Ingrid Helena Ribeiro

**Identificação das variantes dos genes *RHD* e *RHCE* em
pacientes com doença falciforme usando estratégia de
sequenciamento de nova geração**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientadora Dr(a). Carla Luana Dinardo

São Paulo

2020

Ingrid Helena Ribeiro

**Identificação das variantes dos genes *RHD* e *RHCE* em
pacientes com doença falciforme usando estratégia de
sequenciamento de nova geração**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientadora Dr(a). Carla Luana Dinardo

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Ingrid Helena

Identificação das variantes dos genes RHD e RHCE
em pacientes com doença falciforme usando estratégia
de sequenciamento de nova geração / Ingrid Helena
Ribeiro. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Medicina Tropical. Área de
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.
Orientadora: Carla Luana Dinardo.

Descritores: 1. Antígenos de grupos sanguíneos
2. Anemia falciforme 3. Genotipagem eritrocitária
4. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala
5. Sistema do grupo sanguíneo Rh-Hr

USP/FM/DBD-110/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho é dedicado:

Ao meu avô **José Ribeiro** e a minha avó **Florinda Augusta**, que nunca mediram esforços para transformar meus momentos espinhosos em jardins floridos.

A minha mãe **Vilma**, que mesmo estando a muitos quilômetros de distância sempre esteve presente em minha vida.

Aos meus filhos **Yasmin e Adrian** e minha enteada **Nicolly**, que souberam entender minha ausência e renovaram diariamente minhas energias com abraços e beijos.

Ao meu companheiro de todas as horas **Marcelo Cosenza**, que me deu forças para seguir adiante e me fez acreditar em mim mesma.

AGRADECIMENTOS

Nesses anos de mestrado, de muito estudo, esforço e empenho, gostaria de agradecer àqueles que me acompanharam e foram fundamentais para a concretização de mais esse sonho. Eles tiveram e ainda tem extrema importância nessa conquista e, portanto, gostaria de expressar minha sincera gratidão:

Ao **Instituto de Medicina Tropical da Fundação Faculdade de Medicina de São Paulo**, pela oportunidade da realização do estudo, incentivo científico e possibilidade de realização do curso de mestrado.

À minha orientadora, **Dra. Carla Luana Dinardo**, por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos. Sem sua orientação e amizade em todo o caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível. Agradeço por todos os ensinamentos compartilhados de forma precisa e admirável.

À **Dra. Ester Cerdeira Sabino** pela colaboração com o projeto e disponibilidade do laboratório, de Biologia Molecular do Instituto de Medicina Tropical, para realização do sequenciamento de Nova Geração, assim como, a disposição de seu aluno, **Lucas Franco**, na orientação do uso dos equipamentos.

À minha coorientadora e amiga, **Márcia Regina Dezan**, pela paciência e profundo apoio, sempre me estimulando em todos os momentos. Obrigada pela orientação teórica e técnica, por me corrigir quando necessário sem nunca me desmotivar, não medindo esforços para a realização deste trabalho. Saiba que sempre será um grande exemplo para mim.

À **Dra. Juliana Vieira Bianchi**, minha professora de graduação, pela primeira oportunidade na iniciação científica e indicação à minha orientadora, o que possibilitou a minha inserção no mestrado e me inspirou a ingressar na área de hemoterapia e pesquisa, agradeço por ter me incentivado a seguir no caminho da pós-graduação.

À minha amiga, **Valéria Brito Oliveira**, por desejar sempre o melhor para mim, me acompanhando nesse árduo percurso acadêmico, compartilhando amizade e conhecimento, sempre a disposição para ajudar quando necessário. Ter você por perto foi essencial para que eu conseguisse seguir em frente.

À minha amiga, **Marina Conrado**, que sempre foi uma pessoa admirável e um grande exemplo de dedicação, ajudando todos à sua volta. Agradeço do fundo do coração por todo o tempo destinado a me ajudar, sempre com calma, atenção e uma palavra amiga.

Agradeço imensamente a todos os **colaboradores da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo**. Aos que ainda estão e àqueles que já passaram por algum dos setores da Instituição, pela amizade e incentivo diário na conclusão desse trabalho. A todos que de alguma forma contribuíram direta, ou indiretamente, o meu muito obrigada!

À **Fundação Pró-Sangue**, em especial ao **Prof. Dr. Vanderson Rocha** e ao **Prof. Dr. Alfredo Mendrone**, por gentilmente colocar à disposição os laboratórios e a área experimental, possibilitando a realização da pesquisa e cedendo amostras de todos os pacientes incluídos neste estudo.

Agradeço também aos membros da Banca de Qualificação pelos conselhos, sugestões e interesse em contribuir para o desenvolvimento do projeto, **Dra Juliana Vieira Bianchi** e **Dr. João Renato Rebello Pinho**.

À **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)**, pelo apoio financeiro por meio da bolsa de estudos concedida durante o processo de realização dos experimentos do curso de mestrado.

Esta pesquisa recebeu o apoio financeiro da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** sob o processo de número: 2014/50250-6. A qual acreditou na potencialidade como contribuição científica nacional e internacional.

“Através da arte e da ciência, em seus sentidos mais amplos, é possível fazer uma contribuição permanente para a melhoria e o enriquecimento da vida humana, são essas atividades nas quais nós, estudantes, estamos engajados.”

Frederick Sanger

(1918 - 2013)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	02
2	OBJETIVOS.....	05
2.1	Objetivo Geral.....	05
2.2	Objetivos Específicos.....	05
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	07
3.1	Antígenos eritrocitários.....	07
3.2	Doença Falciforme.....	07
3.3	Aloimunização.....	09
3.4	Sistema Rh.....	12
3.4.1	Gene <i>RHAG</i>	19
3.4.2	Gene <i>RHD</i>	19
3.4.2.1	RhD fraco.....	20
3.4.2.2	RhD parcial.....	22
3.4.2.3	RhDel.....	23
3.4.2.4	RhD negativo.....	24
3.4.3	Gene <i>RHCE</i>	26
3.4.3.1	Base molecular dos antígenos Rhc, RhE e RhG.....	27
3.4.3.2	Base molecular dos antígenos Rhe e RhC.....	27
3.5	Variantes Rh.....	28

3.6	Estratégias moleculares.....	36
3.7	<i>Next Generation Sequencing – NGS</i>	37
3.7.1	Plataforma <i>Ion Torrent PGM™</i>	39
3.7.2	Tecnologia do <i>chip Ion Torrent</i>	40
3.7.3	<i>Pipeline</i> de análise.....	42
4	MÉTODOS.....	45
4.1	Casuística.....	45
4.1.1	Desenho do estudo.....	45
4.1.2	Local.....	45
4.1.3	Amostra.....	45
4.1.3.1	Seleção das amostras.....	46
4.1.4	Critérios de inclusão.....	46
4.1.5	Critérios de exclusão.....	46
4.1.6	Justificativas para a realização do projeto.....	47
4.2	Fluxograma do estudo.....	47
4.3	Padronização do ensaio de <i>NGS</i>	47
4.4	Extração do DNA.....	50
4.5	Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	52
4.6	Quantificação e purificação do DNA.....	62
4.7	Preparação da biblioteca.....	63
4.8	Reação em cadeia de polimerase (PCR) em emulsão e enriquecimento.....	64
4.9	Sequenciamento pelo método <i>Ion Torrent (Life Technologies™)</i>	64
4.10	Análise de dados de <i>NGS</i>	65
5	RESULTADOS.....	67
5.1	Etapa de padronização.....	67
5.2	Alinhamento com o genoma referência.....	68
5.3	Genotipagem baseada em <i>NGS</i> dos genes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i>	70
5.4	Desempenho geral	71
5.5	Alelos <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> identificados na amostra estudada.....	72
5.6	Novos alelos de <i>RHCE</i>	75
5.7	Correlação entre dados moleculares e sorológicos de Rh.....	76

5.8	Impacto da genotipagem <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> no gerenciamento de transfusões.....	78
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONCLUSÕES.....	89
8	ANEXOS.....	91
8.1	Anexo A - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	91
8.2	Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	96
8.3	Anexo C - Relatório de Usuário dos <i>Chips</i> SN2-201-Ingrid e SN2-202-Ingrid.....	100
9	REFERÊNCIAS.....	105

APÊNDICES

Apêndice A - Artigo publicado no *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2017

