

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO (FMRP)
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E
BIOTECNOLOGIA

ANA LUISA ALVES MAFRA

**Caracterização molecular de antígenos RhD variantes em doadores de
sangue da Fundação Hemocentro de Brasília - Distrito Federal**

Ribeirão Preto

2019

ANA LUISA ALVES MAFRA

Caracterização molecular de antígenos RhD variantes em doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília - Distrito Federal

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia
Área de Concentração: Hemoterapia e Medicina Profissional

Orientadora: Dra. Evandra Strazza Rodrigues Sandoval

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Mafra, Ana Luisa Alves

Caracterização molecular de antígenos RhD variantes em doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília, Distrito Federal. Brasília, 2019.

105 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional

Orientador: Dra. Evandra Strazza Rodrigues Sandoval

1.Sistema Rh 2. Antígeno RhD 3. D variantes 4. D Fraco 5. D Parcial.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Convênio 422118/2016-8).

Nome: Mafra, Ana Luisa Alves

Título: Caracterização molecular de antígenos RhD variantes em doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília, Distrito Federal.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia. Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

*Dedico essa vitória a **Deus**,
a Ele toda honra e toda glória.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** pela minha vida, pela minha saúde e por me capacitar para essa grande tarefa.

Aos meus pais **Valdomiro** e **Luiza**, professores natos, admiráveis, agradeço pelos ensinamentos, pelos exemplos e por serem as minhas grandes inspirações. Tudo o que sou devo a vocês.

À minha irmã **Valdeíza**, pela amizade incondicional e por ser meu porto seguro; e ao meu cunhado **Tiago**, que esteve sempre presente e torcendo por mim.

Aos meus irmãos **Paulo** e **Tiago**, por todo carinho.

Aos meus sobrinhos **João Felipe**, **Francisco**, **Daniel**, **Antônio** e **Paulo**, por encherem minha vida de alegria.

À minha avó **Catarina**, por todas as orações e todo amor a mim dedicado.

Aos meus amigos **Mike** e **Theo**, por estarem sempre ao meu lado e serem as minhas maiores alegrias em todos os momentos.

À minha amiga **Lucinete Monteiro** por todo o apoio e carinho. Não conseguiria sem você.

À minha orientadora muito querida, Prof^a. Dra. **Evandra Strazza Rodrigues Sandoval** por ser minha maior incentivadora. Agradeço por todos os ensinamentos, pelas palavras, pela paciência, pelo encorajamento, pela disponibilidade, amizade e cordialidade, que sempre me ofereceu.

À Dra. **Simone Kashima Haddad**, por abrir as portas do Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto para mim. Agradeço pela oportunidade, pela confiança e por me permitir vivenciar todos os momentos, como integrante da equipe.

A todos os **docentes** do programa de pós-graduação por todos os ensinamentos e experiências.

Aos colegas de turma, em especial à **Cynthia Yamada**, pelos bons momentos vividos.

A todos da equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto, **Slav, Juliana, Alex, Periclés, Rafaela, Marta, Elaine, Jonathan, Yan, Thalita, Carmem, Luciana e Adriana**, por toda a colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À biomédica do núcleo de imuno-hematologia do Hemocentro de Brasília, **Fabiola Gonçalves Ulhoa André** por toda a compreensão e por ter me apoiado em todos os momentos. Você foi fundamental na realização deste trabalho.

À gerente de laboratórios da Fundação Hemocentro de Brasília, **Bárbara Maciel Sidou Pimentel**, por todo o incentivo e apoio prestados.

Aos funcionários do núcleo de imuno-hematologia do Hemocentro de Brasília, em especial, **Nádia Ciocca, Wagner Mesquita, Franciele Amaral, Ana Teresa, Diego Franciel, Lorena Coelho, Thais Freitas, Meire Maria e Daphne Amaral** e a todos que me incentivaram, que souberam compreender minha ausência e me apoiaram.

Aos funcionários do laboratório de transplantes do Hemocentro de Brasília, em especial, **Josy, Kassia, Agenor e Jeferson**, por toda a ajuda prestada.

Aos amigos do Hospital Regional do Paranoá – DF por todo o apoio e compreensão.

A todos os funcionários da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e da USP-RP que estão envolvidos com este programa de pós-graduação, todos sempre muito prestativos e gentis.

Aos **doadores de sangue** que foram parte essencial para a construção de todo o trabalho.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

ANA LUISA

*“Mas na profissão, além de amar tem de saber,
e o saber leva tempo pra crescer”.*

Rubem Alves

RESUMO

MAFRA, Ana Luisa Alves. **Caracterização molecular de antígenos RhD variantes em doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília - Distrito Federal.** 2019. 105f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: O sistema de grupo sanguíneo Rh é altamente complexo e polimórfico sendo considerado, depois do sistema ABO, o sistema de maior significado clínico na medicina transfusional. Os anticorpos dirigidos contra os seus antígenos estão envolvidos em reações hemolíticas transfusionais, anemia hemolítica autoimune e doença hemolítica do feto e neonatos. O antígeno D é o mais imunogênico dos antígenos do sistema Rh e sua conformação na superfície das hemácias está disposta como um mosaico de diferentes epítomos. Alterações no gene *RHD*, que expressa a proteína RhD, podem ser detectadas pela variação na intensidade da reação sorológica, utilizando-se diferentes reagentes anti-D. As alterações ocorrem por diversos mecanismos genéticos e são responsáveis pelo aparecimento dos fenótipos D fraco e D parcial. Essas variantes podem apresentar mudanças qualitativas e/ou quantitativas na proteína RhD e estão frequentemente envolvidas em casos de aloimunização anti-D. A identificação e classificação dos fenótipos RhD variantes possuem alta relevância clínica, portanto, requerem uma rigorosa investigação molecular, uma vez que os testes sorológicos não são capazes de distinguir entre fenótipos D fraco e D parcial. Dessa forma, esclarecer os resultados fracos ou discrepantes encontrados na sorologia e determinar as variantes RhD têm grande importância para a comunidade científica e, principalmente, para a medicina transfusional. **Objetivos:** Caracterizar, por métodos moleculares, antígenos RhD variantes em amostras de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília que apresentaram fraca expressão do antígeno RhD. **Métodos:** Foram selecionadas para extração de DNA e investigação molecular de antígenos RhD variantes 103 de 7983 amostras de doadores de sangue que apresentaram tanto resultados negativo, inconclusivo ou fraco (menor que 2 cruces) na fenotipagem RhD, realizada por técnica em microplacas, como resultado positivo na confirmação de D fraco. Inicialmente, as amostras foram confirmadas quanto à presença do gene *RHD* por PCR multiplex *RHD* regiões íntron4/éxon7. Na sequência, técnicas de PCR alelo específico e RFLP foram utilizadas para triar as variantes D fraco tipos 1, 2, 3 e 4 ou DAR, seguido do sequenciamento de éxons específicos do gene *RHD* para investigação das demais variantes. As amostras foram avaliadas quanto à zigosidade por dosagem do gene *RHD*, por qPCR, e quanto à presença do Pseudogene (*RHDΨ*) e da deleção do gene *RHD*, por PCR-SSP. Os resultados encontrados foram interpretados em conjunto com os fenótipos RhCE também analisados. **Resultados:** Das amostras estudadas, 68,93% foram caracterizadas como RhD parcial; 21,36% como RhD fraco; 1,94% não apresentaram polimorfismos nos éxons do gene *RHD* e 2,91% apresentaram ausência de éxons *RHD* indicando a presença de um gene híbrido *RHD-CE-D* não definido. Entre as amostras RhD fraco, 16,5% eram *RHD**fraco tipo 3; 5,8% *RHD**fraco tipo 2; 1,94% *RHD**fraco tipo 1; 0,97% *RHD**fraco tipo 38 e 0,97% *RHD**fraco tipo 145. Entre as amostras RhD parcial, 33,01% eram *RHD**DAR 3.1; 32,04% *RHD**DAR 1.2; 1,94% *RHD**DVII; 0,97% *RHD** DOL 1; 0,97% *RHD** DOL 2. **Discussão e conclusão:** Nossos resultados demonstraram que as reações atípicas nos testes sorológicos para o antígeno RhD são indicativas da presença de variantes RhD. Os alelos *RHD**DAR subtipos foram os mais frequentemente encontrados nas amostras dos doadores de Brasília-Distrito Federal. Esses alelos estão associados à aloimunização anti-D. A caracterização de antígenos RhD variantes por meio da associação de testes sorológicos e métodos moleculares visa, principalmente,

determinar os fenótipos/genótipos associados à aloimunização anti-D. Essa caracterização é muito importante para aumentar a segurança transfusional, diminuir a administração desnecessária de imunoprofilaxia anti-D em gestantes e pode, também, colaborar com a preservação dos estoques escassos de unidades de sangue RhD negativo. Além disso, o conhecimento sobre a frequência e distribuição das variantes Rh contribui para a compreensão da origem multirracial da região estudada e auxilia no desenvolvimento de futuros protocolos de genotipagem *RHD* que estabeleçam estratégias de buscas de unidades de sangue compatíveis para pacientes portadores de variantes RhD.

Palavras-Chave: Sistema Rh. Antígeno RhD. RhD variantes. RhD Fraco. RhD Parcial.

ABSTRACT

MAFRA, Ana Luisa Alves. **Molecular characterization of variant RhD antigens in blood donors of the Fundação Hemocentro de Brasília - Distrito Federal**. 2019. 105f. Dissertation (Master) - University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School (FMRP / USP), Ribeirão Preto, 2019.

Introduction: The Rh blood group system is highly complex and polymorphic, and considered, after the ABO system, the system of greater clinical significance in transfusion medicine. Antibodies directed against its antigens are involved in hemolytic transfusion reactions, autoimmune hemolytic anemia and hemolytic disease of the fetus and newborn. Antigen D is the most immunogenic of the Rh system and its conformation on the surface of red blood cells is a mosaic of different epitopes. Changes in the *RHD* gene, which expresses the RhD protein, can be detected by variations in the intensity of the serological reaction by using different anti-D reagents. The changes occur as a result of several genetic mechanisms and are responsible for the appearance of weak D and partial D phenotypes. These variants may exhibit qualitative and/or quantitative changes in RhD protein and are often involved in anti-D alloimmunization. The identification and classification of variant RhD phenotypes are of high clinical relevance. Therefore, they require a rigorous molecular investigation, since serological tests are not able to distinguish between weak D and partial D phenotypes. Thus, clarifying the weak or discrepant results found in serology and determining RhD variants are of great importance to the scientific community and especially to transfusion medicine.

Objectives: To characterize, by molecular methods, variant RhD antigens in donor blood samples from the Blood Center Foundation of Brasília which showed poor expression of the RhD antigen. **Methods:** A total of 103 out of 7983 samples from blood donors who had negative, inconclusive or weak results (less than 2 crosses) in the microplate technique and also tested positive in the weak D confirmation test were selected for DNA extraction and molecular investigation of the RhD antigen. Initially, the presence of the *RHD* gene was confirmed in the samples by PCR multiplex *RHD* intron4/exon7 regions. Then, allele specific PCR and RFLP techniques were used to screen for weak D variant types 1, 2, 3 and 4 or DAR, followed by sequencing of specific exons of the *RHD* gene to investigate the other variants. Samples were evaluated for zygosity by *RHD* gene dosage by qPCR and for the presence of Pseudogene (*RHD*Ψ) and *RHD* gene deletion by PCR-SSP. The results were interpreted in conjunction with the RhCE phenotypes also analyzed. **Results:** Of all samples studied, 68.93% were characterized as partial RhD; 21.36% as weak RhD; 1.94% had no polymorphisms in the *RHD* gene exons and 2.91% had no *RHD* exons indicating the presence of an undefined *RHD-CE-D* hybrid gene. Among the weak RhD samples, 16.5% were weak *RHD**type 3; 5.8% *RHD* * weak type 2; 1.94% *RHD**weak type 1; 0.97% *RHD**weak type 38 and 0.97% *RHD** weak type 145. Among the partial RhD samples, 33.01% were *RHD**DAR 3.1; 32.04% *RHD**DAR 1.2; 1.94% *RHD**DVII; 0.97% *RHD**DOL 1; 0.97% *RHD**DOL 2.

Discussion and conclusion: Our results demonstrated that atypical reactions in serological tests for the RhD antigen are indicative of the presence of RhD variants. The *RHD**DAR subtype alleles were the most frequently found in donor samples from Brasília - Distrito Federal. These alleles are associated with anti-D alloimmunization. The characterization of variant RhD antigens through the association of serological tests and molecular methods mainly aims to determine the phenotypes/genotypes associated with anti-D alloimmunization. This characterization is very important to increase transfusion safety, reduce unnecessary administration of anti-D immunoprophylaxis in pregnant women and may also contribute to the preservation of scarce RhD negative blood units. In addition, knowledge about the

frequency and distribution of Rh variants contributes to the understanding of the multiracial origin of the studied region, and assists in the development of future *RHD* genotyping protocols that establish compatible blood unit search strategies for RhD variant patients.

Keywords: Rh system. RhD antigen. RhD variants. Weak RhD. Partial RhD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Complexo Rh na membrana dos eritrócitos.....	23
Figura 2 - Modelo estrutural das proteínas RhAG, RhD e RhCE.	24
Figura 3 - Representação esquemática do arranjo cromossômico do locus <i>RH</i> , dos genes <i>RHD</i> e o <i>RHCE</i> e dos polipeptídios RhD e RhCE	25
Figura 4 - Árvore filogenética do <i>RHD</i>	27
Figura 5 - Polimorfismo RhD-positivo/RhD-negativo em caucasianos.....	28
Figura 6 - Proteína RhD Fraco	30
Figura 7 - Proteína RhD Parcial	32
Figura 8 - Provável mecanismo de conversão do gene Rh, com pareamento entre <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> em cis	32
Figura 9 - Modelo de nove epítomos de antígenos D parciais.	33
Figura 10 - Fluxograma exemplificando a estratégia experimental para caracterização de amostras RhD variantes.....	42
Figura 11 - Fenotipagem direta de antígenos ABO e RhD em microplaca.....	44
Figura 12 - Confirmação de D Fraco em cartão gel anti-IgG rabbit.	45
Figura 13 - Cartão de fenotipagem Rh-Subgrupos + K.....	46
Figura 14 - Demonstração das etapas da extração de DNA	46
Figura 15 - Detecção de SNP que caracteriza alelo <i>RHD</i> fraco tipo 2 (1154 G>C)..	51
Figura 16 - Detecção de SNP que caracteriza alelo <i>RHD</i> fraco tipo 3 (8 C>G).	51
Figura 17 - Detecção de SNP que caracteriza alelo <i>RHD</i> fraco tipo 4 (602 C>G)	51
Figura 18 - Detecção de SNP que caracteriza alelo <i>RHD</i> fraco tipo 1 (809 T>G) após digestão com enzima de restrição <i>AIW44I</i> (<i>ApaI</i>).....	53
Figura 19 - Amplificação do éxon 1 <i>RHD</i>	55
Figura 20 - Demonstração de polimorfismo na posição 509 T>C (A) após sequenciamento do éxon 4 do gene <i>RHD</i>	56
Figura 21 - Amplificação das regiões íntron 4 e éxon 7 do gene <i>RHD</i>	60
Figura 22 - Teste de zigosidade <i>RHD</i> por PCR-SSP.....	61
Figura 23 - Comparação de dCT (dCT <i>RHD</i> - dCT Beta globina) entre os resultados obtidos no presente estudo e dados obtidos em estudos anteriores de amostras hemizigotos 2,73 (\pm 0,27) e homozigotos dCt de 1,87 (\pm 0,17) para o <i>RHD</i>	62
Figura 24 - Detecção de Pseudogene <i>RHD</i> Ψ	62
Figura 25 - Eletroferogramas parciais do sequenciamento de Sanger e os polimorfismos observados após amplificação dos éxons (1-10) do gene <i>RHD</i> e reação de sequenciamento..	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Terminologia numérica, nome e símbolos postulados pela International Society of Blood Transfusion (ISBT) para os antígenos do sistema Rh	21
Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados para amplificação das regiões íntron 4 e éxon 7 do gene <i>RHD</i> e controle endógeno (HGH) e tamanho dos fragmentos obtidos.....	48
Tabela 3 - Sequência dos primers utilizados para amplificação das regiões correspondentes aos segmentos Hybrid <i>Rhesus box</i> , Pseudogene e controle endógeno (HGH) e os tamanhos dos fragmentos obtidos.....	49
Tabela 4 - Sequência de primers utilizados nas reações de PCR – AS do gene <i>RHD</i> para detecção de D fraco tipos 1, 2, 3, 4 e 15 e Parcial DAU-3	50
Tabela 5 - Enzimas de restrição e fragmentos de PCR-RLFP	52
Tabela 6 - Programação de amplificações das reações de PCR e de sequenciamento gênico.	57
Tabela 7 - Sequência de primers para amplificação do exoma do gene <i>RHD</i> (LEGLER et al., 2001).....	57
Tabela 8 - Características sócio demográficas da população estudada	58
Tabela 9 - Frequências fenotípicas dos antígenos RhCE.....	59
Tabela 10 - Intensidade aglutinação na fenotipagem RhD em temperatura ambiente e a 37°C	60
Tabela 11 - Frequência de variantes <i>RHD</i> na população de doadores de sangue do Distrito Federal, Centro Oeste do Brasil. (N=103).....	64
Tabela 12 - Fenótipos RhD fraco caracterizados neste estudo, Nomenclaura ISBT, SNPs presentes e mudanças na proteína RhD.	65
Tabela 13 - Fenótipos RhD parcial caracterizados neste estudo. Nomenclaura ISBT, SNPs presentes e mudanças na proteína RhD.	65
Tabela 14 – Associação entre fenótipos RhD variantes e fenótipos RhCE.....	66
Tabela 15 - Anticorpos monoclonais, intensidade de aglutinação e antígenos RhD variantes.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Celsius
μ	Micra
μL	Microlitro
2+	Reação de aglutinação 2 cruces
5' – 3'	Orientação química relativa às extremidades de uma cadeia de ácido nucleico
∞	Infinito
ABO	Sistema de Grupo Sanguíneo ABO
AGH	Antiglobulina Humana
AHAI	Anemia Hemolítica Auto Imune
Anti-D	Anticorpo contra o antígeno D
Asn	Asparagina
BARC	Antígeno do sistema Rh (RH52)
Bp	Pares de Base
<i>Buffycoat</i>	Camada leucoplaquetária
CD47	Molécula <i>Cluster of Differentiation 47</i>
cDNA	DNA complementar
CLT	Controle
Cys	Cisteína
D Fraco	Antígeno RhD Fraco
D Parcial	Antígeno RhD Parcial
DAR	Antígeno RhD Parcial DAR
DAU	Antígeno RhD Parcial DAU
Del	Antígeno RhD Del
DF	Distrito Federal
DFR	Antígeno RhD Parcial DFR
DI	Antígeno RhD Parcial categoria DI obsoleto
DII	Antígeno RhD Parcial categoria DII
DIII	Antígeno RhD Parcial categoria DIII
DIVa	Antígeno RhD Parcial categoria DIVa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DOL	Antígeno RhD Parcial DOL
Duffy	Sistema de Grupo Sanguíneo Duffy
DVI	Antígeno RhD Parcial categoria DVI
DVI-	Não detecção do antígeno DVI
DVI+	Detecção do antígeno DVI
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
Éxon	Região do gene que codifica aminoácidos/proteínas
Fenótipo Rh_{null}	Fenótipo em que não há expressão dos antígenos Rh
FEPECS	Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde
FHB	Fundação Hemocentro de Brasília
FPTT	Antígeno do sistema Rh (RH50)
HDFN	Doença Hemolítica do Feto e Recém Nascido
HGH	Human Growth Hormone (Gene do Hormônio do Crescimento)
IAP	<i>Integrin Associated Protein</i>
IAT	Teste Indireto da Antiglobulina do inglês, <i>Indirect Antiglobulin</i>
<i>Test</i>	
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Ile	Isoleucina
Íntron	Região do gene que não codifica aminoácidos/proteínas
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
Kb	Kilo Base
Kd	Kilodaltons
Kell	Antígeno Kell
Leu	Leucina
LISS	Solução salina de baixa força iônica
LW	Grupo Sanguíneo LW
MgCL₂	Cloreto de Magnésio
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PCR-AS ou PCR-AE	PCR - allele specific ou PCR-Alelo específico
PCR-RLFP	PCR - <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Primer	Iniciadores da reação em cadeia da polimerase

Pro	Prolina
qPCR	<i>Quantitative</i> PCR
RH1	Antígeno D
RH2	Antígeno C
RH3	Antígeno E
RH4	Antígeno c
RH5	Antígeno e
RhAG	Glicoproteína Rh-associada
RHAG	Notação para o gene que codifica a glicoproteína Rh-Associada
RhCE	Proteínas C, c, E, e
RHCE	Notação para o gene que codifica as proteínas C, c, E, e
RhD Negativo	Ausência do antígeno D
RhD Positivo	Presença do antígeno D
RhD	Antígeno D
RHD	Notação para o gene que codifica o antígeno D
RHD-CE-D /RHCE-D-CE	Alelos híbridos
RHDΨ	Pseudogene <i>RHD</i>
Rh-Hr	Terminologia de Wiener para o sistema Rh
Ro^{HAR}	Antígeno RhD parcial Ro ^{Har}
rpm	Rotações por minuto
Ser	Serina
Sistema Rh	Sistema de Grupo Sanguíneo Rh
SMP1	<i>Small Membrane Protein 1</i>
TMEM50A	<i>Transmembrane Protein 50A</i>
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TAD	Teste de Antiglobulina Direto
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
α	Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Sistema de grupo sanguíneo Rh.....	20
1.2	Histórico sobre a descoberta do sistema Rhesus.....	21
1.3	Complexo Rh nos eritrócitos	23
1.4	Bases moleculares dos antígenos Rh	25
1.5	Base molecular dos fenótipos Rh.....	26
1.5.1	Base molecular do fenótipo RhD negativo	28
1.5.2	Base Molecular do fenótipo RhD Fraco.....	30
1.5.3	Bases Moleculares do fenótipo RhD Parcial.....	31
1.5.4	Bases Moleculares do fenótipo Rh DEL.....	34
1.6	Reagentes anti-D.....	34
1.7	Genotipagem <i>RHD</i>	36
2	JUSTIFICATIVA.....	39
3	HIPÓTESE	40
4	OBJETIVO GERAL.....	41
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	42
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
6.1	Casuística	43
6.2	Aspectos Éticos.....	43
6.3	Fenotipagem RhD	43
6.4	Confirmação de D Fraco.....	44
6.5	Fenotipagem Rh-Subgrupos + Kell	45
6.6	Extração de DNA.....	46
6.7	Reação em cadeia da Polimerase – PCR.....	47
6.7.1	PCR – Multiplex.....	47
6.7.2	PCR sequência específica (PCR-SSP)	48
6.7.3	PCR alelo específico (PCR- AS).....	49
6.7.4	Reação em cadeia da polimerase <i>Restriction Fragment Length Polymorfisms</i> (PCR-RLFP).....	52

6.7.5	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	53
6.8	Eletroforese em gel de agarose e detecção de produtos de PCR	54
6.9	Reação de sequenciamento de DNA.....	55
7	RESULTADOS	58
7.1	Características da população estudada.....	58
7.2	Perfil sorológico dos antígenos RhCE	59
7.3	Resultados sorológicos da fenotipagem RhD e confirmação de D fraco.....	59
7.4	Confirmação molecular do gene <i>RHD</i>	60
7.5	Resultados da zigosidade <i>RHD</i> e detecção de Pseudogene <i>RHD</i> (<i>RHD</i> Ψ)	61
7.6	Resultados das reações de sequenciamento gênico	63
7.7	Resultados da caracterização molecular de <i>RHD</i> variantes	64
7.8	Associação entre RhD variantes e fenótipos RhCE.....	66
7.9	Associação entre intensidade de aglutinação na fenotipagem RhD e as RhD variantes	67
8	DISCUSSÃO	68
9	CONCLUSÃO.....	76
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
11	ANEXOS.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema de grupo sanguíneo Rh

O sistema de grupo sanguíneo Rh (ISBT 004) é altamente complexo e polimórfico, sendo considerado, depois do sistema ABO, o segundo sistema de maior significado clínico na medicina transfusional (AGRE; CARTRON, 1991; BA et al., 2015; DANIELS, 2002). O sistema Rh consiste de 55 antígenos carregados por duas proteínas RhD e RhCE (Tabela 1) (SIMON et al., 2016; STORRY et al., 2018; WEBSITE ISBT, 2019). Os anticorpos dirigidos contra os seus antígenos estão envolvidos em reações hemolíticas transfusionais, anemia hemolítica autoimune (AHAI) e doença hemolítica do feto e neonatos - HDFN (AGRE; CARTRON, 1991; DANIELS, 2013a).

A natureza dos antígenos Rh e a nomenclatura apropriada para descrever antígenos, proteínas e genes do sistema Rh já foram muito discutidas na literatura. Inicialmente, a teoria de Fisher – Race sugeriu que os antígenos Rh eram determinados por três pares de genes em três loci intimamente ligados, produzindo os antígenos D ou d (ausência do D), C ou c, e E ou e, que poderiam ser montados em oito diferentes complexos genéticos ou haplótipos (*Dce*, *dce*, *DCe*, *dCe*, *DcE*, *dcE*, *DCE* e *dCE*). Em uma teoria alternativa, Wiener, segundo a terminologia Rh-Hr, sugeriu uma série de múltiplos alelos (R1, R2, R0, etc.) em um único locus. O gene codifica um aglutinogênio (antígeno), composto por vários fatores sanguíneos (determinantes sorológicos). Por fim, Rosenfield introduziu uma terminologia numérica, que registrava dados sorológicos. Os antígenos eram numerados conforme a ordem de sua descoberta e reconhecimento como pertencentes ao sistema Rh. Este sistema de nomenclatura, não possuía base genética e somente demonstrava a presença ou ausência de antígeno na hemácia (AVENT; REID, 2000; DANIELS, 2002; SIMON et al., 2016; WAGNER, 2018).

A terminologia atualmente recomendada é a postulada pela Sociedade Internacional de transfusão de sangue, do inglês *International Society of Blood Transfusion* (ISBT) que é baseada na nomenclatura numérica descrita por Rosenfield (Tabela 1). Cada antígeno pertencente a um sistema de grupo sanguíneo é identificado por um número de seis dígitos. Os primeiros três dígitos representam o sistema (por exemplo, 004 para Rhesus), os últimos três dígitos representam a especificidade de cada antígeno, por exemplo, 001 para o antígeno D (WEBSITE ISBT, 2019).

Tabela 1 - Terminologia numérica, nome e símbolos postulados pela International Society of Blood Transfusion (ISBT) para os antígenos do sistema Rh

Nº ISBT	Nome	Símbolo	Nº ISBT	Nome	Símbolo	Nº ISBT	Nome	Símbolo
004.001	RH1	D	004026	RH26	c-like	004046	RH46	Sec
004.002	RH2	C	004027	RH27	cE	004047	RH47	Dav
004.003	RH3	E	004028	RH28	hr ^H	004048	RH48	JAL
004.004	RH4	c	004029	RH29	Rh29	004049	RH49	STEM
004.005	RH5	e	004030	RH30	Go ^a	004050	RH50	FPTT
004.006	RH6	ce or f	004031	RH31	hr ^B	004051	RH51	MAR
004.007	RH7	Ce	004032	RH32	Rh32	004052	RH52	BARC
004008	RH8	C ^w	004033	RH33	Rh33	004053	RH53	JAHK
004009	RH9	C ^x	004034	RH34	Hr ^B	004054	RH54	DAK
004010	RH10	V	004035	RH35	Rh35	004055	RH55	LOCR
004011	RH11	E ^w	004036	RH36	Be ^a	004056	RH56	CENR
004012	RH12	G	004037	RH37	Evans	004057	RH57	CEST
004017	RH17	Hr ₀	004039	RH39	C-like	004058	RH58	CELO
004018	RH18	Hr	004040	RH40	Tar	004059	RH59	CEAG
004019	RH19	hr ^s	004041	RH41	Ce-like	004060	RH60	PARG
004020	RH20	VS	004042	RH42	CeS	004061	RH61	CEVF
004021	RH21	C ^G	004043	RH43	Crawford	004062	RH62	CEWA
004022	RH22	CE	004044	RH44	Nou			
004023	RH23	D ^w	004045	RH45	Riv			

Nota: Rh 13 a 16, 24, 25 e 38 são obsoletos.

Adaptado de (WEBSITE ISBT, 2019)

1.2 Histórico sobre a descoberta do sistema Rh

O sistema Rh foi descoberto em 1939, quando Levine e Stetson investigaram o caso de uma reação transfusional hemolítica grave em uma puérpera, que recebeu transfusão de sangue ABO compatível do seu marido, após dar a luz um natimorto. Eles mostraram que um anticorpo presente no soro da mulher, que não tinha histórico de transfusão, aglutinou os

glóbulos vermelhos do seu marido e de 80% dos doadores de sangue ABO compatíveis, e que esse novo antígeno, que eles não nomearam, era independente dos grupos sanguíneos até então conhecidos, ABO, MN e P (AVENT; REID, 2000; LEVINE; STETSON, 1939). Foi então sugerido, que a mulher havia sido imunizada por um antígeno fetal de origem paterna, e que o episódio hemolítico foi causado por anticorpos maternos que reagiram contra um antígeno presente nos eritrócitos transfundidos (DANIELS, 2002).

No ano seguinte, Landsteiner e Wiener relataram que coelhos imunizados com hemácias de macacos (*Macacus rhesus*) apresentavam anticorpos que pareciam ser similares aos que foram descritos na jovem obstétrica. Este anticorpo foi então denominado como anti-Rh, por causa do macaco Rhesus (LANDSTEINER; WIENER, 1940). No mesmo ano, Wiener e Peters identificaram anticorpos de especificidade aparentemente idêntica no soro de pacientes que tiveram reações transfusionais após receberem transfusões de sangue ABO compatíveis. O anticorpo de Levine e Stetson também pareceu ser o mesmo que o anti-Rh (DANIELS, 2002; DAVIDSOHN, I. ; TOHARSKY, 1942; WIENER; PETERS, 1940).

