Recomendações na prática transfusional.....	77
CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
APÊNDICE.....	89

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Sequência dos primers utilizados nas genotipagens <i>RHD</i> , <i>RH C/c</i> , <i>RH E/e</i>	50
TABELA 2 : Sequência dos primers utilizados na caracterização do gene <i>RHD</i> fraco e <i>RHDHMi</i>	51
TABELA 3 : Sequência de primers utilizados na técnica de PCR para caracterização das variantes <i>RHD</i> parciais híbridas	52
TABELA 4 : Primers utilizados na técnica de PCR para a determinação <i>RHD</i> parcial <i>DAR</i>	52
TABELA 5 : Resultado molecular das amostras fenotipadas como <i>RHD</i> fraco em doadores voluntários de sangue.....	56
TABELA 6 : Caracterização molecular dos tipos do antígeno <i>RhD</i> fraco em doadores voluntários de sangue.....	56
TABELA 7 : Ocorrência das variantes <i>DAR</i> , <i>DHMi</i> e <i>DVI</i> em doadores voluntários de sangue fenotipados como <i>RhD</i> fraco.....	57
TABELA 8: Associação dos antígenos <i>RhD</i> fraco e <i>RhD</i> parcial.....	57
TABELA 9: Resultados de pacientes <i>RhD</i> fraco com anti-D.....	58
TABELA 10: Tipos de <i>RhD</i> fraco e haplótipos <i>RH</i>	58
TABELA 11: Tipos de <i>RhD</i> fraco e grau de aglutinação.....	59
TABELA 12 Densidade antigênica dos antígenos <i>RhD</i> fraco.....	60
TABELA 13: Frequência dos tipos do antígeno <i>RhD</i> fraco em diferentes regiões da Europa e do Brasil.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Descrição
Rh	Sistema Rh
RhD	Antígeno RhD
RhDF	Antígeno RhD fraco
RhC	Antígeno RhC
Rhc	Antígeno Rhc
RhE	Antígeno RhE
Rhe	Antígeno Rhe
<i>RH</i>	Gene <i>RH</i>
<i>RHD</i>	Gene <i>RHD</i>
<i>RHCE</i>	Gene <i>RHCE</i>
<i>RHD-CE-D^s</i>	Gene híbrido <i>RHD-CE-D^s</i>
RH C/c	Genes alelos Cc
RH E/e	Genes alelos Ee
RhD+	Fenótipo RhD-positivo
RhD-	Fenótipo RhD-negativo
RhCC	Fenótipo RhCC
RhCc	Fenótipo RhCc
Rhcc	Fenótipo Rhcc
RhEE	Fenótipo RhEE
RhEe	Fenótipo RhEe
Rhee	Fenótipo Rhee
R0r	Fenótipo RhDccee
R1r	Fenótipo RhDCcee
R2r	Fenótipo RhDccEe

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (cont.)

Sigla	Descrição
r r	Fenótipo dccee
DVI	Antígeno RhD parcial categoria DVI
DAR	Antígeno RhD parcial DAR
DHMi	Antígeno RhD parcial DHMi
μl	Microlitro
ml	Mililitro
g	Giros
ng	Nanogramas
pmol	Picomol
nmol	Nanomol
pb	Pares de base
AGH	Teste da antiglobulina humana
LISS	Tampão de baixa força iônica
GEL-LISS	Técnica de hemaglutinação em gel
DNA	Fita de nucleotídeos
INTRON	Região do gene que não codifica aminoácidos
EXON	Região do gene que codifica aminoácidos
PCR	Reação de cadeia da polimerase / Polymerase Chain Reaction
AS-PCR	Técnica de PCR alelo-específico
PCR-RFLP	Técnica de PCR seguida por análise dos fragmentos
PCR-RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfisms
primers	Sequência de oligonucleotídios sintéticos
nt	Nucleotídeo

	Pág
FIGURA 1: Família de proteínas Rh.....	24
FIGURA 2: Proteínas Rh.....	26
FIGURA 3: Modelo do locus Rh proposto por Wagner & Flegel.....	28
FIGURA 4: Proteínas RhD parcial	30
FIGURA 5: Proteínas RhD fraco.....	31
FIGURA 6: Árvore filogenética <i>RHD</i> idealizada por Wagner & Flegel.....	32
FIGURA 7: PCR para genotipagem <i>RHD</i>	46
FIGURA 8: PCR-RFLP para genotipagem <i>RH E/e</i>	47
FIGURA 9: PCR multiplex para genotipagem <i>RHD</i> , <i>RH C/c</i>	48

LISTA DE FIGURAS (cont)

	Pág
FIGURA 10: PCR alelo-específico para caracterização molecular dos antígenos RhD fraco.....	49
FIGURA 11: PCR multiplex para detecção das variantes <i>RHD</i> híbrida.....	50
FIGURA 12: PCR-RFLP para caracterização das variantes DAR.....	51
FIGURA 13: Resultado molecular nas amostras fenotipadas como RhD fraco	57
FIGURA 14: Caracterização molecular dos tipos de RhD fraco em doadores voluntários de sangue.....	58
FIGURA 15: Ocorrência das variantes DAR, DHMi e DVI em doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD fraco.....	59
FIGURA 16: Associações dos antígenos RhD fraco e RhD parcial.....	59
FIGURA 17: Resultado da citometria de fluxo em amostra com os antígenos RhD fraco e RhD parcial associados.....	63

RESUMO

Considerando a imunogenicidade e importância clínica do antígeno RhD bem como o grande número de variantes RhD identificadas, estudos que possam esclarecer sua expressão e mecanismos moleculares envolvidos são importantes para a padronização de técnicas moleculares e sorológicas em diferentes populações. Assim foram nossos objetivos: padronizar técnicas moleculares para realização da genotipagem *RHD* fraco e determinar sua ocorrência na população brasileira; associar os tipos de RhD fracos encontrados com os haplótipos Rh presentes; e avaliar a aplicação da determinação do antígeno RhD na prática transfusional.

Estudamos 503 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD fraco. Destas amostras de DNA estudadas, 415 (82,5%) foram caracterizadas como RhD fraco, 65 (12,9%) como RhD parcial, 15 (3%) apresentaram associações de RhD parcial e RhD fraco e 8 (1,6%) foram RhD normal.

Os antígenos RhD fraco tipos 1, 3 e 4 foram os mais freqüentes em nossa população. Como estes três tipos de RhD fraco não apresentam risco de aloimunização anti-D, pacientes assim classificados podem ser transfundidos com sangue RhD-positivo.

Nossos resultados demonstraram que 12,9% das amostras fenotipadas como RhD fraco eram na verdade RhD parcial. Os antígenos RhD parciais encontrados em nosso estudo foram DAR, DHMi e DVI. Quarenta (7,9%) amostras de DNA foram caracterizadas como DAR, 16 (3,2%) como DHMi e 9 (1,8%) como DVI.

A caracterização dos antígenos RhD parciais que reagem sorologicamente como RhD fraco, tais como DAR, DHMi e RhD categoria VI pode ser de grande auxílio na prevenção da aloimunização anti-D em pacientes politransfundidos e gestantes. A freqüência dos antígenos RhD parciais DAR, DHMi e DVI encontrada em nossas amostras sugere um elevado risco de aloimunização ao antígeno RhD em pacientes fenotipados como RhD fraco.

Das 503 amostras estudadas, 15 apresentaram mutações responsáveis pela expressão do antígeno RhD fraco e ao mesmo tempo mutações características de antígenos RhD parciais, ou seja, estas amostras possuíam os antígenos RhD fraco e RhD parcial associados.

Estudamos quatro amostras de DNA de pacientes fenotipados como RhD fraco que apresentavam anti-D. Nosso estudo demonstrou que a aloimunização anti-D nestes pacientes estava relacionada à presença de um antígeno RhD parcial e não a um antígeno RhD fraco como diagnosticado sorologicamente. Duas amostras foram classificadas como RhD parcial DAR, 1 como RhD parcial DHMi e 1 como DVI.

Os resultados demonstraram que os tipos de RhD fraco 1, 2, 3 e 4 que foram detectados à TA ou à 37⁰C e apresentaram grau de aglutinação superior a 1+ na AGH podem ser considerados como RhD positivo, pois não foram associados ao antígeno RhD parcial. Apesar deste trabalho ter sido o único que relacionou os tipos de RhD fraco com o grau de aglutinação, a literatura revela que ainda não foi demonstrada aloimunização anti-D em pacientes portadores dos antígenos RhD fraco tipos 1, 2 e 3.

De acordo com os nossos resultados pode-se concluir que:

1. A transfusão com sangue RhD-positivo pode ser recomendada para todos os pacientes que apresentam os tipos do antígeno RhD fraco 1, 3 e 4 identificados por técnicas moleculares e para aqueles que apresentarem grau de aglutinação superior a 1+ na fenotipagem RhD.
2. A utilização de métodos de fenotipagem mais sensíveis em combinação com reagentes anti-D de alta afinidade é recomendada na detecção de antígenos RhD fraco com baixa densidade antigênica em doadores de sangue;
3. Há necessidade da utilização de dois anti-soros monoclonais (IgM e IgG) na determinação do antígeno RhD fraco em pacientes;
4. As genotipagens *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial devem ser realizadas quando os resultados sorológicos não forem claros ou quando o paciente for politransfundido.
5. A biologia molecular associada à hemaglutinação pode aumentar consideravelmente a segurança transfusional pela melhor caracterização dos antígenos RhD em nossa população.

ABSTRACT

The purpose of this study was to characterize by molecular studies the RhD antigens (weak D and partial D) in Brazilian blood donors. DNA samples from 503 blood donors phenotyped as weak D were tested by two different sequence-specific primers (PCR-SSP) assays to determine the presence or absence of *RHD* gene (PCR-SSP intron 4 and exon 10) and to detect the common weak D types.

Of the 503 weak D samples studied, 415 (82,5%) were identified as weak D, 65 (12,9%) as partial D, 15 (3%) showed association of weak D and partial D and 8 (1,6%) were normal D. Weak D types 1, 3 and 4 contributed more than 85% of all molecular weak D types. For these 3 types, D-positive transfusion can be considered safe because no immunization events have been documented yet. These findings show for the first time the frequency of weak D types in Brazilians.

Molecular analysis showed that 12,9% of the weak D phenotype samples studied carried a partial D allele. The partial Ds found in our study were DAR, DVI and DHMi. Forty (7,9%) DNA samples were characterized as DAR, 16 (3,8%) as DHMi and 9 (1,8%) as DVI.

The characterization of the partial D antigens DAR, DHMi and DVI may avoid alloimmunization in patients phenotyped as weak D. Fifteen patients showed mutations to weak D and partial D showing that these samples had the weak D and partial D antigens associated.

We also studied 4 DNA samples of patients phenotyped as weak D who had developed anti-D. Our study showed that anti-D alloimmunization in these patients was associated with the presence of partial D antigens. Two samples were classified as partial D DAR, 1 as DHMi and 1 was DVI.

All the weak D types identified in our study were associated with the intensity of agglutination obtained at room temperature (RT), 37°C and AGH. The sensitivity of detecting weak D depends on the anti-D reagent and on the exact conditions of the methods. Our results showed that the weak D types 1, 2, 3 and 4 were frequently detected at RT and 37°C and therefore could be considered as D-positive for transfusion.

According to our results we could recommend the use of monoclonal anti-D IgM with high avidity to detect weak D antigen with low antigen density in blood donors and two monoclonals, one IgM and one IgG in combination with AGT to detect the weak D antigen in patients.

INTRODUÇÃO

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

Os genes do sistema Rh, *RHD* e *RHCE* são altamente homólogos e diferem na sua localização cromossômica. Os genes *RHD* (LE VAN KIM et. al., 1992; KAJI et. al., 1993) e *RHCE* (CHERIF-ZAHAR et. al., 1990) estão localizados no cromossomo 1p36.13-34.3 (CHERIF-ZAHAR et. al., 1991; CARRIT et. al., 1997) organizados em 10 éxons dentro de uma sequência genômica de aproximadamente 75kb. As diferenças básicas entre estes dois genes estão na região do éxon 10 e na deleção de 600pb no íntron 4 do gene *RHD* se comparado ao gene *RHCE*. O gene *RHAG* reside na região 6p11-21 (RIDGWELL et. al., 1992) e parece estar distribuído nos 10 éxons correspondentes aos genes *RHD* e *RHCE* (CARTRON, 1994) (Figura 1).

O sistema Rh é uma família de proteínas constituída pelos polipeptídios RhD e RhCE com peso molecular de 30 kD (proteínas Rh ou Rh30) codificados pelos genes *RHD* e *RHCE* e pela glicoproteína RhAG de peso molecular 50 kD (glicoproteína Rh50) codificada pelo gene *RHAG*. Os antígenos Rh somente são expressos na superfície da membrana eritrocitária quando a glicoproteína RhAG está presente. Na ausência de RhAG os antígenos Rh não são expressos. A associação das proteínas Rh30 e RhAG dentro de uma mesma família de proteínas baseia-se no fato de ambas apresentarem 36% de homologia na sequência genômica e 50% de identidade nas 12 α hélices transmembranares (Figura 1). Acredita-se que tanta homologia esteja relacionada ao fato de ambas terem sido originadas a partir de um gene ancestral comum (AVENT e REID, 2000). As proteínas RhAG e Rh30 compartilham homologia com a família das proteínas transportadoras de amônia; acredita-se, assim, que a família das proteínas Rh faça parte deste transporte (AGRE et. al., 2000 e AVENT, 2001). Atualmente, muitos estudos estão sendo realizados para confirmar se realmente essa é sua única função, uma vez que, não se sabe até hoje, qual é a verdadeira função da proteína Rh.

Constituído atualmente por 48 antígenos, o sistema Rh apresenta cinco principais antígenos: D, C/c e E/e. Estes antígenos são formados por oito complexos gênicos, conhecidos como haplótipos Rh (*Cde*, *cde*, *cDE*, *cDe*, *cdE*, *Cde*, *CDE*, *CdE*) (RACE, 1965). Destes, o antígeno RhD é o mais importante do ponto de vista clínico devido ao seu alto grau de imunogenicidade. O gene *RHD* codifica o antígeno RhD enquanto o gene *RHCE* (alelos *RH Ce*, *RH cE*, *RH ce* e *RH CE*) codifica os antígenos C/c e E/e (SIMSEK et. al., 1994).

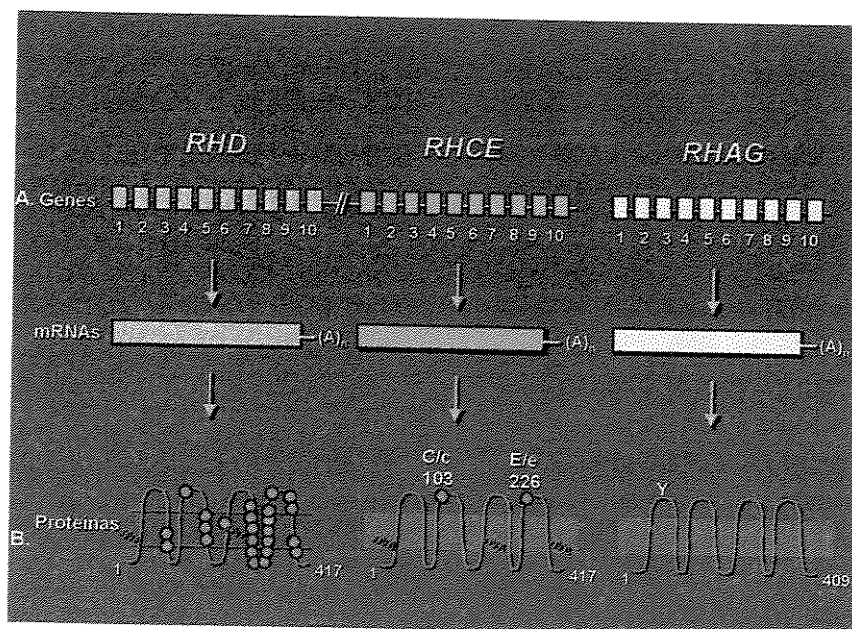


Figura 1: Família de proteínas Rh. A. Constituída pelas proteínas RhD, RhCE e RhAG codificadas pelos genes *RHD*, *RHCE* e *RHAG*. B. As proteínas RhD e RhCE diferem em 35 aminoácidos. O polimorfismo RhC/c encontra-se na 2^o alça extracelular da proteína RhCE enquanto o polimorfismo E/e está localizado na 4^o alça extracelular. A proteína RhAG difere das proteínas RhD e RhCE por apresentar 409 aminoácidos e uma cadeia N-glicosilada.

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

presença ou ausência de um membro desta família de polipeptídios. Os polipeptídios Rh atravessam a membrana eritrocitária 12 vezes, apresentando os segmentos amino-terminal e carboxi-terminal intracelularmente (AVENT et. al., 1992). Os polipeptídios RhD e RhCE têm um único resíduo externo *cisteína* na quinta alça extracelular que pode estar relacionado com a expressão antigênica (Figura 2).

