



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**ESTUDO DAS VARIANTES *RHD* EM PACIENTES  
PORTADORES DA DOENÇA FALCIFORME DO ESTADO DO  
AMAZONAS, BRASIL**

**LUCIANNA CORRÊA TEZZA**

Manaus

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**LUCIANNA CORRÊA TEZZA**

**ESTUDO DAS VARIANTES *RHD* EM PACIENTES  
PORTADORES DA DOENÇA FALCIFORME DO ESTADO DO  
AMAZONAS, BRASIL**

Plano de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque

Manaus

2014

**LUCIANNA CORRÊA TEZZA**

**ESTUDO DAS VARIANTES *RHD* EM PACIENTES  
PORTADORES DA DOENÇA FALCIFORME DO ESTADO DO  
AMAZONAS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

**APROVADA EM:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Leny do Nascimento da Mota Passos - HEMOAM**

---

**Dra. Mariza Aparecida Mota – Hospital Israelita Albert Einstein**

---

**Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque - Orientador**

## DEDICATÓRIA

*A Deus, meus pais Maraluce e Percival, aos  
meus filhos Nicole Lorraine e Valdomiro Filho,  
pelo amor e compreensão na minha ausência.*

*Aos meus mestres, exemplo de vida e amor pela ciência...*

*Em especial à memória da Sra. Marilda Barbosa Ribeiro, minha querida avó, que um dia  
teve o sonho de estudar, mas nunca o realizou.*

## AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por todo seu amor e me proporcionar toda força e determinação nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais *Maraluce Ribeiro Corrêa e Percival Guerreiro Corrêa*, por todo amor, educação, força, apoio e compreensão ao longo de toda minha vida.

Aos meus filhos *Nicole Lorraine Corrêa Pinheiro e Valdomiro Tezza Filho*, por todo amor e compreensão na minha ausência, pois se permitiram entender que para realizar um sonho é necessário dedicação e sacrifícios.

Em especial ao *Dr. Sérgio Albuquerque*, meu orientador, pela inestimável paciência, apoio, humildade e todos os ensinamentos sobre o amor pela ciência, que para mim transmitiu.

Em especial à minha querida amiga *Cleide Leite Gomes*, me ajudar e entender minha ausência nos momentos que também precisou de mim e não pude estar junto.

Em especial à *Diana Mota*, aluna, amiga e companheira por toda sua dedicação e por ter estado ao meu lado neste trabalho quando mais tive dificuldades.

Em especial à minha querida e inesquecível professora *Maria Cristina dos Santos*, por ter me ensinado a ter sede pelo conhecimento, amor por ensinar e principalmente por sempre acreditar no potencial que cada um de nós possui.

Em especial ao *Dr. Rafael Poloni*, amigo e irmão que tanto contribuiu e me ajudou, proporcionando a mim tanta alegria e amor durante a finalização deste trabalho.

Em especial ao *Dhiego Brelaz*, por todo o apoio, amor, paciência e felicidade que me proporcionou neste momento tão importante da minha vida.

Em especial ao *Dr. Aldo Procópio*, amigo que me ajudou na conclusão deste trabalho.

Em especial a *MSc. Luciana Viana*, amiga e irmã que me ajudou e esteve ao meu lado na conclusão deste trabalho.

Em especial ao *Willian Fuzita*, pelo apoio e ajuda que me deu no momento mais difícil para a conclusão desse trabalho.

Em especial à **Raissa Raulino**, pelo apoio e ajuda nos momentos que mais tive dificuldades para a conclusão deste trabalho.

Em especial à **Isalela Passos**, pela a ajuda inestimável pra a conclusão deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, que também são minha família **Nayane de Paula, Rechfy Kassem, Agda Blenda, Alexandre Terço, Edalton Sanguino e Katiane Gomes** por todo companheirismo e amizade que nos une.

A equipe do **Laboratório Santa Edwiges**, pelo apoio e compreensão nos momentos em que tive que estar ausente e mesmo assim nunca deixaram de me apoiar.

Aos meus amigos de turma **Cacilda Satomi Mallman, Nilberto Dias, Willian Fuzita, Walter Luiz, Suellen Nunes, Luciana Brito, Edalton Sanguino, Katiane Gomes, Cláudio Freitas, Yuri Chaves, André Corado e Karem Balieiro** por todos os momentos inesquecíveis que tivemos juntos nesta jornada.

À professora **Dra. Adriana Malheiro**, por ter me orientado no estágio e docência e ter me transmitido a arte de ensinar.

A **Sra. Deuza** por sua paciência e disposição em me ajudar com os pacientes.

Às colegas do laboratório de Imunohematologia **Socorro Montanha, Nina Rosa, Edilza, Francisca Martha**, pela ajuda com a obtenção das amostras.

À **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas**, por me dar a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À **Universidade Federal do Amazonas**, por esta formação acadêmica.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada** e a todos os seus integrantes, pela concretização deste trabalho.

À **Fundação de Apoio à Pesquisa do Amazonas**, pelo o apoio financeiro para a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para concretização deste sonho.

## EPÍGRAFE

*“Errar é o primeiro passo para aprender  
e aceitar o desafio é o primeiro passo para vencer.”*

***Flávio Vieira***

## RESUMO

### Estudo das variantes *RHD* em pacientes portadores da doença falciforme do Estado do Amazonas, Brasil

**Introdução:** Estudos têm demonstrado a presença de variantes *RHD* em pacientes falciforme, resultando em aloimunizações subsequentes. Em razão da proteína Rh ter função estrutural na membrana destas células, outros fatores derivados destes polimorfismos podem impactar na diminuição do tempo de vida do eritrócito. A frequência de variantes *RHD* ainda não é conhecida, nos pacientes falcêmicos do Estado do Amazonas e nem se há uma possível associação entre estas variantes e a transfusão sanguínea nestes indivíduos. **Objetivo:** Nosso objetivo foi investigar as variantes do *RHD* em pacientes falciformes do Estado do Amazonas. **Casuística e métodos:** Pacientes falciformes atendidos no Hemocentro do Amazonas, nos quais realizamos a fenotipagem RhD, pelo método de hemaglutinação em tubo, utilizando reagentes anti-RhD IgG clone MS201 e IgM clone MS26 e genotipagem pelo método PCR multiplex para a caracterização de regiões do Intron 4 e exon 7 do gene *RHD* e outra PCR multiplex para detecção de regiões dos exons 3, 4, 5, 6, 7 e 9 para caracterização de variantes RhD. O método estatístico do Qui Quadrado, foi utilizado para análise das informações retrospectivas do número de transfusões e a presença de variantes RhD. **Resultados:** Foram estudadas 128 amostras, das quais encontramos 45 (35,15%) com resultados discrepantes na sorologia para detecção do antígeno RhD e ainda 12 (9,37%) pacientes com RhD variantes, mas que 03 destes, não apresentaram discrepâncias na sorologia RhD. Ao passo que 33 amostras discrepantes nos testes sorológicos não foram caracterizadas como RhD variante. Dentre as variantes, 07 (58,33%), foram caracterizadas como DVa, em que tais indivíduos receberam até 32 concentrados de hemácias RhD positivo sem desenvolver anti-RhD, 01 (8,33%) DFR apresentando a frequência de transfusão de 18 concentrados de hemácias RhD positivo também sem presença de anti-RhD e de 04 (33,33%) amostras que classificamos como indeterminados, sendo que 2 (50%) dos pacientes considerados indeterminados, apresentaram aloimunização por anticorpo anti-RhD. **Discussão:** Nossos resultados demonstram que nem toda discrepância no teste sorológico é indicativo de RhD variante e que estes podem ser encontrados mesmos resultados 4 cruces nos dois reagentes utilizados. A variante DVa foi a mais frequente em nossos pacientes falciformes não estando associada à aloimunização por anti-RhD em pacientes politransfundidos com hemácias RhD positivo, contrastando assim com a frequência de DIIIa encontrada nestes tipo de pacientes estudados em outras regiões do Brasil e associada ao aumento de risco de aloimunização. **Conclusão:** Diante dos nossos resultados, observamos que testes de biologia molecular são necessários para a detecção do gene *RHD* e ainda que pacientes com variantes DVa, podem não desenvolver anticorpo anti-D quando transfundidos com hemácias RhD positivo. Encontramos indicativos de que presença de variantes RhD caracterizadas nas amostras estudadas, não estão associadas à necessidade de transfusões em pacientes portadores da doença falciforme.



## ABSTRACT

### **Study of RHD variants in patients with sickle cell disease in the state Amazonas, Brazil**

**Introduction:** Studies have demonstrated the presence of RHD variants in sickle cell patients, resulting in subsequent alloimmunization, because of the Rh protein having structural function in membranes of these cells, other factors derived from these polymorphisms may impact on the length of life of the erythrocyte. The frequency of RHD variants is not yet known in sickle cell patients in the state of Amazonas and if there the possibility of association between these variants and blood transfusion in these individuals. **Objective:** Our aim was to investigate the variants of RHD in sickle cell patients in the State of Amazonas **Materials and methods:** We performed phenotyping of samples from patients with sickle cell disease by hemagglutination tube method using the reagent anti-D IgG clone MS201 and anti-D IgM clone MS26. The multiplex PCR genotyping method was performed for characterization *RHD* regions of the Intron 4 and exon 7 and the exons 3, 4, 5,6, 7 and 9 for the characterization of variant RhD. The statistical method of Chi Square was used for analysis of retrospective information on the number of transfusions and the presence of RhD variants. **Results:** We analyzed 128 samples, of which 45 (35.15%) showed discrepant results in serology for detection of RhD antigen and 12 (9.37%) patients with RhD variants. However 03 of these showed no discrepancies in RhD serology. While 33 discrepant samples in serological tests were not characterized as RhD variant. Among the variants, 07 (58.33%) were characterized as DVa, where such individuals were concentrated up to 32 RhD positive red cells without developing anti-RhD, 01 (8.33%) DFR presenting the frequency of transfusion 18 concentrated RhD positive red cells also without the presence of anti-RhD and 04 (33.33%) samples classified as indeterminate, and 2 of these patients had alloimmunization by anti-RhD. **Discussion:** Our results demonstrate that not all discrepancies in serological tests is indicative of variant RhD and that these results can be found 4 crosses for two reagents. The DVa variant was more frequent in our sickle cell patients and this is not associated with anti-RhD alloimmunization by patients with multiple transfusions in RhD positive red blood cells, thus contrasting with the frequency of DIIIa found in these type of patients studied in other regions of Brazil and associated with increased risk of alloimmunization. **Conclusion:** In conclusion, we observed that molecular biology tests are needed to detect the *RHD* gene. The variations DVa patients may not develop anti-D when transfused with RhD-positive erythrocytes. We found indications that the presence of RhD variants are not associated with the need for transfusions in patients with sickle cell disease.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura da molécula de hemoglobina com os pontos de substituição do ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia $\beta$ globínica, modificando a molécula de hemoglobina A para a molécula de Hemoglobina S (5).....	18
<b>Figura 2:</b> Mapa de distribuição epidemiológica do gene das células falciformes no mundo (1). .....	19
<b>Figura 3:</b> Mapa da distribuição do gene Hemoglobina S no Brasil (3).....	20
<b>Figura 4:</b> Fisiopatologia e consequências morfológicas na Anemia Falciforme (4) .....	22
<b>Figura 5:</b> Ilustração das proteínas que compõem a membrana eritrocitária (17) .....	23
<b>Figura 6:</b> Diagrama do <i>locus RH</i> . Figura ilustrando a orientação inversa dos genes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> e a deleção do gene <i>RHD</i> associado ao fenótipo RhD negativo. (24).....	25
<b>Figura 7:</b> Proteína RhD Fraco, apresentando alterações nos epítomos transmembranares e intracelulares (43).....	26
<b>Figura 8:</b> Proteína RhD Parcial, apresentando alterações pontuais nos epítomos extracelulares (43). .....	27
<b>Figura 9:</b> Proteína Del com alterações em epítomos transmembranares e intracelulares em pontos diferentes das alterações das Variantes RhD Fraco (43). .....	29
<b>Figura 10:</b> Genotipagem RHD indicando a presença das bandas do intron 4 e exon 7. ....	39
<b>Figura 11:</b> Genotipagem RHD parcial, demonstrando a ausência da banda que corresponde ao exon 4, caracterizando a variante <i>DFR</i> . .....	41
<b>Figura 12:</b> Genotipagem RHD parcial apresentando a variante DVa .....	41

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Corte quanto ao número de transfusões .....	35
--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados na genotipagem <i>RHD</i> .....	40
<b>Tabela 2:</b> Variações de temperatura utilizadas para anelamento e número de ciclos das PCRs utilizadas.....	40
<b>Tabela 3:</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a caracterização <i>RHD</i> parcial .....	41
<b>Tabela 4:</b> Variações de temperatura de anelamento e número de ciclos da técnica de PCR <i>RHD</i> Parcial.....	42
<b>Tabela 5:</b> Discrepâncias detectadas na reação sorológica entre os reagentes Anti-RhD de classe IgG e de Classe IgM. ....	44
<b>Tabela 6:</b> RhD variantes e suas reações sorológicas. ....	45
<b>Tabela 7:</b> RhD variantes em pacientes falciformes de acordo com a frequência de transfusões. ....	45
<b>Tabela 8:</b> Variantes RhD encontradas, nas diferentes faixas de transfusão. ....	46
<b>Tabela 9:</b> Frequência de transfusões com variantes DVa, DFR e indeterminados. ....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>Sigla</b>	<b>Descrição</b>
Rh	Sistema Rh
RhD	Antígeno RhD
RhC	Antígeno C
RhE	Antígeno E
Rhe	Antígeno e
<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<sup>5</sup></i>	Gene híbrido <i>CE-D<sup>5</sup></i>
<i>RHDΨ</i>	Pseudo gene <i>RHD</i>
<i>RHCE*C/c</i>	Genes alelos Cc
<i>RHCE*E/e</i>	Genes alelos Ee
DIVb	Antígeno RhD Parcial DIVb
DVa	Antígeno RhD Parcial DVa
DVI	Antígeno RhD Parcial DVI
DVII	Antígeno RhD Parcial VII
DAR	Antígeno RhD Parcial DAR
DFR	Antígeno RhD Parcial DFR
DII	Antígeno RhD Parcial DII
DMH	Antígeno RhD Parcial DMH
DNU	Antígeno RhD Parcial DNU