Apêndice B - Artigo publicado na *Transfusion*, 2019

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da mutação gênica responsável pelo surgimento da HbS ²²	08
Figura 2	Fisiopatologia das reações transfusionais hemolíticas tardias. A linha vermelha representa a quantidade de anticorpos produzidos após transfusão de eritrócitos com presença de antígeno incompatível. Modificado ³⁸	12
Figura 3	Proteína Rh na membrana eritrocitária e sua organização em 10 éxons ⁴⁴	15
Figura 4	Estrutura da proteína Rh na membrana eritrocitária. Cada aminoácido é representado por um círculo e os círculos em amarelo representam os aminoácidos que diferem entre a proteína RhD e a RhCE ⁴⁸	16
Figura 5	Representação dos dois genes com 97,8% de homologia ¹	16
Figura 6	Modelo do locus <i>RH</i> - Duplicação do gene <i>RH</i> e deleção. Na forma ancestral (deduzido do locus <i>RH</i> de camundongo) um único gene <i>RH</i> tem proximidade com o gene <i>TMEM50</i> e dois outros genes, <i>P29</i> (P) e <i>NPD014</i> (N), estão localizados acima do gene <i>TMEM50</i> . Com o evento da duplicação, há inversão do gene <i>RH</i> , que ocorre entre os genes <i>N</i> e <i>TMEM50</i> . No ponto de inserção do gene <i>RHD</i> , o segmento de DNA é duplicado, levando a formação da caixa <i>Rhesus</i> que flanqueia o gene <i>RHD</i> . A deleção do gene <i>RHD</i> leva ao aparecimento de caixa <i>Rhesus</i> híbrida e o locus <i>RH</i> claramente lembra o status ancestral antes de ocorrer a duplicação. Modificado ¹	17
Figura 7	Modelo do locus <i>RH</i> . A) Os dois genes <i>RH</i> possuem orientações opostas. B) A conversão gênica em <i>cis</i> pode ser favorecida pela estrutura <i>hairpin</i> . C) Como resultado da conversão gênica, parte de um gene <i>RH</i> é substituído pelo segmento correspondente do outro gene. D) Se a transcrição continua com o molde errado através do <i>TMEM50</i> , é possível a correção deste molde quando ele entra no segundo gene <i>RH</i> . E) O resultado de múltiplas conversões gênicas leva a haplótipos com dois alelos híbridos. Modificado ¹	18

Figura 8	Ilustração da estrutura proteica RhD fraco na membrana eritrocitária ⁴⁸	20
Figura 9	Diagrama de fluxo para gerenciamento dos resultados dos testes transfusionais de um fenótipo sorológico RhD fraco. Caso a tipagem sorológica RhD obtiver resultado RhD-negativo, este deve ser gerenciado como RhD-negativo e se caso positivo, o indivíduo deve ser gerenciado como RhD positivo. Se o resultado for de um fenótipo sorológico RhD fraco, encaminha-se para genotipagem. Caso, RhD fraco do tipo 1, 2 ou 3 não for detectado, este será gerenciado com RhD negativo, caso RhD fraco tipo 1, 2 ou 3 for detectado, este deverá ser gerenciado com segurança como RhD positivo. Adaptado ⁵⁷	21
Figura 10	Representação do RhD parcial na membrana eritrocitária ⁴⁸	22
Figura 11	Ilustração da estrutura proteica RhDel na membrana eritrocitária ⁴⁸	24
Figura 12	Representação do gene <i>RHD*Ψ</i> . Caracterizada pela Inserção dos 37pb na terminação do íntron 3 e éxon 4 ⁴⁸	25
Figura 13	Modelo do gene híbrido <i>RHD*D-CE(3-7)-D</i> ⁴⁸	26
Figura 14	Representação do perfil de epítomos de antígenos D parciais. Cada caixa na cor branca representa 1 de 10 éxons do gene <i>RHD</i> não codificados. Linhas cinzas verticais indicam posição no éxon que codifica as substituições de aminoácidos na proteína. O antígeno identificado com asterisco (<i>RHD</i> Fraco Tipo 4.2.2*) difere de DAR pelas mutações silenciosas 744C>T e 957G>A. As caixas na cor lilás representam éxons que codificam uma região traduzida. Adaptado ¹⁸	29
Figura 15	Haplótipos <i>RHCE</i> e informações associadas. Caixas na cor branca mostram éxons codificados por <i>RHCE</i> ; caixas na cor preta mostram éxons codificados por <i>RHD</i> ; caixas na cor azul retratam éxons não expressos. Substituições de aminoácidos, ao invés de substituições de nucleotídeos, são mostradas sob os éxons. Demarcado entre parênteses denota expressão reduzida de antígeno. A simbologia (+/-) significa: positivo com alguns anticorpos (podendo ser fraco) e negativo com outros anticorpos. Adaptado ¹⁸	30

Figura 16	Representação de exemplos de mutação de ponto nos genes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> ¹⁸	31
Figura 17	Diversidade alélica <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> em pacientes com DF. Cada caixa na cor branca representa 1 de 10 éxons nos genes <i>RH</i> . As caixas de cor preta representam troca exônica entre <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> . Linhas cinzas verticais indicam posição no éxon que codifica as substituições de aminoácidos na proteína. Linhas tracejadas indicam deleção gênica. Ponta de seta indica duplicação de 37 pb. As caixas na cor azul representam éxons que codificam uma região não traduzida do pseudogene <i>RHD</i> inativo. Adaptado ⁷⁷	33
Figura 18	Diferenças nucleotídicas entre os genes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> . Na figura, caixas em negrito representam os éxons. As diferenças de nucleotídeos entre <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> *ce são significativas. A alta homologia entre os éxons 1, 2, 6, 8, 9 e 10 de <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> é importante para destacar e justificar por que os testes baseados em <i>NGS</i> projetados para identificação molecular de Rh devem ser adaptados para que os <i>amplicons</i> específicos de <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> sejam sequenciados individualmente, ou algoritmos devem ser projetados para a interpretação dos resultados ¹⁵	35
Figura 19	Principais elementos de design de <i>chips</i> , fabricação e arquitetura. Os <i>chips</i> são projetados usando ferramentas padrão de projeto CMOS. Os <i>chips</i> são cortados em cubos e embalados, incluindo a célula de fluxo externa, usando processos padrão de embalagem de <i>chips</i> , resultando no chip mostrado, um chip Ion Torrent 314. Os principais blocos funcionais do <i>chip</i> iônico são: a) <i>chip</i> com registradores de seleção de linha para endereçar sequencialmente cada linha e matriz de sensores, mostrando o fechamento das placas flutuantes de metal individuais, interface de sensor e circuito de leitura, contendo circuitos de polarização, para definir a corrente de operação; b) receptor de coluna para definir a tensão de operação, amostra e espera, assim como um mux para capturar a tensão de saída e registro de seleção de coluna para endereçar sequencialmente cada coluna ¹⁰²	41

Figura 20	O <i>pipeline</i> de informática. Esta figura mostra os principais elementos do <i>pipeline</i> de informática primária, que consistem em: (A) aquisição de dados, transferência e redução de dados de largura de banda muito alta; (B) processamento de sinal, que é necessário para remover variação de pH de fundo e ajustar o modelo de incorporação aos dados; (C) <i>base calling</i> , que requer correção de fase e normalização dos sinais de incorporação, e, no caso onde um genoma de referência está disponível; (D) alinhamento das leituras à referência, através de um processo de alinhamento otimizado e local indexado para acomodar variantes e erros de sequenciamento, seguido por chamada de variantes com base na cobertura agregada fornecida pelas leituras em cada <i>locus</i> ¹⁰³	42
Figura 21	Representação esquemática do estudo realizado.....	47
Figura 22	Descrição dos reagentes utilizados para reação de sequenciamento <i>Sanger</i>	49
Figura 23	Ciclagem utilizada na amplificação dos éxons <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> para protocolo de sequenciamento <i>Sanger</i>	49
Figura 24	Descrição dos processos inerentes à purificação e finalização da placa de sequenciamento (<i>MicroAmp® Fast Optical 96-Well-Applied Biosystems</i>).....	50
Figura 25	Descrição do protocolo de extração do DNA genômico.....	51
Figura 26	Descrição do protocolo multiplex baseado na amplificação de éxons específicos de <i>RHD</i> (3-7 e 9) ¹⁰⁹	57
Figura 27	Fluxograma de diagnóstico da zigosidade para <i>RHD</i> pelo método de <i>PCR-RFLP</i> ¹¹⁰	58
Figura 28	(A) Representação esquemática da estrutura genética no <i>locus RH</i> . Linhas tracejadas representam os pontos de interrupção nas caixas <i>Rhesus</i> que causam a exclusão de <i>RHD</i> . (B) Orientação e sequências dos <i>primers</i> HYB2-U e HYB2-L. As sequências de <i>primers</i> estão descritas na parte inferior e a especificidade do alelo é conferida pelas bases identificadas em negrito, além de uma incompatibilidade adicional, que se encontra em letra maiúscula e sublinhada, que pode ser identificada na terceira base a partir da extremidade 3' de cada <i>primer</i> ¹¹¹	59