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

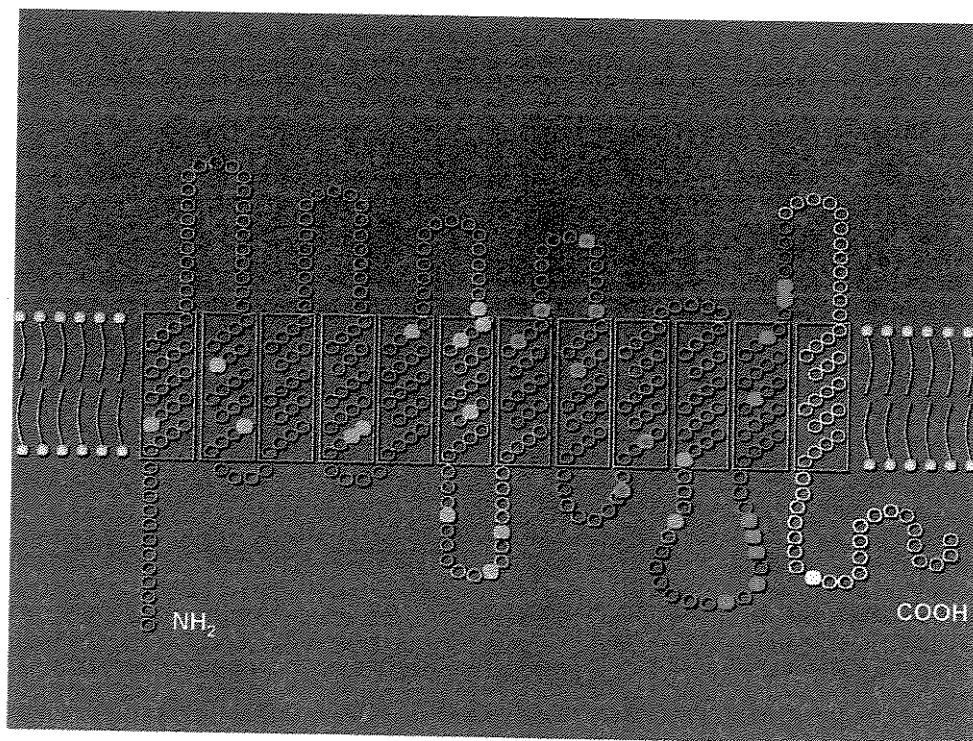


Figura 2: Proteínas Rh. As proteínas Rh são formadas por 417 aminoácidos e apresentam 12 segmentos transmembranares, 6 alças extracelulares e 5 alças intracelulares. Ambos segmentos carboxil e amino-terminal encontram-se na parte intracelular.

COLLIN et. al., (1991) demonstraram por meio da análise do DNA genômico de diferentes fenótipos do sistema Rh, que os indivíduos RhD-positivo possuem os genes *RHD* e *RHCE*, enquanto os indivíduos RhD-negativo possuem somente o gene *RHCE*. Na quase totalidade dos casos dos indivíduos caucasianos RhD-negativo, o gene *RHD* está deletado (LE VAN KIM et. al., 1992; ARCE et. al., 1993). Em alguns casos, o fenótipo RhD negativo pode também estar associado com trocas homólogas dos éxons 3 a 7, ou éxons 2 a 9 do gene *RHCE* no gene *RHD* (BLUNT, 1994; HUANG, 1996).

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

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

WAGNER e FLEGEL (2000) estabeleceram a estrutura molecular do locus Rh, em que os dois genes *RHD* e *RHCE* possuem orientações opostas e encontram-se separados por 30000 pb (Figura 3). Nesta região, encontra-se um outro gene denominado *SMP1* que tem a mesma orientação do gene *RHD* e cuja função no locus Rh ainda não está totalmente esclarecida. O gene *RHD* está flanqueado por dois segmentos de DNA, denominados “caixas Rhesus”, com um comprimento de aproximadamente 9000 pb, apresentando 98% de homologia e orientação idêntica. (Figura 3). De acordo com estes autores, a “caixa Rhesus” conteria a deleção do gene *RHD* com 1463 pb de extensão e estaria presente na maioria dos indivíduos caucasianos RhD-negativo. Esta descoberta possibilitou a padronização de técnicas moleculares para a determinação da zigosidade do antígeno RhD. Mediante estudos realizados com análises das seqüências genômicas do locus RH de humanos e camundongos, WAGNER e FLEGEL (2002) chegaram à conclusão de que o gene *RHD* é o gene duplicado enquanto os genes *RHCE* e *SMP1* são os genes ancestrais.

A proximidade entre estes genes facilitaria a ocorrência de conversão gênica em cis durante os rearranjos gênicos entre eles, levando assim à formação de genes híbridos (partes do gene *RHD* em *RHCE* e vice-versa), responsáveis por algumas variantes do antígeno RhD (Figura 3).

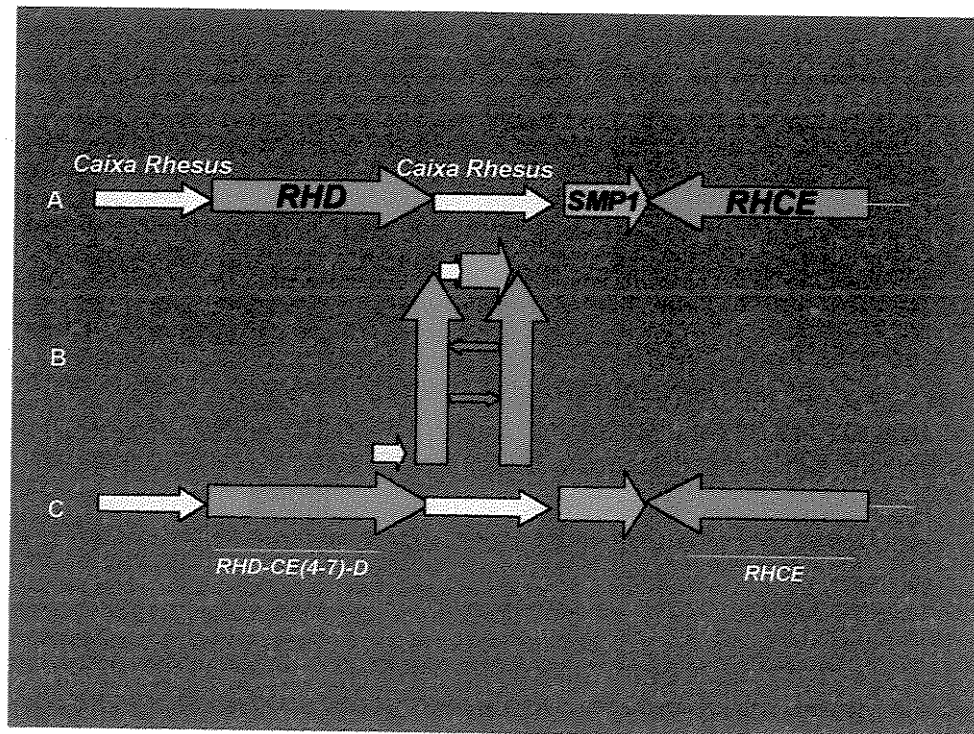


Figura 3: Modelo do locus Rh proposto por Wagner e Flegel (2000).

A No locus Rh os genes *RHD* e *RHCE* encontram-se separados por 30000 pb. Entre eles encontra-se um terceiro gene *SMP1*. B. A proximidade entre estes dois genes, durante o processo de conversão gênica, facilita a troca de regiões homólogas entre eles. C. Formação de genes híbridos responsáveis pelo aparecimento de alguns antígenos RhD parciais.

O antígeno RhD é o mais importante do sistema Rh devido ao seu envolvimento na doença hemolítica peri-natal e nas reações transfusionais hemolíticas. As bases moleculares do polimorfismo do antígeno RhD foram objetos de numerosos trabalhos. O antígeno RhD é considerado como um mosaico composto de 37 epítomos, onde pelo menos nove epítomos (epD1-epD9) já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais (LOMAS et. al., 1984). Alguns indivíduos RhD-positivo podem desenvolver aloanticorpos anti-D dirigidos contra um ou mais dos epítomos ausentes, definindo-se, assim, as categorias do antígeno RhD parcial (D^{II} , D^{III} , D^{IV} , D^{V} , D^{VI} , D^{VII} , DFR, DBT, R^{oHar}) que são diferenciadas umas das outras de acordo com a presença ou ausência de um ou mais epítomos (TIPPETT, et. al., 1996) (Tabela 1).

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

Tabela 1: Categorias do antígeno RhD parcial definidas por Tippett (1996). Através de um painel de anti-soros monoclonais epítomos específicos a categoria dos antígenos RhD parciais podem ser definidas pela presença ou ausência de determinados epítomos.

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

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

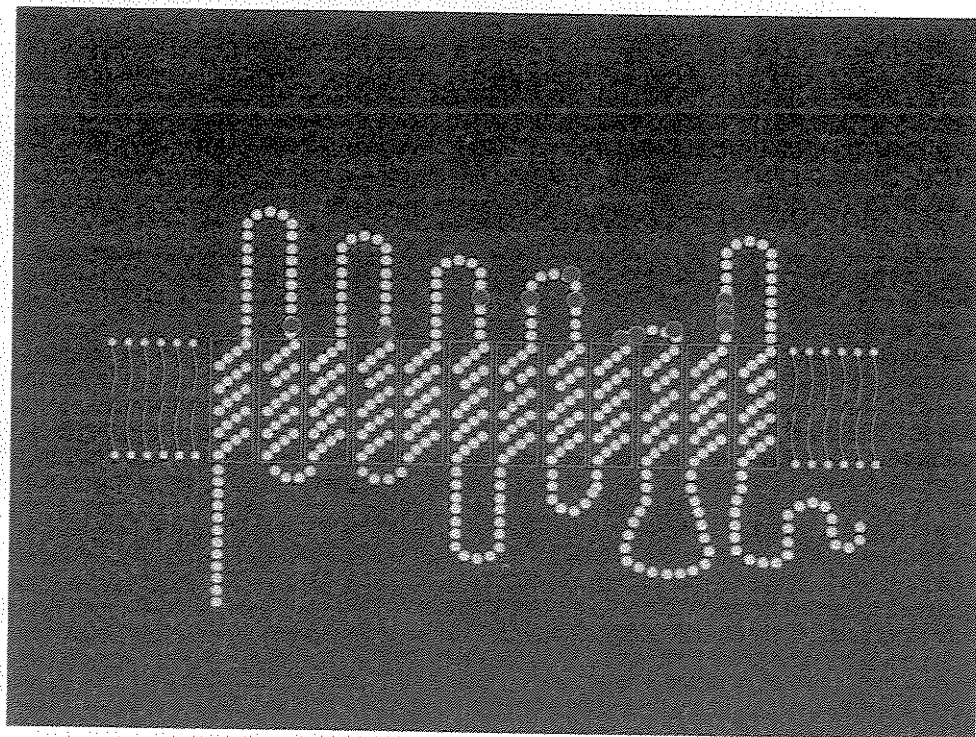


Figura 4: Proteína RhD parcial. Aminoácidos em rosa indicam que as substituições na proteína RhD parcial ocorrem nas alças extracelulares onde se localizam os epítomos RhD.

Os antígenos RhD parciais categorias D^{III}, DAR e DAU não são caracterizados sorologicamente devido ao fato de não existirem anticorpos monoclonais que reconhecem os epítomos específicos expressos por estas variantes. Estudos moleculares demonstraram que elas ocorrem predominantemente em indivíduos de origem africana e seus descendentes (HUANG et. al., 1997; HEMKER et. al., 1999, WAGNER et. al., 2002; CASTILHO et. al., 2005).

Uma outra variante do antígeno RhD, o antígeno RhD fraco, foi descrita por STRATTON (1946). Este antígeno apresenta fraca expressão do antígeno RhD e, dependendo do anti-soro anti-D utilizado, reage apenas pelo teste da antiglobulina humana.

AVENT (1996) e ROUILLAC (1997) acharam que o antígeno RhD fraco apresentava uma variação de expressão quantitativa derivada de uma redução dos níveis de mRNA. WAGNER e FLEGEL (1999) demonstraram que, na verdade, o antígeno RhD fraco surgiu como uma consequência de mutações de ponto missenses em diferentes éxons do gene *RHD*. Atualmente mais de 30 tipos já foram descritos (Site RHESUS: www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/). As substituições dos aminoácidos dos diferentes tipos de RhD fraco estão localizadas nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína RhD (Figura 5). Este fato explica a fraca expressão do antígeno RhD na membrana da hemácia, bem como a ausência de aloanticorpo anti-D na maioria dos indivíduos RhD fracos (WAGNER et. al.,2000; MULLER et. al.,2001).

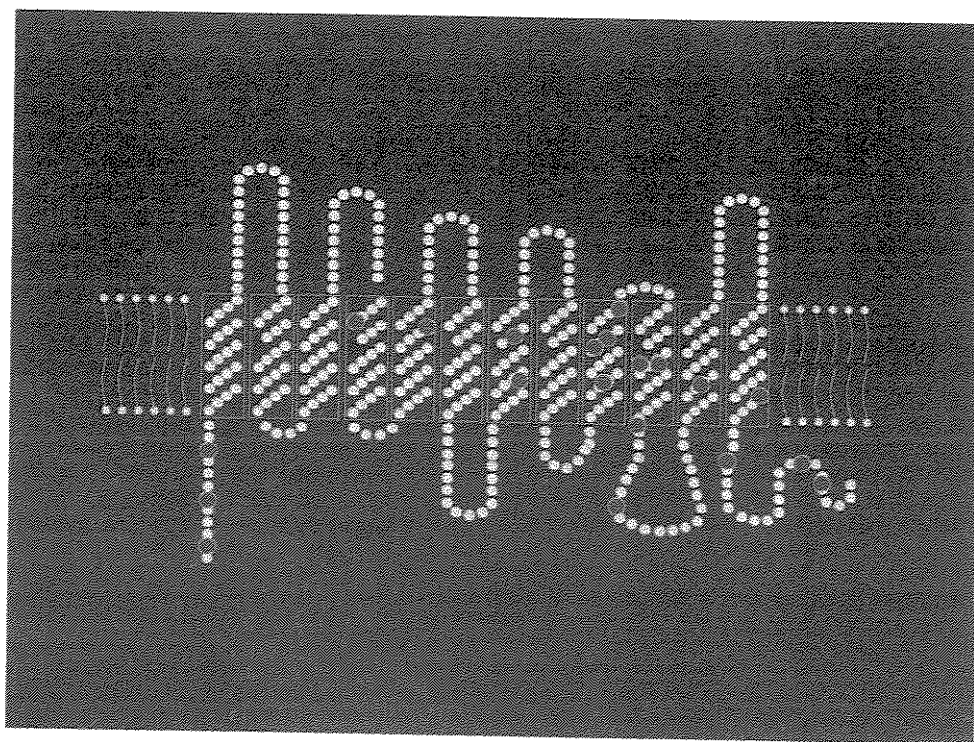


Figura 5: Proteína RhD fraco. Aminoácidos em vermelho indicam que as substituições na proteína RhD fraco ocorrem nas regiões transmembranares e intracelulares.

A presença do alelo *RHC* em trans no locus Rh, também está associada com a expressão fraca do antígeno RhD na hemácia. Algumas vezes este mecanismo encontra-se associado com tipos do antígeno RhD fraco, ocorrendo, assim, uma redução ainda

maior da expressão deste antígeno na membrana da hemácia, o que dificulta consideravelmente a sua identificação sorológica (MOTA et. al., 2005).

O mecanismo relacionado com a expressão reduzida do antígeno RhD fraco, não está totalmente esclarecido, e sua expressão difere dependendo do tipo presente na membrana da hemácia. Mutações missenses que ocorrem no gene *RHD* fraco parecem envolver regiões importantes relacionadas com a integração da proteína Rh com a membrana das hemácias ou com a glicoproteína RhAG (WAGNER e FLEGEL, 2004).

WAGNER e FLEGEL (2000) definiram o modelo da árvore filogenético RH, a partir de estudos realizados com alelos RH de primatas. Segundo esses autores, os haplótipos RH originaram-se a partir da evolução do haplótipo *Dce* (Ro), que seria o haplótipo ancestral. Este teria sofrido eventos moleculares e se dividido em cinco “clusters” *RHD* independentes.

Os clusters RhD categoria IVa e RhD fraco tipo 4 estão presentes em africanos e seus descendentes e geralmente ocorrem com o haplótipo *Dce* (Ro). Em 2002, WAGNER e FLEGEL estudando uma nova variante do antígeno RhD em africanos, identificaram mais um cluster RhD independente, denominado DAU. Assim, estes três grupos formam o “cluster dos alelos africanos”. O cluster euroasiático ocorre mais frequentemente com os haplótipos *DCe* e *DcE*. O quinto e principal cluster envolve o gene *RHD* normal, do qual derivam todos os outros (Figura 6).

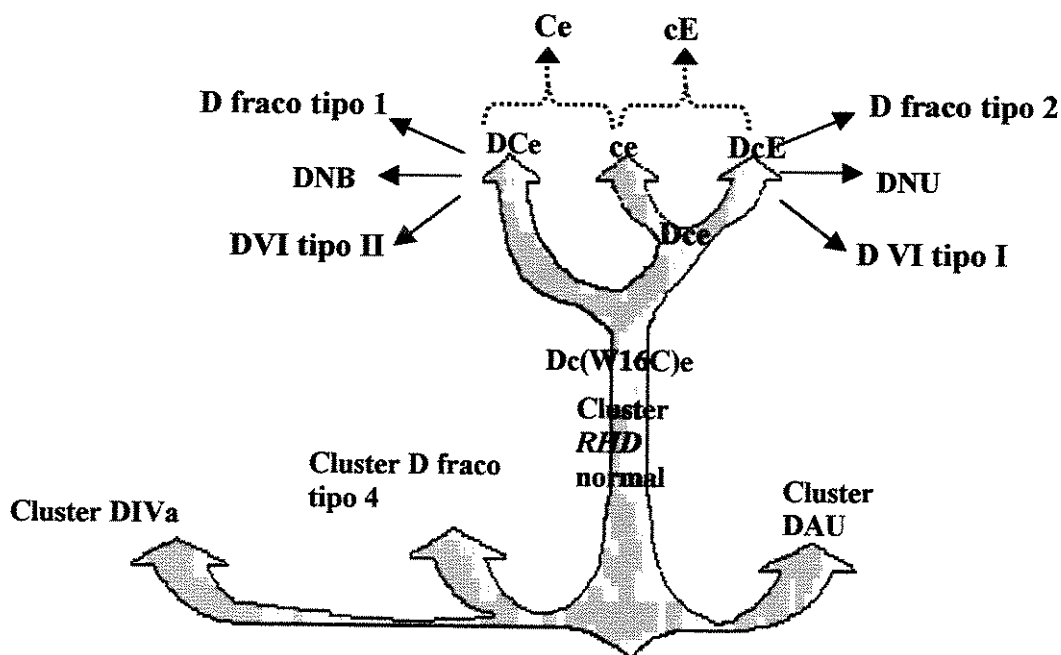


Figura 6: Árvore filogenética *RHD* idealizada por Wagner e Flegel, 2000. Constituída por 4 clusters de alelos *RHD* independentes: D categoria IVa, D fraco tipo 4, D normal ou euroasiático e DAU. Os alelos dos clusters D categoria IVa, D fraco tipo 4 e DAU estão presentes em Africanos e os alelos do cluster D normal ou euroasiático estão presentes em populações europeias e asiáticas.