DHR	Antígeno RhD Parcial DHR
DHMi	Antígeno RhD Parcial DHMi
DFW	Antígeno RhD Parcial DFW
ROHar	Antígeno RhD Parcial RoHar
DAU	Antígeno RhD Parcial DAU
DIIIb	Antígeno RhD Parcial DIIIb
DIIIc	Antígeno RhD Parcial DIIIc
DIVb	Antígeno RhD Parcial DIVb
D <sub>el</sub>	Antígeno D <sub>el</sub>
μl	Microlitro
ml	Mililitro
RPM	Rotações por minuto
Pmol	Picomol
Nmol	Nanomol
PB	Pares de base
AGH	Anti - globulina Humana
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
INTRON	Região que não codifica aminoácidos
EXON	Região codificadora de Aminoácidos
PCR	Reação em cadeia da Polimerase / <i>“Polimerase Chain”</i>
<i>Primers</i>	Seguimentos de oligonucleotídeos sintéticos
NT	Nucleotídeos
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Água destilada e deionizada
ISBT	<i>“International Society of Blood Transfusion”</i>
T.A	Temperatura ambiente

APS	Persulfato de Amônia
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra acético
TEMED	Tetradimetilenodiamino

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 Variantes RhD Fracos .....	26
1.2 Variantes RhD Parciais .....	27
1.3 Variantes D <sub>el</sub> .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivo específico .....	32
<b>3. CASUÍSTICA</b> .....	34
3.1 Área de Estudo.....	34
3.2 Indivíduos do Estudo .....	34
3.3 Critérios de Elegibilidade .....	34
3.4 Tamanho da Amostra.....	34
<b>4. MÉTODOS</b> .....	34
4.1 Modelo do Estudo.....	34
4.2 Inclusão dos Pacientes .....	35
<b>5. MÉTODOS LABORATORIAIS</b> .....	36
5.1 Fenotipagem RhD .....	36
5.2 Pesquisa de D Fraco.....	37
5.3 Fenotipagem CDE.....	37
5.4 Extração de DNA genômico .....	37
5.5 Genotipagem <i>RHD</i> pela técnica de PCR multiplex .....	38
5.6 Genotipagem <i>RHD</i> parcial.....	40
<b>6. RESULTADOS</b> .....	44
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55
<b>APÊNDICES</b> .....	60
<b>ANEXOS</b> .....	71



# *Introdução*

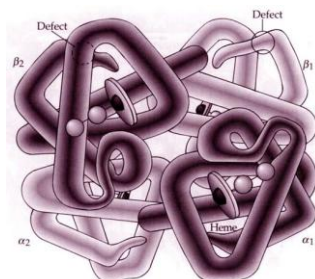
---

## 1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é a doença genética de maior importância no Brasil, por ser a mais incidente na categoria de doenças hereditárias em nosso País (1). Trata-se de um grupo de doenças genéticas caracterizadas pela predominância de uma hemoglobina anormal denominada hemoglobina S (HbS, *sickle hemoglobin*), termo dado por Pauling em 1949 (2), as quais desenvolvem forma de foice irreversível do eritrócito dependendo do grau de desoxigenação (3).

Esta modificação estrutural é responsável por consideráveis alterações nas propriedades físico químicas da molécula de hemoglobina em estado desoxigenado, culminando no evento denominado de falcização, caracterizada pela mudança da forma normal redonda e bicôncava do eritrócito para a forma de foice. Consequentemente têm-se alterações profundas na reologia e na membrana dos eritrócitos, principal mecanismo fisiopatológico da doença (4). Em homozigose (HbSS) é chamada particularmente de anemia falciforme; em heterozigose com outras hemoglobinas variantes HbSC, S talassemias e outras mais raras, como HbSD e HbSE são denominadas de Doenças Falciformes (3).

A forma monogênica da doença é denominada de Anemia Falciforme, sendo conceituada como uma “Doença Molecular” (2), pois é caracterizada pela substituição de adenina (A) por timina (T) (GAG->GTG), desencadeando uma troca de aminoácidos, de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia  $\beta$ -globínica (**Figura: 1**) (5). Essa alteração origina uma hemoglobina anormal denominada Hemoglobina S (**Figura: 2**) que, em condições de baixa oxigenação, sofre alterações físicas e químicas que acarretam em uma polimerização, modificando da forma bicôncava do eritrócito para a forma de foice (5). (**Figura: 3**).

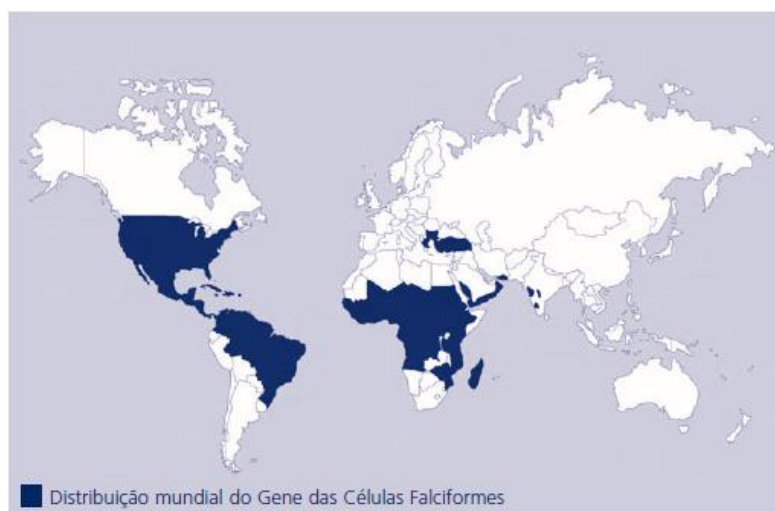


**Figura 1:** Estrutura da molécula de hemoglobina com os pontos de substituição do ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia  $\beta$  globínica, modificando a molécula de hemoglobina A para a molécula de Hemoglobina S (5).

Devido a esse tipo de hemoglobina anormal ter sido encontrada em indivíduos cujos antepassados eram originários da África, sugere-se que sua origem tenha sido no continente africano há milhares de anos atrás e como consequência trazida às Américas, pelo tráfico de escravos, chegando até o Brasil (6).

O traço das células falciformes (heterozigotos HbS) é encontrado, aproximadamente, em 25% da população de africanos ocidentais, 10% dos afro caribenhos, 5% dos portugueses, 0,5 a 5% dos asiáticos e 1% dos afro-norte americanos (1). Dado o exposto, fica claro que o processo da mutação que deu origem à HbS é multi regional, pois através da análise de 11 regiões polimórficas do agrupamento de genes de globina tipo beta determinadas pela aplicação de enzimas capazes de quebrar ligações entre bases nitrogenadas específicas, foi possível concluir que o seguimento cromossômico entre os genes  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , e  $\beta^s$  pode conter diferentes sequências de bases nitrogenadas ou haplótipos, sendo específicas para determinadas populações ou grupos étnicos (7-9).

Há pelo menos três grupos populacionais (haplótipos) diferentes na África que foram denominados *Senegal*, *Benin* e *Bantu* e outros haplótipos foram descritos, sendo um caracterizado em pessoas provenientes do sudeste de Camarões, sendo assim caracterizado o haplótipo *Camarões*. Entre as populações do leste a Arábia Saudita e em grupos tribais da Índia, foram caracterizados como outro haplótipo denominado *Árabe-Indiano*, estando difundida notadamente em populações do leste da Arábia Saudita, Bahrain, Kuwait e Oman (7).



**Figura 2:** Mapa de distribuição epidemiológica do gene das células falciformes no mundo (1).

Por outro lado, em indivíduos caucasóides ingleses, assim como em outras populações do norte da Europa, se encontra essa patologia, devido a casamentos consanguíneos e da subsequente mistura de genes entre diferentes grupos étnicos.

No Brasil a doença das células falciformes se tornou a mais incidente (1), porque a distribuição do gene da HbS em nosso país é bastante heterogênea, isto porque depende da composição negróide ou caucasóide da população, demonstrando que a prevalência de heterozigotos para a HbS é maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%), e menor regiões sul e sudeste é menor (2% a 3%). Portanto as estimativas, baseadas na prevalência, possibilitou estimar a existência de mais de 2 milhões de portadores do gene HbS e mais 8 mil afetados com a forma homozigótica (HbSS), tornando a Doença Falciforme um problema de saúde pública. Estima-se o surgimento de 700 a 1.000 novos casos anuais no Brasil dessa doença. (10). Figura 3



**Figura 3:** Mapa da distribuição do gene Hemoglobina S no Brasil (3).

Segundo dados da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), o Estado do Amazonas apresenta uma prevalência de 0,01% de portadores da doença falciforme, mas esse número vem aumentando.

Nessa patologia, observam-se fenômenos de vaso-oclusão, determinantes para a origem da maioria dos sintomas dos pacientes portadores (11). Porém havendo uma variabilidade clínica, na qual se pode desenvolver um quadro elevado de gravidade,

resultando em inúmeras complicações e frequentes hospitalizações. No entanto, ao passo que uma evolução mais benigna é quase assintomática, sendo possível se detectar em alguns indivíduos.

A anemia hemolítica crônica e os fenômenos de vaso-oclusão presente nos indivíduos homocigóticos (HbSS), levam a crises dolorosas agudas e à lesão tecidual crônica progressiva, acompanhadas de inúmeras complicações que afetam quase todos os órgãos e sistemas, resultando em uma expressiva morbidade, redução da capacidade do trabalho e da expectativa de vida. Isto porque estas manifestações vêm acompanhadas de dores osteoarticulares e abdominais, infecções, infartos pulmonares, retardo no crescimento, acidente vascular cerebral e comprometimento crônico de múltiplos órgãos, sistemas ou aparelhos. (1)

Esses eventos se manifestam na anemia falciforme porque alterações moleculares ocorrem principalmente na membrana eritrocitária, desencadeando as manifestações fisiopatológicas da doença falciforme: a) aumento da adesão de eritrócitos ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios relacionados às plaquetas e granulócitos; b) enrijecimento da membrana eritrocitária, encurtando sua sobrevivência na circulação, de 120 para 16 ou 20 dias; (ANVISA, 2001) c) lesões microvasculares; d) depressão de ácido nítrico, levando à vasoconstrição, ativação da inflamação e do sistema da coagulação (4).

A vaso-oclusão se manifesta, após o fenômeno da falcização, pois os eritrócitos falciformes expõem certas proteínas de membrana, denominadas moléculas de adesão (12). As moléculas de adesão são representadas pelas siglas (PS, CD36, CD47, CD49d, e BECAM/LU), encontradas em maior quantidade na superfície externa da membrana eritrocitária das células falcizadas que nos eritrócitos normais (4). Cada uma dessas proteínas são responsáveis por uma parte na fisiopatologia de aderência endotelial dos eritrócitos falcizados, como mostrado na figura 4.

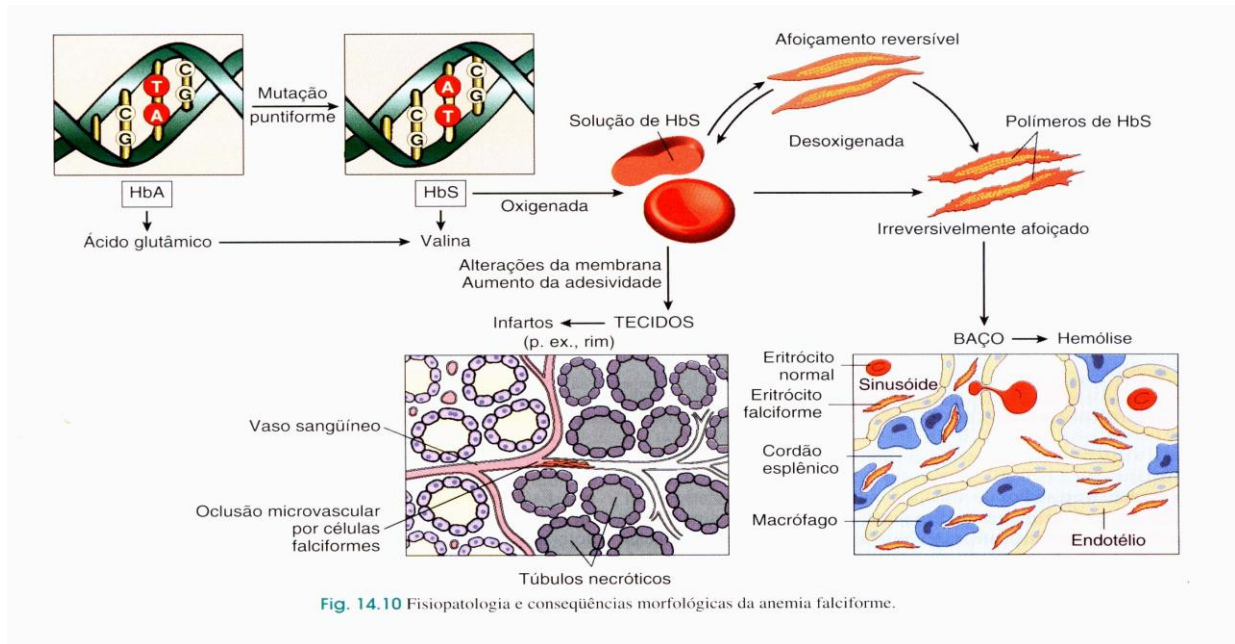


Fig. 14.10 Fisiopatologia e consequências morfológicas da anemia falciforme.