Figura 29	Descrição do protocolo de zigosidade de <i>RHD</i> ¹¹²	60
Figura 30	Descrição do protocolo multiplex que codifica <i>RHD</i> (íntron 4 / éxon 7), pseudogene e RhC/Rhc ⁶³	62
Figura 31	Representação das etapas do sequenciamento pela plataforma <i>IonTorrent</i> ®. 1) Uma biblioteca de sequenciamento foi produzida pela geração de fragmentos de DNA flanqueados pelos adaptadores <i>Ion Torrent</i> ; 2) Esses fragmentos foram amplificados como clones nas partículas <i>Ion Sphere</i> por PCR; 3) As partículas <i>Ion Sphere</i> com o DNA molde amplificado foram aplicadas no <i>chip Ion Torrent</i> ; 4) O <i>chip</i> foi colocado no <i>Ion Torrent PGM</i> e a corrida de sequenciamento foi realizada; 5) Os resultados do sequenciamento foram fornecidos em arquivos em formato padrão; 6) A análise de dados <i>downstream</i> foi realizada utilizando o <i>Ion Reporter</i> ™ Software 5.10 ⁹⁹	65
Figura 32	Gráficos emitidos pelo sequenciamento <i>Sanger</i> . Contém ruídos, impossibilitando a leitura da sequência padrão de <i>RHD</i> pelo <i>software</i> , dificultando a interpretação do éxon 5 quando em heterozigose com o alelo <i>RHD*ψ</i>	68
Figura 33	Descrição dos alelos das variantes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> identificados utilizando o ensaio baseado em NGS em pacientes com DF exibindo anticorpos anti-Rh inesperados. À esquerda, a sequência genética padrão é representada pelas caixas na cor cinza, sendo que cada caixa representa um éxon. Quando as caixas estão na cor preta, significa substituição completa, formando alelos híbridos. Quando as caixas possuem uma linha dentro, isso representa mutações pontuais. À direita, são descritas as alterações nucleotídicas em comparação à sequência padrão e à identificação do éxon afetado, assim como, o número de alelos identificados com a variação genética e a frequência alélica na população estudada.....	73
Figura 34	Resumo dos alelos <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> identificados nos pacientes estudados.....	74
Figura 35	Resumo do genótipo <i>RHD/RHCE</i> e correlação com dados sorológicos de todos os pacientes com DF estudados.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Terminologia dos principais antígenos e dos haplótipos <i>RH</i> mediante <i>ISBT</i> ¹⁸	13
Tabela 2	Nomenclatura dos fenótipos Rh e sua frequência em diferentes etnias. Modificado ¹⁸	14
Tabela 3	Relação de ocorrência da origem das principais variantes RhD parciais ¹⁸	23
Tabela 4	Relação dos mecanismos genéticos associados com o fenótipo RhD negativo.....	25
Tabela 5	Determinação dos antígenos Rhc, RhE e RhG na proteína Rh.....	27
Tabela 6	Reação do anticorpo monoclonal anti-e com eritrócitos expressando haplótipos variantes ¹⁸	34
Tabela 7	<i>Primers</i> de amplificação e sequenciamento para gene <i>RHD</i> ¹⁰⁶	53
Tabela 8	<i>Primers</i> de amplificação e sequenciamento para gene <i>RHCE</i> ¹⁰⁸	54
Tabela 9	Especificação das condições de ciclagem de cada éxon ^{106,108}	55
Tabela 10	Sequências dos <i>primers</i> de <i>RHD</i> . Os nucleotídeos específicos para <i>RHD</i> estão em negrito, as incompatibilidades introduzidas para aumentar a especificidade estão sublinhadas e as sequências não codificantes estão em letras minúsculas. Adaptado ¹⁰⁹	56
Tabela 11	Os <i>primers</i> HYB2-U/HYB2-L são específicos e foram projetados para detectar o alelo deletado por <i>RHD</i> (caixa <i>Rhesus</i> híbrida) ¹¹²	60
Tabela 12	Sequências de <i>primers</i> específicos para o protocolo multiplex <i>RHD</i> (íntron 4 / éxon 7), pseudogene, RhC/Rhc ⁶³	61

Tabela 13	Comparação entre os resultados da metodologia <i>NGS</i> e <i>Sanger</i> na etapa de padronização.....	67
Tabela 14	Demonstrativo dos relatórios de usuário gerados após a primeira e a segunda corridas com alinhamento de acordo com o genoma de referência hg19 relacionada aos <i>chips</i> SN2-201-Ingrid e SN2-202-Ingrid, demonstrando a densidade de carga, o histograma de comprimento de leitura e as estatísticas de resumo obtidas do <i>Ion Torrent Suite</i> ™ após uma execução de sequenciamento representativa do <i>Ion Torrent PGM</i> ™ Fonte: <i>Ion Torrent (PGM™) System</i>	69
Tabela 15	Porcentagem média dos éxons de interesse que estavam cobertos em pelo menos 50 vezes.....	70
Tabela 16	Valor médio de cobertura de cada éxon sequenciado (<i>RHD</i> e <i>RHCE</i>).....	70
Tabela 17	Porcentagem dos genes de interesse com valor de <i>cutoff</i> de pelo menos 50 vezes de cobertura.....	71
Tabela 18	Resumo do desempenho do ensaio baseado em <i>NGS</i> para cada gene estudado.....	71
Tabela 19	Alelos <i>RHD</i> codificante de antígeno variante identificados no estudo.....	74
Tabela 20	Quantidade de unidades de hemácias RhD negativo poupadas do inventário laboratorial de transfusão após o resultado da genotipagem de <i>RHD</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A	Adenina
AGH	antiglobulina humana
<i>BAM</i>	<i>Business Activity Monitoring</i>
C	Citosina
CAPPesq	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CMOS	Metal óxido semiconductor de simetria complementar (<i>complementary metal oxide semiconductor</i>)
DF	Doença Falciforme
dDNTP's	nucleotídeos marcados com fluorescência
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNTP's	nucleotídeos livres
<i>EDTA</i>	ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FPS-HSP	Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo
G	Guanina
Gb	Gigabase
H ⁺	Hidrogênio
HbA	hemoglobina normal
HbS	hemoglobina S
Hg19	genoma humano
HU	Hidroxiuréia
IMT	Instituto de Medicina Tropical
<i>ISBT</i>	Sociedade Internacional de Transusão Sanguínea

NGS	Sequenciamento de Nova Geração (<i>Next Generation Sequencing</i>)
PCR	reação em cadeia de polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGM	<i>Personal Genome Machine</i>
pH	potencial hidrogeniônico
SFF	<i>Small Form Factor</i>
SMD	síndrome mielodisplásica
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
T	Timina

RESUMO

Ribeiro IH. *Identificação das variantes dos genes RHD e RHCE em pacientes com anemia falciforme usando estratégia de sequenciamento de nova geração* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: Os antígenos eritrocitários do sistema de grupo sanguíneo *RH* são codificados por dois genes altamente homólogos, *RHD* e *RHCE*, sendo que os rearranjos gênicos são responsáveis pelas variantes de antígenos por eles codificados. A complexidade dessa variação genética, principalmente em pacientes em regime crônico de transfusão, como aqueles com a doença falciforme (DF), contribui para elevada taxa de aloimunização eritrocitária. Os ensaios moleculares convencionais não conseguem identificar todas as variantes genéticas já descritas para o locus *RH*, bem como prever novos alelos. O sequenciamento de *RHD* e *RHCE* é indicado para ampliar a pesquisa de variantes genéticas de Rh. **OBJETIVOS:** 1) Padronizar a estratégia de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - *NGS*) para identificar assertivamente variantes genéticas de Rh entre pacientes com DF com suspeita sorológica de variantes de Rh. 2) Correlacionar dados genéticos com a classificação sorológica dos anticorpos RH não esperados (direcionados contra antígenos para os quais a fenotipagem eritrocitária é positiva). **MÉTODOS:** Trinta e cinco pacientes com DF com anticorpos RH não esperados foram incluídos. Estratégia de *NGS* foi desenvolvida para genotipar *RHD* e *RHCE* usando *primers* gene-específicos. Os dados genotípicos e sorológicos foram comparados. **RESULTADOS:** Os dados obtidos no ensaio de *NGS* foram específicos para os genes *RHD* e *RHCE*. Dez e vinte e cinco alelos variantes de *RHD* e *RHCE* foram identificados, respectivamente. Entre todos os casos de anticorpos RH não esperados, 62% foram classificados de maneira imprecisa por análise sorológica e, dentre esses casos, 73,1% foram considerados como potencialmente prejudiciais ao paciente, visto que a classificação inacurada do anticorpo como auto ou alo poderia se associar a aumento do risco de reações hemolíticas pós-transfusionais ou falta de unidades de tipo O RhD negativo para transfusão. Encontrados dois novos alelos não descritos na literatura, ainda necessitando de ensaios sorológicos no intuito de determinar se esses codificam antígenos parciais. **CONCLUSÃO:** O ensaio *NGS* projetado para genotipar regiões codificadoras de *RH* foi eficaz e preciso na identificação de variantes. A estratégia proposta esclareceu o fenótipo Rh da maioria dos pacientes, melhorando o suporte à transfusão.

Descritores: Antígenos de grupos sanguíneos; Anemia falciforme; Genotipagem eritrocitária; Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala; Sistema do grupo sanguíneo Rh-Hr.