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

Como rotina, os métodos que amplificam regiões específicas do íntron 4 e éxon 10 têm sido utilizados na genotipagem *RHD*. A amplificação simultânea do íntron 4 e éxon 7 em uma técnica de PCR multiplex tem sido utilizada na genotipagem dos alelos RH C/c e detecção do pseudogene *RHD* (SINGLETON et. al., 2000). A técnica de PCR multiplex tem possibilitado também a caracterização molecular das variantes *RHD*

híbridas, ou seja, as variantes que possuem inserção total ou parcial do éxon *RHD* pelo éxon *RHCE* equivalente (MAASKANT van WIJK et. al., 1998).

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

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

Devido a sua importância clínica e considerando que o antígeno RhD é o mais imunogênico do sistema Rh e que apresenta diversas variantes, estudos que possam esclarecer sua expressão e mecanismos moleculares envolvidos são importantes para a padronização de técnicas moleculares e sorológicas em diferentes populações.

O fato de não existir estudos moleculares que caracterizem os antígenos RhD fraco na população brasileira nos estimulou a realizar um trabalho que possa ajudar a determinar os tipos de RhD fraco mais frequentes de nossa população bem como o seu envolvimento com a aloimunização. A partir deste estudo, acreditamos que seja possível estabelecer uma estratégia sorológica adequada para nossa população que venha a beneficiar os pacientes politransfundidos.

OBJETIVOS

Tendo em vista a importância do tema e sua aplicação na prática clínica transfusional, os objetivos foram:

1. Caracterizar molecularmente os antígenos RhD fraco e RhD parcial em doadores voluntários de sangue
2. Associar os tipos de RhD fraco encontrados com os haplótipos Rh presentes.
3. Avaliar a aplicação da determinação do antígeno RhD fraco e RhD parcial na prática transfusional.

MATERIAL E MÉTODOS

A. MATERIAL

1. Amostras

a) Amostras de sangue

Após consentimento informado, foram coletadas no período de março de 2002 a agosto de 2004, 503 amostras de sangue de doadores voluntários de sangue das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, caracterizados sorologicamente como RhD fraco. Neste período, foram também coletadas quatro amostras de sangue de pacientes fenotipados como RhD fraco e que apresentavam aloanti-D.

2. Cartões Gel (ID-Micro Typing Cards)

Os cartões ID-Liss/Combs foram utilizados na realização da fenotipagem eritrocitária e foram obtidos pela a Diamed AG ®, Morat, Switzerland. Cada cartão ID-Liss/Combs contém seis microtubos e, em cada um deles, uma mistura de gel e soro antiglobulina humana poliespecífica.

3. Tampão LISS modificado (Diluyente 2)

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

4.. Solução de bromelina

Solução de bromelina, utilizada no tratamento das hemácias para a realização da fenotipagem RhD em microplaca (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 três vezes as hemácias em solução fisiológica, usando

centrifugação a 100g durante 1 minuto, a cada vez, 2 µl do concentrado de hemácias obtido foi ressuspensão em 0,5 ml de LISS modificado.

6. Suspensão de hemácias a 3%

Foram preparadas suspensões de hemácias a 3% em salina. Após lavar três vezes as hemácias em solução fisiológica, usando centrifugação a 100g durante 1 minuto, a cada vez, 15 µl do concentrado de hemácias obtido foi ressuspensão em 0,5 ml de solução salina 0,9%.

7. Anti-soros

Os anti-soros empregados na determinação do antígeno RhD foram:

- anti-RhD policlonal (lote DMD18, Gamma Biologicals Inc. ®, Houston, TX).
- anti-RhD policlonal (lote 04A2721, ASEM-NPBI ®, São Paulo, Brasil).
- anti-RhD policlonal (lote 03I01A21, ASEM-NPBI ®, São Paulo, Brasil).
- anti-RhD monoclonal clone BS221 (ASEM-NPBI ®, São Paulo, Brasil).
- anti-RhD monoclonal clone H1121G6 (Ortho Diagnostics ®, Raritan NJ).
- anti-RhD monoclonal clone BS226 (ASEM-NPBI ®, São Paulo, Brasil).
- anti-RhD monoclonal clone BS232 (ASEM-NPBI ®, São Paulo, Brasil).
- anti-RhD blend (BS221+H4111B7) (ASEM-NPBI ®, São Paulo, Brasil).
- soro antiglobulina humana poliespecífico (lote 04K22A21, ASEM -NPBI ®, São Paulo, Brasil).
- soro antiglobulina humana monoespecífico (lote 04M17A21, ASEM -NPBI ®, São Paulo, Brasil).
- soro antiglobulina humana poliespecífico (lote 14060.30.70, Diamed AG ®, Morat, Switzerland).

8. Diluição dos anti-soros

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

9. Extração de DNA

O Easy DNA Kit (Invitrogen ®, Carlsbad, CA) e o Genome Star™ System (Biosystems) foram utilizados na extração de DNA de amostras de sangue periférico.

10. dNTP 10mM

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

11. Taq DNA polymerase

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

12. Tampão tris-Acetado-EDTA (TAE) 50x

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

13. Tampão Tris-Borato-EDTA (TEB) 10x

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

14. Tampão tris-Acetado-EDTA (TAE) 1x

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

15. Tampão Tris-Borato-EDTA (TEB) 1x

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

16. Gel de agarose a 1.5%

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

17. Gel de agarose a 3.0%

Três gramas de agarose (Invitrogen ®, Carlsbad, CA) foram dissolvidos em 100ml de TAE 1x. Esta solução foi aquecida em forno microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, adicionou-se 50µg de brometo de etídio (Invitrogen ®, Carlsbad, CA).

18. Gel de poliacrilamida a 8%

A solução de poliacrilamida foi preparada misturando-se, em um Becker, 23,3ml de acrilamida 40% (Invitrogen ®, Carlsbad, CA), 8,8ml de TEB 10X, 55 ml de ddH₂O, 363µl de persulfato de amônia 10% (Invitrogen ®, Carlsbad, CA) e, 66µl de TEMED (Invitrogen ®, Carlsbad, CA). Esta solução foi colocada em uma placa de vidro, previamente preparada, até que ocorresse a sua polimerização.

19. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares de 50 pb, 100 pb e low DNA mass foram obtidos da Sinapse (MBI Fermentas ®).

20. Enzimas de restrição

As enzimas *Mnl*-I e *Hph*-I foram obtidas da Sinapse (MBI Fermentas ®).

21. Concert rapid PCR purification system

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

22. Big Dye

Reagente (BD Half-term, GenPak, Perkin Elmer Biosystems) utilizado no preparo das reações para o sequenciamento automático de DNA.

B. MÉTODOS

1. Fenotipagem RhD

A fenotipagem RhD foi determinada pelo teste de hemaglutinação clássico em tubo, pelo teste de hemaglutinação em microplaca e pelo método em gel.

1.1. Fenotipagem RhD em tubo

Após identificação dos tubos, 50 µl do anti-soro anti-D e 50 µl das hemácias em teste a 3% em solução salina 0,9%, foram adicionadas aos tubos. Após centrifugação a 3500 rpm por 15 segundos, foi realizada a leitura das reações em função dos padrões de aglutinação em tubo.

1.2. Fenotipagem RhD em microplaca

Após identificação das microplacas, 25 µl das hemácias em teste tratadas previamente com bromelina (50 µl de hemácias e 50 µl de solução de bromelina foram incubadas a 37°C por 15 minutos) e ressuspensas a 3% em solução salina, foram adicionadas às cavidades das microplacas contendo 25 µl do anti-soro anti-D diluído. Após centrifugação a 2000 rpm por 60 segundos, a microplaca foi agitada em um agitador apropriado e foi realizada a leitura das reações em função dos padrões de aglutinação em microplaca.

1.3. Fenotipagem RhD em gel

Após identificação dos cartões ID-LISS-Coombs, 50 µl das hemácias em teste a 0,8% em Diluente 2 foram adicionadas aos tubos contendo gel e soro antiglobulina humana. A seguir, 25 µl do anti-soro diluído, contendo anticorpos específicos ao antígeno a ser estudado, foram adicionadas ao mesmo tubo. Após incubação a 37°C por 15 minutos, os cartões foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação em gel teste.

2. Pesquisa do antígeno RhD fraco

A pesquisa do antígeno RhD fraco foi realizada pela técnica de hemaglutinação em tubo, utilizando-se 50 µl do anti-soro anti-D e 50 µl de suspensão de hemácias a 3% em salina. Após incubação da reação a 37°C por 30 minutos, os tubos foram lavados três vezes com solução salina e foi adicionado 100 µl de soro antiglobulina humana. Após centrifugação a 3500 rpm por 15 segundos, foi realizada a leitura das reações em função dos padrões de aglutinação em tubo.

3. Extração de DNA

O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico utilizando-se os métodos Easy DNA Kit (Invitrogen®, Carlsbad, CA) e o o Genome Star™ System (Biosystems) de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes.

A concentração e qualidade de todos os DNAs preparados foram analisadas. A qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose. E a concentração de DNA foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro a 260 nm.

4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da Polimerase (PCR) utilizou 200 ng de DNA, 50 pmol de cada *primers*, 2 nmol de cada dNTP, 1.0 U de *Taq* DNA polimerase e tampão em um volume final de 50 µl.

Os ciclos de amplificação foram realizados em termo ciclador Perkin Elmer 9700 (Foster City, CA). Os ciclos de amplificação consistiram de: desnaturação a 95°C por 5 minutos 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 62°C e 65°C, 20 segundos a 72°C seguidos de uma extensão de 10 minutos a 72°C. A análise final dos produtos de PCR obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, 2,0%, 3,0% e gel poliacrilamida 8%. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.

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

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

6. Genotipagem *RHD*

Devido à alta homologia existente entre os genes *RHD* e *RHCE*, a estratégia utilizada na genotipagem *RHD* levou em consideração as diferenças existentes entre eles em duas regiões genômicas: intron 4 e exon 10. No intron 4, o gene *RHCE* possui 600 pb a mais que o gene *RHD*, enquanto, na região 3' não traduzida do exon 10, o gene *RHD* possui 47 pb a mais que o gene *RHCE*. Assim, foram utilizados *primers* (REID et al, 2000) que permitem determinar a presença do gene *RHD*, pela análise direta dos produtos de PCR *RHD* (115 pb) e *RHCE* (236 pb), após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 7). As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na Tabela 2.

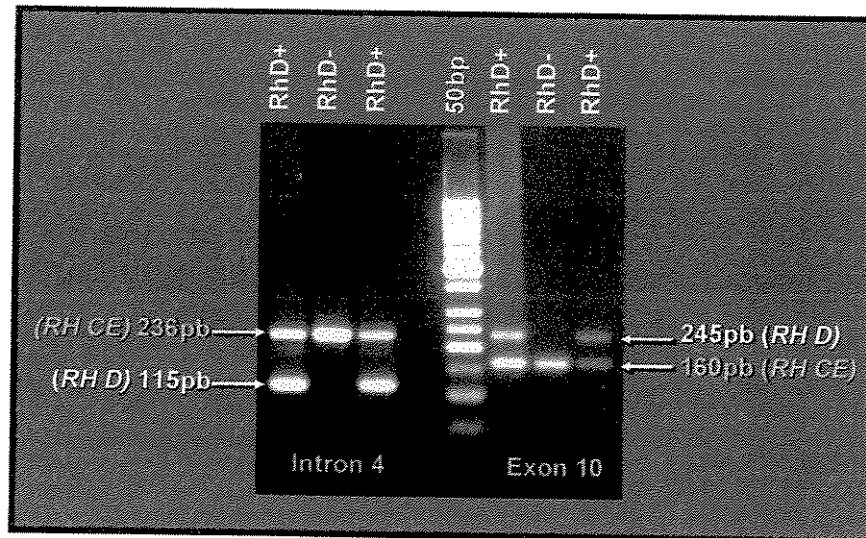


Figura 7. PCR para genotipagem *RHD*. Intron 4: Linha 1: Amostra *RHD*+/*RHCE*+ (*RhD*+); Linha 2: Amostra *RHD*-/*RHCE*+ (*RhD*-), Linha 3: Amostra *RHD*+/*RHCE*+ (*RhD*+), Linha 4: Branco. Linha 5: Marcador molecular de 50pb. Exon 10: Linha 6: Amostra *RHD*+/*RHCE*+ (*RhD*+); Linha 7: Amostra *RHD*-/*RHCE*+ (*RhD*-), Linha 8: Amostra *RHD*+/*RHCE*+ (*RhD*+)

7. Genotipagem *RHEe*

A genotipagem *RHEe* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto de PCR (amplicon) obtido foi digerido com a enzima de restrição *Mnl*-I (PCR-RFLP) de acordo com descrito por RIOS et al, 1999 e REID et al, 2000. A análise dos fragmentos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 3% ou em gel de poliacrilamida a 8%. (Figura 8). As seqüências dos *primers* encontram-se na Tabela 2.

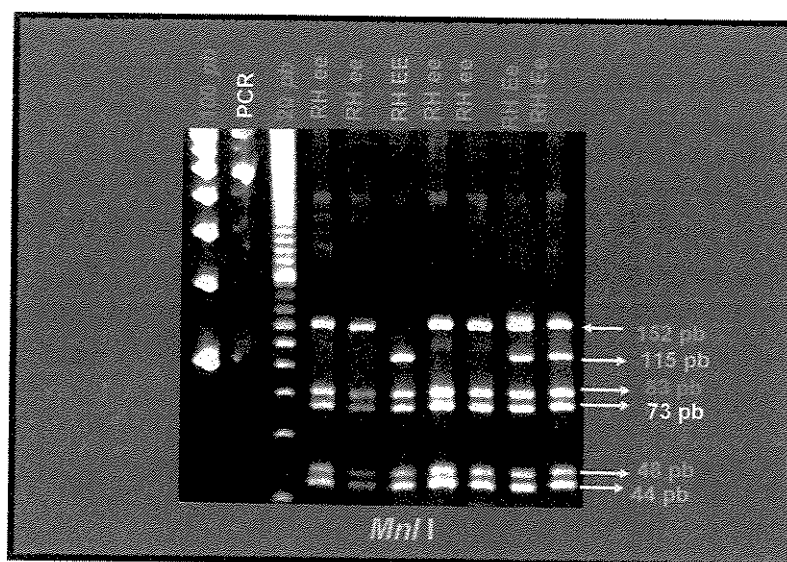


Figura 8. PCR-RFLP para genotipagem *RH/EE*. A presença de um fragmento de 115 pb indica o alelo *RHE* enquanto que um fragmento de 152 pb indica o alelo *RHe*. Os demais fragmentos são comuns aos 2 alelos.

8. Genotipagem *RHCc*

A genotipagem *RHCc* e a determinação do pseudogene *RHD* foram realizadas utilizando-se uma técnica de PCR multiplex que permite a amplificação dos alelos *RHCc* na presença do gene *RHD* (SINGLETON et al., 2000). A reação de PCR utilizou 200 ng de DNA, 50 pmol de cada primer, 2 nmol de cada dNTP, 1.0 U de Taq DNA polimerase e tampão em um volume final de 50 µl. Os ciclos de amplificação foram realizados em um termo ciclador Perkin Elmer 9700 (Foster City, CA) e consistiram de: desnaturação a 95°C por 5 minuto e 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, e 1 minuto a 72°C seguido de uma extensão de 10 minutos a 72°C. A análise dos produtos de PCR obtido foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 3%. (figura 9). As mutações de ponto associadas com este polimorfismo e a sequências dos *primers* utilizados encontram-se na tabela 2.