**Figura 4:** Fisiopatologia e consequências morfológicas na Anemia Falciforme (4)

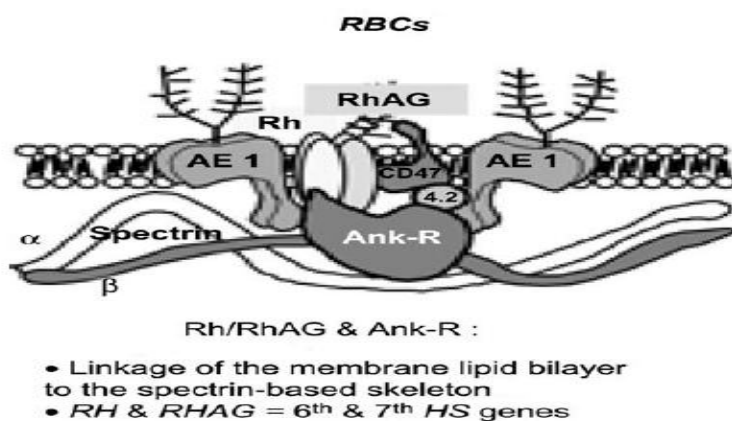
Em particular, o CD47, glicoproteína transmembrânica, parece estar ligado ao Complexo Rh nos eritrócitos, servindo como receptor da trombospondina, responsável pela ligação entre o eritrócito e o endotélio via receptor vitronectina ( $\alpha v \beta 3$ ), facilitando assim a quimiotaxia de leucócitos para o local onde está ocorrendo a vaso-oclusão, o que favorece a inflamação deste local, levando ao aumento da severidade da Doença Falciforme.

A vaso-oclusão vem acompanhada da hemólise dos eritrócitos falcizados, ocorre por destruição extra e intravascular. O mecanismo predominante é a hemólise extravascular, que decorre do reconhecimento e fagocitose dos eritrócitos que sofrem a falcização e/ou lesão de oxidação reduzida da membrana celular. A hemólise intravascular, provavelmente é ocasionada pela lise dos eritrócitos falciformes induzida pela ação do complemento e da fragmentação celular (13, 14). Portanto a falcização tem um papel essencial na indução das anormalidades celulares responsáveis tanto pela hemólise intravascular, quanto a hemólise extravascular, constituindo uma correlação entre a porcentagem de células falcizadas, que constituem uma subpopulação de células densas, desidratadas e a taxa de hemólise (15).

Esses eventos constituem a base para o encurtamento da vida média desses eritrócitos, com consequente anemia hemolítica, e a oclusão da micro circulação levando à isquemia e

eventual infarto tecidual, culminando em lesão orgânica crônica e em crises dolorosas agudas bem típicas da doença falciforme (4).

Porém, Ballas e colaboradores (16) demonstrou que o complexo Rh também é fundamental para a estrutura normal do eritrócito, pois indivíduos Rh null, que não possuem a proteína Rh, evento este que pode estar associada ao desenvolvimento da estomatocitose e esferocitose hereditária (17), sendo ambas estas anemias hemolíticas, assim como a anemia falciforme. Porém, isso não quer dizer, que o fenótipo Rh null seja a causa da esferocitose hereditária. Isso porque a proteína Rh medeia interações subjacentes com o citoesqueleto do eritrócito através da proteína 4.2 e a anquirina, ambas proteínas fundamentais para a estrutura normal do eritrócito, como mostra a figura 5 (17, 18).



**Figura 5:** Ilustração das proteínas que compõem a membrana eritrocitária (17)

De fato que o conhecimento sobre a severidade da Anemia Falciforme é fundamental para ações efetivas de prevenção de complicações hematológicas que esta doença pode causar. Os portadores de anemia falciforme necessitam da terapia transfusional devido a constante hemólise, responsável pela anemia crônica, principal evento dessa patologia.

Em virtude da constante hemólise, estes indivíduos têm como principal terapia a transfusão de sangue, o que ocasiona o desenvolvimento de aloanticorpos, que em sua maioria são formados com especificidade contra antígenos do sistema Rh (19, 20), isto porque há diversas variações gênicas nos genes *RH* em pacientes falciformes são diversos e estão associados à aloimunização Rh (21), apesar de transfusões com unidades aparentemente compatíveis para os antígenos do sistema Rh.

Dado o exposto, fica clara a importância da proteína Rh para estabilidade da estrutura do eritrócito nos indivíduos portadores da doença falciforme. Assim o Sistema Rh pode ser

considerado, o mais complexo e o mais polimórfico de todos os sistemas de grupos sanguíneos (22), por conta da imunogenicidade de seus antígenos e estar diretamente envolvido nas reações hemolíticas pós-transfusionais, nas anemias hemolíticas autoimunes e principalmente na doença hemolítica perinatal (23), também pode estar envolvido em uma maior suscetibilidade de transfusões de sangue em indivíduos portadores da doença falciforme, desencadeando consequências clínicas graves, como a reação hemolítica pós-transfusional, formação de anticorpos e a destruição de hemácias autólogas e alogênicas, sendo este evento denominado de Síndrome da Hiperhemólise (24).

Atualmente o sistema Rh é constituído de 54 (25) antígenos, dos quais os de maior relevância são os antígenos: RhD, C/c, E/e. O antígeno RhD é o mais importante do ponto de vista clínico, devido ao seu alto grau de imunogenicidade (26). O gene *RHD* codifica o antígeno RhD, enquanto que o gene *RHCE* codifica os antígenos C/c, E/e (26).

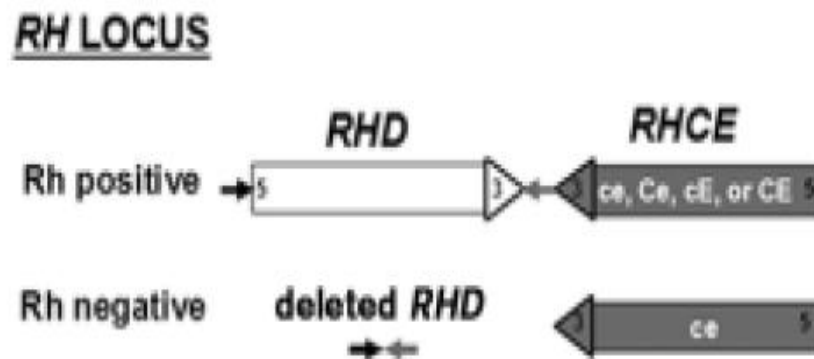
As bases moleculares do sistema Rh são determinadas por rearranjos gênicos, mutações pontuais e deleções, as quais são responsáveis por numerosas variantes dos antígenos RhD e RhCE, demonstrado no estudo de Castilho e colaboradores (27), o que mostrou uma alta frequência das variantes de RhD correspondentes aos alelos *DIIIa* e *DAR* em pacientes portadores de Anemia Falciforme, o que também resulta na diminuição na sobrevivência destes eritrócitos, visto que tais indivíduos se tornam dependentes de transfusões sanguíneas.

Estas numerosas variações nos antígenos do sistema Rh se deve ao fato de que os genes que os codificam são os genes *RHD* (28) e *RHCE* (29), os quais possuem um alto grau de homologia, localizados no cromossomo 1p36.13-34.3 (29, 30), organizados em 10 éxons dentro de uma sequência genômica de aproximadamente 75kb. A principal diferença entre esses dois genes, está na região do éxon 10 e na deleção de 600pb no intron 4 do gene *RHD*, quando comparado ao gene *RHCE* (31).

Indivíduos com o fenótipo RhD - positivo possuem os genes *RHD* e *RHCE*, como foi demonstrado por Colin e colaboradores (32), através da análise do DNA genômico de diversos fenótipos do Sistema Rh. Portanto a maioria das hemácias que apresentam o fenótipo RhD-positivo apresenta uma proteína RhD convencional, enquanto que fenótipo RhD negativo, mostra e que há evidências da presença de diferentes polimorfismos responsáveis pela ausência da expressão do antígeno RhD em vários grupos étnicos, sendo prevalente em brancos (15 - 17%), menos encontrado em negros ( 3 - 5%) e raro em Asiáticos (<0,1%) (33).



Na maioria dos brancos, esse fenótipo resulta da inteira deleção do gene *RHD* (32). (Figura 6)



**Figura 6:** Diagrama do *locus RH*. Figura ilustrando a orientação inversa dos genes *RHD* e *RHCE* e a deleção do gene *RHD* associado ao fenótipo RhD negativo. (24)

Em outros grupos étnicos, o fenótipo RhD negativo é primariamente causado por polimorfismos que inativam o gene *RHD*. Em indivíduos afro descendentes, 66% possuem uma inserção de 37 pb no exon 4 do gene *RHD*, os quais resultam em um *stop codon* prematuro, inativando o gene *RHD*, denominado *RHD Pseudogene* (*RHD $\Psi$* ). Esse evento leva a não produção da proteína D e conseqüentemente a não produção do antígeno D (34) e ainda 15% possuem um gene híbrido *RHD-CE-D*, caracterizados pela expressão de C fraco e não de antígeno RhD (34).

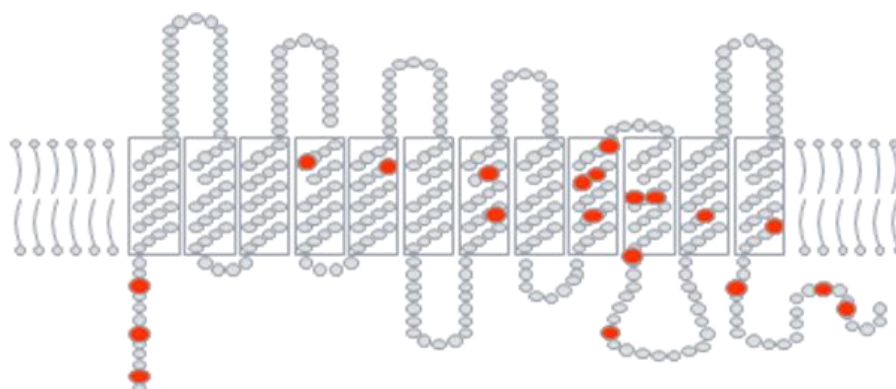
Portanto, a busca do conhecimento das bases moleculares dos antígenos Rh geraram numerosos estudos, mostrando que os epítomos do antígeno RhD possuem diversas conformações e constituído de mais do que simples resíduos de aminoácidos nucleares, pois muitos destes epítomos envolvem diversos *loops* (alças) extracelulares (35). Adicionalmente a troca de aminoácidos em regiões intracelulares da proteína também podem alterar seus epítomos, resultando nas chamadas variantes do antígeno RhD.

Atualmente há descrição de 200 diferentes alelos RhD que codificam proteínas com troca de aminoácidos (Fonte: <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/> (acessado em 10/09/2014) pode causar numerosas variações na expressão dos antígenos RH, incluindo as variantes denominadas de Variantes RhD.

## 1.1 Variantes RhD Fracos

Essa variante foi descrita pela primeira vez por Stratton em 1946 (36), caracterizada por uma alteração quantitativa que leva a uma baixa expressão do antígeno RhD (37, 38). Isso ocorre em consequência de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) em diferentes éxons do gene *RHD* (39, 40) e, dependendo do anti-soro anti-D utilizado e da técnica de hemaglutinação, esta reage somente com o teste de antiglobulina humana.

Até então, já foram descritos 76 tipos de D fraco (Fonte: [www.uniulm.de/~wflegel/RH/](http://www.uniulm.de/~wflegel/RH/). Acessado em 21/06/2014) que, em populações caucasianas os tipos D fraco 1, 2, 3, 4 e 5 são os mais comuns. Dentre estes os mais frequentes são os tipos 1, 2, 3 e 4 (41). Ainda não foi observada a aloimunização por anti-D em indivíduos que apresentavam esses tipos de D fraco. Isto pode ocorrer porque as substituições dos aminoácidos de diferentes tipos de RhD fraco estão localizadas nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína RhD (41, 42), como demonstrado na figura 5.



**Figura 7:** Proteína RhD Fraco, apresentando alterações nos epítomos transmembranares e intracelulares (43).

A presença do alelo *RHC* em trans no locus Rh, também está associada com a expressão fraca do antígeno RhD na hemácia e em algumas vezes este mecanismo pode estar associado com outros tipos do antígeno RhD fraco, ocorrendo assim, uma redução ainda maior da expressão deste antígeno na membrana eritrocitária, dificultando de forma considerável a sua detecção por técnicas sorológicas (44).

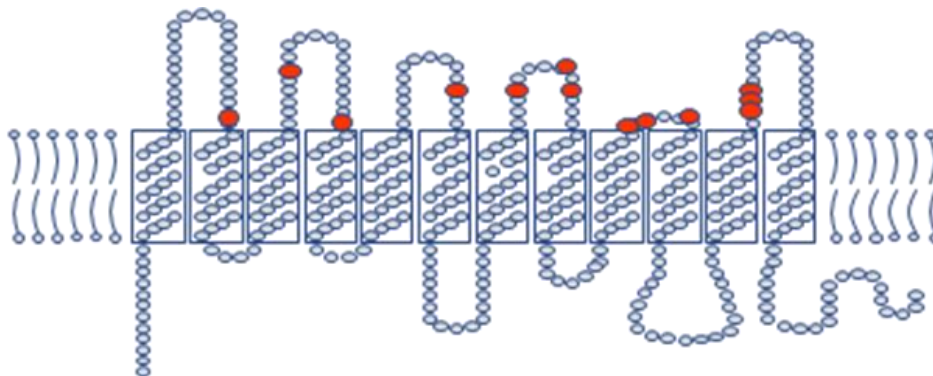
O mecanismo relacionado com a baixa expressão antigênica na membrana da hemácia ainda não foi completamente esclarecido. Contudo polimorfismos de um único nucleotídeo que ocorrem no gene *RHD* fraco parecem envolver regiões importantes relacionadas com a

integração da proteína Rh com a membrana eritrocitária ou com a glicoproteína RhAG (45). A densidade antigênica dos antígenos D fraco variam de 53 a 4000 sítios antigênicos por hemácia (46), sendo os tipos mais comuns e que apresentam maior densidade antigênica são os D fraco tipo 4, seguidos pelos tipos 3, 1, 2 e 5.(41).

## 1.2 Variantes RhD Parciais

De acordo com a análise molecular das variantes de RhD, mostrou que a perda da expressão de certos epítomos RhD, sendo associada a polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene *RHD* ou a rearranjos gênicos entre os genes *RHD* e *RHCE*. As variantes DII, DIIIa, DVIIa, DVII, DMH, DNU, DHR, DHMi, DFW, R0Har, DAR e DAU ocorrem pela presença de SNPs no gene *RHD* enquanto as variantes DIIIb, DIIIc, DIVb, DVa, DVI, 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* (22, 27, 47, 48). Estes codificam proteínas híbridas RhD-CE-D de 417 aminoácidos que conservam alguns epítomos RhD, mas podem expressar novos epítomos detectáveis sorologicamente (46).