Em 1942, Fisk e Foord demonstraram a diferença entre o anti-Rh humano e o animal, e concluíram que não se tratava do mesmo anticorpo (FISK; FOORD, 1942; NARDOZZA et al., 2010). Muitos anos depois foi reconhecido que os dois anticorpos eram diferentes. No entanto, o termo antígeno Rhesus continuou sendo usado de forma inapropriada, para se referir ao antígeno D, e o termo Fator Rh e anti-Rh se manteve para o anticorpo produzido por humanos. O antígeno de origem animal foi chamado de LW referindo-se a Landsteiner e Wiener (AVENT; REID, 2000; DANIELS, 2002; LEVINE; et al., 1963; NARDOZZA et al., 2010). Pouco tempo após a descoberta do RhD, os outros principais antígenos do sistema Rh (C, c, E e e) foram identificados (RACE, 1944).

Após uma série de experimentos e estudos de casos, foi encontrada uma frequência aproximada de 85% de Rh positivo nas populações estudadas e o anticorpo anti-Rh foi associado às reações transfusionais. Foi também revelado que este aglutinogênio era capaz de causar isoimunização após repetidas transfusões de sangue e na gravidez com incompatibilidade Rh materno-fetal (FISK; FOORD, 1942; LEVINE, P. KATZIN, 1941; LEVINE et al., 1942; WIENER; PETERS, 1940).

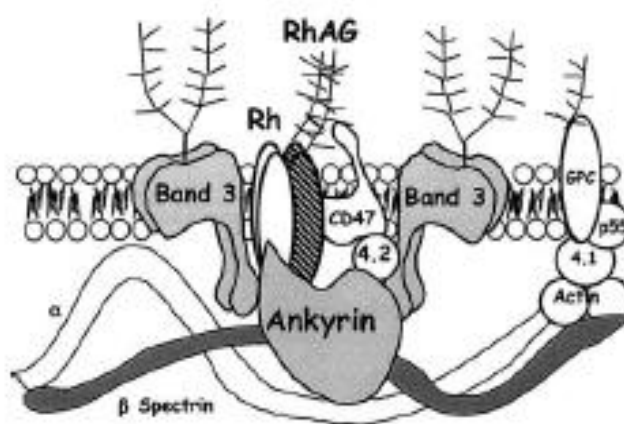
A partir dessas descobertas, o sistema Rh tornou-se amplamente conhecido por sua implicação na isoimunização Rh materna. No início dos anos 1960, a profilaxia da Imunoglobulina (Ig) anti-D foi apresentada como ferramenta na prevenção da DHFN, após ser demonstrado que hemácias RhD positivo revestidas de Ig anti-D não induziam a imunidade para o antígeno D. Em 1968, foi observado que a introdução da profilaxia Rh na rotina de

atendimento a gestantes com fenotipagem sorológica RhD negativo e não-aloimunizadas, permitiu uma significativa queda na incidência de DHFN (SCHMIDT; JÚNIOR; LOURES, 2010; SCOTT, 2001; VIRK; SANDLER, 2015).

1.3 Complexo Rh nos eritrócitos

Os antígenos Rh são expressos como parte de um complexo proteico na membrana das hemácias. Esse complexo é expresso apenas nas células da linhagem eritróide e, portanto, os antígenos Rh são expressos apenas nas hemácias (DEAN, 2005).

As proteínas do sistema Rh (RhD e RhCE) e a glicoproteína Rh-associada RhAG são integrantes desse complexo proteico, que inclui ainda a proteína CD47, também conhecida como proteína associada à integrina (IAP), a glicoforina B, as glicoproteínas Duffy e LW, e a Banda 3 (Figura 1) (AVENT, 2001; SIMON et al., 2016; WAGNER; FLEGEL, 2004; WESTHOFF, 2007). O complexo Rh contribui para a manutenção das propriedades mecânicas da membrana eritrocitária por meio da interação do citoesqueleto (espectrina), com a proteína 4.2 e anquirina (VAN KIM; COLIN; CARTRON, 2006).

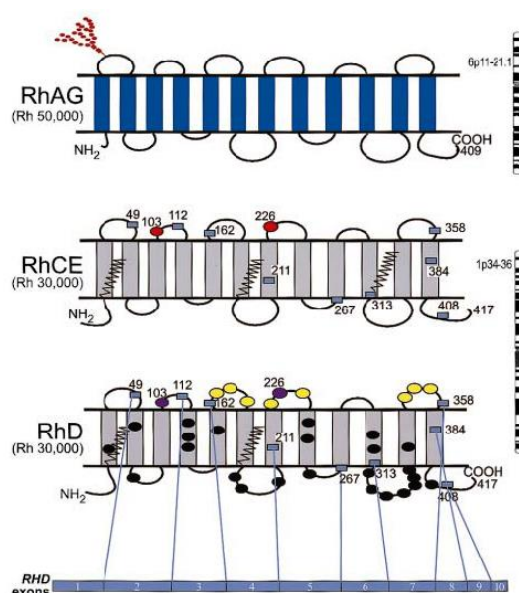


Fonte: Adaptado de (VAN KIM; COLIN; CARTRON, 2006)

Figura 1 - Complexo Rh na membrana dos eritrócitos

A glicoproteína proteína Rh-associada (RhAG) consiste de 409 aminoácidos e é codificada pelo gene *RHAG*, localizado no cromossomo 6p11-p21.1 (Figura 2). Sua natureza como regulador genético para a expressão dos antígenos Rh foi verificada através da identificação de mutações no locus *RHAG* (AVENT; REID, 2000; HUANG; YE, 2010).

A presença da proteína RhAG na membrana das hemácias é um requisito para a expressão dos antígenos Rh. Mutações em homozigose no gene *RHAG* é a causa mais comum do raro fenótipo Rh null, no qual, nenhum dos antígenos do sistema Rh é expresso (DANIELS, 2002). Os eritrócitos do fenótipo Rh_{null} são estomatocíticos e esferocíticos, e os indivíduos afetados têm anemia hemolítica. O papel estrutural das proteínas Rh tem sido inferido a partir da presença de defeitos nos eritrócitos em indivíduos com esse fenótipo (WESTHOFF, 2007).



Fonte: Adaptado de (AVENT; REID, 2000)

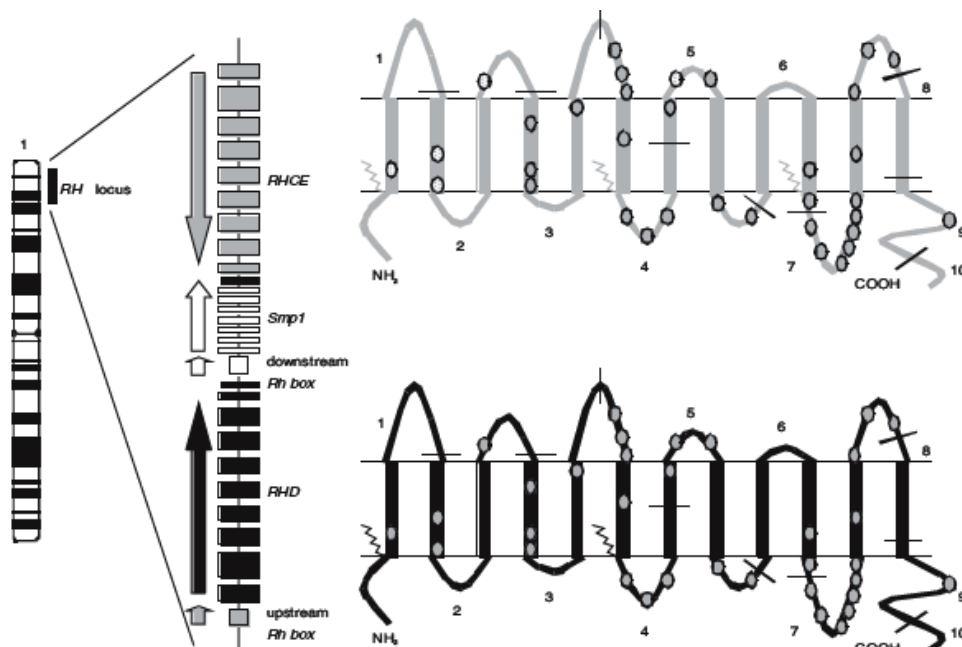
Figura 2 - Modelo estrutural das proteínas RhAG, RhD e RhCE. A proteína RhAG (50 kd) consiste em 409 aminoácidos e é codificado pelo gene *RHAG* no cromossomo 6p11-p21.1. As proteínas RhCE e RhD (30 kd) possuem estruturas semelhante e são codificados pelos genes *RHCE* e *RHD* respectivamente, no cromossomo 1p34-p36. O domínio da proteína RhD é codificado por cada éxon e está representada por caixas numeradas de 1 a 10. Os círculos coloridos representam as diferenças de aminoácidos nas regiões extracelular, transmembranar e intracelular entre as proteínas RhD e RhCE.

A associação das proteínas Rh e RhAG dentro de uma mesma família de proteínas baseia-se no fato de ambas apresentarem 36% de homologia na sequência genômica e 50% de identidade nas 12 α hélices transmembranares, indicando uma relação de ancestralidade (AVENT, REID, 2000; WAGNER, FLEGEL, 2000). Estudos funcionais e de modelagem estrutural revelaram que elas compartilham homologia com uma antiga família de proteínas envolvidas no transporte de amônia (AVENT, 2001; HUANG; YE, 2010; WAGNER, 2013; WESTHOFF, 2007).

1.4 Bases moleculares dos antígenos Rh

Os antígenos do sistema Rh são transportados em duas proteínas, RhD e RhCE, codificadas pelos genes homólogos *RHD* e *RHCE* respectivamente. Os principais antígenos do sistema são: D, C, c, E, e, sendo o antígeno D o mais imunogênico. A proteína RhD carrega a presença ou ausência do antígeno D (RH1), enquanto que a proteína RhCE carrega os antígenos C, c, E, e e (RH2 a RH5) (AVENT; REID, 2000; WAGNER; FLEGEL, 2004).

Os genes homólogos *RHD* e *RHCE* estão localizados no cromossomo 1p36.13-p34.3, são intimamente ligados, possuem orientações opostas (5'-*RHD*-3' - 3'-*RHCE*-5') e estão interceptados por um terceiro gene, o *SMP1* (*Small membran protein 1*) ou *TMEM50A*, cuja função não foi definida (CHOU; FASANO, 2016; REID, 2001; VAN KIM; COLIN; CARTRON, 2006). O gene *RHD* é flanqueado por dois segmentos de mesma orientação (5'-3'), com 98,6% de homologia, formados por sequências repetitivas de aproximadamente 9000 pb cada, denominadas *Rhesus Boxes* (Caixas Rhesus) “*usptream*” e “*downstream*” (Figura 3) (DANIELS, 2013a; FLEGEL, 2012).



Fonte: Adaptado de (TAX, 2005)

Figura 3 - Representação esquemática do arranjo cromossômico do locus *RH*, dos genes *RHD* e o *RHCE* e dos polipeptídeos RhD e RhCE

Cada gene (*RHD* e *RHCE*) consiste de 10 éxons que codificam uma proteína de 417 aminoácidos, com modelos estruturais de 6 loops extracelulares, 12 segmentos proteicos

transmembranosos e 7 intracelulares (Figura 2). As extremidades proteicas C e N terminais são intracelulares. Os genes *RHD* e *RHCE* possuem 97% de homologia e codificam proteínas que diferem entre si de 32 a 35 aminoácidos dependendo do alelo considerado (DANIELS, 2013b; FLEGEL; WAGNER, 2002; WAGNER; FLEGEL, 2004; WESTHOFF, 2004).

Essas diferenças estão dispersas ao longo da sequência de aminoácidos da proteína. Apenas um número limitado dessas diferenças está localizado exofacialmente; tais diferenças são restritas ao loop 3, codificado pelo éxon 4, loop 4, codificado pelo éxon 5, e loop 6, codificado pelo éxon 7. No loop 2 codificado por éxon 2, o alelo c mas não o alelo C do *RHCE* difere do RhD (WAGNER; FLEGEL, 2004).

Os polimorfismos antigênicos C/c e E/e estão respectivamente associados à substituição do aminoácido Serina (C) na posição 103 por uma Prolina (c) e de uma Prolina (E) na posição 226 por uma Alanina (e) na segunda e quarta alças extracelulares da proteína RhCE (Figura 1) (WESTHOFF, 2007). No caso do polimorfismo C/c ocorrem 6 substituições de nucleotídeos, que levam a 4 mudanças de aminoácidos (Cys16Trp, Ile60Leu, Ser68Asn, e Ser103Pro). No entanto apenas a o aminoácido 103 é crítico para o polimorfismo (MOURO et al., 1993).

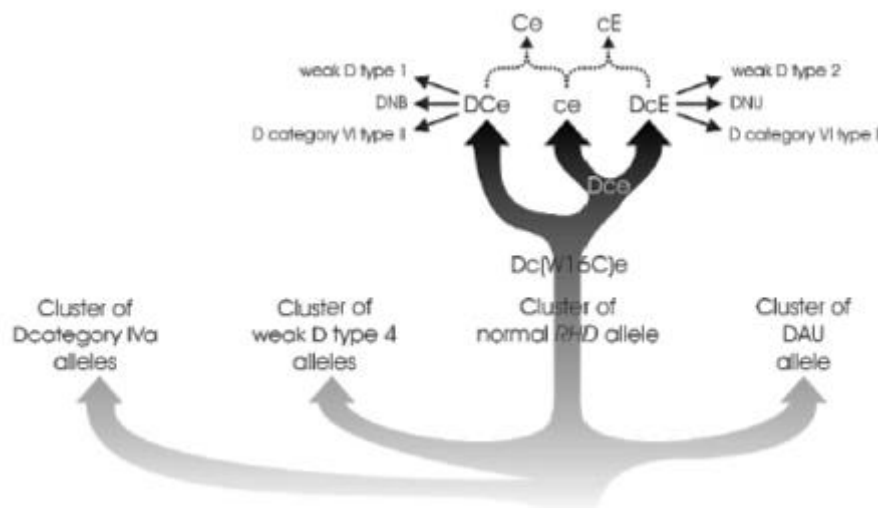
1.5 Base molecular dos fenótipos Rh

A biologia da antigenicidade do Rh tem sido intensamente explorada, e está claro que existe um alto grau de variabilidade nos genes *RHD* e *RHCE*. O sistema Rh é composto por 05 antígenos comuns (D, C, c, E, e) e 50 antígenos de alta ou baixa frequência. A presença de um grande número de antígenos e fenótipos variantes tem feito do sistema Rh um dos mais complexos e polimórficos em humanos. (HUANG; LIU; CHENG, 2000; HUANG, 1997; VAN KIM; COLIN; CARTRON, 2006; WEBSITE ISBT, 2019).

O conceito de antígenos RhD variantes foi construído a partir das observações de Stratton, 1946, que ao realizar tipagem RhD em uma amostra de doador de sangue, observou resultados variáveis (positivo, fraco e negativo) com diferentes reagentes anti-D (STRATTON, 1946). A partir dessa observação, décadas de estudos sorológicos resultaram em uma riqueza de informações sobre a variação dos antígenos Rh (HUANG, 1997). A detecção sorológica de antígenos de grupos sanguíneos e de fenótipos polimórficos forneceu uma fonte valiosa de amostras de sangue adequadas para estudos a nível molecular (AVENT; REID, 2000). A capacidade de clonar DNA complementar (cDNA) e sequenciar genes que

codificam as proteínas Rh levou a uma compreensão das bases moleculares associadas aos antígenos Rh (AVENT; REID, 2000).

Existem quatro clusters independentes de alelos *RHD*: O cluster D categoria IVa, o cluster D fraco tipo 4, o cluster D Eurásia e o cluster D DAU (Figura 4). Os alelos dos clusters D categoria IVa, D fraco tipo 4 e DAU estão amplamente confinados a indivíduos de ascendência africana e geralmente ocorrem em haplótipos *Dce*. Os alelos do cluster D Eurásia são predominantes nas populações eurásianas e ocorrem mais frequentemente em haplótipos *DCe* e *DcE*. A grande maioria dos alelos aberrantes detectados em indivíduos da população Euroasiática pertence ao cluster D Eurásia e pode ser derivado do *RHD* “padrão”, por um evento molecular único (isto é, substituição de um único nucleotídeo ou conversão de um único gene). Em contraste, a maioria dos alelos dos clusters “africanos” difere do *RHD* “padrão” por mais do que um único evento molecular (DANIELS, 2013a; WAGNER; FLEGEL, 2004).



Fonte: Adaptado de (WAGNER; FLEGEL, 2004)

Figura 4 - Árvore filogenética do *RHD*

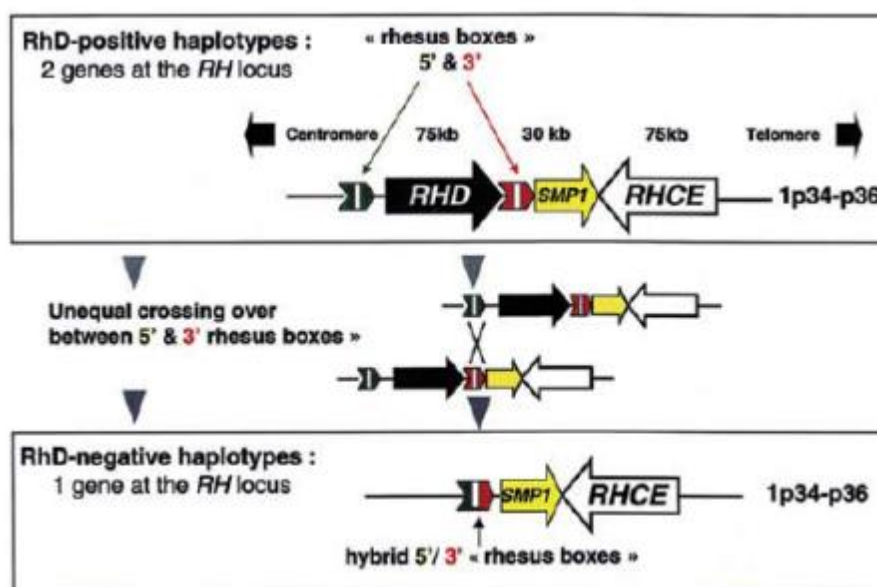
Os alelos *RHD* foram classificados com base na relação fenotípica com a variação molecular em: D Parcial, D Fraco, DEL e alelos não funcionais (FLEGEL, 2012). Atualmente, mais de 200 alelos *RHD* variantes já foram caracterizados (WAGNER; FLEGEL, 2014; WEBSITE ISBT, 2019).

1.5.1 Base molecular do fenótipo RhD negativo

O fenótipo RhD negativo representa uma total ausência dos polipeptídios D na membrana eritrocitária e a consequente ausência de todos os epítomos do antígeno D (DANIELS, 2002; WESTHOFF, 2007). Esta característica genética particular contribui para a forte antigenicidade da proteína RhD (FLEGEL, 2007). A exposição do RhD a indivíduos D negativos frequentemente resultam na produção do anticorpo anti-D (CHOU; WESTHOFF, 2009).

Diferentes eventos genéticos são responsáveis pela perda da expressão do antígeno RhD em diferentes populações (WESTHOFF, 2007). A deleção do gene *RHD* é a causa mais comum em caucasianos (15-17%) e menos comum em negros (5%) e asiáticos (3%) (DANIELS, 2002; WESTHOFF, 2007).

A deleção do gene *RHD* é resultado de um “crossing over” desigual que ocorre entre duas regiões com 1463pb sobre as *Rhesus boxes* (caixas rhesus) e é caracterizada pela presença de uma caixa rhesus híbrida (Figura 5) (DANIELS, 2002; WAGNER; FLEGEL, 2004). Este evento ocorre quando dois segmentos de DNA são altamente homólogos como as “*Rhesus Boxes*” (FLEGEL, 2007). O locus *RH* do haplótipo *RHD* negativo é similar ao locus *RH* ancestral antes do evento de duplicação (WAGNER; FLEGEL, 2004).



Fonte: Adaptado de (VAN KIM; COLIN; CARTRON, 2006)

Figura 5 - Polimorfismo RhD-positivo/RhD-negativo em caucasianos. Nos haplótipos RhD-positivo, o locus *RH* é composto pelos genes *RHD* e *RHCE* em orientação oposta, enquanto o gene *RHD* está ausente de RhD haplótipos negativos. A presença de um híbrido 5'/3' rhesus box em locus RhD-negativo sugere fortemente que a deleção do gene *RHD* ocorreu por crossing-over desigual

A duplicação dos genes Rhesus ocorreu durante a evolução dos primatas, dando origem aos genes *RHD* e *RHCE* em humanos. É provável que a orientação do *RHD* tenha sido invertida durante esse evento (WAGNER; FLEGEL, 2002).

Em africanos negros, dois outros alelos *RHD* negativo estão também presentes (FLEGEL; WAGNER, 2002). Nestes, o cenário molecular mais comum do fenótipo RhD negativo é a homozigose ou a hemizigose (com o *RHD* deletado) para um completo, mas inativo, gene *RHD*, presente em 67% dos casos. Este gene inativo, chamado de *RHD* pseudogene ou *RHD Ψ* contém uma sequência duplicada de 37 bp (19 últimos nucleotídeos no íntron 3 e 18 primeiros nucleotídeos do éxon 4). Esta duplicação gera uma leitura “frameshift” (mudança no quadro de leitura) e a introdução de um stop códon prematuro. O *RHD Ψ* também possui uma mutação nosense no éxon 6 (Try>stop), que garante a ausência da proteína RhD nos eritrócitos (DANIELS, 2002; WAGNER; FLEGEL, 2004).

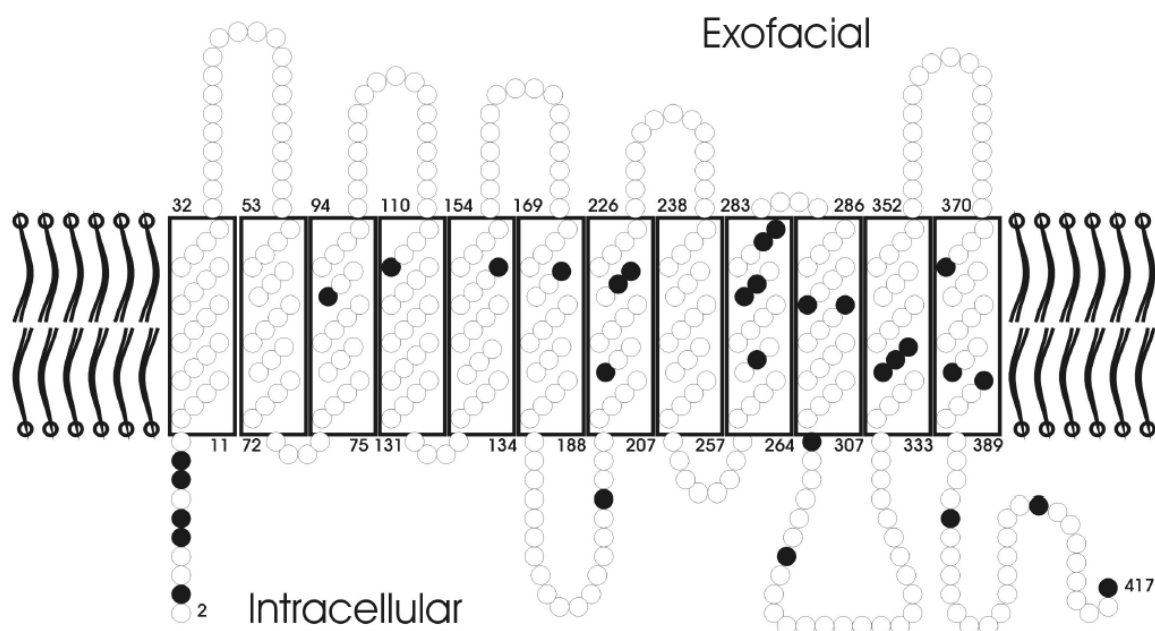
Estes alelos *RHD* não funcionais são importantes para qualquer abordagem de genotipagem, incluindo a genotipagem *RHD* por PCR (Reação em cadeia da Polimerase): a menos que a mutação seja detectada especificamente, a PCR *RHD* dará uma previsão falsamente positiva para o antígeno D. Portanto, uma correta caracterização do antígeno D por PCR em africanos tornou-se possível somente após a caracterização da estrutura do *RHD Ψ* . A detecção específica de *RHD Ψ* é considerada mandatória para qualquer predição do antígeno D por PCR, especialmente em populações miscigenadas (WAGNER; FLEGEL, 2004).

Outras formas de alelos *RHD* aberrantes podem expressar proteínas RhD que não carregam o antígeno D. Essas proteínas RhD são codificadas por alelos híbridos RHD-CE-D no qual os segmentos *RHCE* devem englobar pelo menos os éxons 4 a 7. Isso faz com que os loops extracelulares 3 a 6 se assemelhem a RhCE. Os loops 1 e 2 não diferem entre as proteínas RhD e RhCE e toda a parte extracelular dessas proteínas híbridas é igual a proteína RhCE. Essas proteínas RhD anormais não podem expressar o antígeno D. Os dois exemplos mais importantes de tais alelos são o gene híbrido RHD-CE(4-7)-D que é a terceira causa mais comum de fenótipos RhD negativos entre os africanos e o RHD-CE(2-9)-D que é uma das principais causas do fenótipo RhD negativo em chineses (CHOU; WESTHOFF, 2009; DANIELS, 2002; WAGNER; FLEGEL, 2004).

1.5.2 Base Molecular do fenótipo RhD Fraco

O fenótipo D fraco é representado por um grupo de genótipos *RHD* que codificam proteínas com alterações associadas a uma expressão reduzida do RhD na superfície dos eritrócitos (geralmente menos de 5.000 antígenos D por hemácias). Geralmente não há nenhuma mudança qualitativa e, portanto, nenhuma imunização anti-D (FLEGEL, 2007, 2012; WAGNER et al., 1999).

A fraca expressão do antígeno D resulta principalmente de mutações de ponto (SNP) no gene *RHD* que codificam alterações de aminoácidos nas regiões intracelulares ou transmembrana da proteína RhD (Figura 6). Essas mudanças afetam a inserção e a integração da proteína na membrana eritrocitária e, portanto, a quantidade de proteína RhD é refletida no número reduzido de sítios do antígeno D nas hemácias. Esse fato explica porque o teste indireto da antiglobulina humana (AGH) pode ser necessário para a detecção do antígeno D (DANIELS, 2002; FLEGEL, 2012; WESTHOFF, 2005, 2007).



Fonte: Adaptado de (WAGNER; FLEGEL, 2004)

Figura 6 - Proteína RhD Fraco. Os aminoácidos estão representados em círculos. Os círculos pretos indicam substituições de aminoácidos, cada uma das quais foi correlacionada com um tipo de D Fraco molecularmente distinto.

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

deste antígeno na membrana da hemácia, o que dificulta consideravelmente, a sua identificação sorológica (ARASZKIEWICZ; SZYMANSKI, 1987; MOTA et al., 2005).

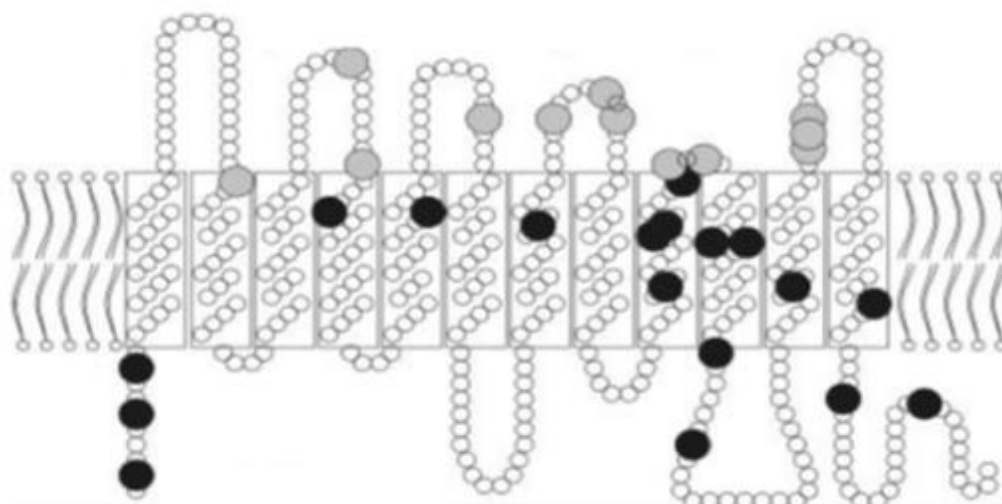
A maioria dos indivíduos com fenótipos D fraco podem seguramente receber hemácias RhD positivo e não produzir anti-D. No entanto, alguns indivíduos considerados inicialmente com fenótipo D fraco produziram aloanticorpo anti-D. A imunização anti-D em portadores de D fraco é rara, exemplos incluem o D fraco tipo 11,15, 21 e 57, o D fraco tipo 4.2, também conhecido como DAR, e D fraco tipo 7. Os D fraco tipos 1, 2, 3 e 4.0/4.1, que são os mais prevalentes em populações europeias e caucasianas, representam mais de 95% dos tipos de D fraco identificados (DANIELS, 2002; FLEGEL, 2012; WAGNER et al., 2000; WESTHOFF, 2005).

A definição de D fraco depende dos reagentes anti-D e das técnicas utilizadas, o que dificulta a avaliação das frequências desse fenótipo. Uma estimativa é de que 0,2% a 1% de indivíduos caucasianos e 1,7% de negros do norte de Londres carregam hemácias com a expressão reduzida do antígeno D (DANIELS, 2002; WAGNER et al., 2000).

1.5.3 Bases Moleculares do fenótipo RhD Parcial

Os antígenos D parciais são caracterizados pela perda e/ou alteração de um ou mais epítomos da proteína RhD. Eles podem ou não mostrar uma expressão enfraquecida do antígeno D, tornando difícil a diferenciação sorológica entre D parcial e D fraco (AVENT, 2001; HUANG; LIU; CHENG, 2000).