ABSTRACT

Ribeiro IH. *Identification of RHD and RHCE gene variants in patients with sickle cell anemia using a new generation sequencing strategy* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Introduction: The erythrocyte antigens of the Rh blood group system are encoded by two highly homologous genes, RHD and RHCE, and gene rearrangements are responsible for variants of these antigens. The complexity of this genetic variation, especially in patients with chronic transfusion, such as sickle cell disease (SCD), has a high rate of alloimmunization. Conventional molecular assays cannot identify all genetic variants already described for the RH locus as well as predict new alleles. RHD and RHCE sequencing is indicated to broaden the search for Rh genetic variants. **AIMS:**1) To standardize the Next Generation Sequencing (NGS) strategy to assertively identify Rh genetic variants among SCD patients with serologic suspicion of Rh variants and evaluate if it can improve the transfusion support.2) To correlate genotype with phenotype data in the case of unexplained Rh antibodies (directed to antigens with positive phenotype). **METHODS:** Thirty-five SCD patients with unexplained Rh antibodies were enrolled. A NGS-based strategy was developed to genotype RHD and RHCE using gene-specific primers. Genotype and serological data were compared. **RESULTS:** Data obtained from the NGS-based assay were gene-specific. Ten and 25 variant RHD and RHCE alleles were identified, respectively. Among all cases of unexplained Rh antibodies, 62% had been inaccurately classified by serological analysis and, of these, 73.1% were considered as relevant, as were associated with increased risk of hemolytic reactions and shortage of units suitable for transfusion. Found two new alleles not described in the literature, still needing serological tests in order to determine whether they encode partial antigens. **CONCLUSION:** The NGS assay designed to genotype RH coding regions was effective and accurate in identifying variants. The proposed strategy clarified the Rh phenotype of most patients, improving transfusion support.

Descriptors: Blood groups antigens; Anemia sickle cell; Genotyping techniques; High-throughput nucleotide sequencing; Rh-Hr blood group system.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A incidência global das hemoglobinopatias é de 4,5% na população mundial e, devido a sua alta prevalência, esta condição passou a representar grave problema de saúde pública em muitos países.^{1,2} No Brasil, a Doença Falciforme (DF) é a síndrome hereditária que possui maior representatividade nesse índice, possuindo relevância significativa segundo o Ministério da Saúde e a Associação Brasileira de Saúde Pública de 2016, com cerca de mais de 200 mil casos por ano, ou seja, um a cada mil brasileiros. A população com DF apresenta alto risco de aloimunização eritrocitária. A DF afeta de 0,1% a 0,3% da população negróide, sendo observada também, em decorrência da alta taxa de miscigenação, em parcela cada vez mais significativa da população caucasóide brasileira.³

As transfusões sanguíneas são parte do tratamento de pacientes com doenças hematológicas e fundamentais para prevenção de complicações naqueles que possuem a DF.⁴ Esses pacientes, expostos a aloantígenos eritrocitários por transfusão, podem produzir anticorpos irregulares (aloimunização eritrocitária) e apresentar reações transfusionais hemolíticas agudas e tardias, piorando a morbimortalidade da doença.⁵

A aloimunização a antígenos eritrocitários é uma das principais complicações pós-transfusionais entre pacientes portadores de DF, o que dificulta significativamente o processo pré-transfusional, pois a identificação de unidades de hemácias compatíveis para transfusão pode ser retardada, levando a atrasos na transfusão. Uma vez que um anticorpo clinicamente significativo é produzido, unidades de hemácias que não possuam os antígenos correspondentes devem ser transfundidas, pois unidades incompatíveis podem ocasionar hemólise extravascular tardia e, em casos graves, hiperhemólise.^{6,7} As taxas de aloimunização variam entre 7% e 62,1% em pacientes com DF e os fatores de risco mais importantes para o

desenvolvimento de aloanticorpos são o número de transfusões e o estado de inflamação do receptor no período pré-transfusional.^{8,9,10} O fornecimento de unidades de eritrócitos com antígenos compatíveis é a melhor profilaxia para prevenir a aloimunização¹¹, mas há vários fatores que podem tornar essa estratégia ineficaz, o que é representado principalmente pela ocorrência de transfusões fora do banco de sangue original e a presença de variantes *RHD* e *RHCE*, cuja frequência é alta entre os pacientes com DF e que não são identificadas no início da profilaxia.^{8,11,12}

Medidas para prevenir a aloimunização devem ser planejadas pelos bancos de sangue. Na rotina habitual de determinação da tipagem RhD de pacientes normalmente são utilizados tipos distintos de soros anti-D, com o intuito de identificar variantes antigênicas. No entanto, muitas vezes não é possível identificar variações na expressão do antígeno RhD com base em técnicas sorológicas, podendo levar à não identificação de fenótipo parcial e ao desenvolvimento de aloanticorpos pelo paciente.¹³ A alternativa para resolução deste problema seria o uso de técnicas moleculares para detectar a presença de variantes *RHD* e *RHCE*, sendo altamente recomendado para o aumento da segurança transfusional.¹⁴

Os maiores candidatos a protocolos de transfusão crônica são pacientes com DF e com síndrome mielodisplásica, tendo em vista que o risco de aloimunização aumenta com a exposição transfusional, trazendo consigo o risco de reação hemolítica pós-transfusional. Mesmo com protocolos de transfusão de unidades fenótipo-idênticas, as chances de aloimunização por estes grupos de pacientes ainda é significativa.¹⁵

Nesse contexto, o sequenciamento de todas as regiões de codificação dos genes *RHD* e *RHCE* representa estratégia promissora para a identificação de variantes, principalmente nos casos que envolvam inserções, deleções e possíveis alelos híbridos. O presente estudo tem o intuito de desenvolver estratégia de sequenciamento do locus *RH* por meio de Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* – *NGS*), plataforma *Ion Torrent Personal Genome Machine* (*PGM*)., a fim de acuradamente identificar variantes deste sistema em pacientes com DF.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever a diversidade de variantes *RH* em coorte brasileira de pacientes falciformes com anticorpos Rh inesperados, usando estratégia de sequenciamento de nova geração (*NGS*).

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar se o genótipo obtido a partir do sequenciamento dos genes *RHD* e *RHCE* alteraria a conduta transfusional para os pacientes estudados.

Definir quais anticorpos eram presumidamente auto-direcionados, com base no genótipo *RH*.

3 Revisão da literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Antígenos eritrocitários

Os sistemas de grupos sanguíneos compostos por antígenos presentes na membrana eritrocitária. Estes antígenos são parte integrante dos componentes da membrana e possuem características sorológicas bem definidas.¹⁶

Os antígenos eritrocitários são herdados geneticamente e caracterizados por sequências de aminoácidos específicas, constituindo proteínas que podem estar ligadas a carboidratos ou a lipídios.¹⁷ A diversidade dos antígenos de grupos sanguíneos, como qualquer outro traço biológico, encontra-se ao nível do gene.^{18,19}

De acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (*ISBT*, 2017), existem atualmente 346 antígenos eritrocitários distribuídos em 38 sistemas de grupos sanguíneos.²⁰ Atualmente 43 genes são conhecidos como responsáveis pelo controle da expressão dos antígenos de grupos sanguíneos.²⁰ Os genes de todos os grupos sanguíneos reconhecidos pelo *ISBT* já foram clonados, ou seja, possuem sua base molecular definida, permitindo a determinação precisa do fenótipo a partir do ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid* - DNA) genômico.²¹

3.2 Doença Falciforme

A simples substituição pontual de uma base nitrogenada, adenina por timina (GAT → GTT), no sexto *códon* do éxon 1 no DNA do cromossomo 11 (Figura 1), ocasiona o surgimento de uma hemoglobina patológica. A troca de bases nitrogenadas no DNA, ao invés de codificar a produção (transcrição) do aminoácido ácido glutâmico, irá, a partir daí, determinar a produção do

aminoácido valina, que entrará na posição 6 da sequência de aminoácidos que compõem a cadeia β da hemoglobina, modificando sua estrutura molecular.²²

Cromossomo 11 normal

- 6ª códon cadeia β → GAG → ácido glutâmico

Cromossomo 11 mutante

- 6ª códon cadeia β^s → GTG → valina

Figura 1 - Representação esquemática da mutação gênica responsável pelo surgimento da HbS²²

Esta troca de um único aminoácido na composição da cadeia beta globínica ocasiona o surgimento de uma estrutura hemoglobínica nova denominada hemoglobina S (HbS), *sickle-foice*. Deste fato decorre uma série de alterações físico-químicas na estrutura da hemácia, acarretando a deformação e o enrijecimento de sua membrana celular e ocasionando a vasocclusão de pequenas arteríolas, tornando-se responsável por toda a sequência de alterações estruturais e funcionais nos mais diversos órgãos e sistemas do paciente acometido pela DF.²²