Estas alterações ocorrem nas alças extracelulares da proteína RhD, onde estão localizados os epítomos de RhD como mostra a (figura 6). Isso explica por que indivíduos com fenótipo RhD parcial perdem a expressão de alguns epítomos do antígeno RhD e podem desenvolver aloanticorpo anti-D, ao entrar em contato com hemácias RhD-positivo normais. Ainda há as categorias DIII, DAR e DAU, que não são caracterizados sorologicamente devido ao fato de não existirem anticorpos monoclonais que possam reconhecer os epítomos específicos expressos por estas variantes. Foram demonstrados em estudos moleculares que tais variantes ocorrem principalmente na população de origem africana, as quais estão também presentes em indivíduos portadores de anemia falciforme (22, 27, 47, 48).



**Figura 8:** Proteína RhD Parcial, apresentando alterações pontuais nos epítomos extracelulares (43).

A densidade antigênica dos antígenos RhD parciais varia de 500 a 25.000 sítios antigênicos por hemácia e portanto muitos antígenos RhD parciais podem ser caracterizados sorologicamente como RhD normais, visto que, a densidade antigênica da proteína RhD varia entre 10.000 a 25.000 sítios antigênicos por hemácia (46). Então considerando o “*cut off*” sorológico de 500 antígenos por hemácias, alguns antígenos RhD parciais (DAU, DAR, DVI) podem também ser identificados na rotina sorológica como RhD fraco ou até mesmo como RhD-negativo.

No Brasil, foi demonstrada, a alta frequência das variantes de RhD correspondentes aos alelos *DIIIa* e *DAR* em pacientes portadores de Anemia Falciforme, associados a aloimunizações Rh, apesar de transfusões com unidades aparentemente compatíveis para antígenos do sistema Rh (27). Portanto, indivíduos que expressam essas variantes são fenotipados como RhD positivo, porém desenvolvem anti-D.

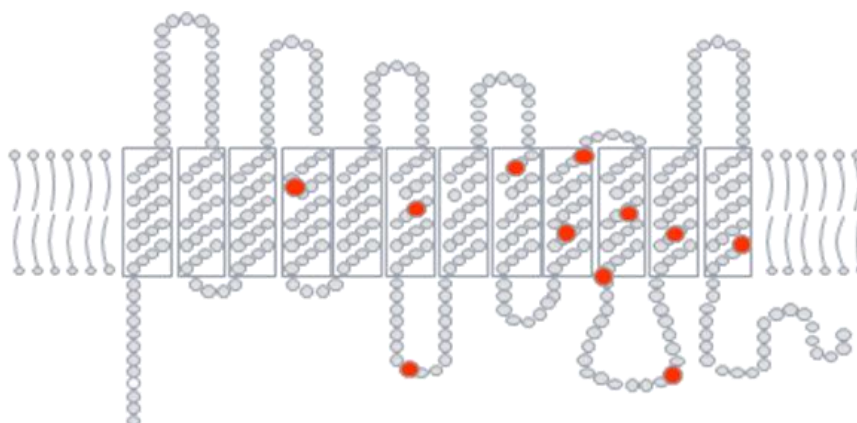
Estes resultados nos mostram que a tipagem sorológica das hemácias não pode distinguir os produtos de genes variantes de RhD dos antígenos convencionais, resultando em uma aloimunização posterior e um maior comprometimento da sobrevivência dos eritrócitos, uma vez que estes pacientes já possuem a série eritróide alterada em forma de foice, associada também a alterações na proteína Rh (17, 18) e nelas são expressas uma quantidade maior de moléculas de adesão e imunoglobulinas (13, 49), podendo estar associado a uma maior suscetibilidade de transfusão nestes indivíduos.

Hemácias com alguma forma de expressão alterada do antígeno RhD não são dificilmente encontradas na rotina da prática transfusional. Uma estimativa de 1% a 2% de indivíduos caucasianos possuem alelos RhD que codificam antígenos RhD fraco ou RhD parcial, sendo esta frequência alta em indivíduos de etnia africana (50, 51).

### **1.3 Variantes D<sub>el</sub>**

Essa variante foi recentemente identificada em asiáticos (52), como uma consequência de deleções em introns e SNPs em sítios de “*Splice*” do gene *RHD* que impedem a integração da proteína RhD com a membrana eritrocitária, consequentemente reduzindo consideravelmente sua expressão. Sendo assim, apresenta um baixíssimo nível do antígeno RhD na membrana eritrocitária, com densidade antigênica inferiores a 50 antígenos por hemácia, portanto, um nível antigênico muito abaixo do *cut off* (corte) sorológico, não sendo possível sua detecção por técnicas sorológicas, nem mesmo por teste de aglutinação indireta. E pelo fato de somente poder ser identificada por testes de adsorção e eluição e por testes moleculares, esta variante foi denominada de D<sub>el</sub>.

Indivíduos que apresentam este fenótipo, são geralmente classificados na rotina imunohematológica como RhD-negativo e apresentam antígeno RhC. Os alelos D<sub>el</sub>, mais frequentes são IVS5-38del4 que ocorre pela deleção de 4 nucleotídeos no intron 5 do gene *RHD* entre os nucleotídeos -38e-41, o alelo K409K que ocorre por SNP em sítio de *splice*. Ambos foram associados com a indução de aloimunização anti-D em receptores RhD-negativo (53, 54). As substituições dos aminoácidos dos antígenos Del estão localizadas nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína RhD, como demonstrado na Figura 7.



**Figura 9:** Proteína Del com alterações em epítomos transmembranares e intracelulares em pontos diferentes das alterações das Variantes RhD Fraco (43).

Recentemente estudos realizados na China demonstraram que indivíduos com o fenótipo Del que apresentavam densidades antigênicas inferiores a 22 sítios antigênicos por hemácia podem ser considerados RhD-negativo, pois não produzem aloimunização (55). Mas segundo a literatura, ainda há controvérsias em relação à imunogenicidade do antígeno Del e, portanto quando se identifica o alelo Del molecularmente em doadores de sangue, não se recomenda transfundir a receptores RhD-negativo (53, 54).

Fazer a distinção sorológica entre os antígenos D fraco e RhD parcial de baixa densidade antigênica é muito difícil, e mesmo com a grande variedade de monoclonais anti-D disponíveis, ainda se classifica alguns RhD parciais como D fracos. Porém esta diferenciação é importante, principalmente em pacientes e gestantes, pois podem auxiliar nos procedimentos transfusionais e na profilaxia Rh (56). Técnicas moleculares têm sido indicadas para esta finalidade e atualmente estão sendo amplamente utilizadas na definição das variantes de RhD (57, 58).

Pelo fato de estes estudos demonstrarem que as variantes do antígeno RhD em pacientes portadores de Anemia Falciforme são diversas e estão associadas também à Síndrome da Hiperhemólise (24), que é constituída por uma complicação de aloimunização relatada após transfusão de sangue, que leva a diminuição do nível de hemoglobina e à reticulocitose, o que resulta na destruição das hemácias autólogas e alogênnias em pacientes falciformes, aumentando assim da severidade da fisiopatologia existente nesta doença, ocasionada pela anemia crônica causada após a administração de concentrado de hemácias nestes pacientes (59, 60).

Diante destes dados vimos que as variantes RhD podem estar não só implicadas à aloimunizações, como também na indicação de transfusão de sangue nestes indivíduos, porém não existem dados explicando uma associação destas variantes com a redução do tempo de vida das hemácias.

O que talvez possa também estar contribuindo para um número aumentado de transfusões em indivíduos falciformes portadores das variantes de RhD.

Este estudo se faz relevante pela ciência de estudos relacionados às variantes RhD e a necessidade de transfusão de sangue em pacientes portadores de Anemia Falciforme serem escassos, motivo este que nos levou a questionar uma possível associação das variantes RhD e a necessidade de transfusão de sangue em pacientes portadores da Doença Falciforme.

## *Objetivos*

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Descrever as variantes *RHD* encontradas em pacientes portadores da doença falciforme do Estado do Amazonas.

### **2.2 Objetivo específico**

Investigar a associação das variantes *RHD* com e as transfusões de concentrados de hemácias em pacientes portadores da doença falciforme.



## *Casuística e Métodos*

---

### **3. CASUÍSTICA**

#### **3.1 Área de Estudo**

- Cidade de Manaus

#### **3.2 Indivíduos do Estudo**

- Pacientes portadores da doença falciforme.

#### **3.3 Critérios de Elegibilidade**

Pacientes portadores da doença falciforme, provenientes do Hemocentro do Amazonas e de qualquer gênero, idade e ancestralidade, independentes de achados clínicos e laboratoriais, com qualquer número de transfusão sanguínea.

#### **3.4 Tamanho da Amostra**

As amostras estudadas foram compostas por 128 pacientes falciformes, dos 202 atendidos no HEMOAM.

### **4. MÉTODOS**

#### **4.1 Modelo do Estudo**

Analisamos transversalmente 128 amostras de pacientes falciforme, após o consentimento informado. Posteriormente as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Imunohematologia para a realização dos testes de fenotipagem RhD, genotipagem *RHD* e genotipagem *RHD* parcial.

A fenotipagem RhD foi realizada pelo método clássico da hemaglutinação em tubo e a genotipagem *RHD* para a detecção de uma sequência do intron 4 e exon 7 pela técnica de PCR multiplex para todas as amostras.

Para a caracterização das variantes *RHD* parciais, foi realizada a genotipagem *RHD* Parcial, pela técnica de PCR multiplex convencional para as 128 amostras coletadas.

Investigamos ainda retrospectivamente os prontuários dos pacientes falciforme desde sua entrada até o momento atual, para verificarmos o histórico do número de transfusões, estabelecendo assim uma possível associação entre o número de transfusões e a presença ou não de variantes RhD nesses pacientes. Para uma melhor compreensão dessa possível associação, realizamos os seguintes cortes, considerando também a idade dos pacientes em cada faixa do número de transfusões (quadro 1):

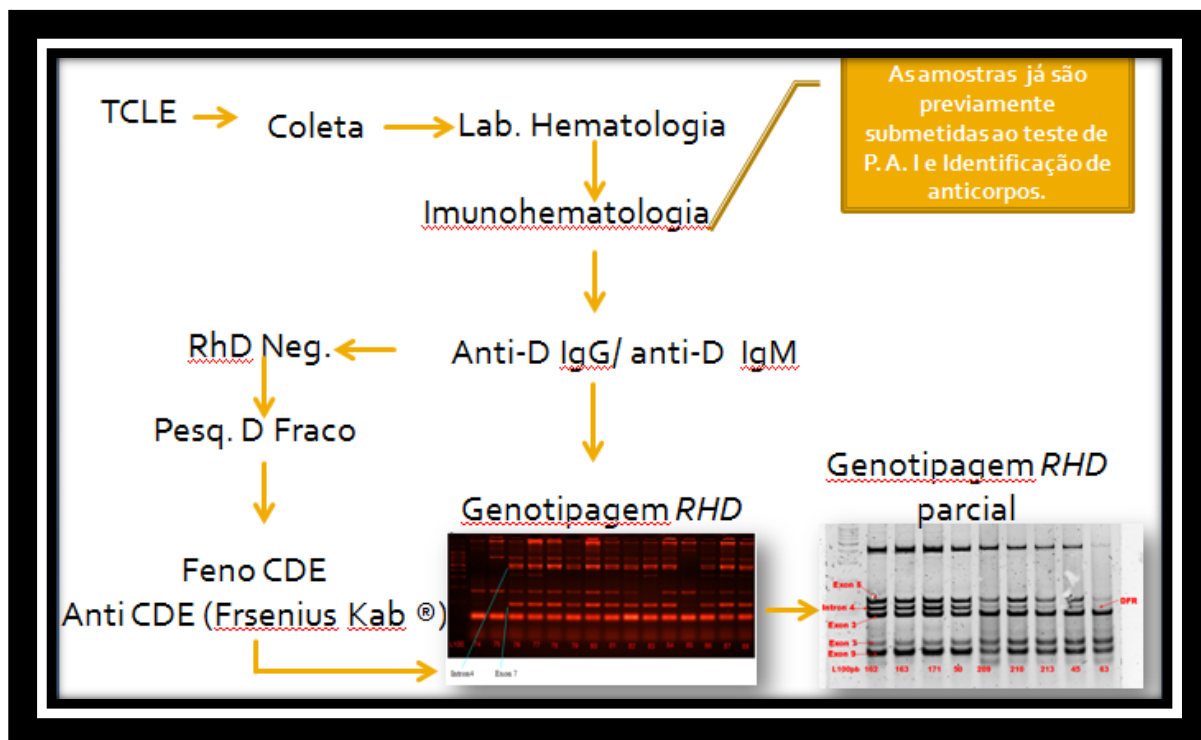
<b>Número de transfusões</b>
0 – 16
17 – 33
34 – 50
51 – 66

Quadro 1: Corte quanto ao número de transfusões

#### **4.2 Inclusão dos Pacientes**

Foram coletadas amostras de sangue de 128 pacientes falciforme, por conveniência após o atendimento ambulatorial, assim como durante a internação dos mesmos. Neste momento foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) com assinatura dos pais ou responsáveis quando menores de idade.

Foram coletadas amostras de sangue venoso, anticoaguladas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), obtidas de pacientes falciforme atendidos no HEMOAM, no período de outubro de 2013 a maio de 2014. Essas amostras foram coletadas do Laboratório de Hematologia e encaminhadas ao Laboratório de Imunohematologia para a realização dos testes imunohematológicos e moleculares, como mostra o fluxograma abaixo.



Fluxograma metodológico

## 5. MÉTODOS LABORATORIAIS

### 5.1 Fenotipagem RhD

Foi utilizada a clássica técnica de hemaglutinação em tubo, utilizando os reagentes anti-D classe IgG clone MS26 e anti-D classe IgM clone MS201. Sendo observado o resultado positivo através da reação de aglutinação (61). Utilizamos o anti-D IgM monoclonal clone MS 201 (Fresenius Kabi, Itapecerica da Serra, SP Brasil) e anti-D IgG monoclonal soro clone MS26 (Fresenius Kabi, Itapecerica da Serra, SP Brasil), de alto teor proteico e um reagente controle para o monoclonal IgG (Fresenius Kabi, Itapecerica da Serra, SP Brasil).