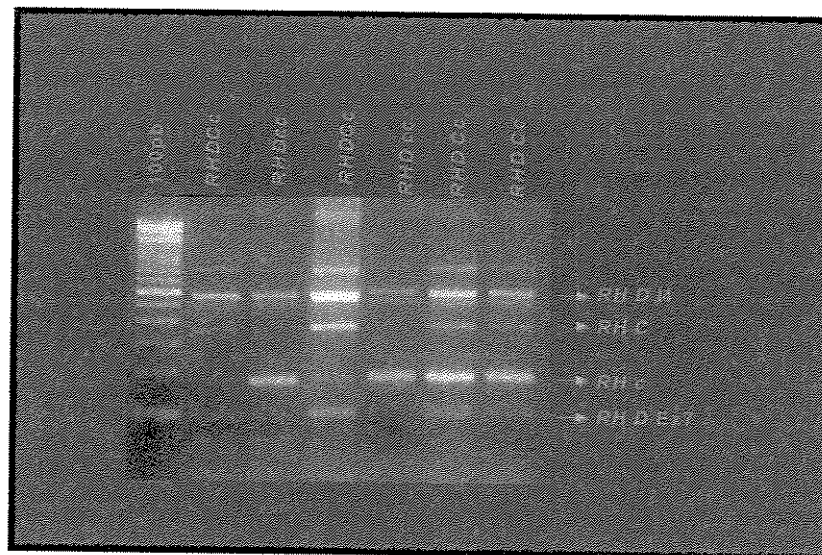


Figura 9. PCR multiplex para genotipagem *RHD* e *RHCc* Linha 1: Marcador molecular de 100pb. Linha 2: genótipo *RHD*+ *RHCc*. Linha 3 genótipo *RHD*+ *RHcc*. Linha 4: genótipo *RHD*+ *RHCc*. Linha 5: genótipo *RHD*+ *RHcc*. Linhas 6 e 7: genótipos *RHD*+ *RHCc*

9. Caracterização molecular dos antígenos RhD Fraco e RhD Parcial HMi

A caracterização molecular dos antígenos RhD fraco e RhD parcial HMi foi realizada utilizando-se uma técnica de PCR alelo-específico (MULLER et al., 2001) com o objetivo de identificar os cinco tipos do antígeno RhD fraco que ocorrem com mais frequência e detectar o antígeno RhD parcial HMi que pode ser confundido com RhD fraco sorologicamente. A reação de PCR e as condições foram previamente descritas. A análise final dos produtos de PCR obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 10). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 3.

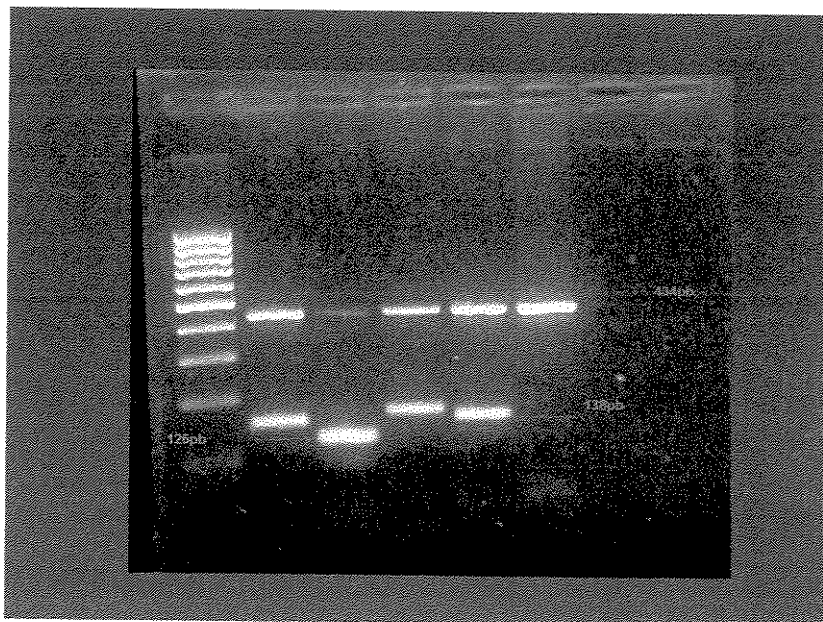


Figura 10. PCR alelo-específico para caracterização molecular dos antígenos RhD fraco. Linha 1: Marcador molecular de 100 pb. Linha 2: D fraco tipo 1. Linha 3: D fraco tipo 2. Linha 4: D fraco tipo 3. Linha 5: D fraco tipo 4. Linha 6: Controle interno (HGH=434pb). Linha 7: Branco

10. Caracterização molecular da variante *RHD* parcial categoria VI tipo I

A caracterização molecular das variantes *RHD* híbrida categoria VI tipo I foi realizada em toda amostra fenotipada como RhD fraco que não foi classificada como *RHD* fraco, DHMi e DAR, utilizando-se uma técnica de PCR multiplex que amplifica 6 exons específicos do gene *RHD*. A variante híbrida DVI tipo I é identificada pela ausência de duas dessas regiões (exons 4 e 5 que pertencem ao gene *RHCE*) (MAASKANT-van-WIJK, 1998). (Figura 11). As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 4.

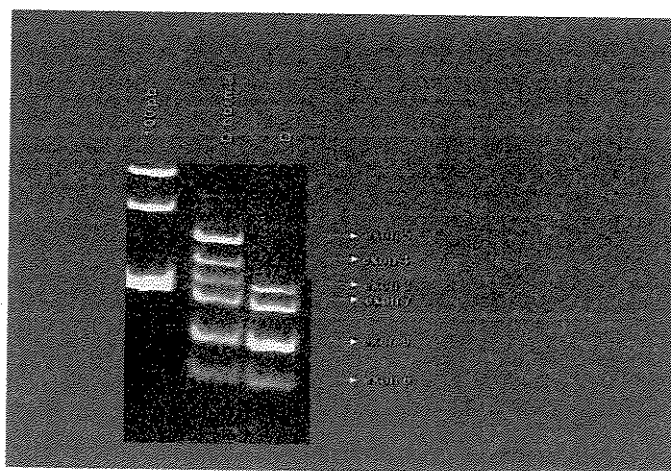


Figura 11. PCR multiplex para caracterização do antígeno RhD parcial categoria VI. A ausência dos exons 4 e 5 indicam a presença do alelo D cat VI tipo I. **Linha 1;** marcador molecular de 100 pb. **Linha 2:** alelo D normal. **Linha 3.** Alelo D VI tipo I.

11. Caracterização molecular do antígeno RhD parcial DAR

A caracterização do antígeno DAR foi realizada em todas as amostras de DNA identificadas como RhD fraco tipo 4. Foi padronizada uma técnica de PCR-RFLP com primers específicos para amplificar o exon 7 do gene *RHD* e o produto obtido foi digerido com a enzima *Hph-I*. O alelo D fraco tipo 4 não tem sítio de restrição para a enzima *Hph I* enquanto que o alelo DAR apresenta 3 sítios para esta enzima e é digerido em 3 fragmentos (189pb, 45 pb e 28 pb). A análise dos fragmentos foi realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (Figura 12). As sequência dos *primers* encontram-se na tabela 4.

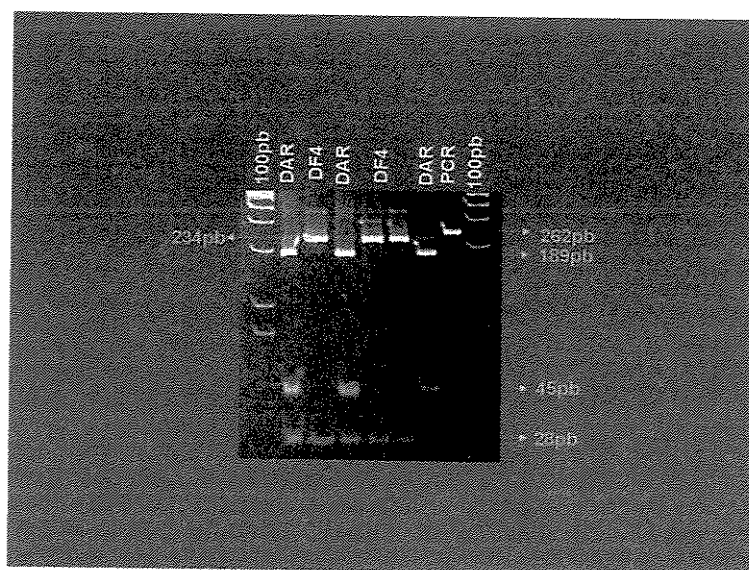


Figura 12. PCR-RFLP para caracterização da variante DAR. Linhas 1, 3 e 6 demonstram a presença de DAR.

12. Sequenciamento das amostras RHD fraco e RhD parcial HMi, DAR

Para confirmação dos tipos de RHD fraco e dos alelos D parciais encontrados pelas técnicas de PCR-alelo específico e PCR-RFLP foram realizadas reações de sequenciamento a partir do produto amplificado dos exons 6 (RhD fraco tipo 1), 9 (RhD fraco tipo 2), 1 (RhD fraco tipo 3), 4 (RhD fraco tipo 4), 6 (DHMi) e 7 (DAR) para a identificação das mutações 809G, 115C, 8G, 602G, 848T e 1025C, respectivamente. O produto do PCR foi purificado conforme recomendado pelo fabricante e a reação analisada no sequenciador ABI 377XL Perkin Elmer Biosystems.

13. Citometria de Fluxo

Foi padronizada uma técnica de citometria de fluxo para avaliar a expressão a dos antígenos RhD fracos estudados. Assim, a expressão dos antígenos RhD nas hemácias RhD fraco foi medida em um citômetro de fluxo FAScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA), utilizando-se 3 anti-D IgG monoclonais e um potente anti-D policlonal. O anticorpo secundário utilizado foi um anticorpo IgG anti-humano produzido em cabra, fragmento Fab, conjugado com fluoresceína (FITC). A fluorescência obtida nas amostras RhD fraco foi comparada com a de hemácias controles com o fenótipo RhD-

positivo R1r (DCcee). O background da fluorescência foi determinado com hemácias RhD-negativo. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados descritos na literatura.

Tabela 2: Sequência dos *primers* utilizados nas genotipagens *D*, *RH C/c*, *RH E/e*

Primers	Sequências	PCR
RHI41	5'-GTG TCT GAA GCC CTT CCA TC -3'	Intron 4
RHI42	5'-GAA ATC TGC ATA CCC CAG GC -3'	Intron 4
RHI43	5'ATT AGC TGG GCA TGG TGG TG 3'	Intron 4
EX10F	5'-TTT CCT CAT TTG GCT GTT GGA TTT TAA -3'	Exon 10
RHD3'-UTR	5'-GTA TTC TAC AGT GCA TAA TAA ATG GTG -	Exon 10
RHCE3'-UTR	5'-CTG TCT CTG ACC TTG TTT CAT TAT AC -3'	Exon 10
EXON 7 for	5'-AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA -3'	
EXON 7 rev	5'-ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC -3'	Exon 7 <i>RHD</i>
INTRON 3 for 1	5'-GGG TTG GGC TGG GTA AGC TCT -3'	Intron 3 <i>RHD</i>
INTRON 4 rev	5'-GAA CCT GCT CTG TGA AGT GCT -3'	Intron 4 <i>RHD</i>
AXON 4 insert	5'-AAT AAA ACCC AGT AAG TTC ATG TGG -3'	Exon 4 <i>RHD</i>
INTRON 3 for 2	5'-AAC CTG GGA GGC AAA TG TT -3'	Intron 3 <i>RHD</i>
C for	5'-CAG GGC CAC CAC CAT TTG AA 3'	<i>RHC</i>
C rev	5'-GAA CAT GCC ACT TCA CTC CAG 3'	<i>RHC</i>
c for	5'-TCG GCC AAG ATC TGA CCG 3'	<i>RHc</i>
c rev	5'-TGA TGA CCA CCT TCC CAG G 3'	<i>RHc</i>
CEI4	5'-GGC AAC AGA GCA AGA GTC CA -3'	<i>RHE/e</i>
CEX5	5'-CTG ATC TTC CTT TGG GGG TG -3'	<i>RHE/e</i>

Tabela 3: *Primers* utilizados na técnica de PCR alelo-específico para RhD fraco e RhD parcial HMi

Primers	Seqüências	Exon/pb
RHDF1 sense	5'aca cgc tat ttc ttt gca gAC TTA TGG 3'	Exon6/153pb
RHDF1 antisense	5'GGT ACT TGG CTC CCC CGAC 3'	
RHDF2 sense	5'ctc caa atc ttt taa cat taa att atg cat tta aac agC 3'	Exon9/126pb
RHDF2 antisense	5'gtg aaa aat ctt acC TTCCAGAAAACTTGGTCATC 3'	
RHDF3 sense	5'aca gag acg gac aca ggA TGA GATG 3'	Exon1/166pb
RHDF3 antisense	5'CTT GAT AGG ATG CCA CGA GCCC 3'	
RHDF4 sense	5'AGA CTA CCA CAT GAA CAT GAT GCA CA 3'	Exon4/138pb
RHDF4 antisense	5' CAG ACA AAC TGG GTA TCG TTG CTC 3'	
RHDF5 sense	5' GGT GCT GGT GGA GGT GAC GGA 3'	Exon3/112pb
RHDF5 antisense	5' gag ctt ttg gcc ctt ttc tccc 3'	
HMi sense	5'AGG AGG CGT GGC TGT GGC TAT 3'	Exon6/108pb
HMi antisense	5'GGT ACT TGG CTC CCC CGAC 3'	
HGH sense	5'TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTTA 3'	Controle interno/434pb
HGH antisense	5'CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTTTC 3'	

Tabela 4: Sequência dos *primers* utilizados na caracterização molecular da variante *RHD* híbrida categoria VI tipo I

Primers	Seqüências	Exon/pb
MR364	5'-TCG GTG CTG ATC TCA GTG GA-3'	Exon3/111
MR474M	5'-ACT GAT GAC CAT CCT CAT GT-3'	
MR496	5'-CAC ATG AAC ATG ATG CAC A-3'	Exon4/126
MR621	5'-CAA ACT GGG TAT CGT TGC TG-3'	
MR648	5'-G TGG ATG TTC TGG CCA AGT T-3'	Exon5/157
Mrex5	5'-cac CTT GCT GAT CTT ACC-3'	
MR898	5'-GTG GCT GGG CTG ATC TAC G-3'	Exon5/57
Mrex6	5'-tgtctagttcttac CGG CAA GA-3'	
MR973	5'-AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA-3'	Exon7/96
MR1068	5'-ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC-3'	
Mre9SD2	5'-aacagGT TTG CTC CTA AAT ATT-3'	Exon9/71
MR1219	5'-A AAC TTG GTC ATC AAA ATA TTT AAC CT-3'	

Tabela 5: *Primers* utilizados na técnica de PCR para a determinação da variante DAR

Primers	Seqüências	Tamanho
RHD16F	5' TCA TAC TGT GGT CCG TAA AC-3'	262pb
RHDEX7R	5'CAA TCA TGA CCA TTG CC 3'	

RESULTADOS

A. PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA A REALIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM *RHD*, *RHD* FRACO E *RHD* PARCIAL

Com o objetivo inicial de padronizar técnicas moleculares de genotipagem *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial, realizamos inicialmente um estudo molecular em 100 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue fenotipados para o antígeno RhD, em dez amostras de DNA de doadores fenotipados como RhD fraco e em dez amostras de DNA de pacientes caracterizados previamente como RhD parcial.

Apesar dos protocolos de genotipagem de grupos sanguíneos estarem bem estabelecidos foi necessário validá-los na população brasileira. Isto se fez necessário, tendo em vista que a maioria dos *primers* desenhados para genotipagem de grupos sanguíneos foram baseados em seqüências de indivíduos, geralmente de origem caucasiana (CARTON, 1994, WAGNER e FLEGEL, 2001).

Para a validação das técnicas, comparamos os resultados obtidos na genotipagem com os resultados da fenotipagem prévia. Em nossas amostras, houve concordância entre os resultados de fenotipagem e de genotipagem para os antígenos RhD, RhD fraco e RhD parcial e, assim, pudemos validar os métodos para a caracterização molecular dos antígenos RhD fraco e RhD parcial.

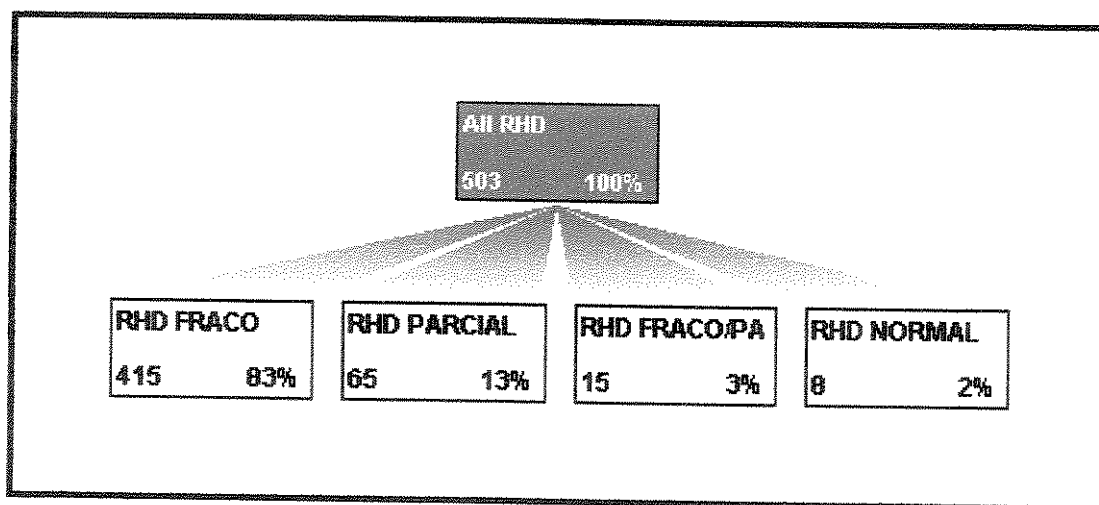
Os resultados demonstraram que os *primers* utilizados na determinação destes genótipos, se hibridizaram adequadamente com as regiões das seqüências obtidas em amostras de DNA em população com indivíduos miscigenados. Assim, estes protocolos podem ser utilizados para a genotipagem *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial em nossa população.