Há várias formas de apresentação clínica dos pacientes portadores da DF, variando de formas leves, quase assintomáticas, a formas incapacitantes, ou com alta taxa de mortalidade, o que tem sido fonte de inúmeras pesquisas ao longo do tempo. A polimerização da HbS e a falcização das hemácias, entretanto, são extremamente bem conhecidas por sofrerem modulação por diversos fatores ambientais. As variações das condições climáticas, sociais, econômicas e de cuidados médicos contribuem para esta diversidade, mas não explicam todo o seu contexto. O evento que deflagrou a mutação do gene da hemoglobina normal (HbA) para o gene da HbS ainda permanece desconhecido.²²

No decorrer dos quase cem anos de estudos relacionados à DF, grandes progressos foram realizados no conhecimento desta doença. A biologia molecular vem sendo utilizada para auxiliar na caracterização fenotípica dos pacientes com DF, principalmente no que diz respeito à determinação do genótipo de antígenos eritrocitários e das variantes das proteínas RhD e RhCE, com alta relevância na prática transfusional destes pacientes.²³

Estudos têm reportado a eficácia do tratamento com Hidroxiuréia (HU) neste grupo de pacientes, por levar à melhora clínica e de parâmetros hematológicos, com redução da incidência de episódios vaso-oclusivos e de hemólise crônica, além de aumento dos níveis de hemoglobina e hematócrito.¹ Além disso, os programas de transfusões sanguíneas crônicas são ferramenta importante no controle da doença, devido ao fato de a infusão de eritrócitos aumentar a capacidade de carregamento de oxigênio e, ao mesmo tempo, diminuir a hipóxia tecidual. Nesse cenário, o aparecimento da aloimunização dos pacientes com DF representa complicação transfusional importante, visto que pode dificultar, ou eventualmente inviabilizar, o tratamento dos pacientes com transfusões.^{24,25}

3.3 Aloimunização

A aloimunização contra antígenos eritrocitários é uma complicação transfusional tardia que afeta entre 8% e 12% dos receptores de transfusão. Esta porcentagem aumenta significativamente no caso de pacientes em regime transfusional crônico, como aqueles com DF e síndrome mielodisplásica (SMD).²⁶ Neste último cenário, aproximadamente 15% dos pacientes desenvolvem anticorpos contra um, ou mais, antígenos eritrocitários.²⁶ A DF está associada a manifestações clínicas como dor e falência de órgãos, dependendo do estado nutricional, idade e comorbidades do indivíduo. A terapia transfusional com concentrado de hemácias é usualmente utilizada no tratamento desta doença, sendo que aproximadamente metade dos pacientes recebem múltiplas transfusões ao longo de suas vidas e aproximadamente

7,5% iniciam programa de transfusão crônica. No entanto, a terapia transfusional pode estar associada a risco aumentado de reações hemolíticas pós-transfusionais, aplasia transitória e aloimunização contra antígenos eritrócitos.²⁷

Em 2016, na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, 62,5% dos pacientes com DF apresentavam ao menos um aloanticorpo eritrocitário.⁸ A presença destes aloanticorpos no soro dos pacientes está associada a atrasos na liberação de futuras transfusões devido à complexidade dos testes pré-transfusionais, à dificuldade para encontrar doadores compatíveis e à possibilidade de reações hemolíticas graves no caso de liberação emergencial de unidades não compatíveis.²⁸ De forma a limitar a aloimunização eritrocitária nesta população de pacientes, alguns autores estimulam compatibilização racial entre pacientes portadores de DF e doadores de sangue, enquanto outros recomendam transfusões fenotipicamente compatíveis com os antígenos eritrocitários mais imunogênicos: D, K, RhE, Rhc, RhC, Rhc, Fya, Jka, S e s.^{29,30,31}

No caso do grupo sanguíneo Rh, a frequência de antígenos variantes é maior em população negra em comparação à caucasiana. Pacientes portadores de variantes antigênicas denominadas como antígenos parciais apresentam perda de epítomos imunogênicos na estrutura dos antígenos e, mediante exposição a antígenos íntegros via transfusão, ou gestação, há possibilidade de aloimunização.²⁸

Sabe-se que a taxa de variantes dos principais antígenos do sistema Rh (RhD e RhCE) é muito mais alta em pacientes afrodescendentes e, mais especificamente, em pacientes com DF. Estes pacientes devem precocemente ser identificados como portadores de alelos variantes e devem receber transfusões antígeno-negativo para os antígenos envolvidos, de forma a evitar a aloimunização.¹

As bases fisiopatológicas da aloimunização dependem de múltiplos fatores como padrão de resposta imunológica do indivíduo, frequência de transfusões, imunogenicidade do antígeno, idade e sexo do receptor. Estudos

realizados entre 2014 e 2017 por Fasano, Sins e Allali associaram o aumento na incidência de aloimunização na população com DF com a ocorrência de transfusões em momentos de maior inflamação sistêmica, como na vigência de crise vaso-oclusivas ou de síndrome torácica aguda.^{32,33,34} Além disso, também encontraram maior risco de sensibilização em indivíduos que receberam transfusão na presença de inflamação prévia. Estudos mostram que condição inflamatória crônica em receptores de sangue favorece o desenvolvimento de aloimunização, condição determinada em vários experimentos com modelos murinos.^{32,35}

Mais de 35% dos aloanticorpos presentes no soro de pacientes aloimunizados podem ser transitórios na DF, pois diminuem ao longo do tempo, ou ficam abaixo do nível de detecção pelas metodologias sorológicas tradicionais. Nesse contexto, o anticorpo não estará presente em quantidades suficientes para detecção em futuros testes pré-transfusionais. Se a transfusão for feita com unidades de eritrócitos apresentando o antígeno incompatível, é provável que ocorra resposta amnésica, na qual os linfócitos da memória são ativados com a produção subsequente de grandes quantidades de anticorpos contra esse antígeno eritrocitário. Isso poderá resultar em rápida destruição das hemácias transfundidas, configurando reação hemolítica pós-transfusional e, em casos graves, síndrome de hiper-hemólise, como representado na Figura 2.^{36,37}

Figura 2 - Fisiopatologia das reações transfusionais hemolíticas tardias. A linha vermelha representa a quantidade de anticorpos produzidos após transfusão de eritrócitos com presença de antígeno incompatível. Modificado ³⁸

É difícil avaliar a verdadeira incidência das reações transfusionais hemolíticas tardias em pacientes com DF, visto que reações leves podem passar despercebidas e mimetizar crises vaso-oclusivas. Sabe-se que a população com DF é particularmente predisposta à ocorrência de reações hemolíticas pós-transfusionais graves, fato que justifica o benefício da transfusão fenótipo-compatível, inclusive para antígenos parciais do sistema Rh.

3.4 Sistema Rh

O sistema Rh é descrito em literatura como sendo o maior e mais imunogênico quando comparado aos demais sistemas de grupos sanguíneos, uma vez que possui profunda complexidade, tendo o maior grau de variabilidade dentre marcadores conhecidos da membrana eritrocitária. É constituído atualmente por 55 antígenos segundo a *ISBT*, sendo cinco antígenos principais.³⁹ Estes antígenos formam oito haplótipos codificados

pelas proteínas RhD e RhCE (Tabela 1), e estão distribuídos heterogeneamente entre diferentes etnias (Tabela 2).⁴⁰

Tabela 1 - Terminologia dos principais antígenos e dos haplótipos *RH* mediante *ISBT*¹⁸

Fenótipo <i>RHD</i> e <i>RHCE</i>			
Principais Antígenos Rh	Terminologia (<i>ISBT</i>)		
		Dce	R ₀
	D(RH1)	Dce	R
	C(RH2)	Dce	R ₁
	E(RH3)	dCe	r'
	c(RH4)	DcE	R ₂
	e(RH5)	dcE	r''
		DCE	R _z
		dCE	r _y

O antígeno RhD possui maior relevância clínica, devido ao fato de ser o mais imunogênico dentre os demais antígenos. Além disso, também é responsável por reações hemolíticas pós-transfusionais e doença hemolítica do feto/recém-nascido (DHFRN).⁴¹

Tabela 2 - Nomenclatura dos fenótipos Rh e sua frequência em diferentes etnias. Modificado ¹⁸

	Fenótipo Deduzido (nomenclatura)	Caucasianos (%)	Africanos (%)	Asiáticos (%)	Cópias dos Antígenos de D
D positivo	$R_1R_1 (R_1r')$	18,5	2	51,8	14500-19300
	$R_2R_2 R_2r''$	2,3	0,2	4,4	15800-33300
	$R_1r (R_1R_0; R_0r')$	34,9	21	8,5	9900-14600
	$R_2r (R_2R_0; R_0r'')$	11,8	18,6	2,5	14000-16000
	$R_0r (R_0R_0)$	2,1	45,8	0,3	12000-20000
	$R_2R_z (R_zr_y)$	0,01	Raro	Raro	-
	$R_1R_z (R_zr'; R_1r_y)$	0,2	Raro	1,4	-
	$R_2R_z (R_zr''; R_2r_y)$	0,1	Raro	0,4	-
	$R_1R_2 (R_1r''; R_2r'; R_zr; R_0R_z; R_0r_y)$	13,3	4	30	23000-36000
D negativo	$r'r$	0,8	Raro	0,1	-
	$r'r'$	Raro	Raro	0,1	-
	$r''r$	0,9	Raro	Raro	-
	$r''r''$	Raro	Raro	Raro	-
	rr	15,1	6,8	0,1	-
	$r'r'' (r_yr)$	0,05	Raro	Raro	-
	$r'r_y; r''r_y; r_yr_y$	Raro	Raro	Raro	-
	$r'S_I$	0	1-2	0	-
Null	Rh_{null}	-	-	-	-
Incomum	Rh_{mod} ; muitas variantes	-	-	-	-