O reagente SOROCLONE® anti-D IgM MS201 (Fresenius Kabi, Itapecerica da Serra, SP Brasil) identifica os antígenos RhD normais e RhD variantes DF1, DF3, DF4, DBT, DII, DIIIa, DIIIb, DIVa, DIVb, DVa, DFR, Dar, HMi, Howe, Casar 1, Lore e Sor. O SOROCLONE® anti-D IgG MS26 (Fresenius Kabi, Itapecerica da Serra, SP Brasil), através do teste indireto da antiglobulina humana identifica o antígeno RhD parcial VI e também os antígenos DF1, DF2, DF3, DF4, DIII, DVa, DFR, HMi, Howe, Carr, Casar 1 e Lore. E o reagente controle Rh BSA® (Fresenius Kabi, Itapecerica da Serra, SP Brasil), tem a mesma composição que o reagente (com exceção do anticorpo) a fim de detectar falsas reações

positivas, que podem ser causadas por *rouleaux*, aglutinina frio ou auto- anticorpos (61). O protocolo da técnica encontra-se no anexo 1.

## **5.2 Pesquisa de D Fraco**

As amostras que obtiveram resultado negativo (ausência de aglutinação) na fenotipagem direta para os anti- RhD IgG e IgM, foram submetidas à prova D Fraco. Esta tem como princípio a ligação antígeno anticorpo, utilizando também a técnica de hemaglutinação em tubo, pelo Teste da Antiglobulina Indireta (TAI), o qual foi usado para demonstrar reações *in vitro* entre hemácias e anticorpos que foram sensibilizadas, mas não aglutinadas.

Este teste tem como objetivo determinar a presença do antígeno RhD de baixa expressão que podem ser detectadas por este teste. Isto porque alguns indivíduos expressam um sítio antigênico por hemácia muito baixo, levando a não detecção na tipagem direta. Portanto, pudemos identificar esta baixa expressão antigênica pela adição de soro de Antiglobulina Humana após incubação das hemácias com anti-D classe IgG clone MS26 ( Fresenius Kabi, Itapeccerica da Serra, SP Brasil), onde foi observada a presença ou não de aglutinação, cujo protocolo está disposto no anexo II.

## **5.3 Fenotipagem CDE**

A fenotipagem para os antígenos CDE foi realizada pela técnica de hemaglutinação em tubo, cujo princípio é a ligação antígeno anticorpo. Foram submetidas a esse teste as amostras que demonstraram resultado negativo para o teste de D Fraco, pois estudo de Wagner e Shao (53, 54) demonstrou, que indivíduos com fenótipo Del apresentam geralmente o antígeno C e/ou antígeno E, portanto indivíduos RhD negativo com o teste com o positivo para o anti-CDE podem ser um provável D<sub>el</sub>.

Para a realização desse teste utilizamos o regente monoclonal humano anti-CDE, de baixo teor proteico composto pelos reagentes anti-D classe IgM clone P3X61, anti-C de classe IgM P325513G8 e anti-E de classe IgM clone P3X234. Este reagente detecta os antígenos C, D e E do Sistema Rh. O protocolo está disposto no anexo III.

## **5.4 Extração de DNA genômico**

Para extração do DNA de leucócitos de sangue venoso periférico realizamos a técnica de fenol clorofórmio utilizando kit comercial Brazol™ LAC Biotecnológica. O Brazol é a versão otimizada do método de passo único baseada na metodologia desenvolvida por

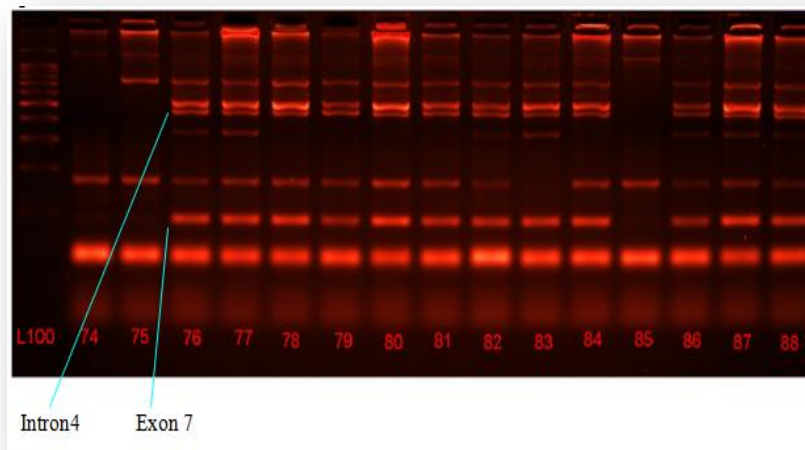
Chomczynski (62). Nessa técnica o DNA pode ser obtido na interfase entre a fase orgânica e a fase aquosa, através da adição de etanol e isopropanol, seguido de lavagem com etanol.

A concentração e a qualidade de todos os DNAs preparados foram analisadas através da concentração de DNA, o qual foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro a 260 nm realizadas no Nanodrop modelo 2000 Spectrophotometer. O protocolo desse procedimento está disposto no anexo IV.

### **5.5 Genotipagem *RHD* pela técnica de PCR multiplex**

O protocolo utilizado para genotipagem *RHD* foi cedido pelo Hospital Israelita Albert Einstein, cuja técnica foi padronizada por Singleton e colaboradores (34), que demonstrou que em virtude do alto grau de homologia entre os genes *RHD* e *RHCE*, considerou as diferenças existentes entre eles em duas regiões genômicas: o intron 4 e exon 7. No intron 4 o gene *RHCE* possui 600 pb a mais que o gene *RHD* e o exon 7 é específico do gene *RHD* (34). Para a determinação do pseudogene *RHD* utilizou-se a técnica de PCR multiplex que permite a amplificação dos alelos *RHCE*\*C/c na presença do gene e a detecção da duplicação de 37 pb no gene *RHD* conhecida como pseudogene *RHD* ou *RHD* $\Psi$  (34).

Para realização dessa PCR foi utilizado 200ng de DNA, 50pmol de cada oligonucleotídeo (*primer*) obtidos da Invitrogen® (Carlsbad, CA), 2mmol de cada desoxiribonucleotídeo (dNTP) obtidos da empresa Invitrogen® (Carlsbad, CA), 1,0 U de enzimas promotoras da clonagem e amplificação de genes (Taq DNA polimerase) obtidos da empresa Invitrogen® (Carlsbad, CA), São Paulo, SP e tampão em um volume final de 30 $\mu$ l. A análise dos produtos da PCR foi realizada pós eletroforese em gel de agarose obtida da empresa (LAC®, Biotecnologia, USA) a 1,5%, utilizando como controle o marcador molecular de 100pb (*lader*) obtidos da empresa (Invitrogen®, Carlsbad, CA), foram utilizados na análise do tamanho dos fragmentos de DNA como mostra a Figura 8.



**Figura 10:** Genotipagem RHD indicando a presença das bandas do intron 4 e exon 7.

As mutações de ponto associadas com este polimorfismo e a sequência dos *primers* utilizados foram obtidas da empresa Invitrogen® (Carlsbad, CA) encontram-se na tabela 1 e os ciclos de temperatura para a amplificação estão descritos na tabela 2.

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados na genotipagem *RHD*

<i>Primers</i>	Sequência	Genbank
EXON 7 for	5'-AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA -3'	
EXON 7 ver	5'-ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC -3'	AJ299026
INTRON 3 for 1	5'-GGG TTG GGC TGG GTA AGC TCT -3'	AB03519
		2
INTRON 4 rev	5'-GAA CCT GCT CTG TGA AGT GCT -3'	AB04153
		6
EXON 4 insert	5'-AAT AAA ACCC AGT AAG TTC ATG TGG -3'	AB04153
		6
INTRON 3 for	5'-AAC CTG GGA GGC AAA TG TT -3'	AB03519
2		2
C for	5'-CAG GGC CAC CAC CAT TTG AA 3'	X54534
C ver	5' -GAA CAT GCC ACT TCA CTC CAG 3'	U66340
c for	5 '-TCG GCC AAG ATC TGA CCG 3'	X54534
c ver	5' -TGA TGA CCA CCT TCC CAG G 3'	U66340

Tabela 2: Variações de temperatura utilizadas para anelamento e número de ciclos das PCRs utilizadas.

Genotipagem	Temperatura de anelamento	Nº de ciclos
<i>RHD</i> , <i>RHCE</i> , * <i>Cc</i> ,	95°C-15mim; (94°C – 1mim, 65°C – 1 mim, 72°C	30
<i>RHD</i> Ψ	- 3 mim e 30seg)	

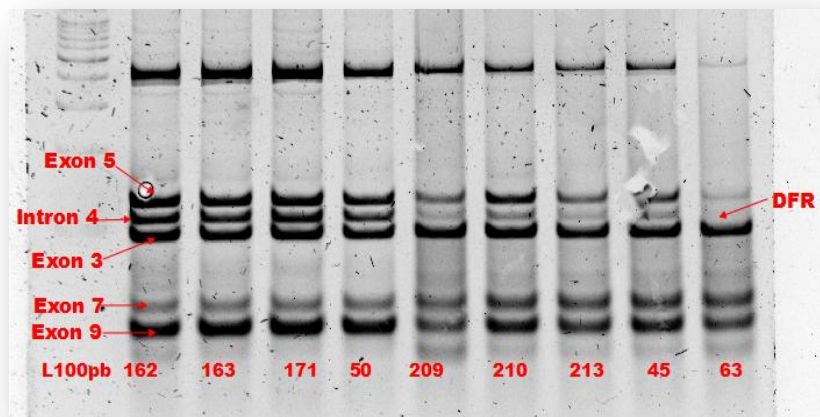
## 5.6 Genotipagem *RHD* parcial

O protocolo utilizado foi cedido pelo Hospital Israelita Albert Einstein, que foi primeiramente padronizado por Maaskant-van e colaboradores (63).

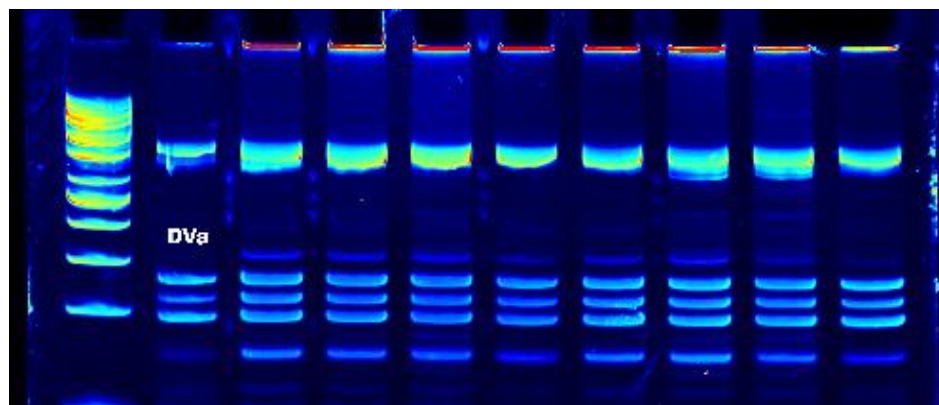
Seguindo o protocolo de Maaskant-van, foi realizada a técnica de PCR multiplex que amplifica 5 exons específicos do gene *RHD*, exons 5, 4, 3, 7 e 9. As variantes híbridas são identificadas pela ausência de uma dessas regiões promotoras (63). Para realização dessa PCR foi utilizado 200ng de DNA, 50pmol de cada oligonucleotídeo (*primer*) obtidos da Invitrogen® (Carlsbad, CA) cuja sequências estão descritas na tabela 3, 2mmol de cada



desoxiribonucleotídeo (dNTP) obtidos da empresa (Invitrogen®, Carlsbad, CA) , 1,0 U de enzimas promotoras da clonagem e amplificação de genes (Taq DNA polimerase) obtidos da empresa Invitrogen® (Carlsbad, CA), São Paulo, SP e tampão em um volume final de 30µl. A análise dos produtos da PCR foi realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida obtida da empresa (LAC®, Biotecnologia, USA) a 12%, utilizando como controle o marcador molecular de 100pb (*lader*) obtidos da empresa (Ivintrogen®, Carlsbad, CA), como mostra a Figura 9 e 10 e os ciclos de amplificação estão dispostos na tabela.



**Figura 11:** Genotipagem RHD parcial, demonstrando a ausência da banda que corresponde ao exon 4, caracterizando a variante *DFR*.



**Figura 12:** Genotipagem RHD parcial apresentando a variante DVa

Tabela 3: Sequência dos *primers* utilizados para a caracterização *RHD* parcial

Primers	Sequências	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'-tgtctagtttcttac 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 4: Variações de temperatura de anelamento e número de ciclos da técnica de PCR *RHD* Parcial.

<b>Genotipagem</b>	<b>Temperatura de anelamento</b>	<b>Nº de ciclos</b>
<i>RHD</i> Parcial que ocorrem por genes híbridos	95°C - 5mim (95°C – 1 mim, 58°C – 1 mim, 72°C por 45 seg	<b>32</b>

O protocolo da técnica esta disposto no anexo VI.

# *Resultados*

---

## 6. RESULTADOS

Do total de 202 pacientes falciformes, foram analisados 128 prontuários quanto ao número de transfusões recebidas desde a definição diagnóstica. Do total de pacientes, 76 não entraram no estudo pelos seguintes motivos: Evasão do tratamento, ou seja, indivíduos que compareciam esporadicamente às consultas e ainda pacientes que residiam em outro Município ou Estado.

Todas as amostras coletadas foram submetidas à fenotipagem RhD utilizando reagente anti-D classe IgG e anti-D classe IgM, produzidos a partir dos clones citados na metodologia deste estudo. Nestes testes encontramos resultados discrepantes com diferentes intensidades na leitura da aglutinação como o seguinte exemplo: 4 cruces em um reagente e 2 cruces no outro. Os resultados destas fenotipagens discrepantes e não discrepantes são demonstrados na tabela 5.

Tabela 5: Discrepâncias detectadas na reação sorológica entre os reagentes Anti-RhD de classe IgG e de Classe IgM.