B. RESULTADOS DA GENOTIPAGEM *RHD*, *RHD* FRACO E *RHD* PARCIAL EM DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE

1. Caracterização molecular dos antígenos RhD, RhD fraco e RhD parcial

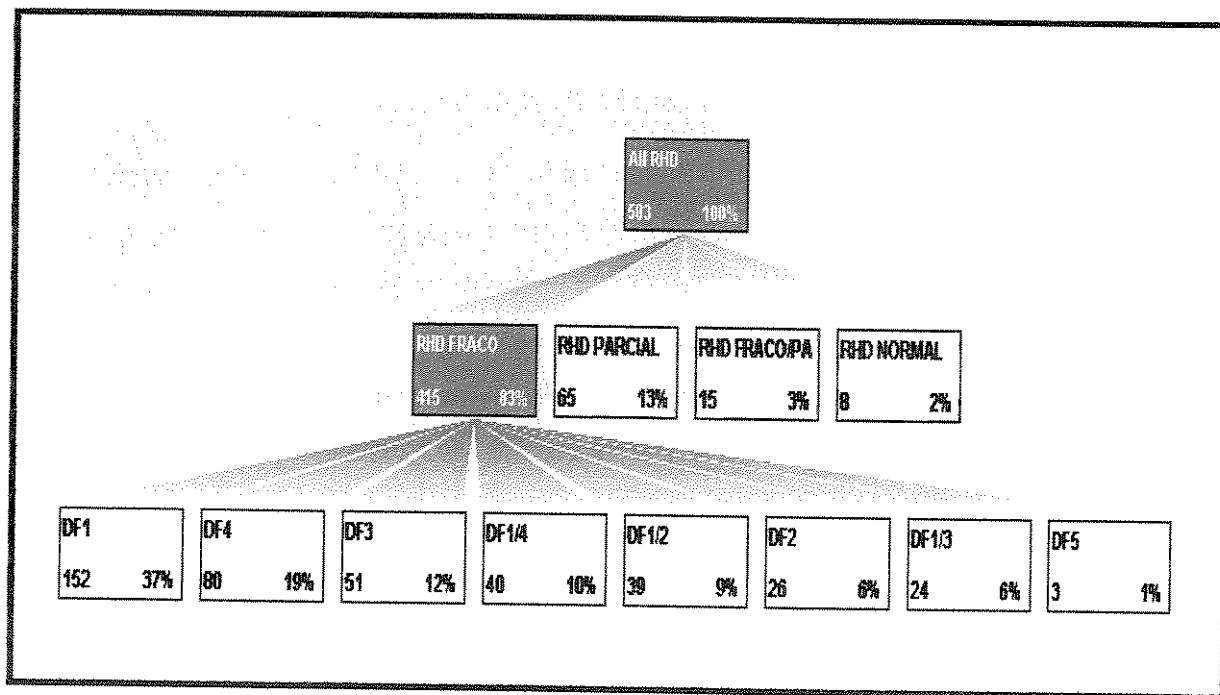
A caracterização molecular dos antígenos RhD, RhD fraco e RhD parcial foi realizada em 503 amostras de doadores voluntários de sangue previamente fenotipados como RhD fraco. Das 503 amostras estudadas, 415 foram molecularmente caracterizadas como RhD fraco, 65 como RhD parcial, 15 apresentaram associações de RhD parcial e RhD fraco e oito eram RhD normal. Os resultados obtidos encontram-se na figura 13.

Figura 13: Resultado molecular nas amostras fenotipadas como RhD fraco



A caracterização molecular do antígeno RhD fraco em doadores voluntários de sangue permitiu demonstrar que associações entre diferentes tipos de RhD fraco são frequentes na nossa população. Os tipos de antígeno RhD fraco obtidos e suas frequências encontram-se na figura 14. Os nossos resultados demonstram que o tipo 1 é o antígeno RhD fraco mais frequente, seguido pelos tipos 4 e 3.

Figura 14: Caracterização molecular dos tipos de RhD fraco em doadores voluntários de sangue.



Os resultados da genotipagem *RHD* parcial em doadores voluntários de sangue demonstraram que 12,9% das amostras fenotipadas como RhD fraco eram RhD parcial. A categoria VI e os tipos DAR e DHMi podem ser considerados freqüentes em nossa população. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 15.

Nas amostras estudadas ainda pudemos observar que existe associação entre os antígenos RhD fraco e RhD parcial em uma mesma amostra. Das 503 amostras estudadas, 15 (3%) apresentaram os antígenos RhD fraco e RhD parcial associados. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 16.

Figura 15: Ocorrência das variantes DAR, DHMI e DVI em doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD fraco

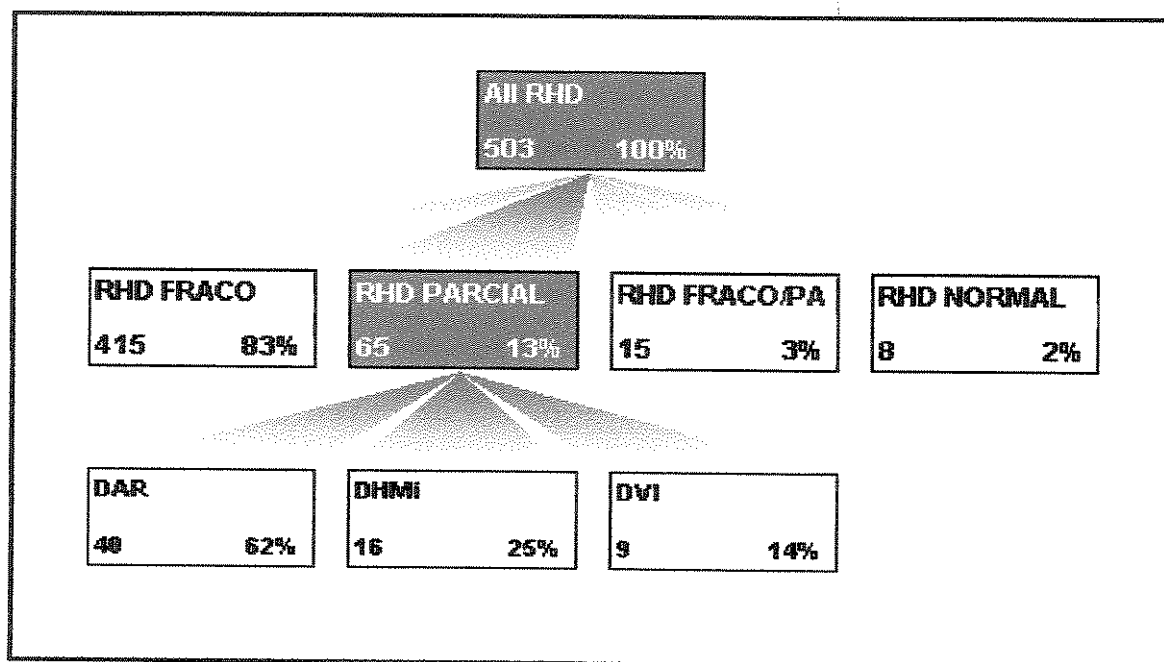
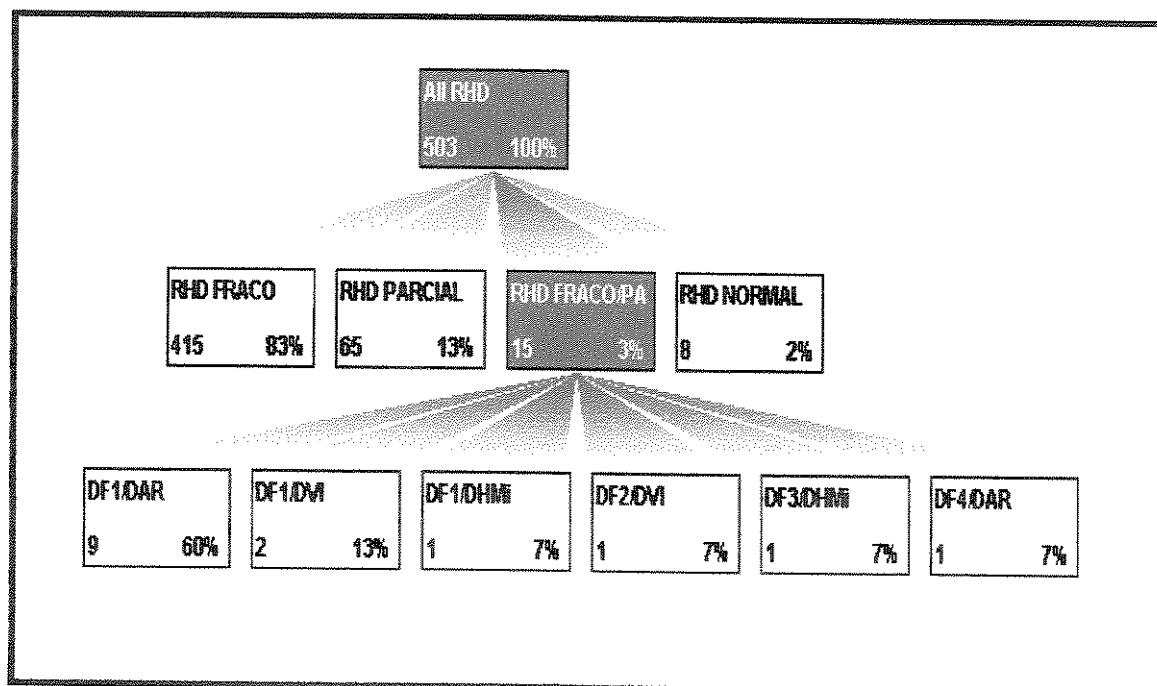


Figura 16: Associações dos antígenos RhD fraco e RhD parcial



2. Associação dos tipos de antígeno RhD fraco com os haplótipos *RH*

Os tipos de antígeno RhD fraco identificados foram associados aos haplótipos *RH* determinados molecularmente em 242 amostras. Os resultados demonstram que os tipos 1 e 3 estão freqüentemente associados aos haplótipos R_{1r} (CcDee) e R_{0r} (ccDee), o tipo 2 ao haplótipo R_{2r} (ccDEe), o tipo 4 ao haplótipo R_{0r} (ccDee) e o tipo 5 ao haplótipo R_{1r} (CcDee). Tabela 5.

Tabela 6: Tipos de RhD fraco e haplótipos *RH*

AMOSTRAS	TIPOS DE RhD FRACO	HAPLÓTIPOS
70	DF1	R_{1r}
37	DF1	R_{0r}
26	DF2	R_{2r}
23	DF3	R_{1r}
18	DF3	R_{0r}
65	DF4	R_{0r}
3	DF5	R_{1r}

3. Associação dos tipos de antígeno RhD fraco com o grau de aglutinação

Os tipos de antígeno RhD fraco identificados foram também associados aos graus de aglutinação obtidos à temperatura ambiente (TA), 37°C e teste da antiglobulina humana (AGH). Os resultados demonstram que os tipos 1, 2, 3 e 4 podem ser detectados à temperatura ambiente enquanto o tipo 5 é detectado a pena pelo teste da AGH. Tabela 7.

Tabela 7: Tipos de RhD fraco e grau de aglutinação

TIPOS DE RhD	GRAU DE	REATIVIDADE
FRACO	AGLUTINAÇÃO	
DF1	2+/3+	AGH
DF2	1+/2+	AGH
DF3	2+	TA
DF3	3+	AGH
DF4	1+	TA
DF4	4+	AGH
DF5	1+	AGH

4. Expressão dos antígenos RhD fraco determinada por citometria de fluxo

Com a finalidade de determinarmos a expressão dos antígenos RhD nos diferentes tipos de antígeno RhD fraco encontrados, realizamos citometria de fluxo em pelo menos uma amostra de cada tipo de RhD fraco e em amostras controles fenotipadas como DCcee e dcee. Verificamos que as amostras RhD fraco apresentam fraca expressão antigênica quando comparadas com as amostras RhD-positivo utilizadas como controle. Observamos ainda que há variação de expressão entre os diferentes tipos de antígeno RhD fraco. Nossos resultados demonstram que o antígeno RhD fraco tipo 5 apresenta menor expressão antigênica, seguido pelos tipos 2, 1, 3 e 4. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8: Expressão antigênica dos antígenos RhD fraco

Amostras	Fenótipo	IFM* media $\pm$ desvio padrão
Controles positivos (total D+=3)		
147-116	DCcee	44.39 $\pm$ 16.95
149-013	DCcee	60.84 $\pm$ 28.67
151-036	DCcee	51.33 $\pm$ 20.53
Controles negativos (total D-=3)		
148-077	dccee	3.96 $\pm$ 2.20
D fraco tipo 1 (total DF1=3)		
611-1	Dccee	8.74 $\pm$ 3.47
327-0	DCcee	9.21 $\pm$ 3.16
624-6	DCcee	7.09 $\pm$ 3.66
D fraco tipo 2 (total DF2=3)		
095-7	DccEe	6.71 $\pm$ 3.34
375-0	DccEe	6.74 $\pm$ 3.22
390-0	DccEe	5.76 $\pm$ 2.78
D fraco tipo 3 (total DF3=1)		
949-4	Dccee	14.39 $\pm$ 3.34
072-0	DCcee	17.83 $\pm$ 11.61
179-0	DCcee	19.83 $\pm$ 14.32
D fraco tipo 4 (total DF4=3)		
041-0	Dccee	21.29 $\pm$ 13.78
317-7	Dccee	17.83 $\pm$ 11.61
023-0	Dccee	19.83 $\pm$ 14.32
D fraco tipo 5 (total DF5=1)		
446-0	DCcee	4.70 $\pm$ 2.38

*IFM: Intensidade Média de Fluorescência

5. Grau de aglutinação e expressão antigênica nas associações RhD fraco e RhD parcial

As 15 amostras que apresentaram os antígenos RhD fraco e RhD parcial associados foram analisadas quanto ao grau de aglutinação e expressão antigênica medida por citometria de fluxo. Todas as amostras estudadas foram detectadas sorologicamente apenas pelo teste da AGH com intensidades de aglutinação de 1+ ou fraca (+). Os resultados da citometria de fluxo demonstraram fraca expressão antigênica ($IFM=5.16 \pm 2.25$) e a presença de dupla população de células nestas amostras (Figura 17).

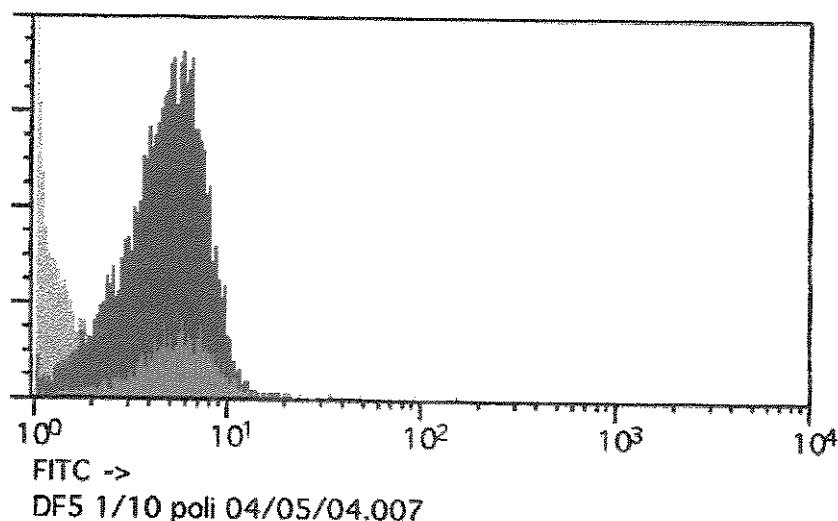


Figura 17. Resultado da citometria de fluxo em amostra com os antígenos RhD fraco e RhD parcial associados. A região em vermelho demonstra a presença do antígeno RhD fraco e a região em verde demonstra a presença do antígeno RhD parcial (células com tamanhos diferentes)

C. RESULTADOS DA GENOTIPAGEM *RHD*, *RHD* FRACO E *RHD* PARCIAL EM PACIENTES

Com a finalidade de caracterizarmos molecularmente o antígeno RhD em quatro amostras de DNA de pacientes fenotipados como RhD fraco que apresentavam anti-D, realizamos a genotipagem *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial nestas amostras. Nossos resultados demonstraram que estes pacientes apresentavam o antígeno RhD parcial e não o antígeno RhD fraco. Duas amostras foram classificadas como RhD parcial DAR, 1 como RhD parcial DHMi e 1 como RhD parcial categoria VI. Tabela 9.

Tabela 9: Resultados de pacientes RhD fraco com anti-D

TOTAL	DAR	DHMi	DVI
4	2	1	1
%	50%	25%	25%

DISCUSSÃO

A. PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA A REALIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM *RHD*, *RHD* FRACO E *RHD* PARCIAL.

Com a finalidade de padronizarmos as técnicas moleculares de genotipagem *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial, foram estudadas 100 amostras de DNA extraídas de sangue periférico de doadores voluntários de sangue fenotipados para o antígeno RhD atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, dez amostras de DNA de doadores fenotipados como RhD fraco atendidos no Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto e dez amostras de DNA de pacientes atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp caracterizados como RhD parcial no New York Blood Center.

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

Em nossas amostras, houve concordância entre os resultados de fenotipagem e genotipagem para os antígenos RhD, RhD fraco e RhD parcial. As categorias do antígeno RhD parcial caracterizadas sorologicamente com anticorpos monoclonais (DIVa, DIVb, DVI, DVa) foram concordantes com as categorias determinadas molecularmente.

Nossos resultados demonstraram que os *primers* utilizados nas genotipagens *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial, desenhados de acordo com as sequências genômicas obtidas de indivíduos com ancestrais caucasianos podem ser empregados na caracterização das variantes *RHD*, em populações com antecedentes étnicos diversos.