A homologia entre os genes *RHD* e *RHCE* corresponde a 98%. Estes genes estão localizados no braço curto do cromossomo 1p36.13-34.3 e organizados em 10 éxons dentro de uma sequência genômica de aproximadamente 60kb (Figura 3).^{42,43}

Figura 3 - Proteína Rh na membrana eritrocitária e sua organização em 10 éxons ⁴⁴

Os antígenos Rh são polipeptídeos transmembranares codificados pelos genes *RHD* e *RHCE*. Enquanto o gene *RHD* codifica o antígeno RhD, o gene *RHCE* codifica os antígenos RhC/Rhc e RhE/Rhe.⁴⁵

Os produtos genéticos de *RHD* e *RHCE* são notavelmente similares, porque ambos codificam para proteínas compostas por 417 aminoácidos que atravessam a membrana celular 12 vezes, sendo 7 intracelulares. As porções carboxi-terminal e amino-terminal estão localizadas na face intracelular (Figura 4).⁴⁶

Os produtos genéticos de *RHCE*, *RHCE*, *RHce*, *RHcE* são ainda mais similares. Os antígenos RhC e Rhc diferem entre si em quatro posições de aminoácidos, enquanto um aminoácido distingue os antígenos RhE e Rhe. Somente pequenas alças de proteínas Rh estão expostas na superfície da hemácia e conferem os pré-requisitos conformacionais para as diferenças sorológicas observadas em casos de expressão fraca de antígenos do sistema Rh.⁴⁷

Figura 4 - Estrutura da proteína Rh na membrana eritrocitária. Cada aminoácido é representado por um círculo e os círculos em amarelo representam os aminoácidos que diferem entre a proteína RhD e a RhCE⁴⁸

A estrutura molecular do *lôcus RH* foi estabelecida no ano de 2000 por Wagner e Flegel, relatando a posição dos dois genes *RHD* e *RHCE*, os quais possuem orientações opostas e encontram-se separados por 30.000 pb (Figura 5).¹

Figura 5 - Representação dos dois genes com 97,8% de homologia¹

O gene *RHD* está flanqueado por dois segmentos de DNA denominados caixa *Rhesus*, tendo um comprimento de aproximadamente 9.000 pb. Esta região contém a deleção do gene *RHD*, estando presente na maioria dos indivíduos caucasianos RhD negativo. (Figura 6).

Figura 6 - Modelo do locus *RH* - Duplicação do gene *RH* e deleção. Na forma ancestral (deduzido do locus *RH* de camundongo) um único gene *RH* tem proximidade com o gene *TMEM50* e dois outros genes, *P29* (P) e *NPD014* (N), estão localizados acima do gene *TMEM50*. Com o evento da duplicação, há inversão do gene *RH*, que ocorre entre os genes *N* e *TMEM50*. No ponto de inserção do gene *RHD*, o segmento de DNA é duplicado, levando a formação da caixa *Rhesus* que flanqueia o gene *RHD*. A deleção do gene *RHD* leva ao aparecimento de caixa *Rhesus* híbrida e o locus *RH* claramente lembra o status ancestral antes de ocorrer a duplicação. Modificado ¹

A posição dos genes *RHD* e *RHCE* favorece a formação de alelos híbridos por conversão gênica. A conversão gênica em *cis* ocorre devido à extrema proximidade entre *RHD* e *RHCE*, originando genes híbridos que contém éxons e regiões intrônicas de *RHD* em *RHCE*, de forma recíproca, levando à formação de variantes dos antígenos RhD e RhCE (Figura 7).

Figura 7 - Modelo do *locus RH*. A) Os dois genes *RH* possuem orientações opostas. B) A conversão gênica em *cis* pode ser favorecida pela estrutura *hairpin*. C) Como resultado da conversão gênica, parte de um gene *RH* é substituído pelo segmento correspondente do outro gene. D) Se a transcrição continua com o molde errado através do *TMEM50*, é possível a correção deste molde quando ele entra no segundo gene *RH*. E) O resultado de múltiplas conversões gênicas leva a haplótipos com dois alelos híbridos. Modificado ¹

O sistema Rh é complexo devido à existência de antígenos parciais e fracos. As alterações nos genes *RHD* e *RHCE* podem levar a mudanças nos nucleotídeos, ou rearranjos gênicos, que podem codificar proteínas variantes com alterações qualitativas (antígenos parciais) ou quantitativas (antígenos fracos) dos antígenos. As alterações moleculares subjacentes às variantes proteicas de Rh são mudanças de nucleotídeos por mutações pontuais, deleções e inserções.⁴⁹

A expressão alterada do antígeno RhD não é incomum. O fenótipo RhD fraco se deve, geralmente, a mutações únicas de aminoácidos e afetam a quantidade de antígeno RhD na membrana eritrocitária. Os fenótipos RhD parciais podem ser causados por trocas únicas de aminoácidos, ou pela presença de alelos híbridos D-CE-D. A distinção entre os fenótipos RhD fraco e RhD parcial é de grande importância clínica, porque os indivíduos com fenótipo RhD parcial podem desenvolver anti-D após exposição a eritrócitos RhD+.

reagentes sorológicos rotineiros não conseguem distinguir entre estes fenótipos, sendo a genotipagem a estratégia utilizada para distinguir entre RhD fraco e RhD parcial.⁵⁰

3.4.1 Gene *RHAG*

O *RHAG* é um terceiro gene ancestral, localizado no cromossomo 6 em 6p11 – p21.1, que codifica a glicoproteína associada ao *RH* (RhAG) de peso molecular de 50kD, essencial para a expressão dos antígenos Rh. Como já dito anteriormente, enquanto os genes *RHD* e *RHCE* são altamente homólogos (97,8%), o gene *RHAG* possui 40% de homologia com eles.^{18,51}

A conformação das proteínas RhD e RhCE, assim como da glicoproteína RhAG, é essencial para a expressão dos antígenos Rh, ou seja, os antígenos Rh somente são expressos quando RhAG está presente. Existe a previsão de que o complexo nuclear seja um tetrâmero de duas moléculas RhAG e duas moléculas RhD, ou RhCE, estabilizadas pelas associações dos domínios N e C terminal.⁵¹

As proteínas Rh30 e RhAG possuem 36% de homologia na sequência genômica e 50% de identidade nas 12 hélices transmembranares. Isso ocorre devido ao fato de que ambas são originadas a partir de um gene ancestral comum.⁴⁸ As proteínas RhAG e Rh30 compartilham homologia com a família das proteínas transportadoras de amônia e acredita-se que a família das proteínas Rh faça parte deste transporte. No entanto, até o presente momento, na literatura há poucos relatos sobre ser essa a única função da proteína Rh.⁵²

3.4.2 Gene *RHD*

De um modo geral, o antígeno RhD pode ser considerado um mosaico composto por 37 epítomos dos quais ao menos nove (epD1-epD9) foram determinados por anticorpos monoclonais diferentes.⁵³ Em alguns casos,

indivíduos RhD positivo podem chegar a desenvolver aloanticorpos anti-D que são dirigidos contra um, ou mais epítomos ausentes, desta forma definindo, as categorias do antígeno RhD parcial (DII, DIII, DIV, DV, DVI, DVII, DFR, DBT, R_o^{Har}), diferenciando-as umas das outras em função da presença ou ausência, de um ou mais epítomos.⁵⁴

3.4.2.1 RhD fraco

O fenótipo RhD fraco é um tipo de variante Rh que foi descrito pela primeira vez em 1946 e resulta de polimorfismos de nucleotídeo único em diferentes éxons no gene *RHD*, codificando alterações de aminoácidos nos segmentos transmembranares ou dentro dos domínios da membrana citoplasmática da proteína (Figura 8).⁵⁵ Esses fenótipos expressam quantidade reduzida de antígeno RhD.⁵⁵

Figura 8 - Ilustração da estrutura proteica RhD fraco na membrana eritrocitária

48

A fraca expressão do antígeno RhD na membrana da hemácia, em geral, não justifica a transfusão de unidades RhD negativo, a não ser que haja coexistência de fenótipo parcial.