Pacientes n	Discrepantes		Sem Discrepância	
	N	%	N	%
128	45	31,5	83	64,8

Dentre as 45 fenotipagens com resultados discrepantes, apenas 5 (11,1%) amostras foram confirmadas como RhD variante.

No entanto encontramos neste estudo, 08 amostras com RhD variante, sem discrepância na fenotipagem RhD como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6: RhD variantes e suas reações sorológicas.

RhD variantes	Discrepantes IgG e IgM	Sem discrepância	Total
DVa	05	02	07
DFR	-	01	01
Indeterminado	-	04	04
Total	05	07	12

Foram realizadas as genotipagens para o gene *RHD*, utilizando-se as técnicas de PCR multiplex tanto para a amplificação de regiões do intron 4 e exon 7, que determinam a presença do gene citado, tanto quanto para a caracterização de possíveis variantes do mesmo, nas regiões dos exons 5, 4, 3, 7 e 9 como descritos na metodologia.

Para facilitar a visualização da frequência de transfusões e presença de variantes RhD, realizamos os seguintes cortes de número de transfusões, como demonstrado na tabela 7.

Tabela 7: RhD variantes em pacientes falciformes de acordo com a frequência de transfusões.

Transfusão	Pacientes		RhD Variante		p
	n	%	N	%	
0 -16	102	80,95	08	66,66	0,4236
17-33	24	19,04	04	33,33	
	126	100,0	12	100,0	

Pode-se observar na tabela 7 a frequência de 66,66% de RhD variante no corte com a frequência de 0-16 transfusões. E dois pacientes que receberam mais de 33 transfusões não foram encontradas variantes RhD.

Nossos resultados demonstraram que dentre as variantes detectadas em nossos testes moleculares, a variante DVa foi a mais frequente das 128 amostras analisadas dentro da faixa de 0-16 amostras, como demonstrado na tabela 8.

Tabela 8: Variantes RhD encontradas, nas diferentes faixas de transfusão.

RhD Variante	Transfusões 0-16	%L %C	Transfusões 17-33	%	Total	
DVa	05	71,42	2	28,57	07	100,00
		50,00		100,00		41,17
DFR	01	100,00	-	-	01	100,00
		10,00				5,88
Indeterminado	04	100,00	-	-	04	100,00
		40,00		-		41,17
Total	10	83,33	02	16,66	12	100,00
		100,0		100,0		100,00

Na tabela 9 é demonstrado uma análise entre o número de transfusões, idade, presença de variantes DVa, DFR e Indeterminados e o desenvolvimento de anticorpos anti-D.

Tabela 9: Frequência de transfusões com variantes DVa, DFR e indeterminados.

Identificação da amostra	Transfusões	Idade	RhD variante	Presença de anticorpos anti-D
36	13	28	DVa	Neg
109	14	10	DVa	Neg
142	09	19	DVa	Neg
151	21	27	DVa	Neg
68	12	32	DVa	Neg
54	18	12	DVa	Neg
15	29	11	DVa	Neg
200	18	14	DFR	Neg
26	14	16	Ind	Neg
152	06	41	Ind	Pos
94	08	12	Ind	Neg
121	06	15	Ind	Pos

Dos pacientes com RhD variante, somente as amostras 152 e 121 apresentaram anticorpo anti-D.

## *Discussão*

---

## 7. DISCUSSÃO

Esse estudo é de grande importância por tratar-se dos primeiros resultados da detecção de variantes de RhD em pacientes portadores da doença falciforme do Estado do Amazonas, uma vez que nossa população é diferenciada de todo o restante do País. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, nossa população composta principalmente por brancos, pardos e indígenas. Pelo fato de nossa população ser composta de maneira diferenciada do restante do Brasil, sugerimos que nossos resultados tenham sido influenciados pela ancestralidade de nossa população.

Segundo Noizat, as variantes RH em pacientes portadores da doença falciforme são numerosas, tendo ela as estudado em indivíduos afro-caribenhos, sendo associadas à aloimunizações em pacientes politransfundidos (64). Isso porque a principal terapia para esses pacientes é a transfusão sanguínea, que os torna um grupo de risco em potencial para uma possível aloimunização. Noizat também demonstrou que os cinco principais antígenos eritrocitários que podem causar aloimunizações são respectivamente os antígenos (D, C, E, c, e). Há variações gênicas nestes antígenos resultantes de mutações causadas por alelos híbridos, dos quais o de maior relevância clínica é denominado de variante *RHD* parcial (64).

Corroborando com estudo de Noizat, Chou e Westhoff demonstraram que as variantes do gene *RHD* são de grande relevância na medicina transfusional para os pacientes falciformes, pois demonstraram que 22% dos pacientes portadores da doença falciforme afro-americanos possuem este gene híbrido, resultando em alterações em alguns epítomos da proteína RhD, levando esses pacientes a serem fenotipados como RhD positivo normais e, no entanto ao receber hemácias RhD positivo, desenvolvem anticorpo anti-D somente para o epítomo da proteína que está alterada, desencadeando o evento denominado da Síndrome da Hiper Hemólise, diminuindo ainda mais o tempo de vida dos eritrócitos em circulação.

Concordando com estudo de Noizat, Westhoff e colaboradores estudaram sorologicamente e molecularmente 39 pacientes afro-americanos, dos quais no estudo sorológico 18 (46,15%) apresentaram anticorpo anti-D (65). Corroborando com trabalho de Westhoff, Castilho e colaboradores, demonstraram também que em afro-brasileiros há uma alta frequência da variante *DIIIa* e *DAR*, também sugerindo um alto risco de aloimunização destes indivíduos, levando a diminuição do tempo de vida dos eritrócitos em circulação.

Ao contrário dos estudos de Westhoff e Castilho (27, 65), nossos resultados demonstraram uma alta frequência da variante *DVa* em pacientes portadores da doença falciforme, sendo esta descrita por Omi (66) e colaboradores na população japonesa. Portanto



a alta frequência desta variante nos pacientes falciformes do estado do Amazonas, pode ser mais um indicativo de que nossa população possui características genéticas semelhantes aos asiáticos, o que poderia explicar nossa frequência diferenciada do restante do Brasil.

Segundo Rouillac e colaboradores, a variante DVa (67) ocorre quando uma parte do gene *RHD* é substituído por um fragmento do gene *RHCE* na região do exon 5. Esse mecanismo de conversão gênica entre o gene *RHD* e o *RHCE*, resultou nas categorias RhD parciais, como demonstrou estudo realizado por Omi e colaboradores (66).

Segundo estudos realizados por Lomas e Scott, as categorias RhD parcial, que apresentam o fenótipo DVa são conhecidas pelas alterações que ocorrem nos epítomos 1 e 5 (sob o modelo de 9- epítomos) ou nos epítomos 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 26, 31 e 32 (sob o modelo de 37 epítomos) (68, 69). A partir do conhecimento molecular da variante DVa, sendo resultado de transcrições RhD-CE-D, em que o exon 5 do gene *RHD* é substituído por completo, ou somente um fragmento que corresponde exon 5 é substituída por fragmentos do gene *RHCE*. Omi e colaboradores também demonstraram um novo fenótipo associado à variante DVa, sendo por eles intitulado de DVa-like, onde estes apresentavam o padrão de aglutinação de hemácias semelhante ao DVa convencional. A diferença entre as variantes DVa e DVa-like pode ser confirmada através da técnica de sequenciamento de DNA.

Omi e colaboradores evidenciaram que as substituições de aminoácidos que ocorrem na posição 223 e 233 foram detectadas tanto nos fenótipos DVa e DVa-like, entretanto as substituições ente os aminoácidos nas posições 238 e 245 só ocorrem no fenótipo DVa-like (66). Portanto em contraste com estudo de Omi e colaboradores, no presente estudo detectamos supostamente somente a variante DVa, uma vez que a técnica empregada foi a biologia molecular convencional, descrita anteriormente na metodologia molecular, a qual só é capaz de detectar somente 15 das 200 variantes descritas atualmente.

Por outro lado, sugere-se que outros fatores também podem estar contribuindo para esta constante hemólise. Isso porque a membrana do eritrócito é composta por proteínas estruturais cruciais para a morfologia normal do eritrócito. Entre estas podemos citar a anquirina, CD47, espectrina e a proteína de ligação 4.2, as quais estão ligadas ao complexo Rh como demonstrou Nicolas (17) e colaboradores. Portanto alterações nas interações entre essas proteínas localizadas na bicamada lipídica e os componentes subjacentes que compõem o citoesqueleto do eritrócito, como a proteína Rh, podem levar também à diminuição do tempo de vida dos eritrócitos em circulação periférica. Corroborando com estudo de Nicolas, Ballas e colaboradores evidenciaram que a ausência da proteína Rh ( $Rh^{null}$ ) resulta em anemia

hemolítica denominada ovalocitose, devido à fragilidade causada pela ausência da proteína Rh, resultando alterações na proteína de ligação 4.2 que compõe o citoesqueleto eritrocitário.

Dentre os 54 antígenos do Sistema RH atualmente descritos pela Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue, o antígeno RhD, além de ser o mais imunogênico, também se faz importante na interação com o citoesqueleto do eritrócito. Em concordância a esses achados, Gahmberg & Karhi demonstraram que o antígeno Rho (D), sendo um polipéptido expresso na superfície eritrocitária RhD positivo, estão de 70 a 80% firmemente associados com o cito esqueleto do eritrócito, onde tal resultado foi obtido após essas células serem tratadas com Triton X100 (70). Sendo assim, sugere-se que as variações no antígeno RhD podem estar influenciando à uma maior fragilidade da membrana eritrocitária diminuindo ainda mais seu tempo de vida em circulação, sugerindo-se que os pacientes falciformes portadores dessas variantes podem estar mais suscetíveis a um maior número de transfusões.

#### **1- ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR**

A diferença entre hemácias que apresentam variantes RhD parciais, as quais apresentam epítomos alterados, daquelas que possuem a densidade antigênica mais baixa ( $D_{el}$  e RhD Fraco) é importante para evitar possíveis aloimunizações. Whestoff e colaboradores (46) demonstraram que devido às limitações dos reagentes utilizados na técnica de hemaglutinação para diferenciar as variantes RhD, muitos pacientes têm produzido anticorpo anti-D, por terem sido considerados RhD positivo.

Neste trabalho, realizamos o estudo sorológico e molecular de 128 (100%) de pacientes portadores da doença falciforme atendidos no HEMOAM, das quais 45 (35,15%) apresentaram discrepância de resultados entre os reagentes anti-D classe IgM e anti-D classe IgG, sendo que destas somente 5 (11,11%) foram caracterizadas molecularmente como RhD parcial. Em contraste com estudo feito por Credidio (43), onde foi utilizada a mesma técnica de hemaglutinação em tubo, nossos resultados mostram que nem todas os RhD parciais DVa irão apresentar discrepância entre os reagentes anti-D IgM e anti-D IgG, resultando em uma transfusão de hemácias RhD positivo normal, para um paciente que possui alteração em alguns epítomos da proteína RhD, levando-o a uma possível aloimunização.

Ainda obtivemos 2 amostras que foram classificadas como inconclusivas, uma vez que essas amostras demonstraram resultados sem discrepância entre os reagentes anti-D IgM e anti-D IgG, as mesmas apresentaram anticorpos anti-D, sugerindo que podemos estar diante

de uma possível variante RhD parcial, mas que a técnica sorológica aplicada não foi capaz de evidenciar.

Ao contrário dos resultados de Castilho e colaboradores (27), nossos resultados demonstram que das 12 amostras caracterizadas como RhD variante, somente 2 (16,66%) apresentaram o desenvolvimento de anticorpos anti-D, sugerindo-se que nem todas as variantes RhD parciais são capazes de desenvolver anticorpos anti-D.

Entretanto, encontramos 2 amostras RhD positivo, sem discrepância de intensidade de aglutinação e na genotipagem, apresentando os intron 4 e exon 7 e a presença dos exons 5, 4, 3, 7 e 9 na genotipagem *RHD* parcial. No entanto, esses apresentavam anticorpo anti-D, demonstrando novamente uma possível presença de variantes RhD nessa população, sugerindo que o número de variantes nessa população pode ser muito maior do que o encontrado nesse estudo, pois a técnica utilizada apresenta limitações, sendo capaz de detectar somente 15 variantes (63) das mais de 200 atualmente descritas (71).

Das 128 amostras genotipadas para o intron 4 e exon 7, encontramos 1 amostra que apresentou a ausência do intron 4 e 1 amostra apresentando ausência do exon 7 na genotipagem *RHD*. Apesar de ambas as amostras apresentarem a amplificação dos exons 5, 4, 3, 7 e 9 na caracterização das variantes *RHD*, as quais as classificamos como indeterminadas.

Por outro lado detectamos 2 amostras que apresentaram o intron 4 e o exon 7 na genotipagem *RHD* e a presença dos exons 5, 4, 3, 7 e 9 na genotipagem *RHD* parcial, ao passo que também possuíam anticorpo anti-D. Por isso classificamos como indeterminadas. Nas genotipagens *RHD* parcial, foram caracterizadas 7 (3,90%) amostras como DVa e 1 (0,78%) e 1 amostra como DFR, uma vez que a técnica manual utilizada ainda apresenta muitas limitações para a caracterização de todas as variantes existentes atualmente, evidenciando a necessidade de técnicas mais específicas e sensíveis que sejam capazes de caracterizar um número maior de polimorfismos existentes em nossa população de estudo.

Nossos resultados juntamente com publicações anteriores da literatura demonstram claramente que as técnicas sorológicas devem ser associadas à biologia molecular, para assim aumentar consideravelmente a segurança transfusional devido a uma melhor caracterização dos antígenos RhD para pacientes dependentes da terapia transfusional e ainda buscar um maior conhecimento sobre as interações desse antígeno com outras proteínas cruciais para a estabilidade normal do eritrócito.