B. GENOTIPAGEM *RHD*, *RHD* FRACO E *RHD* PARCIAL EM DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE

A genotipagem *RHD* tem sido cada vez mais utilizada para diferenciar os antígenos RhD normal, RhD fraco e RhD parcial devido às limitações dos reagentes utilizados nos testes de hemaglutinação (WHESTOFF et al., 2004). As técnicas moleculares permitem distinguir as hemácias que perdem ou apresentam epítomos alterados (RhD parcial), daquelas que possuem níveis reduzidos do antígeno RhD (RhD fraco). Esta diferenciação é importante para prevenir a aloimunização em pacientes e gestantes, uma vez que indivíduos com o fenótipo RhD parcial apresentam risco de aloimunização, enquanto a maioria dos indivíduos RhD fraco não produzem anti-D.

Considerando que as frequências das variantes *RHD* diferem entre as populações e são mais frequentes em africanos do que em caucasianos (WAGNER et al., 2002), estudos que determinem a ocorrência destes antígenos podem direcionar a elaboração de protocolos que auxiliem na escolha da melhor conduta transfusional em populações constituídas por indivíduos descendentes de africanos.

O reconhecimento de amostras com fraca expressão do antígeno RhD depende do método e da qualidade do reagente anti-D empregado. A utilização de anti-D monoclonais de baixa afinidade e a dificuldade na obtenção de anti-D policlonais de boa qualidade têm causado discrepâncias entre os resultados da fenotipagem RhD e algumas vezes deixado de detectar antígenos RhD fraco com baixa densidade antigênica. A não detecção destes antígenos em doadores de sangue pode causar aloimunização anti-D nos pacientes RhD-negativo transfundidos com estas hemácias (WAGNER et al., 2000; MOTA et al, 2004). Por outro lado, muitos indivíduos classificados sorologicamente como RhD fraco são na verdade RhD parcial (ANSART-PIRENNE et al., 2004). Como a diferenciação entre os antígenos RhD fraco e RhD parcial é impossível de ser realizada na rotina sorológica, muitos pacientes tem produzido anti-D pelo fato de terem sido considerados RhD-positivos.

Assim, as genotipagens *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial têm contribuído significativamente na confirmação do fenótipo RhD fraco, na identificação de antígenos RhD fraco não detectados sorologicamente e na diferenciação entre os antígenos RhD fraco e RhD parcial.

Em nosso trabalho, das 503 amostras de DNA estudadas, 415 (82,5%) foram caracterizadas como RhD fraco, 65 (12,9%) como RhD parcial, 15 (3%) apresentaram os antígenos RhD fraco e RhD parcial associados e 8 (1,6%) eram RhD normais. Quando comparamos nossos resultados com dados da literatura em 2 estudos moleculares realizados em populações européias (MULLER et al., 2001; ANSART-PIRENNE et al., 2004), verificamos que estes autores encontraram uma alta frequência de antígenos RhD parciais em indivíduos fenotipados como RhD fraco, mas não encontraram associações entre RhD fraco e RhD parcial em uma mesma amostra.

O fato de termos encontrado amostras RhD normais em indivíduos fenotipados como RhD fraco demonstra que alguns reagentes não apresentam as especificações necessárias para a realização segura da fenotipagem RhD e deveriam ser melhor analisados antes de serem introduzidos na rotina.

Nossos resultados em conjunto com publicações anteriores demonstram claramente que a biologia molecular associada à hemaglutinação pode aumentar consideravelmente a segurança transfusional e materno-fetal pela melhor caracterização dos antígenos RhD em nossa população.

1. Caracterização molecular dos antígenos RhD, RhD fraco e RhD parcial

O antígeno RhD fraco é caracterizado sorologicamente por apresentar fraca expressão nas hemácias, a qual pode ser reflexo de alterações quantitativas e/ou qualitativas na proteína RhD. Estas alterações são decorrentes de mutações de ponto no gene *RHD* que levam a substituições de aminoácidos na proteína RhD responsáveis pelo enfraquecimento do antígeno RhD na membrana eritrocitária. A identificação destas mutações permite classificar o antígeno RhD fraco em diferentes tipos (WAGNER e FLEGEL, 1999), determinar os tipos mais frequentes em uma determinada população,

relacionar cada tipo de RhD fraco com sua expressão na membrana eritrocitária, associá-los com os haplótipos Rh presentes e com o índice de aloimunização anti-D. Desta forma, pode-se selecionar protocolos mais seguros para a identificação do fenótipo RhD fraco e, conseqüentemente, adotar melhor conduta transfusional.

Até o presente momento, este trabalho foi o único que estudou a freqüência dos tipos de antígeno RhD fraco na população brasileira. Assim, foi possível determinar os tipos mais freqüentes de nossa população e associá-los com suas reatividades sorológicas. Das 415 amostras caracterizadas como RhD fraco, 312 (75,2%) apresentaram apenas um tipo de RhD fraco enquanto 103 (24,8%) amostras apresentaram dois tipos associados.

Quando comparamos nossos resultados com a literatura em um único trabalho realizado por MULLER et al., 2001 na população européia, verificamos que as associações de diferentes tipos de RhD fraco em uma amostra são muito mais freqüentes em nossa população uma vez que das 434 amostras de DNA de indivíduos europeus com o fenótipo RhD fraco estudadas, apenas dois (0,46%) apresentaram estas associações.

Os tipos de RhD fraco mais freqüentes em nossa população foram respectivamente os tipos 1, 4 e 3. Na população européia, MULLER et al., 2001 demonstraram que os tipos mais freqüentes são os tipos 1, 2 e 3 (Tabela 14). A freqüência (19%) do antígeno RhD fraco tipo 4 em nossa população demonstra o alto grau de miscigenação ocorrido uma vez que este tipo é predominante da população africana. Como pode ser observado na Tabela 14, nenhuma amostra RhD fraco estudada foi caracterizada como tipo 4 na população européia.

Tabela 10: Frequência dos tipos do antígeno RhD fraco em diferentes regiões da Europa e no Brasil

Muller et al, 2001	Tyrol Áustria	Northern Alemanha	Southwestern Alemanha
DF1	43 (33%)	169 (65%)	95 (60%)
DF2	10 (8%)	44 (17%)	43 (27%)
DF3	65 (50%)	45 (17%)	7 (9%)
DF4	0	0	0
Presente trabalho	Sul	Nordeste	Sudeste
DF1	10 (2,4%)	30 (7,2%)	112 (27,0%)
DF2	1(0,2%)	10 (2,4%)	16 (3,8%)
DF3	1(0,2%)	9 (2,1%)	41 (9,8%)
DF4	0	10 (2,4%)	70 (16,8%)
DF5	2 (0,48%)	0	1(0,9%)

A grande importância em se caracterizar molecularmente o antígeno RhD fraco deve-se ao fato de não ser possível distinguir sorologicamente o antígeno RhD fraco de alguns antígenos RhD parciais e não se conseguir determinar o tipo de antígeno RhD fraco presente na amostra. De acordo com a literatura, a maioria dos indivíduos que apresentam o fenótipo RhD fraco não desenvolvem anticorpos anti-D e podem ser transfundidos com sangue RhD-positivo. No entanto, alguns pacientes com RhD fraco tipo 4.2, 7 e 15, podem-se aloimunizar se receberem sangue RhD-positivo.

Considerando que os três tipos do antígeno RhD fraco mais frequentes em nossa população são os tipos 1, 3 e 4 que não têm sido associados ao risco de aloimunização, acreditamos que a transfusão com sangue RhD-positivo em pacientes com o fenótipo RhD fraco ainda pode ser considerada segura. No entanto, não está esclarecido se pacientes que apresentam antígenos RhD fraco com baixa densidade antigênica quando expostos a hemácias RhD normal podem se aloimunizar. Além disto, é importante descartar a presença do antígeno RhD parcial. Assim, a genotipagem para o

antígeno RhD fraco deve ser recomendada a todos os pacientes que necessitem de transfusão sanguínea e apresentem o fenótipo RhD fraco detectado apenas pelo teste da antiglobulina com fraca reatividade. Em nosso trabalho, verificamos que todas as amostras que apresentaram o antígeno RhD parcial foram detectadas apenas pelo teste da AGH com uma reatividade igual ou inferior a 1+.

Diante destes fatos, recomendamos a utilização de métodos de fenotipagem mais eficientes e sensíveis, tais como o teste da antiglobulina humana em combinação com reagentes anti-D mais potentes, com alta afinidade, que detectem antígeno RhD com baixa densidade antigênica tanto em doadores quanto em pacientes. Amostras genotipadas como RhD fraco tipo 2 podem ser utilizadas como controles para avaliar a qualidade de anti-soros anti-D uma vez que os reagentes anti-D de alta afinidade reagem com amostras RhD fraco tipo 2 à temperatura ambiente.

Antígenos RhD parciais que se expressam fracamente são freqüentemente fenotipados como RhD fraco pelo fato de não existir anticorpos monoclonais que diferenciem estas duas variantes. Na rotina, o antígeno RhD parcial somente é investigado em pacientes classificados como RhD-positivo que desenvolveram aloanticorpo anti-D. Mesmo assim, ainda é muito difícil identificar as categorias e tipos do antígeno RhD parcial sorologicamente.

Assim, técnicas moleculares têm sido recomendadas na detecção destes antígenos em pacientes que necessitam de transfusões sangüíneas uma vez que indivíduos que possuem estas variantes apresentam risco de aloimunização se transfundidos com sangue RhD-positivo (CASTILHO, et al., 2001, CASTILHO et al., 2005).

A caracterização dos antígenos RhD parciais que reagem sorologicamente como RhD fraco, tais como DAR (HEMKER et al., 1999), DHMi e categoria DVI (JONES, 1995; ROUILLAC et al., 1995) pode ser de grande auxílio na prevenção da aloimunização anti-D em pacientes politransfundidos e gestantes.

O antígeno RhD parcial DAR é de difícil caracterização sorológica, pois apresenta reatividade fraca com todos os anti-soros anti-D monoclonais disponíveis. Este

antígeno possui 9 epítomos RhD alterados devido a 3 mutações de ponto no gene *RHD*: 602 C>G (exon 4), 667 T>G (exon 5) e 1025 T>C (exon 7) (HEMKER et al, 1999).

O antígeno DHMi ocorre pela presença da mutação de ponto 848 T>C no exon 6. Esta mutação altera 6 epítomos RhD, levando assim, à fraca expressão do antígeno RhD nas hemácias (JONES, 1995).

O antígeno RhD parcial categoria DVI ocorre através de rearranjos gênicos entre os genes *RHD* e *RHCE* que levam a alteração de 6 epítomos RhD, e consequentemente, a uma fraca reatividade com alguns anti-soros anti-D monoclonais (ROUILLAC et al, 1995).

Com o objetivo de verificarmos a ocorrência destes três antígenos RhD parciais nas amostras fenotipadas como RhD fraco estudadas, realizamos testes moleculares específicos para a detecção das mutações que caracterizam estas variantes. Em nosso estudo, 65 (12,9%) das 503 amostras de DNA estudadas apresentaram os antígenos RhD parciais DAR, DHMi e DVI. Em 40 amostras de DNA (61,5%) encontramos o antígeno RhD parcial DAR, em 16 (24,6%) o antígeno RhD parcial DHMi e em nove (13,8%) o antígeno RhD parcial categoria VI.

Até o presente momento, este foi o segundo trabalho a determinar a frequência do antígeno RhD parcial DAR por técnicas moleculares. Ao analisarmos os dados da literatura verificamos que a frequência do antígeno RhD parcial DAR por nós encontrada em doadores RhD fraco (7,9%) foi superior à frequência (4,9%) observada por HEMKER et al., 1999 em africanos provenientes da África do Sul. A frequência do antígeno DAR encontrada em doadores de sangue fenotipados como RhD fraco confirma o grau de descendentes de africanos na população brasileira uma vez que esta variante é predominante de africanos.

Nossos resultados demonstram a importância em se caracterizar esta variante em pacientes descendentes de africanos que necessitem de transfusão de sangue, tais como os pacientes falciformes. Em um estudo por nós realizado previamente em amostras de DNA de pacientes falciformes, foi observada uma frequência (4,6%) deste antígeno RhD parcial com presença de aloanticorpo anti-D em três pacientes dos sete

caracterizados como DAR (CASTILHO et al., 2005). Assim, recomendamos a utilização de técnicas moleculares para a caracterização desta variante em pacientes falciformes fenotipados como RhD fraco, uma vez que não existem anti-soros monoclonais específicos para sua identificação na rotina sorológica.

A frequência do antígeno RhD parcial DHMi (3,2%) por nós encontrada foi superior à encontrada por MULLER et al., (2001) na população européia (0,46%) enquanto a frequência do antígeno DVI (1,8%) foi inferior à encontrada (48,3%) por estes autores. Estas diferenças podem ser mais uma vez explicadas pela diversidade étnica da população brasileira, já que, o antígeno DHMi parece ocorrer com mais frequência em africanos enquanto o antígeno RhD categoria VI é predominante de indivíduos caucasianos.

A frequência dos antígenos RhD parcial DAR, DHMi e DVI encontrada em nossas amostras sugere um risco de aloimunização ao antígeno RhD em pacientes fenotipados como RhD fraco.

Até o presente momento, este foi o único trabalho que encontrou a associação do antígeno RhD parcial e RhD fraco em uma mesma amostra. Das 503 amostras de DNA de doadores fenotipadas como RhD fraco 15 (3%) apresentaram mutações no gene *RHD* responsáveis pelo antígeno RhD fraco e ao mesmo tempo mutações que definem as variantes DAR, RhD categoria VI e DHMi, ou seja, possuíam os antígenos RhD fraco e RhD parcial associados.

Nossos resultados demonstram que é possível encontrar indivíduos que apresentam os antígenos RhD fraco e RhD parcial e que sorologicamente seriam classificados como RhD fraco parcial. Apesar desta associação ser impossível de ser identificada na rotina sorológica, verificamos que todas as amostras que apresentaram os dois antígenos eram reativas apenas pelo teste da AGH com uma reatividade inferior a 1+. Assim, recomendamos a caracterização molecular nas amostras de pacientes e gestantes que apresentarem este tipo de reatividade, pelo fato de que ainda não se conhece o risco de aloimunização em portadores do antígeno RhD fraco com baixa densidade antigênica (WAGNER e FLEGEL, 2004).

2. Associação dos tipos de antígeno RhD fraco com os haplótipos RH

De acordo com WAGNER et al., (1999) os tipos de antígeno RhD fraco podem estar associados a haplótipos RH específicos. Com a finalidade de investigar se existe associação entre os haplótipos RH com os diferentes tipos de antígeno RhD fraco encontrados em nossa população, realizamos a genotipagem RH em 242 amostras de DNA caracterizadas molecularmente como *RHD* fraco.

Quando associamos os tipos de RhD fraco encontrados nestas amostras com os respectivos haplótipos, verificamos que os RhD fraco tipos 1 e 3 estão freqüentemente associados aos haplótipos R_{1r} (CcDee) e R_{0r} (ccDee), o tipo 2 ao haplótipo R_{2r} (ccDEe), o tipo 4 ao haplótipo R_{0r} (ccDee) e o tipo 5 ao haplótipo R_{1r} (CcDee). Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por WAGNER et al., (1999) para os tipos 1, 3, 2 e 4 que foram associados aos haplótipos R_{1r} , R_{2r} e R_{0r} , mas diferem do tipo 5 que foi associado ao haplótipo R_{2r} . Em nosso estudo, verificamos ainda a presença do haplótipo R_{0r} associado ao RhD fraco tipos 1 e 3, o que demonstra a miscigenação que ocorreu em nossa população.

Estes resultados sugerem que existe associação entre os tipos de RhD fraco e os haplótipos RH na população brasileira, mas indicam que os haplótipos RH não podem ser considerados na identificação dos tipos 1, 3 e 4 de RhD fraco devido à presença do haplótipo R_{0r} que caracteriza a miscigenação brasileira.

3. Associação dos tipos de antígeno RhD fraco com o grau de aglutinação

Como mencionados anteriormente não é possível diferenciar os tipos do antígeno RhD fraco por métodos sorológicos e como nem sempre os laboratórios de Imunohematologia podem dispor de recursos moleculares, associamos cada tipo de RhD fraco caracterizado com o grau de aglutinação obtido na fenotipagem. Embora a reação de aglutinação dependa diretamente do reagente anti-D utilizado, acreditamos que estes resultados podem ser de grande auxílio sorológico na identificação do antígeno RhD

fraco e conseqüentemente no direcionamento da melhor conduta transfusional para pacientes RhD fraco.

Todos os tipos do antígeno RhD fraco encontrados em nosso estudo foram associados ao grau de aglutinação obtido à temperatura ambiente (TA), à 37°C e pelo teste da antiglobulina humana (AGH).

Nossos resultados demonstraram que os tipos de RhD fraco 1, 2, 3 e 4 que foram detectados à TA, à 37°C e apresentaram grau de aglutinação superior a 1+ na AGH podem ser considerados como RhD positivo, pois não foram associados ao antígeno RhD parcial. Assim, pacientes que apresentam o fenótipo RhD fraco com esta reatividade podem ser transfundidos com sangue RhD positivo. Apesar deste trabalho ter sido o único que relacionou os tipos de RhD fraco com o grau de aglutinação, a literatura revela que ainda não foi demonstrada aloimunização anti-D em pacientes portadores dos antígenos RhD fraco tipos 1, 2, 3 e 4 (WAGNER et al., 2000).

Os antígenos RhD fraco que apresentaram grau de aglutinação inferior a 1+ pelo teste da AGH estavam na sua maioria, associados ao antígeno RhD parcial. Assim, nossa recomendação é que pacientes que apresentam o fenótipo RhD fraco com esta característica devem ser considerados RhD-negativos. Por outro lado, doadores fenotipados como RhD fraco, independentemente do grau de aglutinação, devem sempre ser considerados RhD-positivos pois já foi demonstrado previamente que mesmo com baixa densidade antigênica o antígeno RhD fraco pode ser imunogênico (FLEGEL e WAGNER, 2000; MOTA et al., 2005).