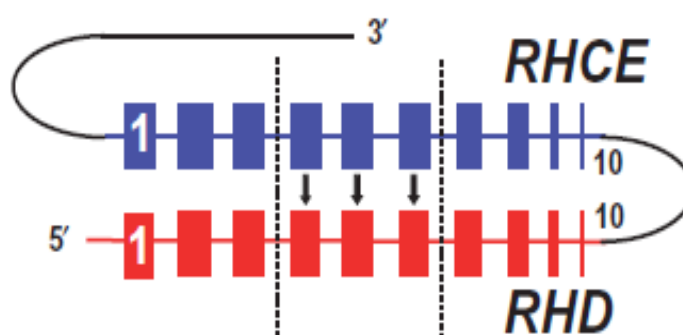
Os fenótipos D parciais têm alterações na proteína RhD que diferem suficientemente da proteína RhD normal, a ponto de causar a produção de alo anti-D e não reagir com alguns dos reagentes anti-D monoclonais. Três tipos de eventos são responsáveis pela formação destes fenótipos: a formação de alelos híbridos *RHD-CE-D* ou *RHCE-D-CE* causados pelas conversões gênicas entre os genes *RHD* e *RHCE*, que são favorecidas pela estrutura do locus *RH*; mutações missenses localizadas nos loops extracelulares (Figura 7); e múltiplas substituições de aminoácidos dispersas na proteína RhD (FLEGEL; WAGNER, 2002; WESTHOFF, 2007).



Fonte: Adaptado de (FLEGEL; WAGNER, 2002)

Figura 7 - Proteína RhD Parcial. As posições de aminoácidos afetados nos fenótipos D parciais, incluindo as categorias D, são mostradas em cinza. As substituições de aminoácidos ocorrem nos segmentos proteicos extracelular em fenótipos D parciais. Os círculos pretos representam as substituições de aminoácidos que ocorrem em fenótipos D fraco.

Os genes híbridos têm regiões do *RHD* substituídos pelas correspondentes regiões do *RHCE* (Figura 8). Essas substituições podem envolver regiões curtas que englobam vários códons, éxons inteiros ou grandes regiões do gene, e a nova sequência de aminoácidos que resulta da junção da proteína RhD com RhCE pode gerar novos antígenos Rh (WESTHOFF, 2007).



Fonte: Adaptado de (DANIELS, 2013a)

Figura 8 - Provável mecanismo de conversão do gene Rh, com pareamento entre *RHD* e *RHCE* em cis. Neste exemplo éxons 4-6 do *RHD* são substituídos pelos éxons equivalentes de *RHCE* para produzir o gene *RHD-CE-D* característico de fenótipo DVI tipo II.

O antígeno D é um mosaico de diferentes epítomos. Pessoas com eritrócitos que não possuam um ou mais desses epítomos (referidos como expressando um antígeno D parcial)

podem fazer o aloanti-D dirigido aos epítomos D ausentes. Historicamente, os estudos sorológicos classificaram o antígeno D em seis categorias principais (DII a DVII, com DI sendo obsoleto), com base na interação das hemácias e soros dos membros da categoria D, e também pelos padrões de reação com anti-D policlonal selecionado (Figura 9). Muitos outros D parciais foram adicionados posteriormente (por exemplo, DFR, DBT, DOL e DAU). Três modelos de epítomos foram propostos compreendendo 9 epítomos ou 37 epítomos ou a combinação de ambos com base no padrão de reação sorológica de 80 anticorpos monoclonais anti-D (FLEGEL, 2012; REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012).

	Reactions with monoclonal anti-D							
	epD1	epD2	epD3	epD4	epD5	epD6/7	epD8	epD9
DII	+	+/0	+	0	+	+	+	0
DIIIa	+	+	+	+	+	+	+	+
DIIIb	+	+	+	+	+	+	+	+
DIIIc	+	+	+	+	+	+	+	+
DIVa	0	0	0	+	+	+	+	0
DIVb	0	0	0	0	+	+	+	0
DVa	0	+	+	+	0	+	+	+
DVI	0	0	+	+	0	0	0	+
DVII	+	+	+	+	+	+	0	+
DFR	+/0	+/0	+	+	+/0	+/0	0	+
DBT	0	0	0	0	0	+/0	+	0
DHAR	0	0	0	0	+/0	+/0	0	0

+ = Positive; +/0 = Positive with some anti-D, negative with other anti-D; 0 = Negative.

Fonte: Adaptado de (REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012)

Figura 9 - Modelo de nove epítomos de antígenos D parciais.

Reações com anti-D mostraram que alguns fenótipos D parciais expressaram fortemente epítomos D (por exemplo, DIII, DIVa), outros têm expressão variável dos epítomos relevantes, demonstrando assim alteração qualitativa e quantitativa (por exemplo, DVa, DVII). Ainda outros têm epítomos muito fracamente expressos (por exemplo, DVI Tipo 1, DAR) e estes são referidos como “fenótipos D parciais fracos”. Alguns fenótipos parciais D estão associados à expressão de um antígeno de baixa frequência (por exemplo, FPTT com DFR e Ro^{Har}; e BARC com DVI tipos II e III) (AVENT, 2001; REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012).

1.5.4 Bases Moleculares do fenótipo Rh DEL

O fenótipo DEL é caracterizado por uma expressão reduzida do antígeno D, detectável sorologicamente apenas por técnicas de adsorção e eluição (AVENT, 2001; FLEGEL; WAGNER, 2002). Este fenótipo apresenta uma densidade antigênica muito baixa com números de sítios variando 22 a 36 por célula (KÖRMÖCZI et al., 2005; KULKARNI, 2017).

O DEL foi relatado em um terço de indivíduos D negativo do leste asiático e da população chinesa onde o alelo *RHD* 1227 G>A (K409K) é a mutação mais comum identificada. A substituição ocorre no limite entre o íntron 9/éxon 9 e resulta na perda de transcrição do éxon 9 (DANIELS, 2002, 2013b; FLEGEL, 2012).

Em caucasianos, o fenótipo DEL mais comum é o alelo *RHD* (M295I) com uma frequência de 1: 6493 em europeus. Uma frequência muito maior de 1: 272 foi encontrada em doadores D negativo. No Brasil, alelos DEL já foram caracterizados em indivíduos fenotipados como RhD negativos (COSTA et al., 2014; KULKARNI, 2017; MOTA et al., 2012).

A expressão do fenótipo DEL é mais frequentemente causada por mutações missenses, que alteram os sítios de *splicing*. Outros mecanismos responsáveis pelo fenótipo DEL incluem inserções, deleções, formação de alelos híbridos e stop códon (FLEGEL, 2012; STEGMANN et al., 2016).

A presença da variante DEL é de interesse mundial, devido ao seu potencial para causar aloimunização anti-D, quando doadores de sangue DEL positivos são inadvertidamente rotulados como RhD negativo. Diversos trabalhos têm realizado a genotipagem em doadores de sangue RhD negativo, a fim de descartar a presença do alelo *RHD*. E muitos deles têm confirmado uma alta incidência da não expressão dos alelos *RHD* em indivíduos com positividade para os antígenos C e/ou E (CHRISTIANSEN; SØRENSEN; GRUNNET, 2010; COSTA et al., 2014; FLEGEL, 2012; FLEGEL; VON ZABERN; WAGNER, 2009; GASSNER et al., 2005; MOTA et al., 2012; MOUSSA et al., 2014).

1.6 Reagentes anti-D

Na medicina transfusional há grande interesse clínico na detecção de antígenos RhD variantes, principalmente, porque seus anticorpos estão implicados em severas reações transfusionais, na DHFN e AHAI. Indivíduos que possuem esses fenótipos, se doadores, podem não ser corretamente detectados, podendo causar produção de alo anti-D em receptores

RhD negativos; e, se pacientes, podem ser sensibilizados e formar alo anti-D ao receberem hemácias com antígeno RhD normal e/ou quando mulheres podem ser sensibilizadas na gestação de feto RhD positivo. (DANIELS, 2013b; HEMKER et al., 1999).

Tendo em vista esses fatores, a correta identificação dos antígenos RhD é de suma importância na rotina laboratorial imuno-hematológica seja em doadores ou pacientes e, portanto, a escolha dos reagentes e metodologias utilizadas deve ser realizada de forma bastante criteriosa.

No Reino Unido, a recomendação para pacientes, incluindo as gestantes, é a testagem, em duplicata, por aglutinação direta com um potente anti-D monoclonal IgM. Esses reagentes são selecionados para detectar todos os tipos de D fraco, com exceção das hemácias DVI que são fenotipadas e tratadas como RhD negativo, devido ao risco de formação de anti-D. O teste da antiglobulina (AGH) não é recomendado para pacientes. Para a fenotipagem de doadores de sangue, a recomendação é a seleção de dois reagentes com diferentes clones, capazes de detectar hemácias DVI e as demais variantes e os resultados discrepantes ou inconclusivos devem ser repetidos e classificados como RhD positivo (DANIELS, 2013b).

No Brasil, em doadores de sangue, o antígeno RhD é determinado colocando-se as hemácias com antissoro anti-RhD (anti-D). Se a reação for negativa para a presença do antígeno RhD, é efetuada a pesquisa do antígeno D fraco. Para a realização da pesquisa de antígeno D fraco, é recomendada a utilização de, no mínimo, dois antissoros anti-RhD, sendo que, pelo menos um desses antissoros contenha anticorpos da classe IgG. Os antissoros devem ser obtidos de linhagens celulares distintas, incluindo a fase da antiglobulina humana (AGH). Quando a tipagem RhD ou a pesquisa do antígeno D fraco resulta positiva, o sangue é rotulado como "RhD positivo". Quando ambas as provas resultarem negativas, o sangue é rotulado como "RhD negativo" (BRASIL, 2017).

Em pacientes, a recomendação é que o antígeno RhD seja determinado colocando-se as hemácias com antissoro anti-RhD. Se a reação for negativa para a presença do antígeno RhD, recomenda-se a realização da pesquisa do antígeno D fraco. Se a pesquisa de D fraco não for realizada, o paciente será considerado Rh negativo para fins transfusionais. Quando a tipagem RhD ou a pesquisa do antígeno D fraco resultar positiva, o paciente pode ser considerado "RhD-positivo". Quando ambas as provas resultarem negativas, o paciente será considerado "RhD negativo". Recomenda-se também a utilização de um antissoro monoclonal que detecta o antígeno D parcial categoria VI (DVI+ / positivo) e um antissoro que não detecta o antígeno D parcial categoria VI (DVI- / negativo). Nesta hipótese quando houver

discrepância nos resultados entre os dois antissoros utilizados, deve-se investigar a presença dos antígenos D fraco e/ou D parcial na amostra (BRASIL, 2017).

Devido a grande variabilidade antigênica das variantes RhD, quando consideramos a fenotipagem do antígeno RhD em doadores de sangue, é importante que os reagentes utilizados sejam capazes de detectar o maior número possível de variantes com baixa expressão antigênica e/ou alterações qualitativas, juntamente com a utilização de técnicas e metodologias sensíveis.

Em relação à detecção de antígenos RhD variantes em pacientes e gestantes, a estratégia adequada para a seleção de reagentes anti-D para fenotipagem RhD, deve considerar o potencial de aloimunização anti-D dos antígenos RhD variantes que devem ou não ser detectados. Comumente utilizamos reagentes anti-D DVI- para fenotipagem RhD, todavia, outras variantes devem ser consideradas nesse contexto, como por exemplo, as variantes DAR e DIIIa. Essas variantes são associadas à aloimunização anti-D e são frequentemente encontradas em indivíduos brasileiros (CASTILHO et al., 2005; SANDLER; CHEN; FLEGEL, 2017).

1.7 Genotipagem *RHD*

A investigação molecular de D variantes é indicada sempre que houver discrepâncias de resultados entre os reagentes anti-D ou quando da ocorrência de reações fracas na tipagem RhD, uma vez que, os testes sorológicos não são capazes de distinguir entre D fraco e D parcial. A distinção entre essas variantes é muito importante, pois indivíduos que possuem fenótipos D fraco tipos 1, 2 e 3, que são a maioria, e outros fenótipos D fraco menos frequentes, podem receber transfusão de sangue RhD positivo, sem risco de aloimunização, preservando os estoques baixos de bolsas de sangue RhD negativo, e evitando a aplicação desnecessária da profilaxia Ig anti-D em gestantes, com exceção de alguns fenótipos D fraco raros (5, 11, 15, 21, 57), enquanto que, indivíduos que possuem antígenos RhD parciais devem receber sangue RhD negativo, pois correm risco de aloimunização por anti-D (SANDLER; CHEN; FLEGEL, 2017; WAGNER et al., 2000).

A genotipagem molecular do *RHD* pode também ser usada para determinar o fenótipo de pacientes que foram recentemente transfundidos ou cujos glóbulos vermelhos estão revestidos com IgG (Teste da antiglobulina Direto (TAD) positivo). A identificação do RhD, por métodos moleculares, tem aplicações ainda no contexto do pré-natal na determinação da

zigosidade paterna do gene *RHD*, para prever o status de RhD fetal e prevenir procedimentos invasivos e imunoprofilaxia anti-D (WESTHOFF, 2004).

Há ainda aplicações da genotipagem dos genes *RHD* e *RHCE* em pacientes com doença falciforme, que são homozigotos para alelos *RH* variantes, e/ou estejam em risco para a produção de aloanticorpos contra antígenos Rh de alta incidência e, junto com a genotipagem em doadores, pode causar um impacto positivo na redução da aloimunização por antígenos Rh e otimizar o uso de sangue raro, nesses pacientes (WESTHOFF, 2006, 2007).

Ao longo dos anos, diversas metodologias foram desenvolvidas e aplicadas na caracterização molecular de antígenos D variantes. Os métodos disponíveis podem ser divididos nas seguintes categorias: baixo a médio rendimento: PCR, PCR-RFLP, PCR-SSP ou PCR-AS, PCR em tempo real, sequenciamento de DNA e pirosequenciamento e alto rendimento com sistemas baseados em Microarrays (Bloodchip, BeadChip e Genome Lab. SNP stream) (MONTEIRO et al., 2011).

Uma das abordagens mais comuns, a PCR-AS ou PCR-SSP, utiliza sequências de primers oligonucleotídeos específicos, com a amplificação indicando a presença de um alelo e a falta de amplificação que denota ausência do alelo. A visualização é feita por eletroforese em gel de agarose. Outro método comum é o polimorfismo de comprimento de fragmento por PCR-RFLP do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*, com primers projetados para amplificar a região contendo um alelo de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) seguido por digestão com uma enzima de restrição para detectar o SNP. O tamanho dos produtos, conforme determinado por eletroforese, indica a presença ou ausência do SNP (WESTHOFF, 2004, 2006). Embora sejam bastante reprodutíveis, esses métodos possuem a desvantagem de serem muito trabalhosos e demorados, além de requererem análises pós-PCR, o que dificulta a automação e aumenta o risco de contaminação (MONTEIRO et al., 2011).

Devido ao alto grau de polimorfismo do sistema Rh, além das técnicas anteriormente mencionadas, pode ser ainda necessário o emprego de métodos específicos para a genotipagem de um antígeno particular, podendo até mesmo requerer métodos de sequenciamento direto para identificação de genes *RHD* alterados (CREDIDIO, 2010).

As plataformas automatizadas com detecção baseada em fluoresceína e tecnologias de microchips estão sendo ativamente exploradas, por exemplo, a utilização de beads e microarrays, que podem facilmente analisar várias regiões dos genes e aplicar automação de algoritmos multifacetados para interpretações precisas (WESTHOFF, 2006).

Sendo assim, a utilização das ferramentas de biologia molecular tem sido fundamental na implementação de metodologias nos laboratórios de imuno-hematologia, principalmente,

quando a investigação se concentra em antígenos de grupos sanguíneos altamente polimórficos e imunogênicos, como os antígenos do sistema Rh. Apesar da robustez dos métodos que envolvem a genotipagem *RH* e os inúmeros benefícios que essa tecnologia pode trazer para a medicina transfusional, muitos laboratórios não dispõem desse recurso, principalmente, devido aos custos de insumos e equipamentos, e necessitam de laboratórios de referência para a resolução de casos complexos.

Mediante todo o conhecimento acumulado durante décadas de investigações acerca das variantes RhD e a escassez de trabalhos que caracterizem essas variantes em nossa região, nós resolvemos investigar a ocorrência e determinar as frequências desses alelos na população do Distrito Federal, Centro Oeste do Brasil, assim como, desenvolver uma estratégia de genotipagem *RHD* em nossa instituição, visando à implementação futura.

2 JUSTIFICATIVA

A correta identificação das variantes RhD tem grande importância na medicina transfusional. No entanto, ainda existem poucos relatos sobre a distribuição e a frequência destas variantes de RhD no território brasileiro. A maioria dos trabalhos relata o cenário da região sudeste. Porém outras regiões do país devem ser consideradas, uma vez que dependendo da região estudada, a influência da colonização portuguesa, italiana ou africana sofrida no Brasil, pode modificar a composição das variantes de RhD. Além disso, a população brasileira possui uma alta taxa de miscigenação, e a simples caracterização étnica, considerando o próprio relato ou a cor da pele, não pode ser considerada. Desta forma, o presente trabalho destina-se à caracterização das variantes do antígeno RhD e à avaliação da frequência dos seus alelos, a nível molecular, em doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília, Distrito Federal, Centro Oeste do Brasil.

O desenvolvimento deste trabalho irá permitir a correta determinação das variantes RhD em uma região que não possui outros estudos desta natureza. Além disso, esta pesquisa ampliará o conhecimento das características multirraciais da população do Distrito Federal e poderá auxiliar em futuros protocolos de genotipagem de grupos sanguíneos, necessários para a confirmação de resultados sorológicos. Desta forma, os dados gerados com ferramentas moleculares para descrição de variantes RhD associados à metodologia de hemaglutinação podem aumentar, consideravelmente, a segurança transfusional em nossa população.

3 HIPÓTESE

No Distrito Federal amostras de sangue com discrepância sorológica na determinação do antígeno RhD na rotina imuno-hematológica de doadores de sangue apresentam uma frequência considerável de variantes de Rh D Fraco/Parcial, que pode ter relação com a composição étnica-racial da região.

A caracterização molecular de antígenos RhD variantes é uma estratégia complementar aos testes sorológicos, que pode ser implementada na rotina imuno-hematológica de doadores e pacientes.

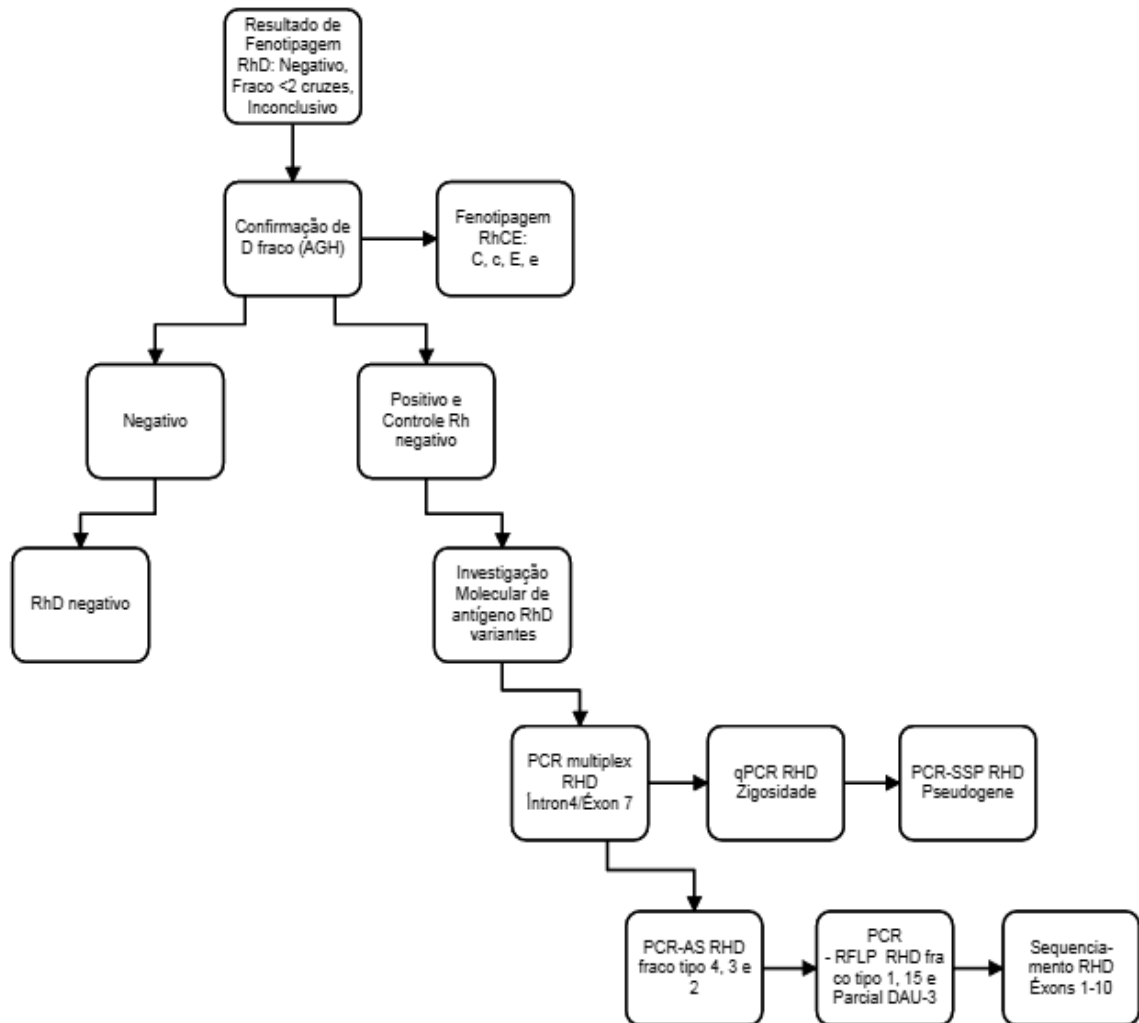
4 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as variantes RhD fraco tipos 1, 2, 3 e 4 e RhD parciais em amostras de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília por métodos moleculares.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar amostras com reatividade fraca, inconclusiva ou discrepante na fenotipagem RhD;
- Confirmar por métodos moleculares a presença de antígenos RhD variantes, em amostras de doadores de sangue;
- Estabelecer a prevalência de variantes Rh D fraco tipos 1, 2, 3 e 4 e alelos *RHD* Parciais, entre as amostras de sangue previamente fenotipadas como RhD atípicas;
- Analisar a associação entre variantes RhD e fenótipos RhCE;
- Avaliar a zigosidade do gene *RHD* em amostras caracterizadas como D fraco e/ou D Parcial

5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



Fonte: Própria

Figura 10 - Fluxograma exemplificando a estratégia experimental para caracterização de amostras RhD variantes. Após a investigação sorológica de antígeno D na rotina imuno-hematológica de doadores de sangue foram selecionadas as amostras que apresentaram reações fracas, inconclusivas e discrepantes com o resultado de confirmação de fraco positivo. A fenotipagem RhCE foi realizada em todas as amostras com o intuito de fazer associação entre os fenótipos. Para iniciar a investigação molecular de antígenos D variantes foi realizada PCR-SSP para a amplificação das regiões íntron 4 e éxon 7 do gene *RHD* em todas as amostras com o intuito de confirmar a presença do gene *RHD*. Após confirmação, as amostras seguiram para uma triagem por PCR-AS para os RhD fraco tipos 2, 3 e 4, inicialmente com as 10 primeiras amostras. O resultado da triagem demonstrou que o D fraco tipo 4 (602C>G) foi o mais frequente e, portanto a investigação nas demais amostras se iniciou por essa variante. De forma subsequente seguiu-se a investigação do D fraco tipos 2, 3 e PCR- RFLP para o D fraco tipos 1 e 15 e Parcial DAU-3. O teste de zigosidade *RHD* (qPCR e deleção do gene *RHD*) e o teste para detecção de Pseudogene (*RHD*Ψ) foram executados para todas as amostras. Por fim, as amostras que não haviam sido caracterizadas por meio das técnicas executadas foram encaminhadas para a realização de sequenciamento dos 10 éxons do gene *RHD*. Adicionalmente, as amostras inicialmente caracterizadas como RhD fraco tipo 4 foram encaminhadas para sequenciamento dos éxons 3, 5, 6 e 7 para a determinação dos subtipos dessa variantes conhecidas como DAR.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Casuística

Para a investigação molecular de antígenos RhD variantes, foram selecionadas 103 amostras de sangue periférico, obtidas de doadores voluntários de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília (FHB), que apresentaram na triagem sorológica de imunohematologia resultados da fenotipagem para o antígeno RhD, negativos, inconclusivos ou com aglutinações fracas (menores que 2 cruces); e que após o teste indireto da antiglobulina humana (AGH), para confirmação de D fraco, apresentaram resultado positivo e controle Rh negativo (Figuras 10 e 11).

O período de coleta se estendeu de outubro a dezembro de 2016, no qual foram analisadas 7.983 amostras de sangue no laboratório de imunohematologia de doadores da Fundação Hemocentro de Brasília.

Os critérios de exclusão foram: amostras inadequadas para a extração de DNA com hemólise e/ou manipulação prévia, sem condições assépticas e/ou com ausência da camada leucoplaquetária; amostras que apresentaram resultado positivo no teste sorológico de controle Rh; e casos duplicados, para doadores que fizeram mais de uma doação no período de coleta das amostras, sendo considerada somente a amostra da primeira doação.

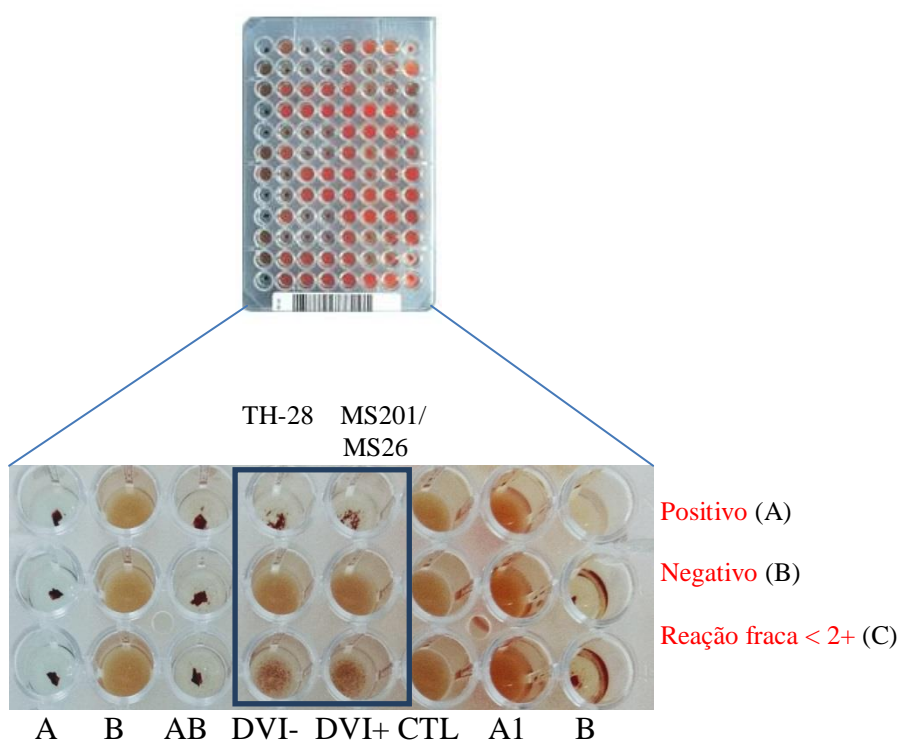
6.2 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da Fundação Hemocentro de Brasília - DF e pela Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - DF (FEPECS), instituições vinculadas à Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal. A Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP) foi incluída como instituição coparticipante. Número de processo pela plataforma Brasil é CAAE: 60130416.0.0000.5553 (ANEXO 1).

6.3 Fenotipagem RhD

A fenotipagem para o antígeno RhD foi realizada pelo método de hemaglutinação em microplaca em fundo U, contendo anticorpos monoclonais anti-D liofilizados, de duas linhagens celulares distintas, TH-28 (IgM), MS-201/MS-26 (IgM/IgG), DiaMed GmbH, Cressier FR, Switzerland, Biorad®.

Após a retirada do lacre da microplaca, foram pipetados, de forma automatizada, 50 μL de suspensão de hemácias (do doador) em bromelina, na concentração 0,8% nos poços correspondentes ao anti-D. A bromelina é uma solução que atua como uma enzima proteolítica que modifica antígenos presentes nas hemácias, exacerbando a reatividade de certos sistemas de antígenos/anticorpos, como os antígenos do sistema Rh e destruindo outros. A microplaca foi incubada durante 10-15 minutos em temperatura ambiente (18-25°C) e centrifugada por 90 segundos a 900 rpm. A leitura foi realizada de forma automatizada, pelo equipamento Lyra, Biorad[®] (Figura 11). As amostras que apresentaram resultados negativos, inconclusivos e/ou aglutinação fraca (menor que 2+), foram submetidas ao teste de confirmação do RhD Fraco.



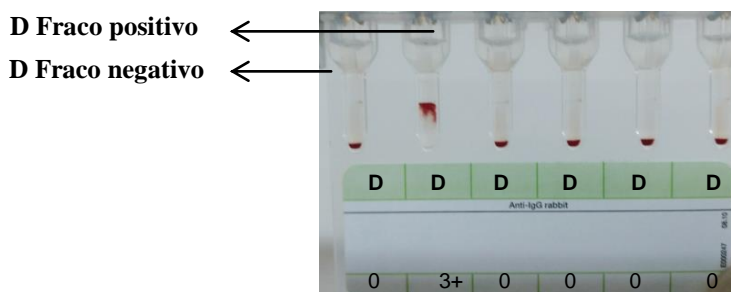
Fonte: Acervo pessoal

Figura 11 - Fenotipagem direta de antígenos ABO e RhD em microplaca. Interpretação dos resultados: (A) Positivo; (B) negativo; (C) Aglutinação fraca menor que 2+. O resultado inconclusivo é caracterizado quando é observada discrepância de resultados entre os reagentes anti-D (DVI- e DVI+), ou quando ocorrem aglutinações extremamente fracas e o equipamento não consegue interpretar.

6.4 Confirmação de D Fraco

A confirmação sorológica de RhD Fraco, realizada por meio do teste indireto da antiglobulina humana (AGH) a 37°C, utilizou cartão gel Coombs anti-IgG, DiaMed GmbH, Cressier FR, Switzerland, Biorad[®], contendo em seus microtubos, anticorpos anti-IgG (coelho) suspensos em gel.