## *Conclusão*

---

## 8. CONCLUSÃO

Considerando os objetivos do presente trabalho, as condições em que foi realizada as técnicas sorológicas e moleculares para a caracterização das variantes RhD em amostras de sangue e DNA de pacientes portadores da doença falciforme podemos concluir que:

- 1- Os antígenos RhD parciais mais frequentes em nossa população de estudo foi DVa, seguido da variante DFR.
- 2- Não foi possível detectar e diferenciar por técnica sorológica antígenos RhD variantes.
- 3- Pacientes com variante DVa, não desenvolveram anticorpo anti-D, uma vez que em nossos resultados, demonstraram que 3 amostras com anticorpo irregular, caracterizadas com esta variante não foi identificado o anticorpo como anti-D.
- 4- Nossos resultados demonstram que o estudo sorológico e a biologia molecular em associação podem aumentar consideravelmente a segurança transfusional pela melhor caracterização das variantes do antígeno RhD em nossa população de estudo.
- 5- Demonstramos que somente a técnica de PCR multiplex para a caracterização das variantes *RHD* parciais utilizada, não é capaz de distinguir e caracterizar todas as variantes existentes nessa população, havendo a necessidade de técnicas mais específicas que possam abranger um maior número de polimorfismos como a técnica de *Microarray*.
- 6- A presença de RhD variantes não está implicada a suscetibilidade a um maior número de transfusões em pacientes portadores da doença falciforme.

## ***Referências Bibliográficas***

---

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Diagnóstico M. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. 2002;1.
2. Pauling L, Itano HA, Singer S, Wells IC. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. Landmarks in Medical Genetics: Classic Papers with Commentaries. 1949;51:200.
3. Naoum PC, Naoum FA. Doenças das células falciformes. São Paulo, Sarvier. 2004.
4. Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. Rev bras hematol hemoter. 2007;29(3):207-14.
5. Cerami A, Peterson CM. Cyanate and sickle-cell disease. Scientific American. 1975;232(4):44.
6. Ruiz MA. Anemia falciforme. Objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. Rev bras hematol hemoter. 2007;29(3):203-6.
7. Naoum PC. Hemoglobinopatias e talassemias: Sarvier; 1997.
8. Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V, et al. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa: the Senegal type and the Benin type. New England Journal of Medicine. 1985;312(14):880-4.
9. Steinberg MH, Embury SH. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. Blood. 1986;68(5):985-90.
10. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil:[editorial]; Sickle cell disease in Brazil:[editorial]. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007;29(3):204-6.
11. de Galiza Neto GC, da Silva Pitombeira M. Aspectos moleculares da anemia falciforme. 2003.
12. Naoum PC, FA N. Hematologia Laboratorial-Eritrócitos. Edição da Academia de Ciência e Tecnologia São José do Rio Preto-SP. 2005.
13. Galili U, Clark MR, Shohet SB. Excessive binding of natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction. Journal of Clinical Investigation. 1986;77(1):27.
14. Hebbel RP, Miller WJ. Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and oxidative determinants of hemolytic anemia. Blood. 1984;64(3):733-41.
15. McCurdy PR, Sherman AS. Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia: a study with both DF32P and 51CR. The American journal of medicine. 1978;64(2):253-8.
16. Ballas SK, Clark MR, Mohandas N, Colfer H, Caswell M, Bergren M, et al. Red cell membrane and cation deficiency in Rh null syndrome. Blood. 1984;63(5):1046-55.
17. Nicolas V, Le Van Kim C, Gane P, Birkenmeier C, Cartron J-P, Colin Y, et al. Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rhnull-associated mutation. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(28):25526-33.
18. Bruce LJ, Ghosh S, King MJ, Layton DM, Mawby WJ, Stewart GW, et al. Absence of CD47 in protein 4.2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex Presented at the 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 7-11, 2001, and abstract published in Blood. 2001; 98:(suppl1): 10a. Blood. 2002;100(5):1878-85.
19. Rosse W, Gallagher D, Kinney T, Castro O, Dosik H, Moohr J, et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood. 1990;76(7):1431-7.
20. Aygun B, Padmanabhan S, Paley C, Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. Transfusion. 2002;42(1):37-43.
21. Noizat-Pirenne F, Lee K, Le Pennec P-Y, Simon P, Kazup P, Bachir D, et al. Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety. Blood. 2002;100(12):4223-31.
22. Huang C-H. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. Current Opinion in Hematology. 1997;4(2):94-103.
23. Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. JAMA: The Journal of the American Medical Association. 1984;251(10):1316-7.

24. Chou ST, Westhoff CM. Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. *ASH Education Program Book*. 2009;2009(1):178-84.
25. Storry J, Castilho L, Daniels G, Flegel W, Garratty G, Francis C, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Berlin report. *Vox sanguinis*. 2011;101(1):77-82.
26. Agre P, Cartron J-P. Molecular biology of the Rh antigens. *Blood*. 1991;78(3):551-63.
27. Castilho L, Rios M, Rodrigues A, Pellegrino J, Saad S, Costa F. High frequency of partial DIIIa and DAR alleles found in sickle cell disease patients suggests increased risk of alloimmunization to RhD. *Transfusion Medicine*. 2005;15(1):49-55.
28. Le van Kim C, Mouro I, Cherif-Zahar B, Raynal V, Cherrier C, Cartron J-P, et al. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(22):10925-9.
29. Cherif-Zahar B, Mattei M, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron J-P, Colin Y. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34. 3–1p36. 1 by in situ hybridization. *Human genetics*. 1991;86(4):398-400.
30. Carritt B, Kemp T, Poulter M. Evolution of the human RH (rhesus) blood group genes: a 50 year old prediction (partially) fulfilled. *Human molecular genetics*. 1997;6(6):843-50.
31. Cartron J-P. Defining the Rh blood group antigens: biochemistry and molecular genetics. *Blood reviews*. 1994;8(4):199-212.
32. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron J-P. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood*. 1991;78(10):2747-52.
33. Race R. Modern concepts of the blood group systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1965;127(2):884-91.
34. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000;95(1):12-8.
35. Avent N, Butcher S, Liu W, Mawby W, Mallinson G, Parsons S, et al. Localization of the C termini of the Rh (rhesus) polypeptides to the cytoplasmic face of the human erythrocyte membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(21):15134-9.
36. Stratton F. A new Rh allelomorph. *Nature*. 1946;158:25.
37. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000;95(2):375-87.
38. Rouillac C, Gane P, Cartron J, Le Pennec P, Cartron J, Colin Y. Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D (Du) and RhC/e in RN phenotypes. *Blood*. 1996;87(11):4853-61.
39. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular Basis of Weak D Phenotypes Presented at the 25th Congress of the International Society of Blood Transfusion held in Oslo on June 29, 1998 and published in abstract form in *Vox Sang* 74: 55, 1998 (suppl). *Blood*. 1999;93(1):385-93.
40. Flegel W, Khull S, Wagner F. Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs. *Transfusion*. 2000;40(4):428-34.
41. Müller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schönitzer D, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion*. 2001;41(1):45-52.
42. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Müller TH, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*. 2000;95(8):2699-708.
43. Credidio DC. Variantes do antígeno RhD: estudo sorológico e molecular. 2010.
44. Mota M, Fonseca N, Rodrigues A, Kutner J, Castilho L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox sanguinis*. 2005;88(2):130-5.
45. Wagner F, Flegel W. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology/American Red Cross*. 2004;20(1):23.
46. Westhoff CM. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion*. 2004;44(11):1663-73.



47. Hemker M, Ligthart P, Berger L, Van Rhenen D, Van Der Schoot C, Maaskant-van Wijk P. DAR, a new RhD variant involving exons 4, 5, and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African blacks. *Blood*. 1999;94(12):4337-42.
48. Wagner FF, Ladewig B, Angert KS, Heymann GA, Eicher NI, Flegel WA. The DAU allele cluster of the RHD gene. *Blood*. 2002;100(1):306-11.
49. Green GA. Autologous IgM, IgA, and complement binding to sickle erythrocytes in vivo. Evidence for the existence of dense sickle cell subsets. *Blood*. 1993;82(3):985-92.
50. Okuda H, Kawano M, Iwamoto S, Tanaka M, Seno T, Okubo Y, et al. The RHD gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;100(2):373.
51. Daniels G, Green C, Smart E. Differences between RhD-negative Africans and RhD-negative Europeans. *The Lancet*. 1997;350(9081):862-3.
52. Körmöczi GF, Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion*. 2005;45(10):1561-7.
53. Wagner T, Körmöczi GF, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*. 2005;45(4):520-6.
54. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion*. 2005;45(10):1581-4.
55. Shao C-P. Transfusion of RhD-positive blood in "Asia type" DEL recipients. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(5):472-3.
56. Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion*. 2008;48(3):473-8.
57. Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clinical Laboratory*. 2002;48(1-2):53-60.
58. Polin H, Danzer M, Hofer K, Gassner W, Gabriel C. Effective molecular RHD typing strategy for blood donations. *Transfusion*. 2007;47(8):1350-5.
59. Ballas SK, Marcolina MJ. Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. *Transfusion*. 2006;46(1):105-10.
60. Talano J-AM, Hillery CA, Gottschall JL, Baylerian DM, Scott JP. Delayed hemolytic transfusion reaction/hyperhemolysis syndrome in children with sickle cell disease. *Pediatrics*. 2003;111(6):e661-e5.
61. Judd WJ, Johnson ST, Storry J. *Judd's methods in immunohematology*: AABB press; 2008.
62. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993;15(3):532-4, 6-7.
63. Maaskant-van Wijk P, Faas B, Ruijter Jd, Overbeeke M, Borne A, Rhenen Dv, et al. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion*. 1998;38(11-12):1015-21.
64. Noizat-Pirenne F. Relevance of blood groups in transfusion of sickle cell disease patients. *Comptes rendus biologiques*. 2013.
65. Westhoff CM, Vege S, Halter-Hipsky C, Whorley T, Hue-Roye K, Lomas-Francis C, et al. DIIIa and DIII Type 5 are encoded by the same allele and are associated with altered RHCE\* ce alleles: clinical implications. *Transfusion*. 2010;50(6):1303-11.
66. Omi T, Takahashi J, Tsudo N, Okuda H, Iwamoto S, Tanaka M, et al. The Genomic Organization of the Partial D Category D<sup>ce</sup> Va: The Presence of a New Partial D Associated with the D<sup>ce</sup> Va Phenotype. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;254(3):786-94.
67. Rouillac C, Colin Y, Hughes-Jones N, Beolet M, D'Ambrosio A, Cartron J, et al. Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid Rh D-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood*. 1995;85(10):2937-44.
68. Lomas C, Tippett P, Thompson K, Melamed M, Hughes-Jones N. Demonstration of Seven Epitopes on the Rh Antigen D Using Human Monoclonal Anti-D Antibodies and Red Cells from D Categories. *Vox sanguinis*. 1989;57(4):261-4.

69. Scott M, Voak D, Jones J, Avent N, Liu W, Hughes-Jones N, et al. A structural model for 30 Rh D epitopes based on serological and DNA sequence data from partial D phenotypes. *Transfusion clinique et biologique*. 1996;3(6):391-6.
70. Gahmberg CG, Karhi KK. Association of Rho (D) polypeptides with the membrane skeleton in Rho (D)-positive human red cells. *The Journal of Immunology*. 1984;133(1):334-7.
71. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. *The blood group antigen factsbook*: Academic Press; 2012.

## *Apêndice*

---

**APÊNDICE****APÊNDICE I – Equipe Científica**

<b>NOME</b>	<b>FORMAÇÃO</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>ÓRGÃO</b>	<b>ATIVIDADE</b>
Sérgio Albuquerque	Farmacêutico	Doutor	Hemoam	Imunohematologista
Lucianna Tezza	Farmacêutica	Graduada	UFAM	Biologia Molecular
Alexandre Terço	Acad. Farmácia	Graduando	UNINORTE	Bolsista PAIC
Agda Lima	Acad. Biomedicina	Graduanda	FAMETRO	Bolsista PAIC
Diana Mota	Acad. Biomedicina	Graduanda	FAMETRO	Bolsista PAIC
Lya de Assis	Biomédica	Graduada	FAPEAM	Bolsista DCTA
Nayane de Paula	Biomédica	Graduada	FAPEAM	Bolsista DCTA
Edalton Sanguino	Biólogo	Especialista	UFAM	Biotecnologia
Rechfy Kassem	Biomédica	Graduada	UEA	Biologia Molecular
Edson Lira	Estatístico	Especialista	HEMOAM	Análise estatística

APENDICE II – TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### APENDICE III – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM, sob o parecer 0015.0.112.000-09.

APENDICE IV- QUESTIONÁRIO

**Estudo das variantes *RHD* em pacientes portadores da doença falciforme do Estado do Amazonas, Brasil**

FICHA DE DADOS DO PARTICIPANTE

Nº do Paciente \_\_\_\_\_

Data     /     /

Nº do Prontuário \_\_\_\_\_

1	Nome completo e/ou responsável	
2	Data do nascimento	Naturalidade
3	Gênero: Masculino (   )    Feminino (   )	
4	Endereço:	
5	Telefone:	
6	Uso de medicamentos (   ) SIM (   )NÃO	Qual?
7	Já apresentou quadro de reação Transfusional? Sim (   ) Não (   )	Qual sintoma?

APENDICE V- Quadro com os nossos achados da faixa de transfusão 0 a 16

Quadro 2: Quadro demonstrando nossos achados na faixa de transfusão de 0 – 16 transfusões.