4. Expressão antigênica dos antígenos RhD fraco determinada por citometria de fluxo

A expressão do antígeno RhD nas amostras contendo os tipos de RhD fracos mais freqüentes foi determinada por citometria de fluxo e comparada com amostras controles RhD-positivos e RhD-negativos.

Nossos resultados sugerem que os cinco tipos de antígenos RhD fraco estudados apresentam um número de sítios antigênicos bem inferior aos antígenos RhD

normais e que os tipos 5 e 2 podem não ser detectados por técnicas sorológicas dependendo do anticorpo utilizado. A variação de expressão entre os diferentes tipos de antígeno RhD fraco e os resultados por nós obtidos estão de acordo com os descritos na literatura demonstrando que o tipo 5 apresenta menor expressão antigênica, seguido pelos tipos 2, 1, 3 e 4 (WAGNER et al., 2000).

Pudemos constatar ainda que há pouca variação de expressão antigênica entre as amostras que apresentam o mesmo tipo de antígeno RhD fraco independentemente do haplótipo RH presente. Este resultado confirma dados da literatura que mostram que cada tipo de antígeno RhD fraco apresenta uma densidade antigênica padrão com pouca variação e que apenas a presença do efeito C trans (antígeno RhC em posição trans a RhD) pode diminuir consideravelmente a densidade antigênica em amostras com o mesmo tipo de antígeno RhD fraco (WAGNER et al., 2000; MULLER et al., 2001; ANSART-PIRENNE et al., 2004; MOTA et al., 2005).

5. Grau de aglutinação e expressão antigênica nas associações RhD fraco e RhD parcial

A presença simultânea dos antígenos RhD fraco e RhD parcial nos estimulou a realizar um estudo mais detalhado desta associação, pois como já mencionamos anteriormente esta ocorrência é um fato inédito.

Avaliamos as 15 amostras que apresentaram os antígenos RhD fraco e RhD parcial associados quanto ao grau de aglutinação e expressão antigênica. Os testes de hemaglutinação realizados nestas amostras demonstraram fraca ($< 1+$) intensidade de aglutinação detectada apenas pelo teste da AGH. Por outro lado, os resultados obtidos na citometria de fluxo demonstraram claramente a presença de duas populações de hemácias e, assim, foi possível diferenciar os antígenos RhD fraco e RhD parcial. Estas amostras apresentaram ainda uma fraca expressão antigênica ($IFM=5.16 \pm 2.25$), o que explica a sua difícil identificação sorológica.

Estes resultados demonstram mais uma vez que as amostras fenotipadas como RhD fraco e que apresentam fraca reatividade apenas pelo teste da AGH devem ser consideradas RhD-negativo em pacientes que necessitam de transfusões sanguíneas.

C. RESULTADOS DA GENOTIPAGEM *RhD*, *RhD* FRACO E *RhD* PARCIAL EM PACIENTES

Foram avaliadas molecularmente quatro amostras de DNA de pacientes fenotipados como *RhD* fraco que apresentavam anti-D. Nosso estudo demonstrou que a aloimunização anti-D nestes pacientes estava relacionada à presença de um antígeno *RhD* parcial e não a um antígeno *RhD* fraco como diagnosticado sorologicamente. Os antígenos *RhD* parciais envolvidos foram classificados como *RhD* parcial DAR, DHMi e DVI.

Considerando que sorologicamente não é possível identificar antígenos *RhD* parciais pelos anti-soros anti-D utilizados na rotina transfusional, e que só existem anticorpos monoclonais para identificar as variantes *RhD* parciais DVI e DHMi, recomendamos a utilização de protocolos moleculares para a identificação dos antígenos *RhD* parciais em todos os pacientes classificados como *RhD* fraco que necessitem de transfusão.

Como mencionado anteriormente, indivíduos com os fenótipos DAR, DHMi e DVI podem desenvolver anticorpo anti-D quando expostos ao antígeno *RhD* completo. De fato, todos estes pacientes estudados receberam sangue com o fenótipo *RhD*-positivo, desenvolvendo, assim, aloanticorpo anti-D. Estes resultados demonstram que não existe um limite bem definido entre os antígenos *RhD* fraco e *RhD* parcial que perdem epítomos específicos e podem estar associados à aloimunização anti-D.

D. RECOMENDAÇÕES NA PRÁTICA TRANSFUSIONAL

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, a importância da determinação do antígeno *RhD* na medicina transfusional e com base em critérios deduzidos cientificamente, sugerimos as seguintes recomendações para a fenotipagem *RhD* fraco em pacientes e doadores de sangue brasileiros:

- utilização de anti-soros monoclonais anti-D IgG em conjunto com o teste da AGH na fenotipagem *RhD* fraco de todos os doadores de sangue.

- utilização de anti-soros monoclonais anti-D IgM de alta afinidade na fenotipagem RhD de pacientes.
- todos os doadores de sangue classificados como RhD fraco devem ser considerados RhD-positivo.
- pacientes fenotipados como RhD fraco podem ser considerados RhD-positivo quando suas hemácias apresentarem reações de aglutinação com intensidade maior que 1+ na AGH com anti-soros monoclonais anti-D IgG ou reações positivas à TA ou 37°C com anti-soros monoclonais anti-D IgM
- as genotipagens *RHD* fraco e *RHD* parcial devem ser utilizadas na classificação dos tipos de antígenos RhD fraco e RhD parcial presentes e na identificação de controles.
- as genotipagens *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial devem ser realizadas em toda situação de dúvida, ou seja, quando os resultados sorológicos não forem claros ou quando o paciente for politransfundido.
- pacientes RhD parcial devem ser transfundidos com sangue RhD-negativo independente do tipo ou categoria do antígeno RhD parcial presente.

Acreditamos que estas recomendações baseadas em nossos resultados possam contribuir na conduta transfusional de pacientes fenotipados como RhD fraco e na seleção adequada do reagente anti-D utilizado na rotina de fenotipagem do antígeno RhD.

CONCLUSÃO

Considerando os objetivos do presente trabalho, as condições em que foi realizada a caracterização molecular do antígeno RhD (RhD fraco e RhD parcial) em amostras de DNA de doadores de sangue brasileiros fenotipados como RhD fraco, podemos concluir que:

1. Os protocolos utilizados para a identificação molecular do antígeno RhD fraco que incluíram *primers* desenhados de acordo com as seqüências genômicas de indivíduos caucasianos, podem ser empregados para a determinação das variantes RhD fraco em populações com antecedentes étnicos diversos, como é o caso população brasileira.
2. Os antígenos RhD fraco mais freqüentes na população brasileira foram os tipos 1, 3 e 4.
3. Nosso estudo demonstrou que associações entre diferentes tipos de antígenos RhD fraco são freqüentes em nossa população.
4. Sessenta e cinco (12,9%) das amostras fenotipadas como RhD fraco foram caracterizadas como RhD parcial.
5. O antígeno RhD parcial DAR apresentou freqüência (7.9%) na população estudada.
6. Não é possível diferenciar o antígeno RhD fraco de um antígeno RhD parcial por técnicas sorológicas.
7. Este estudo identificou pela primeira vez a ocorrência simultânea dos antígenos RhD fraco e RhD parcial em uma mesma amostra.
8. A caracterização molecular dos antígenos RhD parcial DAR, DHMi e DVI em pacientes RhD fraco poderá contribuir significativamente na prevenção da aloimunização anti-D em pacientes politransfundidos.
9. Doadores de sangue classificados como RhD fraco devem ser considerados RhD-positivos.

10. Pacientes fenotipados como RhD fraco podem ser considerados RhD-positivo quando suas hemácias apresentarem reações de aglutinação com intensidade maior que 1+ na AGH ou reações positivas à TA ou 37°C.
11. A utilização de métodos de fenotipagem mais sensíveis em combinação com reagentes anti-D de alta afinidade, é recomendada na detecção de antígenos RhD fraco com baixa densidade antigênica em doadores de sangue.
12. A análise da citometria de fluxo permitiu demonstrar que o antígeno RhD fraco tipo 5 apresenta menor expressão antigênica, seguido pelos tipos 2, 1, 3 e 4.
13. Há pouca variação de expressão antigênica entre as amostras que apresentam o mesmo tipo de antígeno RhD fraco independentemente do haplótipo RH presente.
14. Nossos resultados demonstram claramente a necessidade da utilização de dois anti-soros monoclonais (IgM e IgG) na determinação do antígeno RhD.
15. As genotipagens *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial devem ser realizadas quando os resultados sorológicos não forem claros ou quando o paciente for politransfundido.
16. Nossos resultados demonstram que a biologia molecular associada a hemaglutinação pode aumentar consideravelmente a segurança transfusional pela melhor caracterização dos antígenos RhD em nossa população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRE,P.; CARTRON, J.P. Molecular Biology of the Rh antigen. **Blood**, 78: 551-563, 1991.
- ARCE, M A.; THOMPSON, E.S.; WAGNER, F.F.; COYNER; FERDMAN, K.E.; LUBLIN, D.M. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individual. **Blood**, 82:651-655, 1993.
- AVENT, N.D.; BUTCHER, S.K.; LUI,W. Localization of the C termini of the Rh (Rhesus) polypeptides to the cytoplasmatic face of the human erythrocyte membrane. **Journal Biological Chemical**, 267:15-134,1992.
- AVENT, N. D.; REID,M. E. The Rh Blood group system: a review. **Blood**, 95:375-387, 2000.
- AVENT, N. D. Molecular biology of the Rh blood group system. **J. P. Hematology/Oncology**, 23: 394-402,2001.
- AVENT, N. D. A new chapter in Rh research: Rh protein are ammonium transporters. **Molecular Medicine**,7, 2001.
- ANSART-PIRENNE, H.; ASSO-BONNET, M.; LE PENNEC, P.Y.; ROUSSEL, M.; PATEREAU, C.; NOIZAT-PIRENNE, F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. **Transfusion**, 44: 1282-1286,2004.
- BECKER, E .A. M.; FAAS, B.H.W.; SIMSER, S.; OVERBEEKER, M.A.M.; VAN RHERNEN,D. J. The genetic basic of a new partial D antigen : D^{DBT}. **British Journal of Haematology**, 93: 720-727,1996.
- BECKER, E.A. M.; FAAS, B.H.W.; SIMSER, S.; OVERBEEKER, M.A.M.; VAN RHERNEN, D. J. Low antigen site density and weak D immunogenicity cannot be explained by structural genomic abnormalities or regulatory defects of the Red gene. **Transfusion**, 37: 616-623,1997.
- BLUNT,T.; DANIELS, G.; CARRIT, B. Serotype switching in a partially detected *RHD* gene. **Vox Sanguinis**, 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**, 6:843-850,1997.
- CARTRON, J.P. Defining the blood group antigen: biochemistry and molecular genetics. **Blood Reviews**, 8: 199-211,1994.
- CASTILHO, L.; RIOS, M.; BIANCO, C.; PELLEGRINO, Jr.J.; ALBERTO, F.L.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. DNA-based typing of blood groups for the management of polytransfused sickle cell disease patients. **Transfusion**, 42: 232-238,2001.

CASTILHO, L.; RIOS, M.; RODRIGUES, A.; PELLEGRINO, Jr.J.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. High frequency of partial DIIIa and DAR alleles found in Sickle cell disease patients suggest increased risk of alloimmunization to RhD. **Transfusion Medicine**, 15: 49-55,2005.

CHERIF-ZAHAR, B.; BLOY, C.; LE VAN KIM, C.; BLANCHARD, D.; BAILLY, P.; HERMAND, P.; CARTRON, J.P.; COLIN, Y. Molecular cloning and proteins struture of a human blood group Rh polypeptide. **Proc. Natl. Acad. Science USA**, 87: 6243-6247, 1990.

CHERIF-ZAHAR, B.; MATTEI, 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.

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.

DANIELS, G.; GREEN, C.; SMART, E. Differences between RhD-negative Africans and RhD-negative Europeans. **Lancet**, 380:862-863,1997.

DANIELS, G.; FAAS, B.H.W.; GREEN, C.A.; SMART, E.; MAASKANT-VAN WIJK, P.A.; AVENT, N.D.; ZONDERVAN, H.A.; VON DEM BORNE, A.E.G.K.R.; VAN DER SCHOOT, C.E. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. **Transfusion**, 38: 951-958,1998.

DANIELS, G.L.; ANSTEE, D.J.; CARTRON, J.P.; DAHR, W.; FLETCHER, A.; GARRATTY, G.; HENRY, S.; JORGENSEN, J.; JUDD, W.J.; KORNSTAD, L.; LEVENE, C.; LIN, M.; LOMAS-FRANCIS, C.; LUBENKO, A.; MOULDS, J.J.; MOULDS, J.M.; OVERBEEKE, M.; REID, M.E.; ROUGER, P.; SCOTT, M.; SISTONEN, P.; SMART, E.; TANI, Y.; WENDEL, S.; ZELINSKI, T. International Society of Blood Transfusion working party on terminology for red cell surface antigens. **Vox Sanguinis**, 80:193-196,2001.

DE VETTEN, M.P.; AGRE, P.The Rh polypeptide is a major fatter acid acylater erythrocytes membrane proteic. **Journal Biological Chemical**, 263: 18193-18196,1998.

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

FISHER, R.A.;citer in RACE, R.R. An incomplete antibody in human serum. **Nature**, 153: 771-772,1944.

FLEGEL, W.A.; KHULL, S. R.; WAGNER, F.F. Primary anti-D immunization by weak D types 2 RBCs. **Transfusion**. 40: 428-434,2000.

- FLEGEL, W.A.; WAGNER, F.F. Molecular biology of partial D and weak D: Implications for blood bank practice. **Clin. Lab.**; 48: 53-59,2002.
- GAHMBERG, C. G. Molecular identification of the human Rh₀(D) antigen. **FEBS Lett**, 140: 93-97, 1982.
- FLEGEL, W.A.; WAGNER, F.F. Molecular genetics of RH. **Vox sanguinis**, 78: 109-115,2000.
- GIBLETT, E.R. Blood group alloantibodies: an assessment of some laboratory practices. **Transfusion**, 4: 299-308,1977.
- 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: 4337-4342, 1999.
- HUANG,C. H. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigen. **Current Opinion in Hematology**,4: 94-103, 1997.
- HUANG, C.H.; CHENG, Y.; REID, M.E. Human D^{IIIa} erythrocytes : RhD protein is associated with multiple dispersed amino acids variations. **American Journal of Hematology**, 55: 139-145,1997.
- HUANG, C. H.; PHILLIP,Z.; CHENG,Y. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. **Seminars in Hematology**, 37: 150-165,2000.
- HYLAND, C.A.; WOLTER, L.C. Identification and analysis of RH genes: application of PCR and RFLP typing. **Transfusion Medicine Reviews**, 9: 289-301, 1995.
- ISSIT, P.D. The Rh blood group system: additional complexities (editorial). **Immunohematology**, 10:109-16,1994.
- ISSIT, P.D. Recent advances in the Rh blood group system. **Vox Sanguinis**, 70: 26-30,1996.
- JONES, J. Identification of two new D variants, DHMi and DHMii using monoclonal anti-D. **Vox Sanguinis**,69: 236-241,1995.
- KAJII, E.; UMENISHI, F.; IWAMOTO, S.; IKEMOTO, S. Isolation of a new cDNA clone encoding an Rh polypeptide associated with the the Rh blood groups system. **Human Genetic**, 91:157-162,1993.
- LEGLER, 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: 852-855,1999.

- LEGLER, T.J.; MAAS, J.H.; KOHLER, M.; WAGNER, T.; DANIELS, G.L.; PERCO, P.; PANZERS, S. RHD sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. **Blackwell Science**. 11: 383-388,2001.
- LE VAN KIM,C.; MOURO, I.; CHERIF-ZAHAR, B. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. **Proc. Natl. Acad.Sci_USA**, 89: 925-929, 1992.
- LOMAS, C.; TIPPETT, P.; THOMPSON, K.M. Demonstration of seven epitopes on the D antigen using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. **Vox Sang**, 57: 261-164, 1984.
- LIN, I.L.; SHIH, M.C.; HSIEH, M.H.; LIU, T.C.; CHANG, S.E.; LIN, C.L.; CHANG, J.G. Molecular basis of weak D in Taiwanese. **Ann. Hematol.**, 82: 617-620,2003.
- MAASKANT-VAN WIJK, P.A.; FAAS, B.H.; DE RUIJTER, J.A.; OVERBEEKE, M.A.; VON DEM BORNE, A.E.; VAN RHENEN, D.J.; VAN DER SCHOOT, C.E. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. **Transfusion**, 38:1015-1021,1998.
- MOORE, S.; WOODROW, C.E.; McCLELLAND, D.B.L. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D), (c), (E) and Fy^a. **Nature**, 295: 529-531,1982.
- MOURO, I.; COLIN, Y.; CHERIF-ZAHAR,B. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. **Nature Genetic**, 5: 62-65,1992.
- MOURO, I.; LE VAN KIM, C.; ROUILLAC, C. Rearrangements of the blood group RhD gene associated with the D^{VI} category phenotype. **Blood**, 83: 1129-1135, 1994.
- MOTA, M.; FONSECA, N.L.; RODRIGUES, A.; KUTNER, J.M.; CASTILHO, L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. **Vox Sanguinis**, 88: 130-135,2005.
- MÜLLER, T.H.; WAGNER, F.F.; TROCKENBACHER, A.; EICHER, N.I.; FLEGEL, W.; SCHÖNITZER, D.; SCHUNTER, F.; GASSNER, C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central Europeans populations.**Transfusion**, 41:45-52, 2001.
- OKUDA, H.; KAWANO, M.; IWAMOTO, S.; TANAKA, M.; SENO, T.; OKUBO, Y.; KAJII, E. The RHD gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. **Journal Clinical Investigation**, 100:373,1997.
- PETZ, L.D.; SWISHER, S.N.; KLEINMAN, S. Blood groups.Clinical Practice in Transfusion Medicine, 3 ed, New York, 96-116, 1996.