Sorologicamente, um fenótipo RhD fraco é definido quando a reatividade dos eritrócitos resultam em baixa, ou nenhuma, reatividade ($\leq 2+$ de intensidade de aglutinação) nos testes sorológicos com anti-D em hemaglutinação direta, porém aglutinando de forma moderada ou até mesmo com forte reatividade, quando utilizada com a antiglobulina humana (AGH).⁵⁶

Recentemente, em 2015, Sandler e colaboradores recomendaram a genotipagem *RHD* para pacientes que possuam um fenótipo RhD fraco detectado pela metodologia sorológica. Sendo assim, aqueles indivíduos que estiverem molecularmente associados a genótipos RhD fraco do tipo 1, 2 ou 3, poderiam ser transfundidos com unidades RhD positivo com segurança, visto que estes fenótipos RhD fraco não estão associados a fenótipo parcial (Figura 9).⁵⁶

Figura 9 - Diagrama de fluxo para gerenciamento dos resultados dos testes transfusionais de um fenótipo sorológico RhD fraco. Caso a tipagem sorológica RhD obtiver resultado RhD-negativo, este deve ser gerenciado como RhD-negativo e se caso positivo, o indivíduo deve ser gerenciado como RhD positivo. Se o resultado for de um fenótipo sorológico RhD fraco, encaminha-se para genotipagem. Caso, RhD fraco do tipo 1, 2 ou 3 não for detectado, este será gerenciado com RhD negativo, caso RhD fraco tipo 1, 2 ou 3 for detectado, este

deverá ser gerenciado com segurança como RhD positivo. Adaptado
57

3.4.2.2 RhD parcial

As alterações de aminoácidos localizadas na porção da proteína fora da membrana podem justificar o aparecimento de antígenos parciais, conforme representado na Figura 10.

Figura 10 - Representação do RhD parcial na membrana eritrocitária ⁴⁸

Muitos fenótipos RhD parcial são identificados como RhD positivo por teste de aglutinação direta e esses indivíduos somente terão identificação assertiva de presença de antígenos parciais após a formação de anticorpo anti-D, estimulado por transfusão ou gravidez.

A genotipagem *RHD* é dificultada por fatores como o tamanho do gene, a presença de rearranjos com *RHCE* e o elevado número de mutações por nucleotídeo único, *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs), que são encontradas em variantes de diferentes etnias.

Os genes *RHD* e *RHCE* são altamente homólogos entre si, ocorrendo trocas de DNA durante o processo de *crossing over* na meiose e

gerando genes híbridos que codificam as variantes dos genes *RHD* e *RHCE* (Tabela 3).⁴⁶ Nesse contexto, indivíduos com fenótipo RhD parcial perdem a expressão de epítomos RhD, desenvolvendo anti-D ao receber unidades eritrocitárias RhD positivo.¹

Tabela 3 - Relação de ocorrência da origem das principais variantes RhD parciais¹⁸

Variantes RhD parciais	
Origem da Ocorrência	Variantes
Mutações missenses no gene <i>RHD</i>	DII, DIIIa, DIVa, DVII, DMH, DNU, DHR, DHMi, DFW, DAR e DAU
Formação de genes híbridos	DIIIb, DIIIc, DIVb, Dva, DVI, DFR, DBT, R _o ^{Har} e DCS

As variantes mais predominantemente expressas em indivíduos de origem africana são DIII, DAR e DAU. Estas variantes não são passíveis de caracterização sorológica devido à inexistência de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer seus epítomos específicos.⁵⁸

3.4.2.3 RhDel

O fenótipo RhDel é considerado fraco, podendo ser detectado apenas pela técnica de adsorção e eluição. Os indivíduos com fenótipo RhDel são tipados rotineiramente como RhD negativo e são encontrados frequentemente na Ásia (Figura 11).⁴⁸

Figura 11 - Ilustração da estrutura proteica RhDel na membrana eritrocitária ⁴⁸

Na atualidade, já foram identificados mais de 25 alelos *RH*DEL* distintos, sendo que todos possuem relação com a existência de alterações moleculares que de alguma maneira afetam a inserção da proteína RhD no interior da membrana eritrocitária, tendo ainda a presença de antígenos RhC ou RhE. Ao realizar a análise molecular das variantes de RhDel, foi demonstrado que estas são decorrentes principalmente das mutações de ponto, da mutação de sítio de *splicing*, ou da deleção do éxon 9. Os distintos alelos *RH*DEL* se encontram associados à expressão completa, ou parcial do antígeno D, estimulando o desenvolvimento de anti-D em pacientes RhD negativo, nas situações que envolvem transfusão de unidades provenientes de doadores de sangue que são portadores do fenótipo Del.⁵⁹

3.4.2.4 RhD negativo

É importante destacar que a ausência funcional da proteína RhD, ou a existência de uma proteína RhD modificada e que não expressa o antígeno D, são os fatores responsáveis pela geração do fenótipo RhD negativo.⁶⁰ O principal mecanismo que justifica fenótipo RhD negativo em caucasianos é a

deleção do gene *RHD*, resultante de um *crossing over* desigual ocorrido na caixa *Rhesus* levando à formação de caixa *Rhesus* híbrida.⁶⁰

As inserções e deleções que geram alterações em sequências de aminoácidos, assim como as mutações *non sense*, que levam à presença de *códon* de terminação prematura (*stop códon*), são outros mecanismos que podem ser responsáveis pela aparição do fenótipo RhD negativo.^{61,62}

Até o presente momento, há três mecanismos associados ao fenótipo RhD negativo (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação dos mecanismos genéticos associados com o fenótipo RhD negativo

Mecanismo Genético	Origem Étnica Predominante
Deleção do gene <i>RHD</i>	Caucasianos
Presença do gene <i>RHD*Ψ</i>	Africanos
Gene híbrido <i>RHD*D-CE(3-7)-D</i>	Africanos

A inserção de 37 pb entre a região do íntron 3 e o éxon 4 do gene *RHD*, gerando um *códon* de terminação da tradução na posição 210, é conhecida como pseudogene (*RHD*Ψ*).⁶³ Essa variação genética leva à não expressão de RhD na membrana eritrocitária (Figura 12).^{48,63}

Figura 12 - Representação do gene *RHD*Ψ*. Caracterizada pela Inserção dos 37pb na terminação do íntron 3 e éxon 4 ⁴⁸

O gene *RHD* híbrido *RHD*D-CE(3-7)-D* apresenta os éxons 4 a 8 de *RHCE* e está associado ao fenótipo V-VS+. Este gene codifica uma proteína alterada com ausência do antígeno RhD e à fraca expressão dos antígenos RhC e Rhe (Figura 13).^{48,63}

Figura 13 - Modelo do gene híbrido *RHD*D-CE(3-7)-D*⁴⁸

3.4.3 Gene *RHCE*

O polimorfismo RhE/Rhe resulta da substituição de um único aminoácido no éxon 5, com a substituição de uma prolina (E) na posição 226 para uma alanina (e).^{45,64} Já o polipeptídeo Rh que carrega os antígenos RhC e Rhc diferem um do outro pela substituição de quatro aminoácidos em uma cadeia de 417 aminoácidos, muito embora apenas a substituição de uma serina (C) na posição 103 para uma prolina (c) pareça ser crítica para o polimorfismo RhC/Rhc.⁶⁴ Por outro lado, o polipeptídeo codificado pelo gene *RHD* difere daquele codificado pelo *RHCE* em 34 a 37 aminoácidos, dependendo do alelo *RHCE* considerado. Apenas um número limitado de diferenças ocorre na parte externa; tais diferenças são restritas a alça 3 codificada pelo éxon 4, a alça 4 codificada pelo éxon 5 e a alça 6 codificada pelo éxon 7. Essas diferenças podem talvez explicar, em parte, a imunogenicidade do antígeno RhD.⁶⁵

3.4.3.1 Base molecular dos antígenos Rhc, RhE e RhG

Esses antígenos (Rhc, RhE e RhG) estão fortemente correlacionados com a presença de um aminoácido específico dentro de uma proteína Rh (Tabela 5).