<b>Paciente</b>	<b>Idade</b>	<b>Nº de transfusão</b>	<b>P.A.I</b>	<b>I.A.I</b>	<b>TAD</b>	<b>D variante</b>
05	13	12	-	-	-	-
06	28	14	+	-	-	-
07	23	5	+	-	-	-
8	19	5	-	-	-	-
23	29	15	-	-	+	-
26	28	14	-	-	+	Ind
34	10	9	-	-	-	-
<b>36</b>	<b>28</b>	<b>13</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>DVa</b>
38	27	4	-	-	-	-
40	27	13	-	-	-	-
41	9	12	-	-	-	-
66	18	3	-	-	-	-
69	8	7	-	-	-	-
71	15	15	-	-	-	-
75	4	13	-	-	-	-
77	7	10	-	-	-	-
78	2	6	-	-	-	-
79	2	5	-	-	-	-
81	28	14	-	-	-	-
82	3	6	-	-	-	-
83	32	4	-	-	-	-
85	7	5	-	-	-	-
86	14	10	-	-	-	-
87	9	12	-	-	-	-
88	8	9	-	-	-	-
90	14	2	-	-	-	-
91	12	9	-	-	-	-
92	2	14	-	-	-	-
93	38	9	-	-	-	-
94	11	10	+	-	+	Ind
95	26	8	+	-	+	-
96	11	6	-	-	-	-
97	27	8	+	-	-	-
99	20	4	-	-	-	-
100	17	5	+	-	-	-



101	28	30	+	-	+	-
102	14	3	-	-	-	-
103	6	4	+	K	-	-
104	15	8	-	-	-	-
105	36	8	-	-	-	-
106	11	10	+	-	+	-
107	7	9	-	-	-	-
109	10	14	-	-	-	DVa
110	12	6	-	-	-	-
111	12	13	-	-		-
112	15	2	-	-	+	-
113	13	6	-	-	-	-
114	7	5	+	-	+	-
115	30	13	+	E	+	-
116	7	9	-	-	-	-
117	27	10	-	-	-	-
118	18	17	-	-	-	-
119	4	9	-	-	-	-
120	11	4	-	-	-	-
121	14	6	+	D,E	+	-
122	16	5	-	-	-	-
123	11	6	-	-	-	-
124	9	14	-	-	-	-
125	14	3	+	-	+	-
126	22	6	+	-	+	-
127	32	9	+	K	+	-
128	45	0	-	-	-	-
129	14	9	-	-	-	-
130	9	2	-	-	-	-
133	15	12	-	-	-	-
134	1	2	-	-	-	-
135	27	6	-	-	-	-
136	6	14	-	-	+	-
137	2	8	-	-	-	-
138	23	4	-	-	-	-
139	32	6	-	-	-	-
140	14	11	-	-	+	-
141	19	1	-	-	-	-
142	19	10	+	?	-	DVa
143	18	23	?	?	?	-
144	17	3	-	-	-	-
145	18	9	?	?	?	-

146	9	14	-	-	+	-
147	47	7	-	-	-	-
148	29	8	-	-	-	-
149	17	16	-	-	-	-
150	14	12	-	-	-	-
152	42	6	+	D	-	-
153	15	1	-	-	-	-
154	3	0	-	-	-	-
155	28	1	-	-	-	-
156	20	8	-	-	-	-
157	25	9	-	-	-	-
158	17	7	-	-	-	-
159	25	2	-	-	-	-
160	6	7	-	-	-	-
161	21	9	-	-	-	-
162	46	2	-	-	-	-
165	3	15	-	-	-	-
166	15	0	-	-	-	-
167	37	0	-	-	-	-
168	20	14	-	-	+	-
169	17	13	-	-	-	-
360	21	14	-	-	-	Indeterminado
362	62	14	-	-	-	Indeterminado
363	21	5	-	-	-	Indeterminado
156	17	8	-	-	-	DVa

**Apendice VI – Quadro com nossos achados na faixa de transfusão de 17 a 33 transfusões.**

Quadro 3: Quadro demonstrando nossos achados na faixa de transfusão de 17 - 32 transfusões.

<b>Paciente</b>	<b>N. transfusões</b>	<b>Idade</b>	<b>P.A.I</b>	<b>LA</b>	<b>TAD</b>	<b>RhD varinate</b>
10	24	10	-	-	-	-
15	29	11	+	-	-	Dva
68	32	12	+	-	+	DVa
27	19	9	-	-	-	-
29	24	31	-	-	-	-
30	20	9	-	-	--	-
54	18	12	+	-	-	DVa
58	20	13	-	-	-	-
70	19	14	-	-	-	-
73	18	4	-	-	-	-
74	18	54	-	-	-	-
76	19	20	+	-	+	-
80	17	13	-	-	-	-
84	17	16	-	-	-	-
89	20	7	-	-	-	-
98	28	18	-	-	+	-
101	30	29	+	-	+	-
118	18	17	-	-	-	-
131	21	29	-	-	-	-
143	18	23	-	-	-	-
151	21	27	-	-	-	-
164	30	61	-	-	-	-
362	26	22	-	-	-	Ind
200	18	17	-	-	-	DFR



## APÊNDICE IX- CRONOGRAMA 2014

## Cronograma de atividades 2014

DESCRIÇÃO	MESES												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Bibliografia													
Coleta das Amostras													
Apresentação da Qualificação													
Coleta das Amostras													
Realização dos testes sorológicos													
Realização dos testes Moleculares													
Análise dos Resultados Laboratoriais	*	*	*	*	*	*							
Análise Estat.						*	*	*					
Elaboração Final da Dissertação							*	*	*				
Apresentação da Dissertação									*				



## ANEXOS

### ANEXO I

#### FENOTIPAGEM RhD SMART KIT (Fresenius Kabi, Itapecerica da Serra, SP Brasil)

- **Materiais**

A amostra é de sangue venoso anticoagulado em EDTA.

Tubos de hemólise, micropipetas semi-automáticas e centrífuga.

- **Preparo da amostra**

- 1- Preparar suspensão de 3 hemácias a 5% em solução salina (cloreto de sódio a 0,9%);
- 2- Centrifugar a amostra a 3500rpm por 3 minutos;
- 3- Dispensar em um tubo de hemólise 50µL do concentrado de hemácias da amostra já centrifugada;
- 4- Dispensar sobre as hemácias 950µL de solução salina;
- 5- Homogeneizar por pipetagem.

- **Procedimento**

- 1- Identificar os tubos de hemólise;
- 2- Dispensar em dois tubos de hemólise uma gota do reagente anti-D classe IgM em um dos tubos e uma gota do anti-D classe IgG no outro tubo teste;
- 3- Em um terceiro tubo, colocar uma gota de reagente CONTROLE Rh para anti-D IgG;
- 4- Acrescentar em cada tubo uma gota de suspensão de hemácias a 5% do sangue a classificar;
- 5- Homogeneizar e centrifugar por 15 segundos a 3500 rpm;
- 6- Ressuspender o “botão” de hemácias agitando delicadamente o tubo e observar a presença ou não de aglutinação.
- 7- A interpretação está disposta no quadro 2.

Quadro 4: Quadro de interpretação do resultado de fenotipagem em tubo com anti-D classe IgG e anti-D classe IGM

Reação com	Reação com	Reação com clone	Interpretação
------------	------------	------------------	---------------

clone Anti-D IgM à T.A	clone Anti-D IgG à T.A	anti-D IgG com HGH	dos resultados
+	+	NA	D positivo
-	-	-	D negativo
+	-	+	D fraco e /ou parcial
+	-	-	D parcial Em especial DII, DIV, DBT e DAR
-	-	+	D fraco e/ou parcial Em especial DF2 e DVI



## ANEXO II

### PESQUISA DE D FRACO

- 1- Lavar as hemácias que apresentam resultado negativo, por 3 vezes, com solução salina a 0,9%;
- 2- Decantar completamente a solução salina após a última lavagem;
- 3- Adicionar 2 gotas de Antiglobulina Humana (HGH Soro de Coombs) BSA<sup>®</sup> em cada tubo;
- 4- Homogeneizar e centrifugar os tubos por 15 segundos, a 3500 rpm;
- 5- Ressuspender o “botão” de hemácias agitando delicadamente o tubo e observar a presença ou não de aglutinação.
- 6- Anotar os resultados.

**OBS: Em caso de resultado negativo (ausência de aglutinação) validar o teste utilizando hemácias controle. (controle de Coombs).**

- 7- Adicionar 1 gota do reagente (controle de coombs);
- 8- Homogeneizar e centrifugar os tubos durante 15 segundos a 3500 rpm
- 9- Ressuspender o “botão” de hemácias agitando delicadamente o tubo e observar a presença ou não de aglutinação.

**OBS: Para validar o teste a reação deverá se tornar positiva (presença de aglutinação).**

## ANEXO III

### FENOTIPAGEM CDE (Fresenius Kabi, Itapeceira da Serra, SP Brasil)

#### Materiais

- 1- Amostra de sangue venoso anticoagulado com EDTA;
- 2- Tubos de hemólise;
- 3- Micropipetas semiautomáticas;
- 4- Centrífuga.

#### Preparo da amostra

- 1- Centrifugar a amostra por 5 minutos a 3500 rpm;
- 2- Dispensar em um tubo de hemólise em um tubo de hemólise 50µL de concentrado de hemácias da amostra a ser testada;
- 3- Dispensar sobre as hemácias 950µL de solução fisiológica para a obtenção de suspensão de hemácias a 5%;
- 4- Homogeneizar.

#### PROCEDIMENTO

- 1- Identificar os tubos de hemólise;
- 2- Dispensar 1 gota do reagente CDE em cada tubo de hemólise;
- 3- Acrescentar em cada tubo, 50µL de suspensão de hemácias a 5% do sangue a classificar;
- 4- Homogeneizar e centrifugar os tubos por 15 segundos a 3500 rpm;
- 5- Ressuspender o “botão” de hemácias agitando delicadamente e observar a presença ou não de aglutinação.
- 6- Interpretação dos resultados estão dispostos no quadro 3.

Quadro 5: Interpretação dos resultados com anti-CDE

Reação Anti-CDE	Interpretação
+	D e/ou C e/ou E positivo
-	CDE negativo

## ANEXO IV

### EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO (Brazol™ LAC Biotecnológica)

#### FASE 1 – EXTRAÇÃO DO DNA

- 1- Pipetar 200µL da amostra de sangue em um microtubo de 2,0 mL, devidamente identificados. Se possível pipetar somente o creme leucocitário (*buffy coat*);
- 2- Adicionar 400µL de Brazol gelado (4°C) e agitar no vortex até a mostra adquirir um aspecto homogêneo;
- 3- Adicionar 100µL de clorofórmio gelado (4°C) e misturar no vortex até a amostra adquirir uma coloração marrom;
- 4- Centrifugar a amostra 12 minutos a 10.000 rpm em T.A;
- 5- Após a centrifugação, retirar o microtubo cuidadosamente da centrífuga e verificar se a solução está dividida em duas fases;
- 6- Pipetar cuidadosamente o sobrenadante e transferir para tubos para tubos de 1,5 mL devidamente identificados;

#### FASE 2 – PRECIPITAÇÃO DO DNA GENÔMICO

- 1- Adicionar 500µL de etanol a 100% gelado (4°C), homogeneizar no vortex e observar a formação de um precipitado. O precipitado é usualmente visualizado em 30 e 60 segundos;
- 2- Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm em T.A;
- 3- Decantar o sobrenadante e adicionar novamente 500µL de etanol a 100% gelado (4°C);
- 4- Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm em T.A;
- 5- Decantar o sobrenadante;
- 6- Remover o etanol residual com pipeta e colocar no banho seco a 56°C por 10 minutos;
- 7- Adicionar 200µL de água destilada estéril em cada tubo (H<sub>2</sub>Odd);
- 8- Quantificar o DNA genômico utilizando o equipamento NanoDrop 1000;
- 9- Armazenar o DNA purificado a 4°C ou a -20°C.

## ANEXO V

GENOTIPAGEM *RHD* (Intro 4 e exon 7)Quadro 6: Protocolo PCR *RHD*

MIX	Produto	1 amostra
H <sub>2</sub> O		14,4 µL
Tampão (15Mm MgCl <sub>2</sub> )		3µL
MgCl <sub>2</sub>		1µL
dNTP		1µL
Exon 7 for/Exon 7 rev (100ng)	95pb	0,4/0,4µL
Intron 3 for 1/Intron 4 rev(100ng)	498/535 pb	0,3/0,4 µL
Intron 3 for 2/Exon 4 inset rev (100ng)	250pb	2,0/2,0µL
C for/ Crev (100ng)	320pb	1,3/0,5 µL
c for/c rev (100ng)	177 pb	0,5/0,5µL
Tap polimerase		0,3µL
Total		28,0µL
DNA		2,0µL

Ciclos de temperaturas de anelamento: 95°C por 15', 94°C por 1', 65,5°C por 1', e 72°C por 3' e 30'' (30 ciclos); 72°C por 10' e 4°C (Singleton, 2000).

Para a visualização das bandas e interpretação dos resultados, foi utilizado o gel de agarose a 1,5%, preparado dissolvendo-se 1,5 g de agarose e (Invitrogen®, Carlsbad, CA) em 100 ml de TEB 1X(Tris -Borato - EDTA). Esta solução foi aquecida em microondas, durante 1 minuto e, após o resfriamento, foi adicionado 1,2µL de brometo de etídio (Invitrogen®, Carlsbad, CA).

## ANEXO VI

GENOTIPAGEM *RHD* PARCIALQuadro 7: Protocolo de genotipagem *RHD* parcial

MIX	EXON	1 AMOSTRA
H <sub>2</sub> O		15,3µL
Tampão 10X (20mM MgCl <sub>2</sub> )		4µL
dNTP		1µL
MR648 (200ng)	Exon 5	0,7µL
Mrex5 (200ng)	Exon 5	0,7 µL
Mre9SD2 (100ng)	Exon 9	1,0µL
MR1219 (100ng)	Exon 9	1,0µL
MR364 (25ng)	Exon 3	0,3µL
MR474M (25ng)	Exon 3	0,3µL
MR973 (25ng)	Exon7	0,3µL
MR1068 (25ng)	Exon 7	0,3µL
MR621 (20ng)	Exon 4	0,3 µL
MR496 (20ng)	Exon 4	0,3µL
MR898 (25ng)	Exon6	0,2µL
Mrex6 (20ng)	Exon 6	0,2µL
HGH5580	Cont. Inter	0,3µL
HGH5967	Cont. Inter	0,3µL
Taq polimerase (5.0 U)		0,5µL
Total		27µL
DNA		3,0µL

Ciclos de temperatura para anelamento: 95°C por 5', 95°C por 1', 58°C por 1' e 72° por 45'' (32 ciclos); 72°C por 5' e 4°C. (Maaskant-van Wijk et al, 1998).

Para a visualização das bandas e interpretação dos resultados foi utilizado o gel de poliacrilamida a 12%, preparando-se em um Becker 12,2 de água deionizada e destilada (ddH<sub>2</sub>O), 6,4 de acrilamida a 40% (Invitrogen ®, Carlsbad, CA), 2 ml de TEB a 10X, 400µL

de persulfato de amônia 10% (Invitrogen ®, Carlsbad, CA) e 10 µL de TEMED (Invitrogen ®, Carlsbad, CA). A solução foi distribuída em 4 pares de de placas de vidro com suporte próprio e foi aguardada a polimerização.