PETZ, L. D.; GARRATTY, G. Acquired immune haemolytic anemias. New York: **Churchill Livingstone**, 1980.

PELLEGRINO, Jr.; J.; CASTILHO, L.; RIOS, M.; SOUSA, C.; A. Blood group genotyping in a population of highly diverse ancestry. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 15: 8-13, 2000.

POULTER, M.; KEMP, T.; CARRITT, B. DNA-based Rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHD status using the polymerase chain reaction. **Vox Sanguinis**, 70: 164-168, 1996.

RACE, R.R. Modern concepts of the blood group system. **127 Ann NY Acad. Scienc**: 884-891, 1965.

RACE, R. R.; SANGER, R. Blood groups in man. 6^{ed} **Oxford Scientific Publishers**: 220-227, 1975.

REID, M. E.; RIOS, M.; YAZDANBAKHS, K. Application of molecular biology techniques to transfusion medicine. **Seminars Hematology**, 37: 166-176, 2000.

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

RIDGWELL, K.; SPURR, N.K.; LAGUDA, B.; MACGOCH, C.; AVENT, N.D.; TANNER, M.J.A. Isolation of cDNA clone for a 50kd glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (Rhesus) blood group antigen expression. **Biochemical Journal**, 287: 223-226, 1992.

RIDGWELL, K.; EYERS, S.A.; MAWBY, W.J.; ANSTEE, D.J.; TANNER, M.J. Studies on the glycoprotein associated with Rh (Rhesus) blood group antigen expression in the human red blood cell membrane. **Journal Biological Chemical**, 269: 6410-6416, 1994.

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

ROUILLAC, C.; COLIN, Y.; HUGHES-JONES, N.C.; BOELET, M.D.; AMBROSIO, A.M.; CARTRON, J.P.; LE VAN KIM, C. Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid RhD-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. **Blood**, 85: 2937-2944, 1995.

ROUILLAC, C.; GANE, P.; CARTRON, 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: 4853-4861, 1996.

- RUPREHT, R. R.; HARTMAN, K.P.; GALVANI, V.; ROZMAN, P.; SERBEC, V.C. Weak D and partial D in Slovenian population through serology and genotyping. **Eur. J. Physiol**, 440: 195-195, 2000.
- 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 RhD-negative blood group phenotype. **Blood**, 95:12-18, 2000.
- SHAO, C.P.; MAAS, J.H.; KOHLER, M.; LEGLER, T.J. Molecular background of RhD-positive, D-negative, Del and weak D phenotypes in Chinese. **Vox sanguinis**, 83: 156-161, 2002.
- TIPPETT, P.; LOMAS-FRANCIS, C.; WALLACE, M. The Rh antigen D: partial D antigen and associated low incidence antigen. **Vox Sanguinis**, 70: 123-131, 1996.
- WAGNER, F.F.; GASSNER, C.; SMULLER, T.H.; SCHONITZER, D.; SCHUNTER, F.; FLEGEL, W.A. Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct Immunohematological feature. **Blood**, 91: 2157-2168, 1998.
- WAGNER, F.F.; GASSNER, C.; SMULLER, T.H.; SCHONITZER, D.; SCHUNTER, F.; FLEGEL, W.A. Molecular of weak D phenotypes. **Blood**, 93: 385-393, 1999.
- WAGNER, F.F.; FLEGEL, W.A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. **Blood**, 95, 12: 3662-3668, 2000.
- WAGNER, F.F.; FROHMAJER, A.; LADEWIG, B.; EICHER, N.I.; LONICER, C.B.; MULLER, T.H.; SIEGEL, M.H.; FLEGEL, W.A. Weak D alleles express distinct phenotypes. **Blood**, 95, 8: 2699-2708, 2000.
- WAGNER, F.F.; FROHMAJER, A.; FLEGEL, W. A. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. **BMC genetics**. 21: 10, 2001.
- WAGNER, F.F.; LADEWIG, B.; ANGERT, K.S.; HEYMANN, G.A.; EICHER, N.I.; FLEGEL, W.A. The DAU allele cluster of the RHD gene. **Blood**, 100, 1: 306-311, 2002.
- WAGNER, F.F.; MOULDS, J.M.; TOUNKARA, A.; KOURIBA, B.; FLEGEL, W.A. RHD allele distribution in Africans of Mali. **BMC genetics**, 4: 14, 2003.
- WAGNER, F.F.; FLEGEL, W. A. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. **Immunohematology**, 20: 23-36, 2004.
- WESTHOFF, C.M. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. **Transfusion**, 44: 1663-1673, 2004.

APÊNDICE

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcial	Conclusão	Haplótipo RH
B. M. G.L. de A. M	Brasil	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0800002250-8 Maria Teixeira	Florianópolis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100122796-4	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100123458-8	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100123470-7	Fortaleza	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0100123508-8	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100123584-3	Fortaleza	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0100123846-0	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0100123879-6	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100158975-0	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100159945-4	Fortaleza	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMI	DHMI	
0100161597-2	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0100163540-0	Fortaleza	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0100170489-4	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100171001-0	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100171141-9	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100172014-8	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100172387-2	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100173320-7	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100173971-0	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100174048-3	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100175460-3	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100175880-3	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100176363-7	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100177960-6	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0100178600-9	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	
0100178948-2	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0100179126-6	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcial	Conclusão	Haplotipo RH
0100180521-6	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0100183062-8	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0200087746-0	Fortaleza	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCcee
0500031153-1	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0500032429-3	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0500034695-5	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0500034882-6	Fortaleza	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0500035083-9	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0500036001-0	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0500039745-2	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0500039771-1	Fortaleza	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCcee
0500040186-7	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCcee
A. P. de S	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
F. R. M	Fortaleza	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCcEe
J. A. M	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
J.	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
J. J. da S	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
L. M. R	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
M.	Fortaleza	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
N. T. M.	Fortaleza	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0500018196-4	Marília	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0500018209-0	Marília	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
Dfraco A	Marília	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
4843	Recife	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
0100417101-3	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	
0100417366-0	Recife	Positivo	Negativo	Negativo		Negativo		DF1	RHCcee
0100418432-8	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	

Nome / Número	Origem das Amostras	RBDN	RHDQ	RHDQ	RHDQ	RHD4	RHDS	D Parcela	Conclusão	Haplotipo RH
010418716-6	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	HMI	DF1/DHMI	
0100420689-5	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	
0100421151-1	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0100421319-0	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100421518-5	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
0200057787-3	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0300052301-6	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0300052371-7	Recife	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,4	
0300052374-1	Recife	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF2	RHcccEe
0300052489-6	Recife	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0300052582-5	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMI	DHMI	
0900068409-9	Recife	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0900068556-7	Recife	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
1100004098-4	Recife	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMI	DF4	RHCccc
J.	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DHMI	
148	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1	RHccc
630	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
858	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
1773	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
2397	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
5152	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
5493	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF4	RHccc
7375	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
7658	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
8330	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
9202	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
9251	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF2	RHcccEe
9390	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
									DF1	RHccc
									DF4	RHccc
									DF1	RHccc
									DF2	RHcccEe

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcial	Conclusão	Haplótipo RH
988	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
010003057-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100108760-7	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0100108761-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100109312-7	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0100110912-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
0100112069-8	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DF1,DAR	
0100112254-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
0100113572-7	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0100114024-9	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DF1,DAR	
0100114384-4	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	RHccc
0100114641-7	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	RHCccc
0100114904-1	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHcccEe
0100115174-7	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100115473-8	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
0100115476-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0100118072-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCccc
0100119254-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0100119371-7	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DF1,DAR	
0100120147-7	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DVI	DVI	
0100120319-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		D POS	
0100120319-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCccc
0100120596-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DVI	DVI	
0100120724-6	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0100120949-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHccc
0100120964-8	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMi	DHMi	
0100121188-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100121434-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc

Nome / Número	Origem das Amostras	RHDI	RHDZ	RHDG	RHD4	RHDE	D Parcial	Conclusão	Haplótipo RH
0100121480-3	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo			DF1, 3	
0100121504-4	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHccEe
0100121503-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccEe
0100121536-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		D POS	
0100121543-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100121727-6	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100121762-4	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0100121920-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0100122409-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccEe
0100122568-6	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccEe
0100122601-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMI	DHMI	
0100122681-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccEe
0100123189-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		D POS	
0100123710-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccEe
0100124102-9	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1, 4	
0100124208-4	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0100124274-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccEe
0100124293-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccEe
0100124293-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccEe
0100124301-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccEe
0100124420-6	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DVI	DVI	
0100124517-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF4	RHccEe
0100124629-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccEe
0100124752-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
0100124938-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccEe
0100124986-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHccEe
0100125076-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2, DAR	
0100125113-0	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo		DF2	RHccEe

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcial	Conclusão	Haplótipo RH
0100128386-4	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DF1, DAR	
0100129341-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0100129450-5	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0100129471-8	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
0100129572-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0100129619-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMI	DHMI	
0100129657-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0100129683-4	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0100129756-3	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0100129771-7	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0100129809-8	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1	RHCee
0100129876-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DF1,4	
0100129886-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DAR	
0100129997-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DF1	RHCee
0100130060-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	
0100130157-9	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DHMI	DHMI	
0100130179-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCee
0100130184-6	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100130243-5	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0100130289-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0100130289-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0100130408-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DVI	DVI	
0100130453-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100130471-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
0100130574-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
0100130580-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
0100130673-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100130706-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMI	DHMI	

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcel	Conclusão	Hapetipo RH
0100130847-6	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100130888-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DVI	DVI	
0100131008-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
0100131067-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DF1/DAR	
0100131104-3	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100131230-9	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0100131300-3	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCeEa
0100131358-5	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		D POS	
0100131389-5	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DVI	DVI	
0100131482-4	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCeEe
0100131500-6	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCeEe
0100131823-4	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0200074429-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DF1,DAR	
0200075962-9	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0200077629-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DVI	DVI	
0200078382-1	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0200078611-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1	RHCee
0200078938-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DF1,DAR	
0200079032-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0200079041-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0200079317-7	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0200079336-3	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0200079442-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0200082327-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0200082426-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0200083039-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0200083039-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	DHMI	DF3,DHMI	
0200083124-9	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,3	
								DF1	RHCee

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcial	Conclusão	Haplótipo RH
0200083330-6	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200083336-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCccc
0200083419-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DHMI	DHMI	
0200084005-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		D POS	
0200084023-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0200084340-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0200084624-6	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
0200085485-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0200085713-2	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0200085713-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0200085748-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0200085797-3	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0200085797-3	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0200085857-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCccc
0200086079-6	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0200086152-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCccc
0200086253-5	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0200086260-8	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0200086420-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1	RHCccc
0200086660-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHccc
0200087690-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200087691-9	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
0200087760-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0200087992-6	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0200087992-9	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DF2, DAR	
0200088132-7	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0200088190-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHccc
0200088235-8	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D. Parental	Conclusão	Histórico RH
0200088255-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0200088502-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200088585-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
0200088694-9	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0200088746-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200088865-8	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
0200088903-4	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200093007-7	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHccc
0200093007-7	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200093139-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHccc
0200093199-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200093274-6	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200093334-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccc
0200093580-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200093911-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DVI	DVI	
0200093920-1	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHcccEe
0200093969-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
0200093972-4	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHcccEe
0200094033-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHccc
0200094096-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMI	DHMI	
0200094097-8	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DVI	DVI	
0200094098-6	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DVI	DF1/DVI	
0200094162-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200094169-9	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHcccEe
0200094178-8	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DF1/DAR	
0200094351-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
0200094451-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHccc
0200094455-8	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMI	DHMI	

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcial	Conclusão	Haplotipo RH
0200094495-7	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0200094533-3	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0200094633-0	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHccEe
0200094663-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0200094684-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccee
0200094754-9	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,2	
0200094935-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0200094940-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0300016853-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo		DF3,4	
0300017004-9	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0300017617-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccee
0300017747-7	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0300019591-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCcee
0300019704-4	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHccEe
0400002488-5	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHccee
04000025675-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccEe
04000025725-0	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
04000025763-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCcee
04000025813-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccee
04000025835-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccee
04000025882-6	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccee
04000027439-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
04000027442-2	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHccEe
04000027574-7	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCcee
04000027654-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHccee
04000027657-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMi	DHMi	
04000027731-6	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
04000027759-6	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	

Nome / Número	Orgão das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcial	Conclusão	Haplótipo RH
0400027800-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
0500031170-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
0500031668-1	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DF1,DAR	
0500032529-0	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0500033066-8	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0500033776-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DF1,DAR	
0500034198-8	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
0500034227-5	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
0500034445-6	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCccc
0500034474-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
0500035971-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
0500036172-5	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
0500036488-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMI	DHMI	
0500037707-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCccc
0500038313-3	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCccc
0500038391-5	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
0500038428-8	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
0500038546-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
0500038801-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
0500039038-5	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
0500039631-6	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
0500040115-8	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMI	DHMI	
0500040405-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
0500040838-1	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		DF2	RHCccc
0500041015-7	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0500042776-9	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
0500042858-7	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF2	RHCccc
0500042919-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,4	
								DF1,3	

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcial	Conclusão	Haplótipo RH
0500042927-3	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0500043592-3	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
0500043776-4	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0500044112-5	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
0500044253-9	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCcEe
0500044309-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCcee
0500044415-9	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCcEe
0500044489-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCcee
0500044617-8	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0500044619-4	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
0500044627-5	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0500044751-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMi	DHMi	
0500044875-8	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0500045078-7	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCcEe
0500045080-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DVI	DVI	
0500045144-9	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
1100004414-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCcee
1100004627-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCcee
1100005761-5	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
1100006144-2	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DHMi	DHMi	
1100006160-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
1100006364-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCcee
1100008982-0	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		D POS	
2100034599-8	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
4100036621-9	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		D POS	
4500012095-7	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCcEe
6100002433-4	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCcee
6100002456-3	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCcee

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcial	Conclusão	Hepatotipo RH
6100003027-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DF1,DAR	
6100003057-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
6100003108-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
6100003254-0	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
6100004600-1	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
6100004832-2	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
9200000398-2	Ribeirão Preto	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
944-7	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
G. L.	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
M.	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
R. A. T. de S.	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	DAR	DAR	
V. L.	Ribeirão Preto	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DF1,DAR	
4425	São Paulo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
19840	São Paulo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
22383	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
26337	São Paulo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCccc
30446	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
37636	São Paulo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
537867	São Paulo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	
2023269	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
2023534	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCccc
0100123074-4	São Paulo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCccc
0102314-059	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHDCccc
0200086246-2	São Paulo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
A.	São Paulo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1,3	
A. F.	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1,4	
A. R.	São Paulo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCccc
C.F. P. C.	São Paulo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1,2	

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcial	Conclusão	Haplotipo RH
E. S.	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1, 4	
G. J. R.	São Paulo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1, 2	
M. A.	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
M. do C.	São Paulo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCcee
NH	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1, 4	
S. T.	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1, 4	
S. M. de M. P.	São Paulo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1, 2	
VMS	São Paulo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1, 2	
W. R. da S	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
Y. G. B	São Paulo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1, 2	
337238	Unicamp	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1, 2	
0202281-023	Unicamp	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
0302304-021	Unicamp	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0403039-56	Unicamp	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
F. A. R	Unicamp	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	DAR	DAR	
M. A	Unicamp	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1, 3	
S. R. S	Unicamp	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCcee
6212	Vera Cruz	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0202283-001	Vera Cruz	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0202287-014	Vera Cruz	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
0203163-004	Vera Cruz	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
A. M. M. de Q	Vera Cruz	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCcee
M. da S	Vera Cruz	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCcee
R. F. S	Vera Cruz	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCcee
0203063-014	Vera Cruz	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
L. A. da S	Florianópolis	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		D POS	
M. A. A	Florianópolis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1, 2	
J. C. S	Florianópolis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCcee
								DF1	RHCcee

Nome / Número	Origem das Amostras	RHD1	RHD2	RHD3	RHD4	RHD5	D Parcel	Conclusão	Haplotipo RH
G. A. da S	Florianópolis	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1, 3	
P. L. S	Florianópolis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
T. R	Florianópolis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
E.	Florianópolis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
T. R	Florianópolis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
R. R	Florianópolis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
R. de O	Florianópolis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
T.	São Paulo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
043978	São Paulo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
0104080-51	Unicamp	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		DF5	RHCee
0404105-036	Unicamp	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCee
GHP	Unicamp	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF3	RHCee
RRS	Unicamp	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		DF1, 3	
VMS	Unicamp	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1	RHCee
W.	Unicamp	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo		DF1, 4	
233276	Unicamp	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF1, 3	
60798	Unicamp	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCee
333451	Unicamp	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
330067	Unicamp	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCee
J. R. de A	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCee
0200099484-9	Ribeirão Preto	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0104130-018	Unicamp	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		DF2	RHCee
C. de O	Florianópolis	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		DF1	RHCee
M. F	Florianópolis	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		DF3	RHCee
0100179990-9	Fortaleza	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		DF3	RHCee
0100418839-0	Recife	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
0100003057-1	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		DF1, 4	
0100121536-6	Ribeirão Preto	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo		DF4	RHCee
								DF3	RHCee