Após a retirada do lacre do cartão, foi pipetado no microtubo, 50µL de hemácias suspensas em LISS (ID Diluente 1) na concentração 0,8% e adicionado 50µL de antissoro anti-D (anticorpo anti-D IgG monoclonal, linhagem celular ESD1, Biorad®). O cartão foi incubado durante 15 minutos a 37°C e centrifugado por 10 minutos. Após a centrifugação foi feita a leitura e interpretação dos resultados de forma automatizada (Figura 12). A solução LISS é uma solução de baixa força iônica modificada, que facilita a ligação entre o anticorpo e seu antígeno complementar. As amostras que apresentaram resultados positivos foram encaminhadas para o teste de controle Rh. Este teste utiliza a mesma metodologia, mesmos reagentes, do mesmo fabricante do teste de confirmação do D fraco, com exceção do reagente anti-D. O resultado positivo neste teste, invalida a fenotipagem RhD, e o teste da antiglobulina Direto (TAD) é realizado nesses casos. Todo o processo ocorreu de forma automatizada, por meio do equipamento Techno, Biorad®.



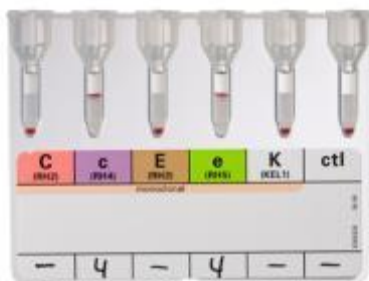
Fonte: Acervo pessoal

Figura 12 - Confirmação de D Fraco em cartão gel anti-IgG rabbit. Interpretação dos resultados: as amostras que apresentaram aglutinação formando uma linha vermelha (hemácias) na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel foram interpretadas como RhD positivo (**D Fraco positivo**) e aquelas que apresentaram botão compacto de hemácias no fundo do microtubo foram interpretadas como RhD negativo (**D fraco negativo**).

6.5 Fenotipagem Rh-Subgrupos + Kell

A fenotipagem dos antígenos Rh (C, c, E, e) e antígeno Kell foram realizados pelo método cartão gel, em todas as amostras selecionadas para o estudo. O cartão continha anticorpos monoclonais anti-C (linhagem celular MS-24), anti-c (linhagem celular MS-33), anti-E (linhagem celular MS-260), anti-e (linhagens celulares MS-16, MS-21 MS-63 e anti-K (linhagem celular MS-56) suspensos em gel, DiaMed GmbH, Cressier FR, Switzerland, Biorad® (Figura 13).

Após a retirada do lacre do cartão foi pipetado no microtubo, 10 -12,5µL de suspensão de hemácias em LISS na concentração de 5%. O cartão foi centrifugado por 10 minutos e a leitura foi realizada de forma automatizada, por meio do equipamento Techno, Biorad®.

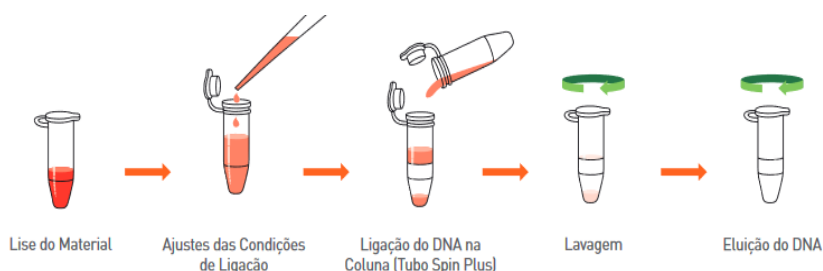


Fonte: Disponível em: <<http://www.bio-rad.com/pt-br/product/diaclon-rh-subgroups-k?ID=LO34V6LBW>> Acesso em 01/03/2019

Figura 13 - Cartão de fenotipagem Rh-Subgrupos + K. Interpretação dos resultados: a aglutinação formando uma linha vermelha em cada microtubo é interpretada como reação positiva e as hemácias compactas no fundo de cada microtubo são interpretadas como reação negativa. O microtubo ctl, é o controle da reação. O resultado negativo valida o teste. Fenótipo RhCE: ccee, e Kell negativo.

6.6 Extração de DNA

Foi utilizado para extração de DNA o kit comercial Biopur Mini Spin Plus 250, (Mobius Life Science, Pinhais – PR, BR). O DNA foi obtido por meio de *buffycoat* de amostras de sangue, colhidas do sangue periférico dos doadores de sangue, em tubos contendo o anticoagulante EDTA K2EDTA, Vacuette®, Greiner Bio-One. O kit utilizado permitiu a extração e purificação de DNA genômico empregando tubo-filtro. A metodologia abrange as etapas de lise da amostra, ligação do DNA genômico à membrana do tubo, lavagem da membrana e eliminação do etanol e eluição do DNA genômico (Figura 14).



Fonte:< <http://www.biometrix.com.br/kit-de-extracao/biopur-dna>> Acesso: 25 de fev. de 2019

Figura 14 - Demonstração das etapas da extração de DNA

O protocolo da extração de DNA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e consistiu em: adicionar 25 µL de Proteinase K e 200 µL de amostra biológica, em um microtubo de centrifugação de 1,5 mL. Adicionar 200 µL de Tampão de Lise S e homogeneizar vigorosamente em vórtex (10 a 20 segundos). Incubar os microtubos a 56°C por 15 minutos. Adicionar 210 µL de Etanol (96-100%) e homogeneizar em vórtex. Transferir toda a mistura para o Tubo Spin S. Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g. Descartar o tubo de coleta com o filtrado. Colocar o tubo-filtro sob um novo tubo de coleta e adicionar 500 µL de tampão de lavagem SI. Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g. Descartar o Tubo de coleta com o filtrado. Colocar o tubo-filtro sob um novo tubo de coleta e adicionar 600 µL de Tampão de Lavagem SII. Centrifugar por um minuto a 11.000 x g. Colocar o tubo-filtro novamente sob o Tubo de Coleta e centrifugar por mais um minuto a 11.000 x g para secagem da membrana de sílica. Colocar o tubo-filtro em um tubo de eluição S e adicionar 200 µL de Tampão de Eluição S. Aguardar um minuto e centrifugar por mais um minuto a 11.000 x g.

Após a extração as amostras foram submetidas à quantificação e qualificação do DNA no aparelho NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific), USA.

6.7 Reação em cadeia da Polimerase – PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método de síntese enzimática de fragmentos de DNA, que inclui as etapas de desnaturação, anelamento e extensão (ou polimerização). As etapas da PCR são promovidas por aumento e diminuição de temperatura.

Neste trabalho, foram utilizadas diferentes técnicas de PCR, como por exemplo: a reação de PCR – Multiplex, PCR alelo específico (PCR-AE), PCR sequência específica (PCR-SSP), *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (PCR-RFLP) e PCR em tempo real.

6.7.1 PCR – Multiplex

A técnica de PCR-multiplex é utilizada quando mais de um segmento genômico é amplificado numa única reação, cada um com seu par de primers específico. Foi utilizada para caracterização molecular confirmatória do gene *RHD*. Esta reação foi utilizada para a confirmação molecular do gene *RHD*, onde foram amplificadas três regiões gênicas; o íntron 4, o éxon 7 do gene *RHD* e como controle endógeno da reação, o gene do hormônio de crescimento humano (HGH). A escolha das regiões (íntron 4 e o éxon 7) se baseou nas diferenças entre as sequencias gênicas dos *RHD* e *RHCE* nessas regiões.

O protocolo consistiu na mistura de 17,5 µL de água free nuclease, 5,0 µL de buffer PCR 10X (concentração final 1X), 2,0 µL de MgCl₂ 50 mM (concentração final 1,5 mM), 5,0 µL de dNTPs 10 mM (concentração final 0,2 mM), 2,5 µL de primer éxon 7 sense 7,5 µM, 2,5 µL de primer éxon 7 antisense 7,5 µM; 2,5 µL de primer Íntron 3 sense 5 µM, 2,5 µL de primer íntron 4 antisense 5 µM; 2,5 µL de primer HGH sense 3 µM, 2,5 µL de primer HGH antisense 3 µM (Tabela 2); 0,5 µL de enzima *Taq* DNA polimerase da Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific 5 U/µL (concentração final 0,0125 U/µL) e 5 µL de DNA genômico (200ng/µL). As reações foram incubadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com programa de amplificação específico (Tabela 6). Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese de gel agarose 2%.

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados para amplificação das regiões íntron 4 e éxon 7 do gene *RHD* e controle endógeno (HGH) e tamanho dos fragmentos obtidos.

Localização	bp	Primers	Sequência	T°C
<i>RHD</i>	95	Exon 7/for	5'AGCTCCATCATGGGCTACAA 3'	64.5
		Exon 7/rev	5'ATTGCCGGCTCCGACGGTATC 3'	72.9
	498	Intron 3/for 1	5'GGGTTGGGCTGGGTAAGCTCT 3'	69.4
		Intron 4/rev	5'GAACCTGCTCTGTGAAGTGCT 3'	63.6
Controle endógeno	434	HGH-S (HGH-5580)	5'-TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3'	70.1
		HGH-AS (HGH-5967)	5'-CCACTCACGGATTCTGTGTGTTTC-3'	70.2

6.7.2 PCR sequência específica (PCR-SSP)

Esta técnica foi utilizada para determinação da zigosidade do gene *RHD* e também para detecção do pseudogene. No caso da zigosidade, o princípio do teste se baseou na existência de um segmento denominado “Hybrid *Rhesus box*”, que caracteriza a deleção completa do gene *RHD*. A detecção do Hybrid *Rhesus Box* foi analisada a partir da amplificação de um fragmento de 2778 pb (Tabela 3), utilizando primers específicos para o hybrid e “upstream” e “downstream” *Rhesus Boxes*, juntamente com o controle endógeno HGH, conforme protocolo adaptado previamente descrito de Perco et al (PERCO et al., 2003).

O protocolo desta reação consistiu na mistura de 24,5 µL de água free nuclease, 5,0 µL de buffer PCR 10X (concentração final 1X), 3,0 µL de MgCl₂ 50 mM (concentração final 3 mM), 2,0 µL de dNTPs 10 mM (concentração final 0,4 mM), 1,25 µL de primer HGH sense 10 µM, (concentração final 0,25 µM), 1,25 µL de primer HGH antisense 10 µM (concentração final 0,25 µM), 5,0 µL de primer U1-s sense 10 µM (concentração final 1 µM),

5,0 µL de primer RNB-31 antisense 10 µM (concentração final 1 µM) (Tabela 3), 0,5 µL de enzima *Taq* DNA polimerase 5 U/µL (concentração final 0,05 U/µL) e 5 µL de DNA genômico (200ng/µL).

As reações foram incubadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com programa de amplificação específico (Tabela 6). Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese de gel agarose 2% corados com Gel Red.

O protocolo para a detecção do pseudogene (*RHDΨ*), se baseou na amplificação de um fragmento de 250bp, entre o íntron 3 e éxon 4, que contém a inserção de 37bp. O protocolo desta reação consistiu na mistura de 33 µL de água free nuclease, 5,0 µL de buffer PCR 10X; 1,5 µL de MgCl₂, 1,0 µL de dNTPs 10 mM, 1,0 µL de primer HGH sense 70ng/µL, 1,0 µL de primer HGH antisense 70ng/µL, 1,0 µL de primer Íntron 3/for2 sense 150ng/µL, 1,0 µL de primer éxon 4 insert/ver 150ng/µL (Tabela 3), 0,5 µL de enzima *Taq* DNA polimerase 5 U/µL e 5 µL de DNA genômico (200ng/µL).

As reações foram incubadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com programa de amplificação específico (Tabela 6). Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese de gel agarose 2% corados com gel Red.

Tabela 3 - Sequência dos primers utilizados para amplificação das regiões correspondentes aos segmentos Hybrid *Rhesus box*, Pseudogene e controle endógeno (HGH) e os tamanhos dos fragmentos obtidos.

Localização	bp	Primers	Sequência	T°C
Hybrid <i>Rhesus Boxes</i>	2778	U1-s	5' TGAGCCTATAAAAATCCAAAGCAAGTTAG 3'	64.0
		Rnb-31	5' CCTTTTTTTGTTTGTTTTGGCGGTGC 3'	68.0
Pseudogene <i>RHDΨ</i>	250	Intron 3/for2	5' AACCTGGGAGGCAAATGTT 3'	63.3
		Exon 4 insert/rev	5' AATAAAACCCAGTAAGTTCATGTGG 3'	62.8
Controle endógeno	434	HGH-S (HGH-5580)	5'-TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3'	70.1
		HGH-AS (HGH-5967)	5'-CCACTCACGGATTCTGTGTGTTTC-3'	70.2

6.7.3 PCR alelo específico (PCR-AE) ou PCR *allele specific* (PCR-AS)

A PCR - AE utiliza primers dirigidos a um único ponto de mutação ou polimorfismo no DNA. Esta técnica foi utilizada para a detecção de polimorfismos de único nucleotídeo que caracterizam a expressão dos fenótipos RhD fraco tipos 1, 15 e Parcial DAU-3 (ver PCR-RFLP), 2 (1154G>C), 3 (8C>G) e do polimorfismo (602 C>G) comum a diversos fenótipos incluindo o fenótipo RhD fraco tipo 4 ou DAR.

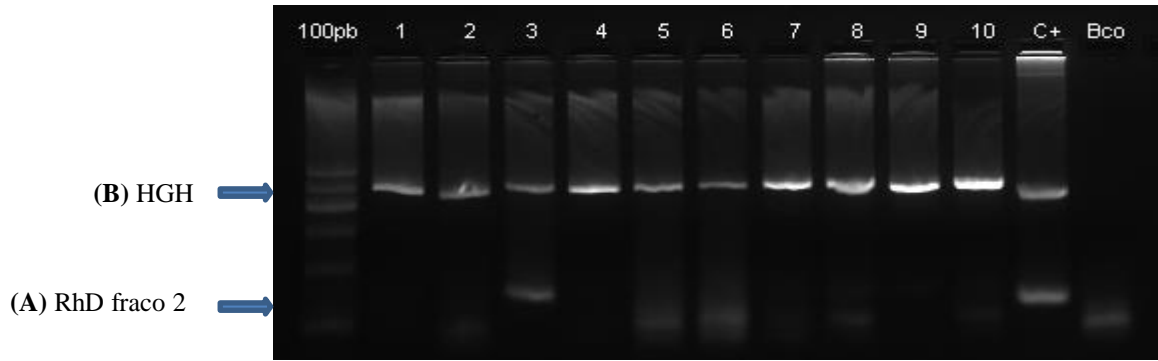
O protocolo da PCR-AS consistiu na mistura de 13,1 µL de água free nuclease, 5,0 µL de buffer PCR 10X (concentração final 1X), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM (concentração final 1,5 mM), 1,0 µL de dNTPs 10 mM (concentração final 0,2 mM), 1,0 µL de primer HGH sense 20 µM, 1,0 µL de primer HGH antisense 20 µM, 1,0 µL de primer sense 10 µM (concentração final 0,5 µM), 1,0 µL de primer antisense 10 µM (concentração final 0,5 µM) correspondente a detecção de cada tipo de D fraco (Tabela 4), 0,4 µL de enzima *Taq* DNA polimerase 5 U/µL (concentração final 0,0125 U/µL) e 5 µL de DNA genômico (200ng/µL).

O protocolo para detecção de D fraco tipo 1, 15 e Parcial DAU consistiu na mistura de 34,75 µL de água free nuclease, 5,0 µL de buffer PCR 10X (concentração final 1X), 12,0 µL de MgCl₂ 50 mM (concentração final 1,5 mM), 1,0 µL de dNTPs 10 mM (concentração final 1,25 mM), 1,0 µL de primer V270G 10 100ng/µL, 1,0 µL de primer RhDI6R 100ng/µL (Tabela 4), 0,25 µL de enzima *Taq* DNA polimerase 5 U/µL e 5 µL de DNA genômico (200ng/µL).

Tabela 4 - Sequência de primers utilizados nas reações de PCR – AS do gene *RHD* para detecção de D fraco tipos 1, 2, 3, 4 e 15 e Parcial DAU-3

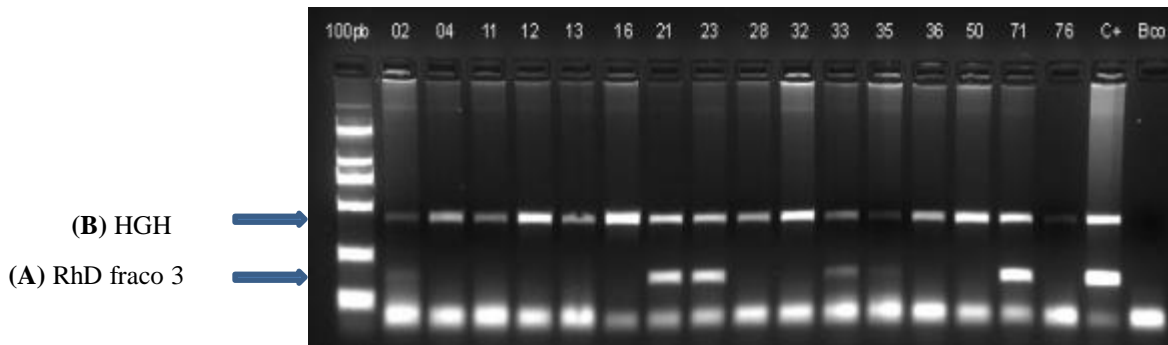
Detecção	Primers	Sequências	pb
<i>RHD</i> Fraco tipo 1 e 15 e DAU-3	V270G-F RhD-16R	5'GAGTGTGATGGGTGCCTAGGATGCTGTGCACCT3' 5'CCTGCTGGCCTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG3'	478
<i>RHD</i> Fraco tipo 2 (1154G>C)	RHDF2 sense RHDF2 antisense	5'CTCCAAATCTTTTAAACATTAAATTATGCATTTAAACAGC3' 5'GTGAAAAATCTTACCTTCCAGAAAACCTTGGTCATC 3'	126
<i>RHD</i> Fraco tipo 3 (8C>G)	RHDF3 sense RHDF3 antisense	5'ACAGAGACGGACACAGGATGAGATG 3' 5'CTTGATAGGATGCCACGAGCCC 3'	166
<i>RHD</i> Fraco tipo 4 /outros fenótipos (602C>G)	RHDF4 sense RHDF4 antisense	5'AGACTACCACATGAACATGATGCACA 3' 5' CAG ACAAACCTGGGTATCGTTGCTC 3'	138

As reações foram incubadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com programas de ampliações específicos (Tabela 6). Os produtos de PCR foram conduzidos em eletroforese de gel agarose 2%, corado com Gel Red. A interpretação dos resultados se deram pela comparação dos tamanhos dos fragmentos visualizados, em relação ao marcador molecular e o controle positivo da reação, conforme exemplificado e descrito nas figuras 15 a 18.



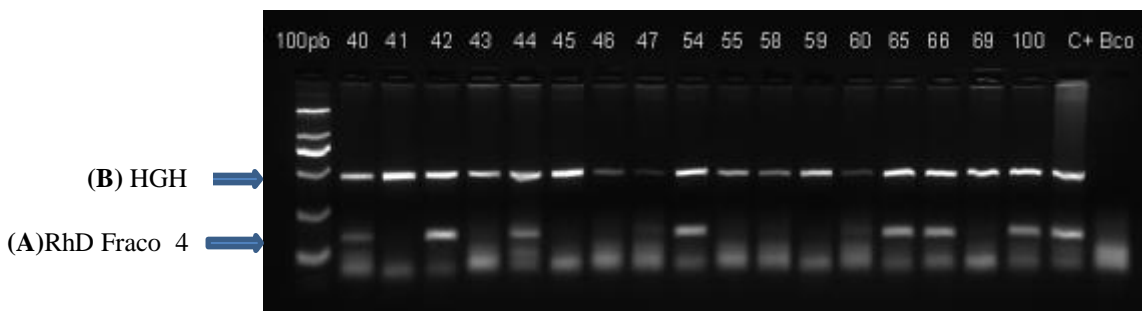
Fonte: Acervo pessoal

Figura 15 - Detecção de SNP que caracteriza alelo *RHD* fraco tipo 2 (1154 G>C). Amplificação por PCR do fragmento de DNA referente ao (A) D Fraco tipo 2 (126 bp) e (B) representa amplificação do controle endógeno o gene do hormônio do crescimento HGH (434 bp). Gel de agarose (2%) corado com Gel Red após a eletroforese. A raia 100pb mostra o marcador de peso molecular Mid Gel Pilot Mid Range Ladder (100) – Qiagen (fragmentos 100-250-500-750 -1000 -2000), Controle positivo (C+) e BCO representa o branco da reação.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 16 - Detecção de SNP que caracteriza alelo *RHD* fraco tipo 3 (8 C>G). Amplificação por PCR do fragmento de DNA referente ao (A) D Fraco tipo 3 (166 bp) e (B) representa amplificação do controle endógeno o gene do hormônio do crescimento HGH (434 bp). Gel de agarose (2%) corado com Gel Red após a eletroforese. A raia (100pb) mostra o marcador de peso molecular Mid Gel Pilot Mid Range Ladder (100) – Qiagen (fragmentos 100-250-500-750 -1000 -2000), Controle positivo (C+) e BCO representa o branco da reação



Fonte: Acervo pessoal

Figura 17 - Detecção de SNP que presente em fenótipos RhD fraco tipo 4 e outros fenótipos (602 C>G). Amplificação por PCR do fragmento de DNA referente ao (A) D Fraco tipo 4 (138 bp) e (B) representa amplificação do controle endógeno o gene do hormônio do crescimento HGH (434 bp). Gel de agarose (2%) corado com Gel Red após a eletroforese. A raia (100pb) mostra o marcador de peso molecular Mid Gel Pilot Mid Range Ladder (100) – Qiagen (fragmentos 100-250-500-750 -1000 -2000), Controle positivo (C+) e BCO representa o branco da reação.

6.7.4 Reação em cadeia da polimerase *Restriction Fragment Length Polymorfisms* (PCR-RLFP)

Esta técnica consiste na amplificação pela PCR, utilizando-se um par de primers complementares a sítios específicos do DNA, e posteriormente, os *amplicons* desta região-alvo são digeridos por enzimas de restrição. Essas enzimas reconhecem e cortam sítios específicos da região-alvo, gerando fragmentos que podem ser separados por tamanho após eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Esta reação foi utilizada para detecção dos polimorfismos correspondentes aos alelos *RHD* fraco tipos 1 (809T>G) e 15 (845G>A) e Parcial DAU-3 (835G>A;1136C>T) após amplificação de uma região de 478bp.

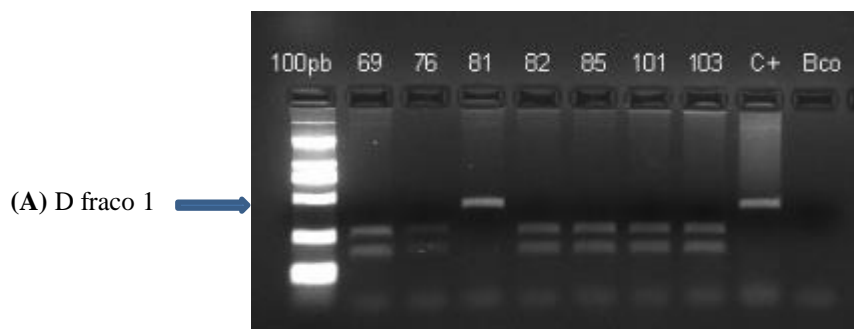
O protocolo consistiu da mistura de 9,0 µL de água livre de nucleases, 1,0 µL Buffer Tango 10X, 5,0 µL do produto de PCR, e 0,5 µL da enzima específica para cada tipo de D Fraco/D Parcial (Tabela 5), obtidas do fornecedor BioLabs, New England. As reações foram incubadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com programa de amplificação específico (Tabela 6). Os produtos obtidos foram posteriormente aplicados em gel agarose 2% para análise dos fragmentos (Figura 18).

Tabela 5 - Enzimas de restrição e fragmentos de PCR-RLFP

Detecção	Enzimas	Fragmentos*
D fraco Tipo 1	<i>AIW44I (ApaI I)</i>	175bp 303bp
D fraco Tipo 15	<i>KPN I</i>	337bp 141bp
Parcial DAU-3	<i>NLa III</i>	120bp 254bp 104bp

*Análise dos fragmentos: Ausência do polimorfismo ocorre digestão.

Presença do polimorfismo não ocorre digestão (478bp).



Fonte: Acervo pessoal

Figura 18 - Detecção de SNP que caracteriza alelo *RHD* fraco tipo 1 (809 T>G) após digestão (PCR-RFLP) com enzima de restrição *AIW44I* (*ApaI*). Amplificação por PCR do fragmento de DNA referente ao (A) D Fraco tipo 1 (478 bp). Gel de agarose (2%) corado com Gel Red após a eletroforese. A raia (100pb) mostra o marcador de peso molecular Mid Gel Pilot Mid Range Ladder (100) – Qiagen (fragmentos 100-250-500-750 - 1000 -2000), Controle positivo (C+) e BCO representa o branco da reação.

6.7.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A reação qPCR é uma variação da reação de PCR convencional que tem a habilidade de monitorar em tempo real, o progresso de uma reação de PCR (amplificação), por meio do uso de moléculas fluorescentes. Essa técnica foi utilizada em parte das amostras para análise de zigosidade do gene *RHD*.

Para a reação do teste de zigosidade *RHD*, foi avaliada as amplificações do éxon 10 do gene *RHD* e do gene referência Beta globina. Inicialmente, para validação da metodologia foi analisado uma coorte de 40 doadores de sangue e os resultados foram comparados aos dados sorológicos e moleculares previamente determinados para o antígeno RhD. De acordo com os dados obtidos, os valores de dCt para as amostras positivas para o antígeno RhD se agruparam claramente, em dois grupos distintos: um com amostras homozigotas(DD) com um valor médio de dCt de 1,87 ($\pm 0,17$) e outro hemizigoto (Dd), com um valor médio de dCt de 2,73 ($\pm 0,27$) ($P < 0,0001$, teste t). Os resultados apresentaram completa concordância com a tipagem sorológica e os testes moleculares previamente realizados. Em seguida, foram realizados os testes de zigosidade com as amostras do estudo.

Para a reação do *RHD* foi preparado o mix contendo 0,938 μ L de água, 6,25 μ L de Master mix Taq Man, 1,25 μ L de Taq Man Assay RhD (10X) contendo (5'-/56-FAM/TACGTGAGA/ZEN/AACGCTCATGACAGCAAAGTCT/3iabKFQ/-3'), primer 1(5'-CCTCTCACTGTTGCCTGCATT-3'), primer 2 (5'-AGTGCCTGCGCGAACATT-3') e 5 μ L de DNA (100 ng/ μ L). Para a reação da Beta Globina, foi preparado mix contendo 0,938 μ L de água, 6,25 μ L de Master mix Taq Man, 1,25 μ L do primer sense, 1,25 μ L do primer não sense,

0,625 μ L da Probe Beta Globina 5 μ M e 5 μ L de DNA (100 ng/ μ L). O programa de amplificação está descrito na Tabela 5.

Os resultados obtidos foram avaliados com auxílio do software do equipamento 7500 Thermo-Scientific. As análises dos resultados foram realizadas de acordo CHIU et al., 2001, pelo cálculo dCT (CT gene RHD – CT Beta Globina) (CHIU et al., 2001).

6.8 Eletroforese em gel de agarose e detecção de produtos de PCR

A eletroforese para detecção dos produtos de PCR foi realizada em gel de agarose 2%, utilizando o seguinte protocolo: 2 gramas de agarose foram diluídas em 100 mL de Tris Base, ácido acético, EDTA(1X) e aquecidos por 2 minutos e 30 segundos, e após homogeneização, mais 2 minutos. Ao término do tempo, a solução foi invertida em suporte adequado com o pente para resfriamento e polimerização.

Os produtos de PCR foram aplicados no gel juntamente com o corante de DNA Gel Red[®] (Botium) que se intercala entre as bases em dupla cadeia de DNA, permitindo sua visualização; e a solução tampão Xileno Cianol (Sigma Aldrich), que tem a função de assegurar que a amostra entre e permaneça no poço do gel pela força da gravidade, além de acrescentar cor à amostra e auxiliar no monitoramento da corrida. Como marcadores de peso molecular foram utilizados o Mid Gel Pilot Mid Range Ladder (100) e Gel Pilot (1Kb) Plus Ladder (100) da QIAGEN[®]. O Marcador molecular auxilia na análise do tamanho dos fragmentos presentes na amostra analisada.

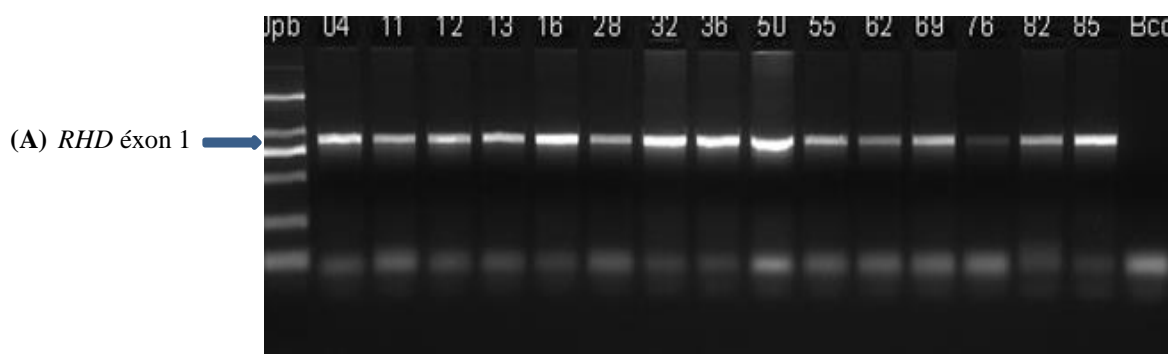
Após pipetagem das amostras nos poços do gel, a cuba de eletroforese foi ligada em 80V por 30 minutos. Para a visualização dos fragmentos amplificados no gel, após a corrida de eletroforese, foi utilizado o equipamento ChemiDoc[™] XRS+ System with ImageLab[™] Software, Biorad[®]. Por fim, a análise do tamanho dos fragmentos de DNA, que migraram ao longo do gel, é realizada a partir da comparação da sua posição em relação ao marcador de peso molecular e ao controle positivo de cada reação.

6.9 Reação de sequenciamento de DNA

As amostras do estudo que não foram caracterizadas por meio das técnicas de PCR-AS e PCR-RLFP foram encaminhadas para sequenciamento gênico de dos 10 éxons do gene *RHD* e aquelas onde foi detectado o polimorfismo 602C>G foram encaminhadas para o sequenciamento gênico dos éxons 3, 5, 6 e 7 do gene *RHD*.

Para a amplificação dos éxons do gene *RHD* foi realizada a reação de PCR utilizando os programas e primers, conforme protocolo adaptado, previamente descrito por Legler et al (Tabela 7) (LEGLER et al., 2001). O protocolo consistiu na mistura de 13,95 μL de água free nuclease, 2,5 μL de buffer PCR 10X (concentração final 1X), 0,75 μL de MgCl_2 50 mM (concentração final 1,5 mM), 1,5 μL de dNTPs 10 mM (concentração final 1.25 mM), 2,0 μL de primer sense 2,5 pMol, 2,0 μL de primer antisense 2,5 pMol e 0,3 μL de enzima Taq DNA polimerase 5 U/ μL (concentração final 0,0125 U/ μL , 2,0 μL de DNA (100 ng/ μL).

A mistura foi incubada no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com programa de amplificação específico (Tabela 6). Os produtos de PCR foram conduzidos em eletroforese de gel agarose 2% corado com Gel Red e a interpretação do resultado se deu conforme figura 19.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 19 - Amplificação do éxon 1 do gene *RHD*. Amplificação por PCR do fragmento de DNA referente ao (A) Éxon 1 do gene *RHD* (767 bp). Gel de agarose (2%) corado com Gel Red após a eletroforese. A raia (100pb) mostra o marcador de peso molecular Mid Gel Pilot Mid Range Ladder (100) – Qiagen (fragmentos 100-250-500-750 -1000 -2000) e BCO representa o branco da reação.

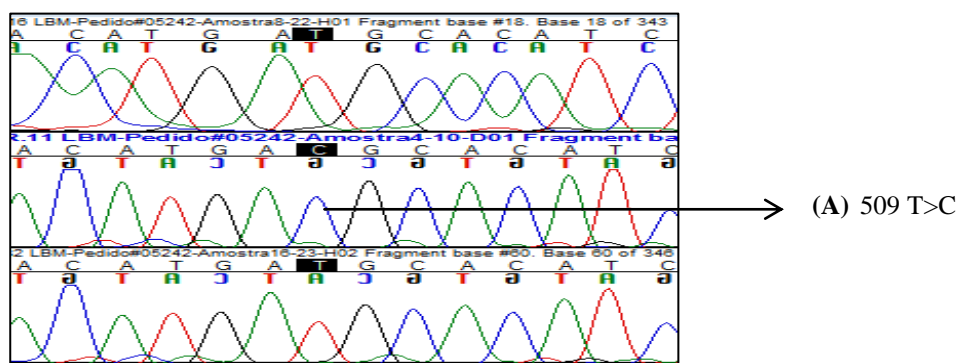
As reações de sequenciamento foram feitas nas amostras onde foi observada amplificação do éxon correspondente utilizando o kit Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. O protocolo consistiu na mistura de 2,0 μL de Big Dye, 2 μL de 5x sequencing buffer, 1,0 μL de primer 2.5 μM , 1,0 μL do produto amplificado (éxons 1-10), e

4,0µL de água free nuclease. A mistura foi incubada no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com programa de amplificação específico (Tabela 6).

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados para a remoção dos nucleotídeos não incorporados e demais reagentes, para evitar interferências quando submetidos ao sequenciador automático. A purificação foi realizada pelo método de precipitação com isopropanol, que consiste em pipetar em cada poço 40 µL de isopropanol 75% e deixar por 20 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar por 20 minutos a 13000rpm. Remover o isopropanol invertendo o tubo/placa. Adicionar 200 µL de etanol 70% e centrifugar por 5 minutos a 13000rpm. Realizar o último passo mais uma vez. Remover todo o etanol (fazendo spin invertido com a placa). Deixar secar a temperatura ambiente. Adicionar 10 µL de Hi Di Formamida. Manter a placa envolvida em papel alumínio em temperatura ambiente até ser levada ao sequenciador automático.

Os produtos purificados foram levados ao sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer), Thermo Fisher scientific. O equipamento contém um sistema de análise de DNA de 24 capilares de 50 cm e polímero POP-7. O sequenciamento de DNA foi realizado pelo Método Sanger.

As seqüências obtidas foram analisadas por meio do Software Sequencher, versão 4.1.4. Com o auxílio do software, as seqüências foram alinhadas com a seqüência do gene *RHD* completo (NC_000001.11 Reference GRCh38.p12 Primary Assembly) e com o éxon correspondente, possibilitando a visualização de polimorfismos, conforme demonstrado na figura 20. A correspondência entre os polimorfismos encontrados e o alelo *RHD* foi possível a partir da construção de uma tabela de alinhamento entre as numerações dos nucleotídeos do gene *RHD* completo e os éxons *RHD* 1-10 (ANEXO 2).



Fonte: Acervo Pessoal

Figura 20 - Demonstração de polimorfismo na posição 509 T>C (A) após sequenciamento do éxon 4 do gene *RHD*. Mutação de ponto com substituição de uma Timina por uma Citosina presente em perfis genotípicos de D variantes. Reação de sequenciamento utilizando primer reverso.

Tabela 6 - Programação de ampliações das reações de PCR e de sequenciamento gênico.

Reações	Programas de amplificação
Íntron 4/Éxon 7	1 x 95°C / 9 min.; 30 x (94°C / 1 min., 60°C / 1 min., 72°C / 3 min.); 1 x 72°C / 7 min.; 4°C ∞
Zigosidade <i>RHD</i> PCR-SSP	1 x 95°C / 10 min.; 35 x (92°C / 1min., 67°C / 1min., 72°C / 5min.); 1x 72°C / 5 min.; 4°C ∞
Zigosidade <i>RHD</i> qPCR	1 x 50°C / 2 min.; 1 x 95°C / 10 min.; 50 x (95°C / 15 seg, 60°C / 1min.30 seg.); 4°C ∞
Pseudogene <i>RHD</i> Ψ	1 x 95°C / 5min.; 28 x (94°C / 1 min., 60°C / 1min., 72°C / 1 min.); 1x 72°C / 7 min.; 4°C ∞
D Fraco tipo 1, 15 e Parcial DAU-3	1 x 95°C / 2 min.; 29 x (94°C / 30 seg., 62°C / 30 seg., 72°C / 30 seg.); 1x 72°C / 10 min; 4°C ∞
D Fraco tipo 2 e 4	1 x 95°C / 5 min.; 35 x (94°C / 20 seg.; 62°C / 20 seg., 72°C / 20 seg.); 1x 72°C / 7 min.; 4°C ∞
D Fraco tipo 3	1 x 95°C / 5min.; 30 x (94°C / 20 seg., 65°C / 20 seg., 72°C / 20 seg.); 1x 72°C / 10 min; 4°C ∞
RLFP D Fraco tipo 1, 15 e Parcial DAU-3	1 x 37°C / 120 min.
Éxon <i>RHD</i> 1-4; 6-10	1 x 95°C / 5 min.; 40 x (94°C / 20 seg., 64°C / 40 seg., 72°C / 1 min.); 1x 72°C / 10min.; 4°C ∞
Éxon <i>RHD</i> 5	1 x 95°C / 5 min.; 40 x (94°C / 20 seg., 60°C / 40 seg., 72°C / 1 min.); 1x 72°C / 10 min.; 4°C ∞
Sequenciamento	1 x 95°C / 1 min.; 25 x (96°C / 10 seg., 50°C / 5 seg., 60°C / 4 min.); 4°C ∞

Tabela 7 - Sequência de primers para amplificação do exoma do gene *RHD* (LEGLER et al., 2001)

Localização	bp	Identificação	Sequências	T °C
Éxon 1	767	RhDE1F*	5'-TCAACTGTGTAAGTATGAGGAGTCAG-3'	55.8
		RhDE1R	5'-GCTATTTGCTCCTGTGACCACTT-3'	57.4
Éxon 2	1602	RhDE2F	5'-TGACGAGTGAACTCTATCTCGAT-3'	55.1
		RhDE2R*	5'-GGCATGTCTATTTCTCTGTCTA AT-3'	54.3
Éxon 3	231	RhDE3F*	5'-GTCGTCCTGGCTCTCCCTCTCT-3'	62.1
		RhDE3R	5'-GAGCTTTTGGCCCTT TTCTCC C-3'	58.8
Éxon 4	378	RhDE4F*	5'-GCCGACACTCACTGCTCTTAC-3'	57.8
		RhDE4R	5'-TGAACCTGCTCTGTGAAGTGC-3'	57.6
Éxon 5	1458	RhDE5F*	5'-TAAGCACTTACAGAGCAGG-3'	54.7
		RhDE5R	5'-TATGTGTGCTAGTCCTGTTAGAC-3'	53.7
Éxon 6	478	RhDE6F	5'-GAGTGTGATGGGTGCCTAGGATGCTGAGCACCT -3'	67.9
		RhDE6R*	5'-CCTGCTGGCCTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG-3'	68.7
Éxon 7	405	RhDE7F*	5'-CATCCCCCTTTGGTGGCC-3'	59.1
		RhDE7R	5'-AAGGTAGGGGCTGGACAG-3'	56.5
Éxon 8	708	RhDE8F	5'-GGTCAGGAGTTCGAGATCAC-3'	54.7
		RhDE8R*	5'-TGGCAATGGTGGAAAGAAAGG-3'	55.6
Éxon 9	697	RhDE9F*	5'-TGCAGTGAGCCGAGGTCAC-3'	60.0
		RhDE9R	5'-CACCCGCATGTCAGACTATTTGGC-3'	60.3
Éxon 10	381	RhDE10F*	5'-CAAGAGATCAAGCCAAAATCAGT-3'	53.5
		RhDE10R	5'-AGCTTA CTGGATGACCACCA-3'	55.8

*Primers utilizados nas reações de sequenciamento de cada éxon.

7 RESULTADOS

7.1 Características da população estudada

No período de outubro a dezembro de 2016 (três meses), 103 de 7983 amostras de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília apresentaram perfil sorológico para antígenos RhD, com intensidade de aglutinação menor que 2 cruces, negativo ou inconclusivo e confirmação de D fraco, pelo teste da imunoglobulina humana (AGH) positivo. A frequência encontrada dos perfis descritos acima representaram 1,29% das amostras analisadas no laboratório no período especificado.

Para todas as amostras foi realizado um levantamento sócio demográfico (Tabela 8). Foi observado que a idade dos doadores variou de 20 a 60 anos, com média de 34 anos e desvio padrão de 9. A autodeclaração étnica revelou uma população de 67% de brancos, 30% de pardos e 7% de negros. O gênero masculino foi o mais frequente, representando 64% dos indivíduos estudados. Entre as amostras de doadores do sexo feminino, 89% se encontram no período de idade fértil. Mais de 70% dos indivíduos estudados são naturais da região Centro Oeste do Brasil.

Tabela 8 - Características sócio demográficas da população estudada

PERFIL DOS DOADORES			
Variáveis		Nº	%
Idade (anos)	20-30	43	41,7
	31-40	36	35,0
	41-50	17	16,5
	50-60	7	6,8
Etnia (autodeclaração)	Branca	65	63,1
	Parda	31	30,1
	Negra	7	6,8
Gênero	Masculino	66	64,1
	Feminino	37	35,9
Naturalidade/ por região	Centro-Oeste	73	70,87
	Sudeste	14	13,59
	Nordeste	14	13,59
	Norte	1	0,97
	Sul	1	0,97

7.2 Perfil sorológico dos antígenos RhCE

A fenotipagem RhCE foi realizada em todas as amostras incluídas no estudo. Em relação ao perfil Rh subgrupos (C/c e E/e), observamos maior frequência do fenótipo Dccee em 66,99% das amostras, seguidos pelo Ccee (21,36%), ccEe (6,8%), CCee (3,88%) e CcEe (0,97%). Os fenótipos e os prováveis genótipos estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Frequências fenotípicas dos antígenos RhCE

Nº de doadores	Antígenos Rh					Fenótipos	Prováveis genótipos	Frequência
	D	C	c	E	e			
69	+	-	+	-	+	D ccee	<i>Dce/dce</i>	66,99%
22	+	+		-	+	D Ccee	<i>DCe/dce</i>	21,36%
7	+	-	+	+	+	D ccEe	<i>DcE/dce</i>	6,8%
4	+	+	+	-	+	D CCee	<i>DCe/dCe</i>	3,88%
1	+	+	+	+	+	D CcEe	<i>DCe/dcE</i>	0,97%

7.3 Resultados sorológicos da fenotipagem RhD e confirmação de D fraco

Também avaliamos a presença do antígeno RhD, por fenotipagem, utilizando anticorpos anti-D monoclonais IgM/IgG (clones TH-28, MS26/MS201) em todas as amostras de sangue incluídas no estudo. Aquelas que apresentaram reações de aglutinação menor que 2+, negativa ou inconclusiva foram encaminhadas para o teste de confirmação de D fraco, utilizando o anticorpo monoclonal IgG ESD1 (teste indireto da AGH).

Em vinte e duas amostras, foram observadas discrepâncias de resultados entre os testes realizados a temperatura ambiente (resultado negativo) e a 37°C em AGH (resultado positivo); 53 amostras apresentaram resultados de intensidade de aglutinação de 1+ com os dois reagentes testados e 28 amostras apresentaram resultados muito fracos e/ou resultados que não foram interpretados pela leitura automatizada e foram considerados inconclusivos.

Em relação a intensidade de reação, as reações fracas menores que 2 cruces (<2+) foram observadas com maior frequência. A maioria das amostras apresentou grau de

aglutinação de 3 a 4 cruces quando realizado o teste em AGH (clone ESD1), com exceção de 02 amostras nas quais foram observadas grau de aglutinação de 1 e 2 cruces (Tabela 10).

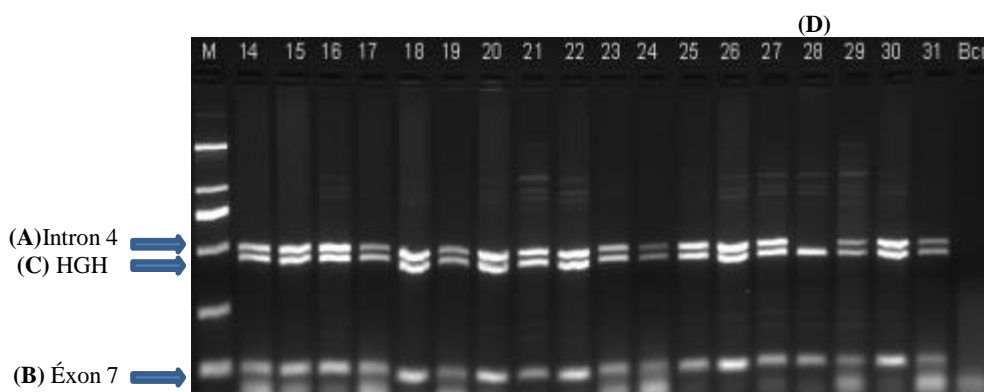
Tabela 10 - Intensidade aglutinação na fenotipagem RhD em temperatura ambiente e a 37°C .

Reações	Anticorpos Monoclonais			Nº	%
	TH-28(IgM)	MS-201/MS-26 (IgM/IgG)	ESD1 IgG (AGH)		
Discrepância	0	0	1+/3+/4+	22	21,36
>2 cruces	1+	1+	2+/3+/4+	53	51,46
Inconclusiva	0/+ ^w	0/+ ^w	3+/4+	28	27,18

Legenda: +^w: Positivo fraco

7.4 Confirmação molecular do gene *RHD*

A genotipagem *RHD* foi realizada por meio de reações de PCR, para amplificação das regiões íntron 4 e éxon 7 do gene *RHD*. Entre as amostras analisadas, em apenas 01 amostra não foi observada a amplificação do íntron 4 (498bp). Em todas as amostras foi possível visualizar a amplificação do éxon 7 (95pb) (As amplificações dessas regiões confirmaram a presença do gene *RHD* e permitiram a continuidade dos testes moleculares).



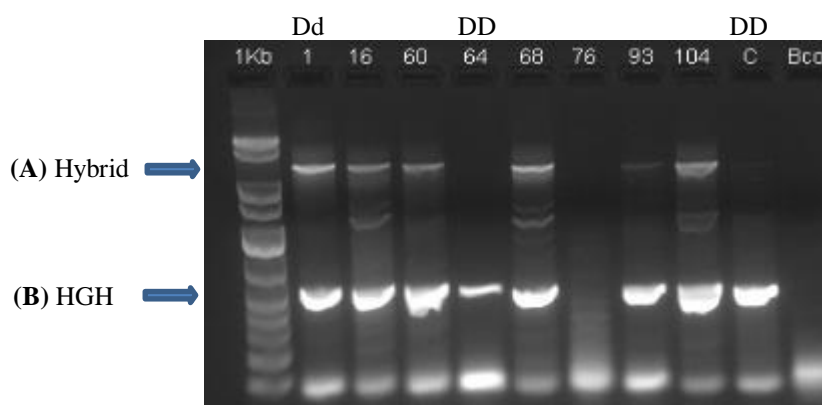
Fonte: Acervo Pessoal

Figura 21 - Amplificação das regiões íntron 4 e éxon 7 do gene *RHD*. O fragmento de DNA referente ao (A) íntron 4 (498 bp), (B) éxon 7 (95 pb) do gene *RHD*, (C) representa amplificação do gene do hormônio do crescimento HGH (434 bp) e (D) demonstram a amostra onde não foi observada amplificação do íntron 4. Gel de agarose (2%) corado com Gel Red após a eletroforese. A raia (M) mostra o marcador de peso molecular Mid Gel Pilot Mid Range Ladder (100) – Qiagen (fragmentos 100-250-500-750 -1000 -2000) e BCO representa o branco da reação.

7.5 Resultados da zigosidade *RHD* e detecção de Pseudogene *RHD* (*RHD*Ψ)

As duas técnicas utilizadas para a determinação da zigosidade *RHD* (PCR-SSP e PCR em tempo real) revelaram que 99.02% (102/103) das amostras são hemizigotos (Dd) para o gene *RHD*. Cada técnica foi realizada em parte das amostras na tentativa de determinar a zigosidade do gene *RHD*.

O genótipo *RHD* variante ou normal/*RHD* deleção foi caracterizado pela presença de uma cópia do *RHD* (detectado por PCR *RHD* íntron4/Éxon7) e pela detecção por PCR-SSP do segmento híbrido “*Rhesus boxes*”, nomenclatura ISBT *RHD**01N.01, em 55 amostras do estudo. Conforme observado na figura 22, nas amostras consideradas hemizigotos, é possível observar dois produtos de amplificação: o segmento híbrido de 2778bp e o controle endógeno HGH de 434bp. Uma amostra demonstrou ser homozigoto (DD) para o gene *RHD*, pois nela não observamos a amplificação do produto que caracteriza o segmento híbrido, mas observamos a amplificação do controle endógeno HGH. Neste caso será necessária a realização de novos testes para determinar qual seria o outro alelo variante presente, visto que, essa amostra apresentou fraca expressão do antígeno D (Figura 22).

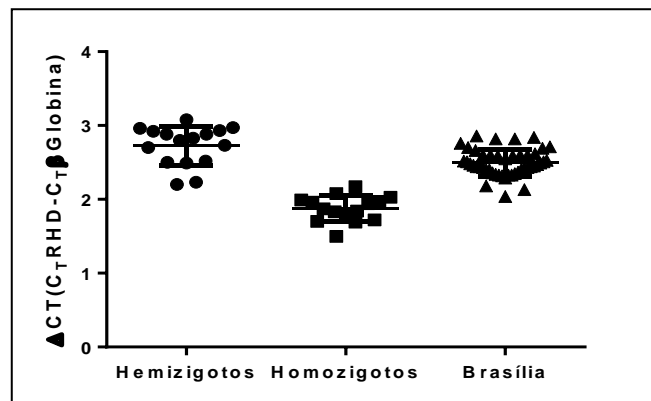


Fonte: Acervo Pessoal

Figura 22 - Teste de zigosidade *RHD* por PCR-SSP. Amplificação por PCR do fragmento de DNA referente ao (A) “Hybrid *Rhesus Boxes*” (2778 pb) e (B) representa amplificação do controle endógeno, o gene do hormônio do crescimento HGH (434 bp). Gel de agarose (2%) corado com Gel Red após a eletroforese. A raia (1kb) mostra o marcador de peso molecular Gel Pilot (1Kb) Plus Ladder (100) – Qiagen (fragmentos 100-200-300-400-500-700-1000- 1600-2000-5000-8000-10000), C representa o controle homozigoto (DD) e BCO representa o branco da reação.

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) também foi utilizada para determinar a zigosidade *RHD* em parte das amostras do estudo. A metodologia foi validada e as análises da validação demonstraram que as amostras consideradas *RHD* homozigotos (DD) e hemizigotos (Dd), foram concordantes com a fenotipagem RhD e os testes moleculares previamente

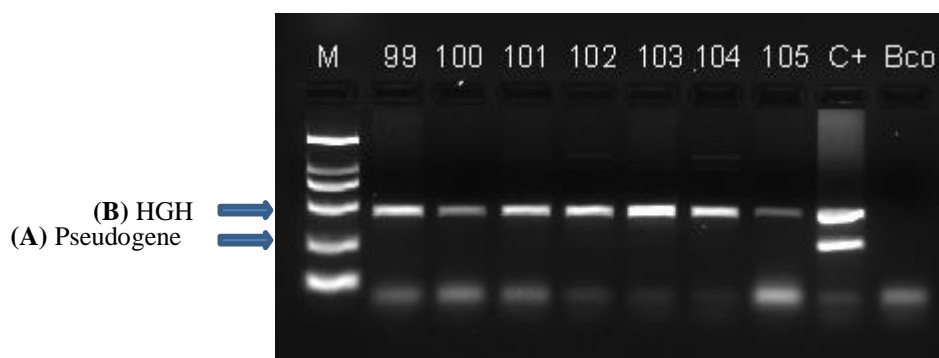
realizados no laboratório. Após a validação, nós analisamos a zigosidade *RHD* em 47 amostras do estudo e comparamos os resultados obtidos com aqueles da validação. Conforme observado na figura 23, todas as amostras dos doadores da Fundação Hemocentro de Brasília, analisadas por qPCR apresentaram valor médio de dCt de 2,49 ($\pm 0,18$) e portanto, foram consideradas hemizigotos para o gene *RHD*.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 23 - Comparação de dCt (dCt *RHD*- dCt Beta globina) entre os resultados obtidos no presente estudo e dados obtidos em estudos anteriores de amostras hemizigotos 2,73 ($\pm 0,27$) e homozigotos dCt de 1,87 ($\pm 0,17$) para o *RHD*

As reações de PCR para a detecção do Pseudogene não detectaram nenhuma amostra com a presença da inserção de 37 bp na junção íntron 3/éxon 4 (Figura 21).

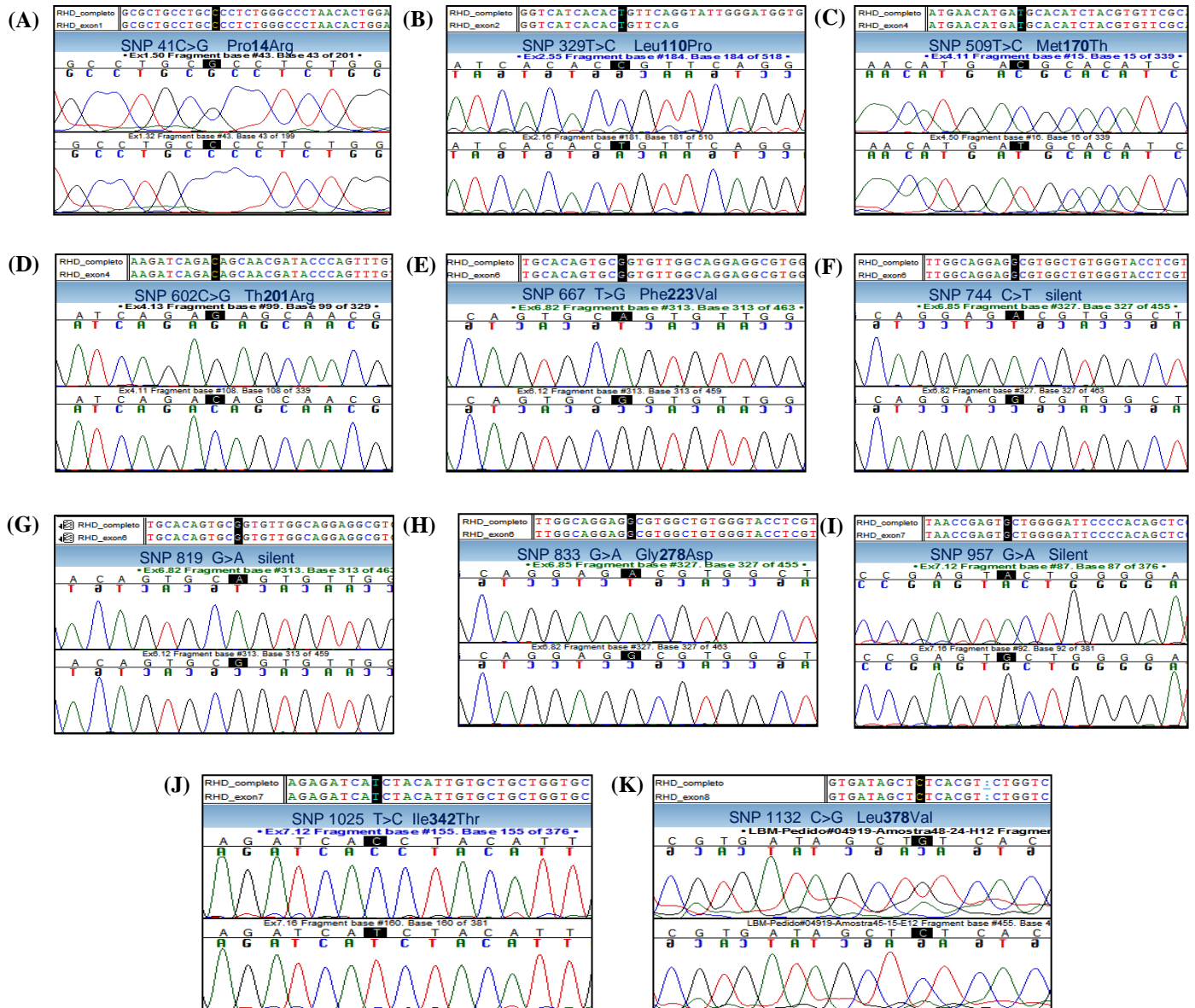


Fonte: Acervo Pessoal

Figura 24 - Detecção de Pseudogene *RHDΨ*. Amplificação por PCR do fragmento de DNA referente ao (A) Íntron 3/Éxon 4 + 37pb do gene *RHD* (250bp) e (B) representa amplificação do controle endógeno o gene do hormônio do crescimento HGH (434 bp). Gel de agarose (2%) corado com Gel Red após a eletroforese. A raia (M) mostra o marcador de peso molecular Mid Gel Pilot Mid Range Ladder (100) – Qiagen (fragmentos 100-250-500-750 -1000 -2000) e C+ controle positivo e BCO representa o branco da reação.

7.6 Resultados das reações de sequenciamento gênico

As análises dos eletroferogramas obtidos de sequenciamento pelo método Sanger dos éxons do gene *RHD* permitiu a detecção de diversos polimorfismos e a caracterização de muitas variantes D (Figura 25).



Fonte: Acervo Pessoal

Figura 25 - Eletroferogramas parciais do sequenciamento de Sanger e os polimorfismos observados após amplificação dos éxons (1-10) do gene *RHD* e reação de sequenciamento. (A) demonstra a mudança do nucleotídeo 41C>G; (B) demonstra a mudança do nucleotídeo 329 T>C; (C) demonstra a mudança de nucleotídeo 509 T>C; (D) demonstra a mudança de nucleotídeo 602 C>G; (E) demonstra a mudança do nucleotídeo 667 T>G; (F) demonstra a mudança do nucleotídeo 744 C>T; (G) demonstra a mudança do nucleotídeo 819 G>A; (H) demonstra a mudança do nucleotídeo 833 G>A; (I) demonstra a mudança do nucleotídeo 957 G>A; (J) demonstra a mudança do nucleotídeo 1025 T>C; (K) demonstra a mudança do nucleotídeo 1132 C>G.

7.7 Resultados da caracterização molecular de *RHD* variantes

Entre as 103 amostras de doadores que apresentaram discrepâncias sorológicas na fenotipagem RhD, 27 (26,21%) apresentaram polimorfismos que caracterizam o fenótipo RhD fraco e em 72 amostras (68,93%) foi observado polimorfismos que caracterizam o fenótipo RhD parciais (Tabela 11). Também observamos que 02 amostras (1,94%) apresentaram 100% de similaridade com as sequências dos 10 éxons do gene *RHD*, não demonstrando alterações nas regiões gênicas estudadas, sugerindo que as alterações possam estar localizadas nas regiões não codificantes (íntrons) ou a presença de antígeno RhD normal.

Em três amostras (2,91%) não foi observada a amplificação de pelo menos dois dos 10 éxons do gene *RHD* sugerindo a presença de um alelo *RHD* parcial e/ou gene híbrido. Para confirmar essa hipótese mais estudos devem ser realizados e no momento as amostras foram classificadas como não definidas. Em uma amostra não foi observada as amplificações dos éxons 4 e 5 e o íntron 4; em outra os éxons 5 e 9 não amplificaram e a última amostra além de não serem observadas as amplificações dos éxons 2, 5 e 8, encontramos também os polimorfismos 602C>G, 957G>A e 1025 T>C. O Esses polimorfismos estão presentes em alguns alelos parciais *RHD**DAR, no entanto, a combinação encontrada não define nenhuma das variantes descritas.

Tabela 11 - Frequência de variantes *RHD* na população de doadores de sangue do Distrito Federal, Centro Oeste do Brasil. (N=103)

Alelos <i>RHD</i>	<i>RHD</i> Fraco	<i>RHD</i> Parcial	<i>RHD</i> normal	Não definidas
Amostras	27	72	2	3
Frequência	26,21%	68,93%	1,94%	2,91%

Portanto, a execução da estratégia experimental desenvolvida para este estudo, permitiu a caracterização de 05 alelos *RHD* fraco e 05 alelos *RHD* parciais, que estão descritos nas tabelas 12 e 13.

7.8 Associação entre RhD variantes e fenótipos RhCE

A compilação dos dados moleculares e sorológicos, permitiu a realização de análises de associação com os fenótipos RhCE (Tabela 14). O fenótipo ccee foi o mais frequentemente associado às variantes caracterizadas neste estudo. O D fraco tipo 3, tipicamente associado ao fenótipo Ccee (88,2%), foi associado a outros dois fenótipos ccee e Ccee. Os fenótipos DAR tipicamente associados ao fenótipo ccee (94,0% e 94,2%) foram também associados aos fenótipos Ccee, CcEe e ccEe. As demais associações estão concordantes com as informações consultadas no Website Rhesus base, disponíveis na URL: The Human Rhesus Base, version 2.4, <http://www.rhesusbase.info/>, update 2018-12-02, acesso em 15 de Fev. 2019.

Tabela 14 – Associação entre fenótipos RhD variantes e fenótipos RhCE.

Fenótipo D variante	Fenótipo C/c e E/e	Nº doadores	%
D Fraco tipo 1	Ccee	2	100
D Fraco tipo 2	ccEe	6	100
D Fraco tipo 3	ccee	1	5,9
	CCee	1	5,9
	Ccee	15	88,2
D Fraco tipo 38	Ccee	1	100
D Fraco tipo 145	ccee	1	100
	ccee	32	94,2
	Ccee	1	2,9
DAR 3.1	CcEe	1	2,9
	ccee	31	94
	ccEe	1	3
DAR 1.2	Ccee	1	3
	Ccee	2	100
DVII	Ccee	2	100
DOL 1	ccee	1	100
DOL 2	ccee	1	100
RHD normal	CCee	2	100
Não definidas	ccee	2	67
	CCee	1	33

7.9 Associação entre intensidade de aglutinação na fenotipagem RhD e variantes RhD

As variantes RhD detectadas também foram associadas às intensidades de aglutinação observadas com anticorpos monoclonais na pesquisa direta a temperatura ambiente (TA) e no teste indireto da AGH a 37°C (Tabela 15).

As análises revelaram que todas as amostras caracterizadas como D Fraco tipos 1, 2, 38 e 145 não reagiram com anticorpos monoclonais em T.A. e reação positiva no teste indireto da AGH. Nos D fraco tipos 38 e 145 apresentaram intensidade de reação fraca (1+) em AGH. Observamos ainda, que os alelos *RHD* fraco tipos 3 e e DAR apresentaram as três reações que qualificaram as amostras para o estudo: discrepância, reação fraca menor que 2+ e inconclusiva. Os alelos DOL não reagiram com a anti-D TH-28 (IgM) a T.A.

Tabela 15 - Anticorpos monoclonais, intensidade de aglutinação e antígenos RhD variantes.

Fenótipo D variante	Nº de doadores	Anticorpos monoclonais x intensidade de aglutinação		
		Microplaca (Fenotipagem direta) TA		Gel (AGH)
		TH-28(IgM)	MS-201/MS-26 (IgM/IgG)	ESD1(IgG)
D Fraco tipo 1	2	0	0	3+
D Fraco tipo 2	6	0	0	3+
D Fraco tipo 3	9	1+	1+	2+/3+
	5	0/+ ^w	0/+ ^w	3+
	3	0	0	3+
D Fraco tipo 38	1	0	0	1+
D Fraco tipo 145	1	0	0	1+
DAR 1.2	8	1+	1+	3+/4+
	18	0/+ ^{w/1+}	0/+ ^{w/1+}	3+/4+
	7	0	0	3+
DAR 3.1	31	1+	1+	3+/4+
	2	0/+ ^{w/1+}	0/+ ^{w/1+}	3+/4+
	1	0	0	3+
DVII	2	1+	1+	3+/4+
DOL 1	1	0	2+	3+
DOL 2	1	0	1+	3+
<i>RHD</i> normal	2	1+	1+	3+
Não definidas	1	0	0	3+
	1	1+	1+	3+
	1	1+	+ ^w	3+

8 DISCUSSÃO

O antígeno RhD é o mais importante antígeno de grupo sanguíneo determinado por uma proteína (WAGNER et al., 1999). A frequência desse antígeno (fenótipo RhD positivo) é observada em cerca de 85% de caucasianos, cerca de 95% de indivíduos da África subsaariana e mais de 99,5% da população da Ásia oriental. Embora a maioria das pessoas sejam RhD positivas ou RhD negativas, a expressão do antígeno RhD na membrana eritrocitária pode apresentar variações quantitativa e qualitativa, devido a ocorrência de mecanismos genéticos variados, sendo denominados como antígenos D variantes (DANIELS, 2013b; WAGNER; FLEGEL, 2004).

O reconhecimento da existência de antígenos RhD variantes ocorreu em 1946 e desde então, inúmeros estudos populacionais se concentraram em caracterizar molecularmente esses alelos. Como exemplos mais recentes, podemos citar os trabalhos de Fichou e colaboradores que investigaram RhD variantes em indivíduos de diferentes regiões da Índia e Dezan e colaboradores, que realizaram a investigação na população de doadores de sangue de São Paulo, Brasil (DEZAN et al., 2018; FICHOU et al., 2018; STRATTON, 1946).

Neste trabalho, nós realizamos a caracterização molecular de antígenos RhD variantes, em 103 amostras de doadores de sangue da região Centro-Oeste brasileira. Foi observada uma frequência de antígenos D variantes de 1,29% nessa população. Este resultado difere de trabalhos realizados em outras regiões do Brasil, como por exemplo, estudos realizados com a população de doadores de sangue do sudeste do Brasil, nas regiões do estado de São Paulo, nos quais foram observadas frequências variadas de 0,3% (CAMPOS et al., 2016), 0,52% (ARNONI et al., 2016), e 0,8% (CRUZ et al., 2012). No entanto, a frequência observada em nosso trabalho foi menor, quando comparada à frequência de 9,75% descrita na população de doadores de sangue do estado do Paraná, sul do Brasil (ZACARIAS et al., 2016). Estudos realizados nos Estados Unidos encontraram frequência de 2,2% de alelos D variantes utilizando metodologia manual em tubo. Na Tunísia, país do norte da África, a frequência de D variantes foi de 0,5% utilizando três metodologias diferentes (placas opalinas, tubo e microplaca) (OUCHARI et al., 2018; WANG; LANE; QUILLEN, 2010).

Embora haja muita variação, é possível que a divergência de resultados encontrados, possa estar diretamente associada à qualidade dos reagentes anti-D (clones) utilizados e as diferentes técnicas e metodologias empregadas (BARROS; WAKIM; CASTILHO, 2006; DANIELS, 2013b; SANDLER; CHEN; FLEGEL, 2017; WESTHOFF, 2005).

Por esse motivo, é importante ressaltar que, Campos e colaboradores utilizaram a metodologia de hemaglutinação em cartão gel e em tubo, empregando para gel reagentes anti-D IgM (clone P3 x 61), e anti-D blend (clones P3 x 290; P3 x 35; P3 x 61; P3 x 2123B10) da Grifols, Barcelona, Spain; e para tubo anti-D IgM (clone MS201) e anti-D IgG (clone MS26) da Fresenius Kabi, São Paulo, Brasil; Arnoni e colaboradores utilizaram a metodologia de fase sólida e avaliaram os clones IgM RUM-1 e blend D175(IgM) + D415 (IgG), da Immucor Inc.; Cruz e colaboradores, utilizaram a metodologia em tubo e avaliaram os clones anti-D IgM (clone MS201) e anti-D IgG (clone MS26; Smart Kit, Fresenius Kabi, São Paulo, Brasil); e Zacarias e colaboradores, utilizaram a metodologia de hemaglutinação em microplaca, usando um anti-D monoclonal IgM anti-DVI- (TH28) e anti-DVI+ (MS201/MS26, IgM/IgG), da DIAMED Latino América S.A., Lagoa Santa-MG, Brasil, os mesmos reagentes e metodologia empregados no presente estudo (ARNONI et al., 2016; CAMPOS et al., 2016; CREDIDIO, 2010; ZACARIAS et al., 2016).

O emprego de diferentes metodologias e reagentes anti-D é uma explicação para a variação da frequência de fenótipos D fraco encontrada em diferentes trabalhos (BARROS; WAKIM; CASTILHO, 2006; WAGNER et al., 2000). Outra provável explicação para a diferença de prevalência encontrada entre as regiões é o fato da colonização de imigrantes ocorrida nas áreas estudadas, pois segundo a literatura, a distribuição das variantes de Rh pode variar de acordo com a raça e etnia (SANDLER; CHEN; FLEGEL, 2017).

Como exemplo, a população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, resultante de uma mistura entre nativos americanos, europeus (principalmente portugueses) e africanos. O processo de miscigenação ocorreu de maneira diversa em diferentes regiões geográficas, com uma tendência mais pronunciada da contribuição nativo americana no norte, uma alta taxa de contribuição africana no nordeste e um número relativamente baixo de contribuições americanas e africanas no sul (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2009). As regiões sudeste e centro-oeste do Brasil são marcadas por uma alta taxa de miscigenação, uma mistura entre as etnias indígenas, africanas e europeias, enquanto que na região Sul do Brasil existe uma predominância de indivíduos caucasianos, devido às intensas imigrações europeias ocorridas na região (MARRERO et al., 2005).

Neste estudo, 26,21% (27/103) das amostras foram caracterizadas como D fraco tipos 1, 2, 3, 38 e 145. O alelo *RHD* fraco tipo 3 foi a variante D fraco mais frequente, representando 16,1% (17/103) das amostras analisadas. O alelo *RHD* fraco tipo 2 foi encontrado em 5,83% (6/103), o *RHD* fraco tipo 1 em 1,94% (2/103), o *RHD* fraco tipo 38 em 0,97% (1/103) e o *RHD* fraco tipo 145 em 0,97% (1/103).

Trabalhos realizados com populações de doadores de sangue e pacientes no Brasil observaram maior frequência das variantes D fraco tipos 1, 2 e 3, em relação às variantes D parciais. Como exemplos, Campos e colaboradores investigaram, por métodos moleculares, 223 amostras de doadores e pacientes da cidade de São Paulo, Brasil, e observaram maior frequência das variantes D fraco tipo 1 (70/223), tipo 2 (44/223) e fraco 3 26/223). Igualmente, Credidio e colaboradores investigaram D variantes em 306 amostras de pacientes e doadores oriundos de diversas partes do Brasil e observaram maior frequência das variantes D fraco tipos 1 (76/306) e 2 (75/306) e 3 (13/306). Estes resultados são similares àqueles realizados com a população europeia, onde também é observada a predominância dessas variantes (ANSART-PIRENNE et al., 2004; ARNONI et al., 2016; CREDIDIO; JR; CASTILHO, 2011; SANDLER; CHEN; FLEGEL, 2017; ZACARIAS et al., 2016).

Por outro lado, nossos resultados demonstraram maior frequência de alelos *RHD* parciais, que representaram 68,93% das amostras analisadas. Os alelos *RHD* DAR 3.1 e DAR 1.2 foram os alelos mais encontrados, com frequências de 33,01% e 32,04% respectivamente. Esses alelos são conhecidos também como alelos D fraco tipo 4 subtipos. A frequência encontrada foi maior quando comparada aos estudos prévios realizados por Credidio e colaboradores, Dezan e colaboradores e Arnoni e colaboradores que encontraram frequências respectivas de alelos *RHD* parciais de 44,4%, 44,3% e 56,3%, todos com maior porcentagem de alelos *RHD* fraco tipo 4 ou DAR (ARNONI et al., 2016; CREDIDIO; JR; CASTILHO, 2011; DEZAN et al., 2018). Estudos semelhantes realizados com populações caucasianas encontraram porcentagens menores de alelos *RHD* parciais. Como exemplo, Van Sandt e colaboradores encontraram uma porcentagem de 9,9% de fenótipos D parciais em doadores de sangue de Flanders, Bélgica (VAN SANDT et al., 2015).

Os alelos *RHD* fraco tipos 1, 2 e 3, são membros do cluster europeu e são alelos prevalentes em 90% dos casos de antígeno D variantes em populações caucasianas, enquanto que o D fraco tipo 4 ou DAR, tem ocorrência de menos de 2% nessa população, e alta frequência em populações africanas (SANDLER; CHEN; FLEGEL, 2017). Hemker et al., demonstrou a ocorrência da variante DAR em 4,9% dos negros sul-africanos (HEMKER et al., 1999). Portanto, a alta frequência dos alelos D fraco tipo 4/DAR encontrada em nosso estudo, sugere a participação da ancestralidade africana na composição étnica da população brasileira, em especial na população brasiliense, devido aos alelos do cluster D fraco tipo 4 estarem largamente confinados a indivíduos ancestrais africanos (CASTILHO et al., 2005; DEZAN et al., 2018; HEMKER et al., 1999; WAGNER; FLEGEL, 2004).

Os alelo *RHD* DAR ou D fraco tipo 4 são variantes do antígeno D caracterizadas pela completa falta de pelo menos nove, dos 37 epítomos do antígeno RhD. Em nossos resultados, foi observado que essas variantes apresentam reações fracas com reagentes anti-D monoclonais, indicando uma fraca expressão antigênica da proteína RhD. Esses resultados corroboram com estudos prévios, os quais demonstraram a perda de epítomos, bem como a descoberta de indivíduos que formaram anti-D, e estudos sorológicos com diferentes anticorpos monoclonais, que relataram que essa variante possui alterações qualitativas com baixa expressão do antígeno D (HEMKER et al., 1999).

Os alelos *RHD**DAR são associados ao haplótipo *Dce* (CASTILHO et al., 2005; WAGNER; FLEGEL, 2014) e nossos resultados corroboraram com essa associação, *RHD**DAR 3.1 (94%) e *RHD**DAR 1.2 (94,2%). Arnoni e colaboradores demonstraram a associação entre o alelo *RHD* DAR 1.2 ou D fraco tipo 4.2.2 com a variantes *RHCE*, em especial o alelo *RHCE**ceAR (93,6%), e o alelo *RHD* DAR 3.1 ou D fraco tipo 4.0 associado ao alelo *RHCE**ceVS.02 (63,4%) e *RHCE**ce (48C,105T, 733G,744C, 102T) (21,9%). Os alelos *RHCE* citados estão associados à expressão de antígenos do sistema Rh de baixa frequência ou a falta de antígenos de alta frequência, além de variantes dos antígenos RhCE (ARNONI et al., 2016). Nossos resultados demonstraram uma frequência de 65,05% de alelos *RHD**DAR que podem estar associados aos antígenos acima mencionados e variantes *RHCE*. No entanto, para averiguação desse fato, novos protocolos devem ser desenvolvidos e posteriormente testados.

Outras variantes foram também caracterizadas em nosso estudo, embora apresentassem menor frequência. Os alelos *RHD* fraco raros, D fraco tipo 38 (1/103) e D fraco tipo 145 (1/103), e alelos *RHD* parciais, DOL 1 (1/103), DOL 2 (1/103), DVII (2/103) que foram identificados por meio de análise de sequenciamento dos éxons *RHD*.

O D fraco tipo 38 possui uma baixa densidade antigênica (60-151 sítios/célula) e, muitas vezes, dependendo do método e reagente utilizados, podem não ser detectado por métodos sorológicos convencionais, a não ser pelo método de adsorção e eluição (COSTA et al., 2014, 2016). No presente estudo, o antígeno D fraco tipo 38 não foi detectado pelos anticorpos anti-D monoclonais na fenotipagem RhD e reagiu fracamente em AGH. Essa variante foi relatada em estudos prévios brasileiros, associada ao haplótipo *DCe*, com frequências relativamente altas, aos nossos resultados e à frequência de 1,5% descrita em caucasianos (ANSART-PIRENNE et al., 2004). Foi observada a ocorrência dessa variante em apenas 01 amostra do estudo, enquanto que, Arnoni e colaboradores descreveram uma frequência de 12,1% dessa variante em suas análises. Campos e colaboradores, Costa e

colaboradores e Dezan e colaboradores, também relataram a caracterização molecular dessa variante, com frequências de 1,2%, 2,8% e 19,81% respectivamente. A menor ocorrência dessa variante em nosso estudo pode estar relacionada às características étnicas da população brasileira ou ainda à capacidade de detecção dessa variante pelo reagente anti-D utilizado, uma vez que, essa variante possui baixa densidade antigênica, podendo ser observadas reações negativas na fenotipagem RhD (ARNONI et al., 2016; CAMPOS et al., 2016; COSTA et al., 2014; PERSON, 2017).

O alelo *RHD* fraco tipo 145, ainda não havia sido caracterizado em brasileiros. O nosso estudo é o primeiro trabalho que descreve a sua ocorrência. Nesta pesquisa, essa variante não reagiu no teste de hemaglutinação direta para o antígeno RhD, nos dois anti-D monoclonais utilizados, e reagiu fracamente (1+) em AGH com anti-D monoclonal. A variante é membro do cluster europeu e neste estudo foi associada ao haplótipo *Dce*. No entanto, não há relatos na literatura, que corrobore essa associação (WAGNER; FLEGEL, 2014).

As variantes DOL 1 e 2 são também membros do cluster D fraco tipo 4, e ocorrem tipicamente em associação com o haplótipo *Dce*. Portanto são alelos comuns em indivíduos com descendência africana (FLEGEL et al., 2009; ROUSSEL et al., 2012). Nos testes sorológicos, essas amostras foram classificadas como inconclusivas, pois não reagiram com um dos reagentes anti-D monoclonais utilizado na fenotipagem antígeno RhD, o anti-D clone IgM TH-28. A densidade antigênica aproximada dessas variantes é de 4.700 sítios por célula (REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012). Ambas, estão envolvidas em aloimunização por anti-D e podem estar ou não associadas a uma fraca reação com anticorpos monoclonais, dependendo do reagente utilizado. Arnoni e colaboradores relataram a frequência de 0.5% dessa variante em suas análises, menor quando comparada aos nossos resultados (ARNONI et al., 2016). O alelos *RHD* DOL são frequentemente associados à variante *RHCE**ceBI. Essa variante é caracterizada pela não expressão do antígeno de alta frequência HrS; pela expressão do antígeno de baixa frequência STEM; e a expressão fraca do antígeno e. Arnoni e colaboradores encontraram uma associação de 100% do alelo *RHD**DOL 2 com a variante *RHCE**ceBI em suas análises (ARNONI et al., 2016; WAGNER; FLEGEL, 2014; WEBSITE ISBT, 2019). Posteriormente, novos experimentos podem ser realizados a fim de investigação dessas associações em nossas amostras.

A variante parcial DVII faz parte de um dos fenótipos D categoria que são caracterizados pela falta de um dos 9 epítomos (epD8), que reagem com anticorpos monoclonais. Essa variante é membro do cluster europeu e está associada à expressão do

antígeno RhD de baixa frequência, o Rh40 (Tar). A variante DVII foi associada ao alelo *RHCE**ce01 (85,7%) por Arnoni e colaboradores. Indivíduos que possuem *RHD**DVII podem desenvolver anticorpos anti-D após imunização por gravidez ou transfusão (ROUILLAC et al., 1995; WEBSITE ISBT, 2019). A alteração molecular que define essa variante está associada a uma baixa densidade antigênica do RhD, com o número de sítios antigênicos variando entre 3.600-8.400 por célula (REID; LOMAS-FRANCIS; OLSSON, 2012; WAGNER et al., 2000). Este resultado também foi encontrado em nosso estudo. Nós observamos uma frequência de 1,94% dessa variante, entre as amostras de doadores de sangue, com resultado fraco ou discrepante para RhD. A frequência encontrada em nosso estudo foi maior que a descrita por Credidio, de 1,5% e colaboradores e Arnoni e colaboradores, de 1,7%. Um estudo realizado na Alemanha com 60.000 doadores de sangue observou o fenótipo DVII 1,13% das amostras. (ARNONI et al., 2016; CREDIDIO; JR; CASTILHO, 2011; DANIELS, 2013a).

Duas amostras, demonstraram ter uma proteína RhD normal após análise de sequenciamento gênico das regiões codificantes do gene *RHD*. Entretanto, testes moleculares adicionais que contemplem as regiões não codificantes do gene *RHD* devem ser realizados posteriormente, a fim de descartar alterações moleculares que resultem na fraca expressão antigênica observada nessas amostras. Outras 03 amostras apresentaram resultados inconclusivos, por não serem observadas as amplificações de éxons específicos do gene *RHD*. Esses resultados sugerem a presença de gene híbrido *RHD-CE-D*, todavia, novas investigações que possibilitem a devida caracterização molecular nessas amostras devem ser realizadas posteriormente.

Nós realizamos uma associação entre os alelos *RHD* variantes e a intensidades de aglutinações encontradas. Nossos resultados foram consistentes com o trabalho de Wagner et al, que demonstrou por citometria de fluxo, a baixa densidade antigênica dos D fraco tipos 1 (759 sítios/célula) e 2 (674 sítios/célula) (WAGNER et al., 2000). Em nosso estudo, as amostras caracterizadas como D fraco tipos 1 e 2 não reagiram na fenotipagem RhD, com os dois reagentes anti-D, indicando uma baixa expressão antigênica, e foram detectados apenas em AGH. Os alelos *RHD* fraco tipos 38 e 145 apresentaram o mesmo comportamento.

Os resultados dos testes sorológicos demonstraram ainda que, 22 (21,36%) amostras não reagiram com os dois reagentes anti-D (clones TH-28 e MS26/MS201) utilizados na fenotipagem para o antígeno D e 28 (27,18%) amostras não reagiram pelo menos em um dos dois reagentes e, somente foram corretamente fenotipadas para o antígeno D quando levadas até à fase em AGH a 37°C, caso contrário, poderia ser erroneamente fenotipadas como RhD

negativo. Esse dado evidencia a importância do teste para confirmação de D fraco na rotina imuno-hematológica, principalmente, em doadores de sangue, sob o risco de aloimunização por anti-D em receptores de sangue RhD negativos.

As análises dos resultados possibilitaram demonstrar que por métodos sorológicos não é possível diferenciar fenótipos D fraco e D parcial, visto que, exemplos das duas variantes (D Fraco e D Parcial), apresentaram os mesmos padrões de reatividade frente aos mesmos reagentes. Além disso, as reações sorológicas classificadas como inconclusivas, onde há discrepâncias de resultados entre os reagentes IgM e IgM/IgG utilizando a mesma metodologia demonstraram a importância da seleção e associação de reagentes que sejam capazes de detectar as variantes do antígeno D.

A fenotipagem para os antígenos Rh, C, c, E e e, realizada em todas as amostras do estudo, permitiu identificar que o fenótipo mais prevalente foi ccee 67% (67/103) e portanto foi fenótipo mais frequentemente associado às variantes RhD. As associações estão consistentes quando comparadas aos resultados encontrados por Credidio e colaboradores e com outros estudos realizados com indivíduos da população brasileira (ARNONI et al., 2014; CAMPOS et al., 2016; CREDIDIO; JR; CASTILHO, 2011; CRUZ et al., 2012; WAGNER et al., 1999; ZACARIAS et al., 2016).

Em relação à determinação da zigossidade *RHD*, a estratégia que melhor se adequou neste estudo foi a técnica de PCR em tempo real baseada na diferença de dCT entre o gene *RHD* em homozigose ou hemizigose e o gene da Beta globina. A técnica qPCR apresenta algumas vantagens em relação ao PCR convencional, dentre elas, a elevada sensibilidade, a eliminação da etapa pós-PCR, a diminuição de contaminação, e a possibilidade de acompanhamento da reação e da quantificação do produto amplificado. No entanto, não foi possível realizar essa técnica em todas as amostras do estudo.

A PCR-SSP, baseada na detecção do segmento híbrido “*Rhesus Box*”, apresenta falhas, principalmente na presença de polimorfismos do gene *RHD* (íntron e éxon) e não deve ser utilizada para predição da zigossidade *RHD* de forma isolada (PERCO et al., 2003; SILENCE et al., 2017). Portanto, os resultados obtidos sobre a zigossidade *RHD* para este estudo apresentaram 99,02% de hemizigose *RHD* entre as amostras analisadas. Todavia, testes adicionais para determinação da zigossidade *RHD*, utilizando técnicas como PCR em tempo real, que não sejam afetadas pela presença polimorfismos devem ser realizados para confirmação desse dado.

Em nossas análises, 98% (101/103) das amostras que apresentaram reações sorológicas indicativas da presença de antígenos D variantes, demonstraram, de fato,

alterações moleculares correspondentes a antígenos D variantes, já descritos na literatura. Dessas variantes, 68,93% (D parcial) possuem grande importância clínica por estarem associadas à aloimunização anti-D.

Nós observamos que, 85% das amostras do estudo foram caracterizadas ou tiveram polimorfismos evidenciados com o auxílio de técnicas de PCR convencionais. No entanto, o sequenciamento de Sanger foi a técnica que melhor auxiliou na caracterização das variantes encontradas. Atualmente, a técnica de PCR é amplamente utilizada, de fácil execução e interpretação, além de possuir um custo acessível. No entanto, podem ser bastante trabalhosas, em especial quando há necessidade de ser detectado mais de um polimorfismo, para caracterização de um antígeno variante, como é o caso das inúmeras variantes do antígeno RhD. O sequenciamento de Sanger é um recurso limitado na maioria dos laboratórios de genotipagem eritrocitária, apesar de apresentar baixo custo por amostra, alta confiabilidade em seus resultados, e ser ideal para estudos de genes específicos, perde por não permitir automação eficiente. Outras plataformas estão sendo utilizadas para genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala (exemplos: Beadchip, Bloodchip, microarrays, etc.). Essas plataformas permitem automação e apresentam alto rendimento. No entanto, exigem uma grande disponibilidade de recursos financeiros e análises de impacto nos serviços transfusionais.

Contudo, a caracterização molecular das amostras com antígenos RhD variantes é muito importante em nossa população, uma vez que, foi evidenciado grande variedade de alelos *RHD* variantes em nosso estudo. Além disso, existem poucos estudos que descrevem a frequência desses alelos no Brasil. A implementação de uma plataforma de genotipagem *RHD* depende além de investimentos e tecnologia, de um conhecimento prévio a respeito das variantes mais frequentes na população a que se destina estudar, para que seja desenvolvida uma estratégia que detecte o maior número de variantes já descritas, que somam mais de 200 alelos, e que permita também a detecção e caracterização de novos alelos.

Desta forma, o presente trabalho possui grande relevância, tanto por agregar conhecimento acerca das características da nossa população, quanto por se tratar de estudo pioneiro de caracterização de antígenos D variantes, na região Centro-Oeste do Brasil, visto que os trabalhos publicados até o momento estão restritos às populações das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Entendemos, portanto, que a estratégia experimental abordada neste trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento de protocolos de genotipagem *RHD* que busquem compatibilizar doadores e pacientes portadores de variantes RhD, causando impacto positivo na qualidade dos processos e aumentando a segurança transfusional.

9 CONCLUSÃO

1. A frequência de amostras de doadores de sangue do Hemocentro de Brasília com reatividade fraca, inconclusiva ou discrepante na fenotipagem RhD foi de 1,29%.
2. O fenótipo ccee foi o mais prevalente entre as variantes caracterizadas.
3. Foi demonstrado que as técnicas sorológicas não conseguem diferenciar fenótipos D fraco e D parcial e, portanto, as técnicas moleculares são superiores para essa finalidade.
4. Em 98% das amostras estudadas, foram detectadas alterações moleculares que caracterizam alelos *RHD* variantes. A frequência de fenótipos RhD parciais foi maior que a frequência dos fenótipo RhD fraco.
5. As frequências dos alelos *RHD* fraco tipos 1, 2 e 3 foram estabelecidas respectivamente em: 1,94%; 5,83%; 16,5%.
6. A frequência de alelos *RHD* parcial foi de 68,93%, sendo que os alelos *RHD**DAR (65,05%) foram os mais encontrados;
7. A associação entre as variantes RhD encontradas no estudo e os respectivos fenótipos RhCE, foram concordantes, em sua maioria, com as associações descritas na literatura.
8. Os testes utilizados para determinação de zigosidade *RHD* revelou que 99,02% das amostras são hemizigotos para o gene *RHD*. No entanto, a técnica PCR-SSP híbrida “*Rhesus Box*” apresenta falhas e não deve ser utilizada de forma isolada na determinação da zigosidade *RHD*.
9. Foi demonstrado que 22 amostras não seriam corretamente fenotipadas para o antígeno RhD, se não fosse empregada a técnica indireta da AGH. A seleção criteriosa de reagentes anti-D e de metodologias sensíveis são essenciais para garantir a detecção dos antígenos RhD normal e variantes.
10. O desenvolvimento de uma estratégia para detecção e caracterização de antígenos RhD variantes acarreta em benefícios à medicina transfusional, em especial, aos pacientes que correm risco de complicações clínicas, causadas pela aloimunização anti-D.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. Estórias de quem gosta de ensinar — O fim dos Vestibulares. Editora Ars Poética. São Paulo, 1995, pág. 31.

DEAN, L. Blood Groups and Red Cell Antigens. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2005.

AGRE, P.; CARTRON, J.-P. Molecular Biology of the Rh Antigens. **Blood**, v. 78, n. 3, p. 551–564, 1991.

ANSART-PIRENNE, H. et al. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. **Transfusion**, v. 44, n. September, p. 1282–1286, 2004.

ARASZKIEWICZ, P.; SZYMANSKI, I. O. Quantitative studies on the Rh-antigen D Effect of the C gene. **Transfusion**, v. 27, n. 3, p. 257–261, 1987.

ARNONI, C. P. et al. How do we identify RHD variants using a practical molecular approach? **Transfusion**, v. 54, n. 4, p. 962–9, abr. 2014.

ARNONI, C. P. et al. RHCE variants inherited with altered RHD alleles in Brazilian blood donors. **Transfusion Medicine**, v. 26, n. 4, p. 285–290, ago. 2016.

AVENT, N. D. Molecular Biology of the Rh Blood Group System. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 23, n. 6, p. 394–402, 2001.

AVENT, N. D.; REID, M. E. The Rh blood group system : a review. **Blood**, v. 95, n. 2, p. 375–387, 2000.

BA, A. et al. RH diversity in Mali: characterization of a new haplotype RHD*DIVa/RHCE*ceTI (D2). **Transfusion**, v. 55, n. 6, p. 1423–1431, 2015.

BARROS, C.; WAKIM, V. L.; CASTILHO, L. Avaliação de reagentes anti-D na detecção dos antígenos D fraco e D parcial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 4, p. 269–274, 2006.

BRASIL. Portaria de Consolidação nº 5/GM/MS, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, p. de 03 de Set. de 2017, 360-seção 1, 2017.

CAMPOS, F. C. A. et al. Variant RHD Types in Brazilians With Discrepancies in RhD Typing. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 30, n. 6, p. 845–848, 2016.

CASTILHO, L. et al. High frequency of partial DIIIa and DAR alleles found in sickle cell disease patients suggests increased risk of alloimmunization to RhD. **Transfusion Medicine**, v. 15, p. 49–55, 2005.

CHIU, R. W. K. et al. Determination of RhD Zygosity: Comparison of a Double Amplification Refractory Mutation System Approach and a Multiplex Real-Time Quantitative

- PCR Approach. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 667–672, 2001.
- CHOU, S. T.; FASANO, R. M. Management of Patients with Sickle Cell Disease Using Transfusion Therapy: Guidelines and Complications. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 591–608, 2016.
- CHOU, S. T.; WESTHOFF, C. M. Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. **Hematology**, p. 178–184, 2009.
- CHRISTIANSEN, M.; SØRENSEN, B. S.; GRUNNET, N. RHD positive among C/E+ and D- blood donors in Denmark. **Transfusion**, v. 50, n. 7, p. 1460–1464, 2010.
- COSTA, S. et al. RHD alleles and D antigen density among serologically D-C+Brazilian blood donors. **Transfusion Medicine**, v. 24, n. 1, p. 60–61, 2014.
- COSTA, S. S. et al. RHD*weak D type 38: A family study. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 1, p. 79–81, 2016.
- CREDIDIO, D. C. **Variantes do antígeno RhD: estudo sorológico e molecular**. [s.l.] Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2010.
- CREDIDIO, D. C.; JR, J. P.; CASTILHO, L. Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: Impact for typing and transfusion strategy. **Immunohematology**, v. 27, n. 1, p. 6–11, 2011.
- CRUZ, B. R. et al. RHD alleles in Brazilian blood donors with weak D or D-negative phenotypes. **Transfusion Medicine**, v. 22, n. 2, p. 84–89, 2012.
- DANIELS, G. **Human Blood Groups**. 2. ed. [s.l.] Blackwell Science Ltd, 2002.
- DANIELS, G. **Human Blood Groups**. 3. ed. [s.l.] Blackwell Publishing Ltd., 2013a.
- DANIELS, G. Variants of RhD - current testing and clinical consequences. **British Journal of Haematology**, v. 161, n. 4, p. 461–470, 2013b.
- DAVIDSOHN, I.; TOHARSKY, B. THE Rh BLOOD FACTOR; AN ANTIGENIC ANALYSIS*. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 12, n. 8, p. 434–441, 1942.
- DEZAN, M. R. et al. High frequency of variant RHD genotypes among donors and patients of mixed origin with serologic weak-D phenotype. **J Clin Lab Anal**, n. April, p. 1–8, 2018.
- FICHOU, Y. et al. Molecular basis of weak D expression in the Indian population and report of a novel, predominant variant RHD allele. **Transfusion**, v. 58, n. March, p. 1–10, 2018.
- FISK, R. T.; FOORD, A. G. OBSERVATIONS ON THE Rh AGGLUTINOGEN OF HUMAN BLOOD. **American Journal of Clinical Pathology** **J Clin Pathol.**, v. 12, p. 545–552, 1942.
- FLEGEL, W. A. The genetics of the Rhesus blood group system. **Blood Transfusion**, v. 5, n. 2, p. 50–57, 2007.
- FLEGEL, W. A. et al. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D

clusters. **Transfusion**, v. 49, n. 6, p. 1059–1069, 2009.

FLEGEL, W. A. Molecular genetics and clinical applications for RH. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 44, n. 1, p. 81–91, 2012.

FLEGEL, W. A.; VON ZABERN, I.; WAGNER, F. F. Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. **Transfusion**, v. 49, n. 3, p. 465–471, 2009.

FLEGEL, W. A.; WAGNER, F. F. Molecular biology of partial D and weak D: Implications for blood bank practice. **Clinical Laboratory**, v. 48, n. 1–2, p. 53–59, 2002.

GASSNER, C. et al. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: A European multicenter study. **Transfusion**, v. 45, n. 4, p. 527–538, 2005.

HEMKER, B. M. B. et al. 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**, v. 12, p. 4337–4343, 1999.

HUANG, C.-H.; LIU, P. Z.; CHENG, J. G. Molecular Biology Group System and Genetics of the Rh Blood. **Seminars i Hematology**, v. 37, n. 2, p. 150–165, 2000.

HUANG, C. H. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. **Current Opinion in Hematology**, v. 4, n. 2, p. 94–103, 1997.

HUANG, C. H.; YE, M. The Rh protein family: Gene evolution, membrane biology, and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 8, p. 1203–1218, 2010.

KÖRMÖCZI, G. F. et al. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. **Transfusion**, v. 45, n. 10, p. 1561–1567, 2005.

KULKARNI, S. Screening for DEL phenotype in RhD negative Indians. **J Clin Lab Anal**, v. 32, n. 3, p. 8–10, 2017.

LANDSTEINER, K.; WIENER, A. R. An Agglutinable Factor in Human Blood Recognized by Immune Sera for Rhesus Blood. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 43, n. 1, p. 223–223, 1940.

LEGLER, T. J. et al. RHD sequencing: A new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. **Transfusion Medicine**, v. 11, n. 5, p. 383–388, 2001.

LEVINE, P. KATZIN, E. M. ISOIMMUNIZATION IN PREGNANCY ITS POSSIBLE BEARING ON THE ETIOLOGY OF ERYTHROBLASTOSIS FOETALIS. **Jour A.M.A.**, v. 116, n. 9, p. 825–827, 1941.

LEVINE, P. et al. A Human 'D-like' Antibody. **Nature**, v. 198, p. 596–597, 1963.

LEVINE, P. et al. ISOIMMUNIZATION: ITS ROLE IN TRANS- FUSION REACTIONS AND IN FETAL ERYTHROBLASTOSIS. **Jour. A.M.A.**, v. 118, n. 2, p. 143–144, 1942.

LEVINE, P.; STETSON, R. E. AN UNUSUAL CASE OF INTRA-GROUP AGGLUTINATION. **Jour. A.M.A.**, v. 113, n. 2, p. 126–127, 1939.

- MARRERO, A. R. et al. Heterogeneity of the Genome Ancestry of Individuals Classified as White in the State of Rio Grande do Sul , Brazil. **American Journal Of Human Biology**, v. 17, p. 496–506, 2005.
- MONTEIRO, F. et al. Technologies involved in molecular blood group genotyping. **ISBT Science Series**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2011.
- MOTA, M. et al. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density Case report. **Vox Sanguinis**, v. 88, p. 130–135, 2005.
- MOTA, M. et al. RHD Allelic Identification Among D-Brazilian Blood Donors as a Routine Test Using Pools of DNA. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 26, n. 2, p. 104–108, 2012.
- MOURO, I. et al. Molecular genetics basis of the human Rhesus blood froup system. **Nature genetics**, v. 5, p. 62–65, 1993.
- MOUSSA, H. et al. RHD positive among C/E+ and D-negative blood donors in Tunisia. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 21, n. 6, p. 320–323, 2014.
- NARDOZZA, L. M. M. et al. Bases moleculares do sistema Rh e suas aplicações em obstetrícia e medicina transfusional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 6, p. 724–728, 2010.
- OUCHARI, M. et al. Transfusion strategy for weak D Type 4.0 based on RHD alleles and RH haplotypes in Tunisia. **Transfusion**, v. 58, n. 2, p. 306–312, 2018.
- PERCO, P. et al. Testing for the D zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. **Transfusion**, v. 43, n. 3, p. 335–339, 2003.
- PERSON, R. D. M. **Estratégia para detecção de variantes RHD na rotina imunoematológica**. [s.l.] Universidade de Campinas, 2017.
- RACE, R. R. An “Incomplete” Antibody in Human Serum. **Nature**, v. 153, p. 771–772, 1944.
- REID, M. E. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 15, n. 3, p. 245, 2001.
- REID, M. E. .; LOMAS-FRANCIS, C. .; OLSSON, M. L. **The Blood Group Antigen FactsBook**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2012.
- RIBEIRO-RODRIGUES, E. M. et al. Short Report Assessing Interethnic Admixture Using an X-Linked Insertion-Deletion Multiplex. **AMERICAN JOURNAL OF HUMAN BIOLOGY**, v. 21, p. 707–709, 2009.
- ROUILLAC, C. et al. Leu110Pro Substitution in the RhD Polypeptide Is Responsible for the DVII Category Blood Group Phenotype. **American Journal of Hematology**, v. 49, p. 87–88, 1995.
- ROUSSEL, M. et al. RHD * DOL1 and RHD * DOL2 encode a partial D antigen and are in cis with the rare RHCE * ceBI allele in people of African descent. **Transfusion**, v. 53, n. 2, p. 363–372, 2012.

- SANDLER, S. G.; CHEN, L. N.; FLEGEL, W. A. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. **British Journal of Haematology**, v. 179, n. 1, p. 10–19, 2017.
- SCHMIDT, L. C.; JÚNIOR, M. D. C.; LOURES, L. F. Atualizações na profilaxia da isoimunização Rh. **Femina**, v. 38, p. 7, 2010.
- SCOTT, M. L. Monoclonal anti-D for immunoprophylaxis. **Vox Sanguinis**, v. 81, p. 213–218, 2001.
- SILLENCE, K. A. et al. Rapid RHD zygosity determination using digital PCR. **Clinical Chemistry**, v. 63, n. 8, p. 1388–1397, 2017.
- SIMON, T. L. et al. Chapter 14 : Rh and LW blood group antigens. In: **Rossi's Principles of Transfusion Medicine**. 5^o ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell, 2016. p. 176–184.
- STEGMANN, T. C. et al. Frequency and characterization of known and novel RHD variant alleles in 37 782 Dutch D-negative pregnant women. **British Journal of Haematology**, v. 173, n. 3, p. 469–479, 2016.
- STORRY, J. R. et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. **Vox Sanguinis**, n. September, p. 1–8, 2018.
- STRATTON, F. A new Rh Allelomorph. **Nature**, v. 158, p. 25–26, 1946.
- TAX, G. H. M. Rh Variability in Multi-Ethnic Perspective Consequences for RH Genotyping. **Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine - CURR CONTROL TRIALS CARDIOV M**, p. 3–176, 2005.
- VAN KIM, C. LE; COLIN, Y.; CARTRON, J.-P. Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. **Blood Reviews**, v. 20, n. 2, p. 93–110, mar. 2006.
- VAN SANDT, V. S. T. et al. RHD variants in Flanders, Belgium. **Transfusion**, v. 55, n. 6, p. 1411–1417, 2015.
- VIRK, M.; SANDLER, S. G. Rh Immunoprophylaxis for Women With a Serologic Weak D Phenotype. **Laboratory Medicine**, v. 46, n. 3, p. 190–194, 2015.
- WAGNER, B. F. F. et al. Molecular Basis of Weak D Phenotypes. **Blood**, v. 93, n. 1, p. 385–393, 1999.
- WAGNER, F. F. et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. **Blood**, v. 95, n. 8, p. 2699–2707, 2000.
- WAGNER, F. F. RHD PCR of D-negative blood donors. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 172–181, 2013.
- WAGNER, F. F. Getting comfortable with RH blood group system terminologies and databases. **ISBT Science Series**, v. 0, p. 1–8, 2018.
- WAGNER, F. F. .; FLEGEL, W. A. Review: the molecular basis of the Rh blood group

phenotypes. **Immunohematology**, v. 20, n. 1, p. 23–36, 2004.

WAGNER, F. F.; FLEGEL, W. A. RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 2272–2273, 2002.

WAGNER, F. F.; FLEGEL, W. A. The Rhesus Site. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 357–363, 2014.

WANG, D.; LANE, C.; QUILLEN, K. Prevalence of RhD variants, confirmed by molecular genotyping, in a multiethnic prenatal population. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 134, n. 3, p. 438–442, 2010.

WEBSITE ISBT. **International Society of Blood Transfusion. Table of blood group antigens. Disponível em : < <http://www.isbtweb.org> > Acesso em 15 de Janeiro de 2019.**

WESTHOFF, C. M. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. **Transfusion**, v. 44, n. 11, p. 1663–1673, 2004.

WESTHOFF, C. M. Review: the Rh blood group D antigen . . . dominant, diverse, and difficult. **Immunohematology**, v. 21, n. 4, p. 155–163, 2005.

WESTHOFF, C. M. Molecular testing for transfusion medicine. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, n. 6, p. 471–475, 2006.

WESTHOFF, C. M. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. **Seminars in Hematology**, v. 44, n. 1, p. 42–50, 2007.


WIENER, A. S.; PETERS, H. R. Hemolytic reactions following transfusions of blood of the homologous group, with three cases in which the same agglutino- gen was responsible. **Ann Intern Med.**, v. 13, n. 12, p. 2306–2322, 1940.


ZACARIAS, J. M. V. et al. Frequency of RHD variants in Brazilian blood donors from Parana State, Southern Brazil. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 55, n. 1, p. 120–124, 2016.

11 ANEXOS

ANEXO 1 - Comprovante de aprovação pelo comitê de ética.







Título da Pesquisa: Caracterização molecular de antígenos RHD variantes em doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília, Distrito Federal.
Pesquisador Responsável: Ana Luisa Alves Mafta
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 60130416.0.0000.5553
Submetido em: 19/05/2016
Instituição Proponente: FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE BRASÍLIA
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio




Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_780256

< _____ >



LISTA DE PESQUISADORES DO PROJETO

CPF/Documento ^	Nome †	Atribuição	E-mail †	Curriculo	Tipo de Análise †	Ação
183.226.048-82	Simone Kashima Haddad	Equipe do Projeto	skashima@hemocentro.fmrp.usp.br	Lattes CV	PROPONENTE	
005.798.358-55	Dimas Tadeu Covas	Equipe do Projeto	dimas@fmrp.usp.br	Lattes CV	PROPONENTE	
278.203.958-00	Evandra Strazza Rodrigues Sandoval	Assistente da Pesquisa, Equipe do Projeto	evandra@hemocentro.fmrp.usp.br	Lattes CV	PROPONENTE	
010.244.314-95	Yuri Santos Oliveira	Equipe do Projeto	ysantosoliveira@gmail.com	Lattes CV	PROPONENTE	
071.731.086-83	Ana Luisa Alves Mafta	Contato Científico, Contato Público, Pesquisador principal	analuisa15mcc@gmail.com	Lattes CV	PROPONENTE	
885.416.731-20	Wagner Ribeiro de Mesquita	Equipe do Projeto	wrmesquita@yahoo.com.br	Lattes CV	PROPONENTE	


LISTA DE COMITÊS DE ÉTICA DO PROJETO

Comitê de Ética ^	Tipo de Vínculo †	Ação
5553 - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde/ FEPECS/ SES/ DF	COORDENADOR	

LISTA DE INSTITUIÇÕES DO PROJETO

CNPJ da Instituição †	Razão Social ^	Tipo de Instituição †	Comitê de Ética †	Ação
	Hemocentro de Ribeirão Preto	COPARTICIPANTE	5440 - USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP/USP	
86.743.457/0001-01	FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE BRASÍLIA	PROPONENTE	5553 - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde/ FEPECS/ SES/ DF	

LISTA DE PROJETOS RELACIONADOS

Tipo †	CAAE †	Versão †	Pesquisador Responsável †	Comitê de Ética †	Instituição †	Origem †	Última Aprovação †	Situação †	Ação
P	60130416.0.0000.5553	1	Ana Luisa Alves Mafta	5553 - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde/ FEPECS/ SES/ DF	FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE BRASÍLIA	PO	PO	Aprovado	

ANEXO 2 – Alinhamento e numeração dos nucleotídeos presentes nas sequências do gene *RHD* e os éxons *RHD* 1 a 10

Éxon 1

Seq. Éxon 1	1	2	3	4	5	6	7	8
Bases	A	T	G	A	G	C	T	C
Gene <i>RHD</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	16	17
T	A	A	G	T	A	C	C	C
9	10	11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24	25	26
G	C	G	G	T	C	T	G	T
18	19	20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	32	33	34	35
C	C	G	G	C	G	C	T	G
27	28	29	30	31	32	33	34	35
36	37	38	39	40	41	42	43	44
C	C	T	G	C	C	C	C	T
36	37	38	39	40	41	42	43	44
45	46	47	48	49	50	51	52	53
C	T	G	G	G	C	C	C	T
45	46	47	48	49	50	51	52	53
54	55	56	57	58	59	60	61	62
A	A	C	A	C	T	G	G	A
54	55	56	57	58	59	60	61	62
63	64	65	66	67	68	69	70	71
A	G	C	A	G	C	T	C	T
63	64	65	66	67	68	69	70	71
72	73	74	75	76	77	78	79	80
C	A	T	T	C	T	C	C	T
72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89
C	T	T	C	T	A	T	T	T
81	82	83	84	85	86	87	88	89
90	91	92	93	94	95	96	97	98
T	T	T	T	A	C	C	C	A
90	91	92	93	94	95	96	97	98
99	100	101	102	103	104	105	106	107
C	T	A	T	G	A	C	G	C
99	100	101	102	103	104	105	106	107
108	109	110	111	112	113	114	115	116
T	T	C	C	T	T	A	G	A
108	109	110	111	112	113	114	115	116

117	118	119	120	121	122	123	124	125
G	G	A	T	C	A	A	A	A
117	118	119	120	121	122	123	124	125
126	127	128	129	130	131	132	133	134
G	G	G	G	C	T	C	G	T
126	127	128	129	130	131	132	133	134
135	136	137	138	139	140	141	142	143
G	G	C	A	T	C	C	T	A
135	136	137	138	139	140	141	142	143
144	145	146	147	148				
T	C	A	A	G				
144	145	146	147	148				

Éxon 2

Éxon 2	149	150	151	152	153	154	155	156
Bases	T	T	G	G	C	C	A	A
Gene <i>RHD</i>	12026	12027	12028	12029	12030	12031	12032	12033
157	158	159	160	161	162	163	164	165
G	A	T	C	T	G	A	C	C
12034	12035	12036	12037	12038	12039	12040	12041	12042
166	167	168	169	170	171	172	173	174
G	T	G	A	T	G	G	C	G
12043	12044	12045	12046	12047	12048	12049	12050	12051
175	176	177	178	179	180	181	182	183
G	C	C	A	T	T	G	G	C
12052	12053	12054	12055	12056	12057	12058	12059	12060
184	185	186	187	188	189	190	191	192
T	T	G	G	G	C	T	T	C
12061	12062	12063	12064	12065	12066	12067	12068	12069
193	194	195	196	197	198	199	200	201
C	T	C	A	C	C	T	C	G
12070	12071	12072	12073	12074	12075	12076	12077	12078
202	203	204	205	206	207	208	209	210
A	G	T	T	T	C	C	G	G
12079	12080	12081	12082	12083	12084	12085	12086	12087
211	212	213	214	215	216	217	218	219
A	G	A	C	A	C	A	G	C
12088	12089	12090	12091	12092	12093	12094	12095	12096
220	221	222	223	224	225	226	227	228
T	G	G	A	G	C	A	G	T
12097	12098	12099	12100	12101	12102	12103	12104	12105
229	230	231	232	233	234	235	236	237
G	T	G	G	C	C	T	T	C
12106	12107	12108	12109	12110	12111	12112	12113	12114

238	239	240	241	242	243	244	245	246
A	A	C	C	T	C	T	T	C
12115	12116	12117	12118	12119	12120	12121	12122	12123
247	248	249	250	251	252	253	254	255
A	T	G	C	T	G	G	C	G
12124	12125	12126	12127	12128	12129	12130	12131	12132
256	257	258	259	260	261	262	263	264
C	T	T	G	G	T	G	T	G
12133	12134	12135	12136	12137	12138	12139	12140	12141
265	266	267	268	269	270	271	272	273
C	A	G	T	G	G	G	C	A
12142	12143	12144	12145	12146	12147	12148	12149	12150
274	275	276	277	278	279	280	281	282
A	T	C	C	T	G	C	T	G
12151	12152	12153	12154	12155	12156	12157	12158	12159
283	284	285	286	287	288	289	290	291
G	A	C	G	G	C	T	T	C
12160	12161	12162	12163	12164	12165	12166	12167	12168
292	293	294	295	296	297	298	299	300
C	T	G	A	G	C	C	A	G
12169	12170	12171	12172	12173	12174	12175	12176	12177
301	302	303	304	305	306	307	308	309
T	T	C	C	C	T	T	C	T
12178	12179	12180	12181	12182	12183	12184	12185	12186
310	311	312	313	314	315	316	317	318
G	G	G	A	A	G	G	T	G
12187	12188	12189	12190	12191	12192	12193	12194	12195
319	320	321	322	323	324	325	326	327
G	T	C	A	T	C	A	C	A
12196	12197	12198	12199	12200	12201	12202	12203	12204
328	329	330	331	332	333	334	335	
C	T	G	T	T	C	A	G	
12205	12206	12207	12208	12209	12210	12211	12212	

Éxon 3

Seq. Éxon 3	336	337	338	339	340	341	342	343
Bases	T	A	T	T	C	G	G	C
Gene <i>RHD</i>	18094	18095	18096	18097	18098	18099	18100	18101
344	345	346	347	348	349	350	351	352
T	G	G	C	C	A	C	C	A
18102	18103	18104	18105	18106	18107	18108	18109	18110
353	354	355	356	357	358	359	360	361
T	G	A	G	T	G	C	T	T
18111	18112	18113	18114	18115	18116	18117	18118	18119

Éxon 4

Seq. Éxon 4	489	490	491	492	493	494	495	496
Bases	A	G	A	C	T	A	C	C
Gene <i>RHD</i>	28401	28402	28403	28404	28405	28406	28407	28408
497	498	499	500	501	502	503	504	505
A	C	A	T	G	A	A	C	A
28409	28410	28411	28412	28413	28414	28415	28416	28417
506	507	508	509	510	511	512	513	514
T	G	A	T	G	C	A	C	A
28418	28419	28420	28421	28422	28423	28424	28425	28426
515	516	517	518	519	520	521	522	523
T	C	T	A	C	G	T	G	T
28427	28428	28429	28430	28431	28432	28433	28434	28435
524	525	526	527	528	529	530	531	532
T	C	G	C	A	G	C	C	T
28436	28437	28438	28439	28440	28441	28442	28443	28444
533	534	535	536	537	538	539	540	541
A	T	T	T	T	G	G	G	C
28445	28446	28447	28448	28449	28450	28451	28452	28453
542	543	544	545	546	547	548	549	550
T	G	T	C	T	G	T	G	G
28454	28455	28456	28457	28458	28459	28460	28461	28462
551	552	553	554	555	556	557	558	559
C	C	T	G	G	T	G	C	C
28463	28464	28465	28466	28467	28468	28469	28470	28471
560	561	562	563	564	565	566	567	568
T	G	C	C	A	A	A	G	C
28472	28473	28474	28475	28476	28477	28478	28479	28480
569	570	571	572	573	574	575	576	577
C	T	C	T	A	C	C	C	G
28481	28482	28483	28484	28485	28486	28487	28488	28489
578	579	580	581	582	583	584	585	586
A	G	G	G	A	A	C	G	G
28490	28491	28492	28493	28494	28495	28496	28497	28498
587	588	589	590	591	592	593	594	595
A	G	G	A	T	A	A	A	G
28499	28500	28501	28502	28503	28504	28505	28506	28507
596	597	598	599	600	601	602	603	604
A	T	C	A	G	A	C	A	G
28508	28509	28510	28511	28512	28513	28514	28515	28516
605	606	607	608	609	610	611	612	613
C	A	A	C	G	A	T	A	C
28517	28518	28519	28520	28521	28522	28523	28524	28525

623	624	625	626	627	628	629	630	631
C	T	G	C	C	A	T	G	C
28535	28536	28537	28538	28539	28540	28541	28542	28543
632	633	634						
T	G	G						
28544	28545	28546						

Éxon 5

Seq. Éxon 5	635	636	637	638	639	640	641	642
Bases	G	C	G	C	C	C	T	C
Gene <i>RHD</i>	28973	28974	28975	28976	28977	28978	28979	28980
643	644	645	646	647	648	649	650	651
T	T	C	T	T	G	T	G	G
28981	28982	28983	28984	28985	28986	28987	28988	28989
652	653	654	655	656	657	658	659	660
A	T	G	T	T	C	T	G	G
28990	28991	28992	28993	28994	28995	28996	28997	28998
661	662	663	664	665	666	667	668	669
C	C	A	A	G	T	T	T	C
28999	29000	29001	29002	29003	29004	29005	29006	29007
670	671	672	673	674	675	676	677	678
A	A	C	T	C	T	G	C	T
29008	29009	29010	29011	29012	29013	29014	29015	29016
679	680	681	682	683	684	685	686	687
C	T	G	C	T	G	A	G	A
29017	29018	29019	29020	29021	29022	29023	29024	29025
688	689	690	691	692	693	694	695	696
A	G	T	C	C	A	A	T	C
29026	29027	29028	29029	29030	29031	29032	29033	29034
697	698	699	700	701	702	703	704	705
G	A	A	A	G	G	A	A	G
29035	29036	29037	29038	29039	29040	29041	29042	29043
706	707	708	709	710	711	712	713	714
A	A	T	G	C	C	G	T	G
29044	29045	29046	29047	29048	29049	29050	29051	29052
715	716	717	718	719	720	721	722	723
T	T	C	A	A	C	A	C	C
29053	29054	29055	29056	29057	29058	29059	29060	29061
724	725	726	727	728	729	730	731	732
T	A	C	T	A	T	G	C	T
29062	29063	29064	29065	29066	29067	29068	29069	29070
733	734	735	736	737	738	739	740	741
G	T	A	G	C	A	G	T	C
29071	29072	29073	29074	29075	29076	29077	29078	29079

742	743	744	745	746	747	748	749	750
A	G	C	G	T	G	G	T	G
29080	29081	29082	29083	29084	29085	29086	29087	29088
751	752	753	754	755	756	757	758	759
A	C	A	G	C	C	A	T	C
29089	29090	29091	29092	29093	29094	29095	29096	29097
760	761	762	763	764	765	766	767	768
T	C	A	G	G	G	T	C	A
29098	29099	29100	29101	29102	29103	29104	29105	29106
769	770	771	772	773	774	775	776	777
T	C	C	T	T	G	G	C	T
29107	29108	29109	29110	29111	29112	29113	29114	29115
778	779	780	781	782	783	784	785	786
C	A	C	C	C	C	C	A	A
29116	29117	29118	29119	29120	29121	29122	29123	29124
787	788	789	790	791	792	793	794	795
G	G	G	A	A	G	A	T	C
29125	29126	29127	29128	29129	29130	29131	29132	29133
796	797	798	799	800	801			
A	G	C	A	A	G			
29134	29135	29136	29137	29138	29139			

Éxon 6

Seq. Éxon 6	802	803	804	805	806	807	808	809
Bases	A	C	T	T	A	T	G	T
Gene <i>RHD</i>	30777	30778	30779	30780	30781	30782	30783	30784
810	811	812	813	814	815	816	817	818
G	C	A	C	A	G	T	G	C
30785	30786	30787	30788	30789	30790	30791	30792	30793
819	820	821	822	823	824	825	826	827
G	G	T	G	T	T	G	G	C
30794	30795	30796	30797	30798	30799	30800	30801	30802
828	829	830	831	832	833	834	835	836
A	G	G	A	G	G	C	G	T
30803	30804	30805	30806	30807	30808	30809	30810	30811
837	838	839	840	841	842	843	844	845
G	G	C	T	G	T	G	G	G
30812	30813	30814	30815	30816	30817	30818	30819	30820
846	847	848	849	850	851	852	853	854
T	A	C	C	T	C	G	T	G
30821	30822	30823	30824	30825	30826	30827	30828	30829
855	856	857	858	859	860	861	862	863
T	C	A	C	C	T	G	A	T
30830	30831	30832	30833	30834	30835	30836	30837	30838

864	865	866	867	868	869	870	871	872
C	C	C	T	T	C	T	C	C
30839	30840	30841	30842	30843	30844	30845	30846	30847
873	874	875	876	877	878	879	880	881
G	T	G	G	C	T	T	G	C
30848	30849	30850	30851	30852	30853	30854	30855	30856
882	883	884	885	886	887	888	889	890
C	A	T	G	G	T	G	C	T
30857	30858	30859	30860	30861	30862	30863	30864	30865
891	892	893	894	895	896	897	898	899
G	G	G	T	C	T	T	G	T
30866	30867	30868	30869	30870	30871	30872	30873	30874
900	901	902	903	904	905	906	907	908
G	G	C	T	G	G	G	C	T
30875	30876	30877	30878	30879	30880	30881	30882	30883
909	910	911	912	913	914	915	916	917
G	A	T	C	T	C	C	G	T
30884	30885	30886	30887	30888	30889	30890	30891	30892
918	919	920	921	922	923	924	925	926
C	G	G	G	G	G	A	G	C
30893	30894	30895	30896	30897	30898	30899	30900	30901
927	928	929	930	931	932	933	934	935
C	A	A	G	T	A	C	C	T
30902	30903	30904	30905	30906	30907	30908	30909	30910
936	937	938	939					
G	C	C	G					
30911	30912	30913	30914					

Éxon 7

<i>RHD</i> Éxon 7	940	941	942	943	944	945	946	947
Bases	G	G	G	T	G	T	T	G
Gene <i>RHD</i>	34051	34052	34053	34054	34055	34056	34057	34058
948	949	950	951	952	953	954	955	956
T	A	A	C	C	G	A	G	T
34059	34060	34061	34062	34063	34064	34065	34066	34067
957	958	959	960	961	962	963	964	965
G	C	T	G	G	G	G	A	T
34068	34069	34070	34071	34072	34073	34074	34075	34076
966	967	968	969	970	971	972	973	974
T	C	C	C	C	A	C	A	G
34077	34078	34079	34080	34081	34082	34083	34084	34085
975	976	977	978	979	980	981	982	983
C	T	C	C	A	T	C	A	T
34086	34087	34088	34089	34090	34091	34092	34093	34094

984	985	986	987	988	989	990	991	992
G	G	G	C	T	A	C	A	A
34095	34096	34097	34098	34099	34100	34101	34102	34103
993	994	995	996	997	998	999	1000	1001
C	T	T	C	A	G	C	T	T
34104	34105	34106	34107	34108	34109	34110	34111	34112
1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010
G	C	T	G	G	G	T	C	T
34113	34114	34115	34116	34117	34118	34119	34120	34121
1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019
G	C	T	T	G	G	A	G	A
34122	34123	34124	34125	34126	34127	34128	34129	34130
1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028
G	A	T	C	A	T	C	T	A
34131	34132	34133	34134	34135	34136	34137	34138	34139
1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037
C	A	T	T	G	T	G	C	T
34140	34141	34142	34143	34144	34145	34146	34147	34148
1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046
G	C	T	G	G	T	G	C	T
34149	34150	34151	34152	34153	34154	34155	34156	34157
1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055
T	G	A	T	A	C	C	G	T
34158	34159	34160	34161	34162	34163	34164	34165	34166
1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064
C	G	G	A	G	C	C	G	G
34167	34168	34169	34170	34171	34172	34173	34174	34175
1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073
C	A	A	T	G	G	C	A	T
34176	34177	34178	34179	34180	34181	34182	34183	34184
1074								
G								
34185								

Éxon 8

Seq. Éxon 8	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082
Bases	A	T	T	G	G	C	T	T
Gene <i>RHD</i>	44456	44457	44458	44459	44460	44461	44462	44463
1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091
C	C	A	G	G	T	C	C	T
44464	44465	44466	44467	44468	44469	44470	44471	44472
1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100
C	C	T	C	A	G	C	A	T
44473	44474	44475	44476	44477	44478	44479	44480	44481

1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109
T	G	G	G	G	A	A	C	T
44482	44483	44484	44485	44486	44487	44488	44489	44490
1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118
C	A	G	C	T	T	G	G	C
44491	44492	44493	44494	44495	44496	44497	44498	44499
1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127
C	A	T	C	G	T	G	A	T
44500	44501	44502	44503	44504	44505	44506	44507	44508
1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136
A	G	C	T	C	T	C	A	C
44509	44510	44511	44512	44513	44514	44515	44516	44517
1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145
G	T	C	T	G	G	T	C	T
44518	44519	44520	44521	44522	44523	44524	44525	44526
1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	
C	C	T	G	A	C	A	G	
44527	44528	44529	44530	44531	44532	44533	44534	

Éxon 9

Seq. Éxon 9	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161
Bases	G	T	T	T	G	C	T	C
Gene <i>RHD</i>	49344	49345	49346	49347	49348	49349	49350	49351
1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170
C	T	A	A	A	T	C	T	T
49352	49353	49354	49355	49356	49357	49358	49359	49360
1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179
A	A	A	A	T	A	T	G	G
49361	49362	49363	49364	49365	49366	49367	49368	49369
1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188
A	A	A	G	C	A	C	C	T
49370	49371	49372	49373	49374	49375	49376	49377	49378
1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197
C	A	T	G	A	G	G	C	T
49379	49380	49381	49382	49383	49384	49385	49386	49387
1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206
A	A	A	T	A	T	T	T	T
49388	49389	49390	49391	49392	49393	49394	49395	49396
1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215
G	A	T	G	A	C	C	A	A
49397	49398	49399	49400	49401	49402	49403	49404	49405
1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224
G	T	T	T	T	C	T	G	G
49406	49407	49408	49409	49410	49411	49412	49413	49414

1225	1226	1227
A	A	G
49415	49416	49417

Éxon 10

Seq.Éxon 10	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235
Bases	T	T	T	C	C	T	C	A
Gene <i>RHD</i>	56353	56354	56355	56356	56357	56358	56359	56360
1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244
T	T	T	G	G	C	T	G	T
56361	56362	56363	56364	56365	56366	56367	56368	56369
1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253
T	G	G	A	T	T	T	T	A
56370	56371	56372	56373	56374	56375	56376	56377	56378
1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262
A	G	C	A	A	A	A	G	C
56379	56380	56381	56382	56383	56384	56385	56386	56387
1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271
A	T	C	C	A	A	G	A	A
56388	56389	56390	56391	56392	56393	56394	56395	56396
1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280
A	A	A	C	A	A	G	G	C
56397	56398	56399	56400	56401	56402	56403	56404	56405
1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289
C	T	G	T	T	C	A	A	A
56406	56407	56408	56409	56410	56411	56412	56413	56414
1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298
A	A	C	A	A	G	A	C	A
56415	56416	56417	56418	56419	56420	56421	56422	56423
1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307
A	C	T	T	C	C	T	C	T
56424	56425	56426	56427	56428	56429	56430	56431	56432
1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316
C	A	C	T	G	T	T	G	C
56433	56434	56435	56436	56437	56438	56439	56440	56441
1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325
C	T	G	C	A	T	T	T	G
56442	56443	56444	56445	56446	56447	56448	56449	56450
1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334
T	A	C	G	T	G	A	G	A
56451	56452	56453	56454	56455	56456	56457	56458	56459
1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343
A	A	C	G	C	T	C	A	T
56460	56461	56462	56463	56464	56465	56466	56467	56468

1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352
G	A	C	A	G	C	A	A	A
56469	56470	56471	56472	56473	56474	56475	56476	56477
1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361
G	T	C	T	C	C	A	A	T
56478	56479	56480	56481	56482	56483	56484	56485	56486
1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370
G	T	T	C	G	C	G	C	A
56487	56488	56489	56490	56491	56492	56493	56494	56495
1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379
G	G	C	A	C	T	G	G	A
56496	56497	56498	56499	56500	56501	56502	56503	56504
1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388
G	T	C	A	G	A	G	A	A
56505	56506	56507	56508	56509	56510	56511	56512	56513
1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397
A	A	T	G	G	A	G	T	T
56514	56515	56516	56517	56518	56519	56520	56521	56522
1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406
G	A	A	T	C	C	T	T	T
56523	56524	56525	56526	56527	56528	56529	56530	56531
1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415
C	T	C	T	G	C	C	A	C
56532	56533	56534	56535	56536	56537	56538	56539	56540
1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424
T	C	T	T	T	G	A	G	G
56541	56542	56543	56544	56545	56546	56547	56548	56549
1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433
A	G	A	A	T	C	T	C	A
56550	56551	56552	56553	56554	56555	56556	56557	56558
1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442
C	C	A	T	T	T	A	T	T
56559	56560	56561	56562	56563	56564	56565	56566	56567
1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451
A	T	G	C	A	C	T	G	T
56568	56569	56570	56571	56572	56573	56574	56575	56576
1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460
A	G	A	A	T	A	C	A	A
56577	56578	56579	56580	56581	56582	56583	56584	56585
1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469
C	A	A	T	A	A	A	A	T
56586	56587	56588	56589	56590	56591	56592	56593	56594
1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478
A	C	A	G	C	C	A	T	G
56595	56596	56597	56598	56599	56600	56601	56602	56603

1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487
T	A	C	C	A	C	A	T	A
56604	56605	56606	56607	56608	56609	56610	56611	56612
1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496
A	C	A	A	C	A	T	C	T
56613	56614	56615	56616	56617	56618	56619	56620	56621
1497	1498	1499	1500	1501	1502	1503	1504	1505
T	G	G	T	A	A	A	C	A
56622	56623	56624	56625	56626	56627	56628	56629	56630
1506	1507	1508	1509	1510	1511	1512	1513	1514
A	C	A	G	A	C	T	G	C
56631	56632	56633	56634	56635	56636	56637	56638	56639
1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523
A	T	A	T	A	T	G	A	T
56640	56641	56642	56643	56644	56645	56646	56647	56648
1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532
G	G	T	G	G	T	C	A	T
56649	56650	56651	56652	56653	56654	56655	56656	56657
1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540	1541
C	C	A	G	T	A	A	G	C
56658	56659	56660	56661	56662	56663	56664	56665	56666
1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550
T	A	A	G	G	T	T	A	A
56667	56668	56669	56670	56671	56672	56673	56674	56675
1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558	1559
T	T	T	A	T	T	A	T	T
56676	56677	56678	56679	56680	56681	56682	56683	56684
1560	1561	1562	1563	1564	1565	1566	1567	1568
A	T	C	T	C	T	C	C	T
56685	56686	56687	56688	56689	56690	56691	56692	56693
1569	1570	1571	1572	1573	1574	1575	1576	1577
T	G	T	T	T	T	T	T	T
56694	56695	56696	56697	56698	56699	56700	56701	56702
1578	1579	1580	1581	1582	1583	1584	1585	1586
T	T	T	T	T	T	T	T	T
56703	56704	56705	56706	56707	56708	56709	56710	56711
1587	1588	1589	1590	1591	1592	1593	1594	1595
T	T	T	T	T	T	T	T	T
56712	56713	56714	56715	56716	56717	56718	56719	56720
1596	1597	1598	1599	1600	1601	1602	1603	1604
G	A	G	A	T	G	T	A	G
56721	56722	56723	56724	56725	56726	56727	56728	56729
1605	1606	1607	1608	1609	1610	1611	1612	1613
T	C	T	T	A	C	T	C	T
56730	56731	56732	56733	56734	56735	56736	56737	56738

1614	1615	1616	1617	1618	1619	1620	1621	1622
G	T	C	A	C	C	C	A	G
56739	56740	56741	56742	56743	56744	56745	56746	56747
1623	1624	1625	1626	1627	1628	1629	1630	1631
G	C	T	A	G	A	G	T	G
56748	56749	56750	56751	56752	56753	56754	56755	56756
1632	1633	1634	1635	1636	1637	1638	1639	1640
C	A	A	T	G	G	C	A	C
56757	56758	56759	56760	56761	56762	56763	56764	56765
1641	1642	1643	1644	1645	1646	1647	1648	1649
C	A	T	C	T	T	G	G	C
56766	56767	56768	56769	56770	56771	56772	56773	56774
1650	1651	1652	1653	1654	1655	1656	1657	1658
T	C	A	C	T	G	C	A	A
56775	56776	56777	56778	56779	56780	56781	56782	56783
1659	1660	1661	1662	1663	1664	1665	1666	1667
C	C	T	C	T	A	C	C	T
56784	56785	56786	56787	56788	56789	56790	56791	56792
1668	1669	1670	1671	1672	1673	1674	1675	1676
C	C	T	G	G	G	T	T	C
56793	56794	56795	56796	56797	56798	56799	56800	56801
1677	1678	1679	1680	1681	1682	1683	1684	1685
A	A	G	C	A	A	A	T	C
56802	56803	56804	56805	56806	56807	56808	56809	56810
1686	1687	1688	1689	1690	1691	1692	1693	1694
T	C	C	T	G	C	C	T	C
56811	56812	56813	56814	56815	56816	56817	56818	56819
1695	1696	1697	1698	1699	1700	1701	1702	1703
A	G	C	C	T	C	C	A	A
56820	56821	56822	56823	56824	56825	56826	56827	56828
1704	1705	1706	1707	1708	1709	1710	1711	1712
A	G	T	A	G	C	T	G	G
56829	56830	56831	56832	56833	56834	56835	56836	56837
1713	1714	1715	1716	1717	1718	1719	1720	1721
G	A	T	T	A	C	A	G	G
56838	56839	56840	56841	56842	56843	56844	56845	56846
1722	1723	1724	1725	1726	1727	1728	1729	1730
C	A	C	C	C	A	C	C	A
56847	56848	56849	56850	56851	56852	56853	56854	56855
1731	1732	1733	1734	1735	1736	1737	1738	1739
C	A	T	C	T	G	G	C	T
56856	56857	56858	56859	56860	56861	56862	56863	56864
1740	1741	1742	1743	1744	1745	1746	1747	1748
A	A	T	T	T	T	T	T	G
56865	56866	56867	56868	56869	56870	56871	56872	56873

1749	1750	1751	1752	1753	1754	1755	1756	1757
T	A	T	T	T	T	T	A	G
56874	56875	56876	56877	56878	56879	56880	56881	56882
1758	1759	1760	1761	1762	1763	1764	1765	1766
T	A	A	A	G	A	T	G	G
56883	56884	56885	56886	56887	56888	56889	56890	56891
1767	1768	1769	1770	1771	1772	1773	1774	1775
G	G	T	T	T	C	A	C	C
56892	56893	56894	56895	56896	56897	56898	56899	56900
1776	1777	1778	1779	1780	1781	1782	1783	1784
A	T	G	T	T	G	G	C	C
56901	56902	56903	56904	56905	56906	56907	56908	56909
1785	1786	1787	1788	1789	1790	1791	1792	1793
A	G	G	C	T	G	A	T	C
56910	56911	56912	56913	56914	56915	56916	56917	56918
1794	1795	1796	1797	1798	1799	1800	1801	1802
T	C	A	A	A	C	T	C	C
56919	56920	56921	56922	56923	56924	56925	56926	56927
1803	1804	1805	1806	1807	1808	1809	1810	1811
T	G	A	C	C	T	C	A	A
56928	56929	56930	56931	56932	56933	56934	56935	56936
1812	1813	1814	1815	1816	1817	1818	1819	1820
G	T	G	A	T	C	T	G	C
56937	56938	56939	56940	56941	56942	56943	56944	56945
1821	1822	1823	1824	1825	1826	1827	1828	1829
C	C	G	C	C	T	C	G	G
56946	56947	56948	56949	56950	56951	56952	56953	56954
1830	1831	1832	1833	1834	1835	1836	1837	1838
C	C	T	C	C	C	A	A	A
56955	56956	56957	56958	56959	56960	56961	56962	56963
1839	1840	1841	1842	1843	1844	1845	1846	1847
G	T	G	C	T	G	G	A	A
56964	56965	56966	56967	56968	56969	56970	56971	56972
1848	1849	1850	1851	1852	1853	1854	1855	1856
C	C	A	C	A	G	G	C	C
56973	56974	56975	56976	56977	56978	56979	56980	56981
1857	1858	1859	1860	1861	1862	1863	1864	1865
T	G	A	G	C	C	A	C	T
56982	56983	56984	56985	56986	56987	56988	56989	56990
1866	1867	1868	1869	1870	1871	1872	1873	1874
G	T	G	C	C	C	A	G	C
56991	56992	56993	56994	56995	56996	56997	56998	56999
1875	1876	1877	1878	1879	1880	1881	1882	1883
C	T	T	G	T	T	T	G	C
57000	57001	57002	57003	57004	57005	57006	57007	57008

1884	1885	1886	1887	1888	1889	1890	1891	1892
T	T	T	T	T	T	A	A	C
57009	57010	57011	57012	57013	57014	57015	57016	57017
1893	1894	1895	1896	1897	1898	1899	1900	1901
A	G	A	T	A	A	C	A	G
57018	57019	57020	57021	57022	57023	57024	57025	57026
1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	1909	1910
T	G	T	G	C	T	C	A	T
57027	57028	57029	57030	57031	57032	57033	57034	57035
1911	1912	1913	1914	1915	1916	1917	1918	1919
A	G	A	A	A	C	T	G	C
57036	57037	57038	57039	57040	57041	57042	57043	57044
1920	1921	1922	1923	1924	1925	1926	1927	1928
T	T	T	G	A	C	A	T	G
57045	57046	57047	57048	57049	57050	57051	57052	57053
1929	1930	1931	1932	1933	1934	1935	1936	1937
A	C	T	G	C	A	A	T	C
57054	57055	57056	57057	57058	57059	57060	57061	57062
1938	1939	1940	1941	1942	1943	1944	1945	1946
A	T	G	T	G	C	T	T	C
57063	57064	57065	57066	57067	57068	57069	57070	57071
1947	1948	1949	1950	1951	1952	1953	1954	1955
A	T	A	G	A	A	A	C	T
57072	57073	57074	57075	57076	57077	57078	57079	57080
1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	1963	1964
T	A	A	T	T	A	G	A	T
57081	57082	57083	57084	57085	57086	57087	57088	57089
1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973
T	A	T	A	C	C	A	C	T
57090	57091	57092	57093	57094	57095	57096	57097	57098
1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982
A	G	A	G	T	C	T	T	C
57099	57100	57101	57102	57103	57104	57105	57106	57107
1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991
A	G	A	T	T	T	T	T	A
57108	57109	57110	57111	57112	57113	57114	57115	57116
1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
T	A	C	T	T	T	T	T	T
57117	57118	57119	57120	57121	57122	57123	57124	57125
2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
T	T	T	T	T	G	A	A	A
57126	57127	57128	57129	57130	57131	57132	57133	57134
2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
C	G	G	A	G	T	C	T	C
57135	57136	57137	57138	57139	57140	57141	57142	57143

2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027
A	C	T	C	T	G	T	C	A
57144	57145	57146	57147	57148	57149	57150	57151	57152
2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036
C	C	A	G	G	C	T	G	G
57153	57154	57155	57156	57157	57158	57159	57160	57161
2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045
A	G	T	G	C	A	G	T	G
57162	57163	57164	57165	57166	57167	57168	57169	57170
2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054
C	C	G	C	A	A	T	C	T
57171	57172	57173	57174	57175	57176	57177	57178	57179
2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063
C	G	G	C	T	C	A	C	T
57180	57181	57182	57183	57184	57185	57186	57187	57188
2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072
G	C	A	A	C	C	T	C	C
57189	57190	57191	57192	57193	57194	57195	57196	57197
2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081
G	C	C	T	C	C	C	A	G
57198	57199	57200	57201	57202	57203	57204	57205	57206
2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090
G	T	T	C	A	A	G	C	A
57207	57208	57209	57210	57211	57212	57213	57214	57215
2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099
A	T	T	C	T	C	C	T	G
57216	57217	57218	57219	57220	57221	57222	57223	57224
2100	2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108
C	C	T	C	A	G	C	C	T
57225	57226	57227	57228	57229	57230	57231	57232	57233
2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117
C	C	C	G	A	G	T	A	G
57234	57235	57236	57237	57238	57239	57240	57241	57242
2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126
C	T	G	G	A	A	T	T	A
57243	57244	57245	57246	57247	57248	57249	57250	57251
2127	2128	2129	2130	2131	2132	2133	2134	2135
C	A	A	G	T	G	C	G	C
57252	57253	57254	57255	57256	57257	57258	57259	57260
2136	2137	2138	2139	2140	2141	2142	2143	2144
A	C	T	A	C	C	A	C	A
57261	57262	57263	57264	57265	57266	57267	57268	57269
2145	2146	2147	2148	2149	2150	2151	2152	2153
C	C	C	A	G	C	T	A	A
57270	57271	57272	57273	57274	57275	57276	57277	57278

2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160	2161	2162
T	T	T	T	T	G	C	A	T
57279	57280	57281	57282	57283	57284	57285	57286	57287
2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170	2171
T	T	T	T	A	C	T	T	G
57288	57289	57290	57291	57292	57293	57294	57295	57296
2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180
A	C	A	G	G	G	T	T	T
57297	57298	57299	57300	57301	57302	57303	57304	57305
2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189
C	A	C	C	A	T	G	T	T
57306	57307	57308	57309	57310	57311	57312	57313	57314
2190	2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198
G	G	C	T	A	G	G	A	T
57315	57316	57317	57318	57319	57320	57321	57322	57323
2199	2200	2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207
A	G	T	T	T	C	A	C	C
57324	57325	57326	57327	57328	57329	57330	57331	57332
2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216
A	G	G	A	T	C	T	C	T
57333	57334	57335	57336	57337	57338	57339	57340	57341
2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225
T	G	G	C	C	T	C	A	T
57342	57343	57344	57345	57346	57347	57348	57349	57350
2226	2227	2228	2229	2230	2231	2232	2233	2234
G	A	T	C	A	G	C	C	T
57351	57352	57353	57354	57355	57356	57357	57358	57359
2235	2236	2237	2238	2239	2240	2241	2242	2243
G	C	C	T	C	G	G	C	C
57360	57361	57362	57363	57364	57365	57366	57367	57368
2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250	2251	2252
T	C	C	C	A	A	A	G	T
57369	57370	57371	57372	57373	57374	57375	57376	57377
2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260	2261
G	C	T	G	G	G	A	T	T
57378	57379	57380	57381	57382	57383	57384	57385	57386
2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270
A	C	A	G	G	T	G	T	G
57387	57388	57389	57390	57391	57392	57393	57394	57395
2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279
A	G	C	C	A	C	C	G	T
57396	57397	57398	57399	57400	57401	57402	57403	57404
2280	2281	2282	2283	2284	2285	2286	2287	2288
G	C	C	C	A	G	C	C	T
57405	57406	57407	57408	57409	57410	57411	57412	57413

2289	2290	2291	2292	2293	2294	2295	2296	2297
A	T	A	C	T	T	C	C	C
57414	57415	57416	57417	57418	57419	57420	57421	57422
2298	2299	2300	2301	2302	2303	2304	2305	2306
T	T	T	T	T	G	A	A	T
57423	57424	57425	57426	57427	57428	57429	57430	57431
2307	2308	2309	2310	2311	2312	2313	2314	2315
A	C	C	A	T	T	T	G	G
57432	57433	57434	57435	57436	57437	57438	57439	57440
2316	2317	2318	2319	2320	2321	2322	2323	2324
T	G	T	T	T	T	G	A	A
57441	57442	57443	57444	57445	57446	57447	57448	57449
2325	2326	2327	2328	2329	2330	2331	2332	2333
G	A	A	T	T	A	A	C	A
57450	57451	57452	57453	57454	57455	57456	57457	57458
2334	2335	2336	2337	2338	2339	2340	2341	2342
G	C	T	T	T	G	T	G	A
57459	57460	57461	57462	57463	57464	57465	57466	57467
2343	2344	2345	2346	2347	2348	2349	2350	2351
A	C	G	T	G	G	C	A	G
57468	57469	57470	57471	57472	57473	57474	57475	57476
2352	2353	2354	2355	2356	2357	2358	2359	2360
T	G	C	T	T	G	T	G	A
57477	57478	57479	57480	57481	57482	57483	57484	57485
2361	2362	2363	2364	2365	2366	2367	2368	2369
T	T	C	A	G	G	C	T	T
57486	57487	57488	57489	57490	57491	57492	57493	57494
2370	2371	2372	2373	2374	2375	2376	2377	2378
C	C	A	T	T	G	A	G	A
57495	57496	57497	57498	57499	57500	57501	57502	57503
2379	2380	2381	2382	2383	2384	2385	2386	2387
C	C	A	A	G	G	G	G	A
57504	57505	57506	57507	57508	57509	57510	57511	57512
2388	2389	2390	2391	2392	2393	2394	2395	2396
G	A	A	C	C	T	G	G	T
57513	57514	57515	57516	57517	57518	57519	57520	57521
2397	2398	2399	2400	2401	2402	2403	2404	2405
T	G	C	A	G	G	A	C	A
57522	57523	57524	57525	57526	57527	57528	57529	57530
2406	2407	2408	2409	2410	2411	2412	2413	2414
A	A	C	A	G	A	C	G	G
57531	57532	57533	57534	57535	57536	57537	57538	57539
2415	2416	2417	2418	2419	2420	2421	2422	2423
A	C	A	G	C	G	T	G	T
57540	57541	57542	57543	57544	57545	57546	57547	57548

2424	2425	2426	2427	2428	2429	2430	2431	2432
G	G	C	A	G	T	G	T	T
57549	57550	57551	57552	57553	57554	57555	57556	57557
2433	2434	2435	2436	2437	2438	2439	2440	2441
T	A	A	A	T	G	C	T	C
57558	57559	57560	57561	57562	57563	57564	57565	57566
2442	2443	2444	2445	2446	2447	2448	2449	2450
T	T	C	T	G	A	A	G	G
57567	57568	57569	57570	57571	57572	57573	57574	57575
2451	2452	2453	2454	2455	2456	2457	2458	2459
C	T	G	A	T	A	C	G	A
57576	57577	57578	57579	57580	57581	57582	57583	57584
2460	2461	2462	2463	2464	2465	2466	2467	2468
C	A	G	C	T	C	T	C	T
57585	57586	57587	57588	57589	57590	57591	57592	57593
2469	2470	2471	2472	2473	2474	2475	2476	2477
G	T	G	C	A	C	T	G	A
57594	57595	57596	57597	57598	57599	57600	57601	57602
2478	2479	2480	2481	2482	2483	2484	2485	2486
T	T	G	C	A	T	A	T	G
57603	57604	57605	57606	57607	57608	57609	57610	57611
2487	2488	2489	2490	2491	2492	2493	2494	2495
C	A	T	C	C	C	A	A	G
57612	57613	57614	57615	57616	57617	57618	57619	57620
2496	2497	2498	2499	2500	2501	2502	2503	2504
A	T	T	A	T	A	T	T	A
57621	57622	57623	57624	57625	57626	57627	57628	57629
2505	2506	2507	2508	2509	2510	2511	2512	2513
T	T	G	T	T	T	T	C	T
57630	57631	57632	57633	57634	57635	57636	57637	57638
2514	2515	2516	2517	2518	2519	2520	2521	2522
A	C	T	G	C	T	A	T	G
57639	57640	57641	57642	57643	57644	57645	57646	57647
2523	2524	2525	2526	2527	2528	2529	2530	2531
T	G	T	C	A	C	A	C	T
57648	57649	57650	57651	57652	57653	57654	57655	57656
2532	2533	2534	2535	2536	2537	2538	2539	2540
T	T	G	C	C	A	A	A	C
57657	57658	57659	57660	57661	57662	57663	57664	57665
2541	2542	2543	2544	2545	2546	2547	2548	2549
A	G	G	A	T	G	T	G	G
57666	57667	57668	57669	57670	57671	57672	57673	57674
2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	2557	2558
A	A	A	A	T	G	A	A	T
57675	57676	57677	57678	57679	57680	57681	57682	57683

2559	2560	2561	2562	2563	2564	2565	2566	2567
A	A	G	C	G	G	T	T	T
57684	57685	57686	57687	57688	57689	57690	57691	57692
2568	2569	2570	2571	2572	2573	2574	2575	2576
T	C	T	T	A	G	G	C	A
57693	57694	57695	57696	57697	57698	57699	57700	57701
2577	2578	2579	2580	2581	2582	2583	2584	2585
C	T	T	C	T	T	A	A	C
57702	57703	57704	57705	57706	57707	57708	57709	57710
2586	2587	2588	2589	2590	2591	2592	2593	2594
A	G	A	C	A	A	T	T	G
57711	57712	57713	57714	57715	57716	57717	57718	57719
2595	2596	2597	2598	2599	2600	2601	2602	2603
G	T	C	A	A	A	A	T	G
57720	57721	57722	57723	57724	57725	57726	57727	57728
2604	2605	2606	2607	2608	2609	2610	2611	2612
A	A	C	T	C	C	A	T	T
57729	57730	57731	57732	57733	57734	57735	57736	57737
2613	2614	2615	2616	2617	2618	2619	2620	2621
G	C	T	T	A	A	G	A	A
57738	57739	57740	57741	57742	57743	57744	57745	57746
2622	2623	2624	2625	2626	2627	2628	2629	2630
A	C	A	C	A	T	A	A	A
57747	57748	57749	57750	57751	57752	57753	57754	57755
2631	2632	2633	2634	2635	2636	2637	2638	2639
C	A	C	C	A	T	T	T	A
57756	57757	57758	57759	57760	57761	57762	57763	57764
2640	2641	2642	2643	2644	2645	2646	2647	2648
G	T	C	A	C	T	G	A	A
57765	57766	57767	57768	57769	57770	57771	57772	57773
2649	2650	2651	2652	2653	2654	2655	2656	2657
C	A	T	A	G	C	T	A	T
57774	57775	57776	57777	57778	57779	57780	57781	57782
2658	2659	2660	2661	2662	2663	2664	2665	2666
A	T	G	T	A	T	G	G	T
57783	57784	57785	57786	57787	57788	57789	57790	57791
2667	2668	2669	2670	2671	2672	2673	2674	2675
T	G	T	T	A	C	T	A	T
57792	57793	57794	57795	57796	57797	57798	57799	57800
2676	2677	2678	2679	2680	2681	2682	2683	2684
G	G	G	A	A	A	T	C	T
57801	57802	57803	57804	57805	57806	57807	57808	57809
2685	2686	2687	2688	2689	2690	2691	2692	2693
T	G	T	T	T	T	G	C	C
57810	57811	57812	57813	57814	57815	57816	57817	57818

2694	2695	2696	2697	2698	2699	2700	2701	2702
A	A	T	T	T	T	C	T	T
57819	57820	57821	57822	57823	57824	57825	57826	57827
2703	2704	2705	2706	2707	2708	2709	2710	2711
T	G	A	A	A	A	T	T	C
57828	57829	57830	57831	57832	57833	57834	57835	57836
2712	2713	2714	2715	2716	2717	2718	2719	2720
T	G	G	C	A	G	A	C	C
57837	57838	57839	57840	57841	57842	57843	57844	57845
2721	2722	2723	2724	2725	2726	2727	2728	2729
A	A	G	G	T	T	C	T	T
57846	57847	57848	57849	57850	57851	57852	57853	57854
2730	2731	2732	2733	2734	2735	2736	2737	2738
T	T	T	G	T	T	T	A	C
57855	57856	57857	57858	57859	57860	57861	57862	57863
2739	2740	2741	2742	2743	2744	2745	2746	2747
A	T	A	A	T	A	C	T	T
57864	57865	57866	57867	57868	57869	57870	57871	57872
2748	2749	2750	2751	2752	2753	2754	2755	2756
G	A	A	A	A	A	T	A	A
57873	57874	57875	57876	57877	57878	57879	57880	57881
2757	2758	2759	2760	2761	2762	2763	2764	2765
A	A	A	T	G	A	A	C	A
57882	57883	57884	57885	57886	57887	57888	57889	57890
2766	2767	2768	2769	2770	2771	2772	2773	2774
A	G	C	T	A	A	C	A	A
57891	57892	57893	57894	57895	57896	57897	57898	57899
2775	2776	2777	2778					
A	C	T	A					
57900	57901	57902	57903					