Tabela 5 - Determinação dos antígenos Rhc, RhE e RhG na proteína Rh

Determinação dos Antígenos c, G e E na Proteína Rh		
Antígeno	Aminoácido	Posição
c	Prolina	103
G	Serina	103
E	Prolina	226

Uma serina na posição 103 está presente tanto em RhD quanto no alelo C de RhCE, por conseguinte, os haplótipos C+ e D+ geralmente também expressam o antígeno G.^{45,66}

3.4.3.2 Base molecular dos antígenos Rhe e RhC

As bases moleculares dos antígenos Rhe e RhC são um pouco mais complicadas, porque os aminoácidos que caracterizam estes alelos de *RHCE* também estão presentes em *RHD*. O antígeno e é associado com a presença de uma alanina na posição 226, que também é encontrada em RhD, o antígeno é somente expresso se a sua alanina usual ocorre em RhCE.⁶⁴

Os alelos que expressam o antígeno RhC decorrem da presença do éxon 2 de *RHD* em *RHCE*.⁶⁶ Uma pequena duplicação no ponto de inserção foi encontrada como sendo o polimorfismo molecular mais viável para prever este mecanismo de expressão do antígeno RhC.^{67,68}

Neste tipo de alelo *RH*C* positivo, uma cisteína deve estar presente na posição 16 codificado pelo éxon 1, sendo necessária para a expressão do

antígeno RhC⁶⁴. Um mecanismo diferente leva à expressão de antígeno RhC parcial como parte do haplótipo (C)ceS. Este antígeno é transportado por uma proteína RhD variante codificada por um alelo híbrido *RHD*D-CE(4-7)-D*, com várias substituições adicionais, incluindo uma treonina *RHCE-like* na posição 152⁶⁴. O haplótipo (C)ceS codifica tanto RhC quanto Rhc, porque o alelo *RHCE*ce*, que está em *cis* com *RHD*D-CE(4-7)-D*, codifica o antígeno Rhc.^{69,70}

3.5 Variantes Rh

A frequência de variantes Rh na população falciforme é alta, podendo acarretar desenvolvimento de anticorpos direcionados a antígenos do sistema Rh, independente das transfusões serem fenótipo compatível.¹⁸

Os mecanismos de conversão gênica promovem rearranjos genéticos de forma a permitir a formação de "*hair pin*" e intercâmbio entre os genes. Um grande número de variantes de Rh e antígenos de baixa incidência surgem a partir deste mecanismo. Sendo assim, pacientes com antígenos parciais e/ou com ausência de antígenos de alta prevalência, tais como hr^B e hr^S, podem desenvolver aloanticorpos (Figuras 14 e 15).¹²

Figura 14 - Representação do perfil de epítomos de antígenos D parciais. Cada caixa na cor branca representa 1 de 10 éxons do gene *RHD* não codificados. Linhas cinzas verticais indicam posição no éxon que codifica as substituições de aminoácidos na proteína. O antígeno identificado com asterisco (*RHD* Fraco Tipo 4.2.2*) difere de DAR pelas mutações silenciosas 744C>T e 957G>A. As caixas na cor lilás representam éxons que codificam uma região traduzida. Adaptado ¹⁸

RHCE / Antígenos associados		Número de Probandos	Anticorpo formado	
Baixo		Outros/CE
D ^{HAR} / FPTT Rh33	c(e) G-	Muitos	D
r ^G / JAHK	(C)(e)(G)	Vários
Ř ^N / Rh32 DAK	(C)(e) Rh46-	Muitos	Rh46
Ř ^N / Rh32 DAK	(C)(e) Rh46-	Muitos	Rh46
ceBP (e ^u)	e+/-	Um
Ce	e+/-	Muitos/poucos
ce ^S / V VS	e+/-	Muitos
ce ^S / V VS	e+/-	Muitos
(C)ce ^S / V- VS	(e) Rh34-	Muitos	Rh34, hr ^B (D)
ceAR / (V) VS-	e+/- Rh18- hr ^S -	Muitos	Rh18 (D,C)
ce ^S (340) / (V/VS)	(hr ^S)	Poucos	E, Ce
ce ^S (697)	e+/-	Poucos
ce ^S (748) / (V/VS)	e+/-	Poucos
ceMO	e+/- hr ^S -	Poucos
ceEK	e+/- Rh18- hr ^S -	Poucos	Rh18
ceBI	e+/- Rh18- hr ^S -	Poucos
cEMI	E-e- hr ^S -	Um
CeVA / Rh33 FPTT	(C)(e)	Vários
CeMA	(C)(e)	Vários
DCE(R ₂)	(C)	Muitos	

Figura 15 - Haplótipos *RHCE* e informações associadas. Caixas na cor branca mostram éxons codificados por *RHCE*; caixas na cor preta mostram éxons codificados por *RHD*; caixas na cor azul retratam éxons não expressos. Substituições de aminoácidos, ao invés de substituições de nucleotídeos, são mostradas sob os éxons. Demarcado entre parênteses denota expressão reduzida de antígeno. A simbologia (+/-) significa: positivo com alguns anticorpos (podendo ser fraco) e negativo com outros anticorpos. Adaptado ¹⁸

Esses mecanismos, no entanto, não são os maiores responsáveis pelo grande número de variantes formadas na população falciforme. A mutação de ponto, que é definida como sendo a troca de um nucleotídeo, é o mecanismo mais frequente para formação de uma variante de Rh de baixa expressão devido à alteração que pode ser gerada na estrutura da proteína.

Exemplos clássicos desse mecanismo na formação de variantes podem ser exemplificados nos alelos *RHD*DAU0.01* e *RHCE*ce48C* (Figura 16).^{18,48}

Figura 16 - Representação de exemplos de mutação de ponto nos genes *RHD* e *RHCE*¹⁸

Quando uma nova variante tem potencial para deflagrar desenvolvimento de anticorpos, ela é classificada do ponto de vista imunológico como parcial.⁷¹ Há consenso para classificar a variante com base na localização da substituição, sendo determinado, pelo índice de base *Rhesus*, que a densidade do antígeno ajude a definir sua classificação.⁷² Esquemáticamente, quando localizada na área externa da membrana, a variante é considerada imunogênica, e quando localizada na região intramembranar no domínio intracelular, a variante é considerada como fraca.⁷²

Contudo, alguns portadores dessas variantes que são classificadas como fraca, têm se imunizado. É o caso dos fenótipos fracos *RHD tipo 11*, *RHD tipo 15*, e *RHD fraco tipo 4.2*, que são encontradas em pacientes com DF.^{73,74}

A questão principal, em caso de ocorrência de um anticorpo Rh não esperado, é saber se este possui significância clínica. Publicações demonstram que, em algumas situações, há o envolvimento de antígenos variantes na causa de morte pós transfusional, encontrados principalmente, em pacientes com a ausência dos antígenos hr^S e Rh46.⁷⁴ Em alguns casos graves de reações transfusionais tardias em pacientes com DF podem ser identificados

autoanticorpos eritrocitários, sem que isso implique que estes participem fisiopatologicamente do processo.⁷⁵

Quando um paciente com anemia falciforme apresentando anticorpos Rh não esperados tipo anti-e é investigado molecularmente, a determinação se o fenótipo final é variante pode ser complicada quando o paciente apresenta mutações sem heterozigose. Nesses casos, não há evidências em literatura que atestem que o anticorpo apresentado é benigno ou necessariamente auto-direcionado. Não há como saber se nesses pacientes irá ocorrer aloimunização a anticorpos com significância clínica, caso os epítopos expressos codificados por um alelo compensem os epítopos ausentes do antígeno codificado pela variação da outra, a ocorrência será ratificada.⁷⁶

Em uma análise retrospectiva realizada em 2013 por Westhoff, com pacientes com DF transfundidos com eritrócitos que foram prospectivamente fenotipados provenientes, principalmente, de doadores afro-americanos, após análise molecular com *BeadChip* (*BioArray, Warren, NJ*) para determinar a diversidade alélica desses pacientes, 182 dos que foram transfundidos estavam associados a genótipos específicos ao sistema Rh. Os pacientes eram homozigóticos, heterozigóticos, ou compostos heterozigóticos para os alelos *RH* variantes, sendo registrado um índice de 73% com a presença de pelo menos um alelo *RH* variante (Figura 17).⁷⁷

<i>RHD</i>	# Alelos	Frequência
	D deletado	52 0,115
	<i>RHD*ψ</i>	12 0,027
	DIIIa-CE(4-7)-D	21 0,046
	<i>RHD</i> convencional	235 0,520
	DAU0	74 0,164
	DAU3	8 0,018
	DAU4	2 0,004
	DAU5	9 0,020
	DIIIa	5 0,011
	DIVa	8 0,018
	DIVa-3	1 0,002
	D fraco parcial 4.0	22 0,049
	DFR	1 0,002
	DAR	1 0,002
	D(48C)	1 0,002

Figura 17 - Diversidade alélica *RHD* e *RHCE* em pacientes com DF. Cada caixa na cor branca representa 1 de 10 éxons nos genes *RH*. As caixas de cor preta representam troca exônica entre *RHD* e *RHCE*. Linhas cinzas verticais indicam posição no éxon que codifica as substituições de aminoácidos na proteína. Linhas tracejadas indicam deleção gênica. Ponta de seta indica duplicação de 37 pb. As caixas na cor azul representam éxons que codificam uma região não traduzida do pseudogene *RHD* inativo. Adaptado ⁷⁷

Anticorpos do tipo anti-e podem ser produzidos por pessoas com epítomos Rhe nas hemácias. Esta situação ocorre com mais frequência em negros do que em caucasianos e se devem a antígenos e parciais. A aloimunização severa de variantes Rhe ocorre em pessoas com ausência de epítomos Rh, e foram definidos com estudos monoclonais anti-e e moleculares (Tabela 6).^{78,79} Há dois anticorpos que podem mimetizar anti-e: anti-hrS e anti-

hrB, ambos secundários à perda de antígenos de alta frequência na membrana eritrocitária por variantes Rh.

Tabela 6 - Reação do anticorpo monoclonal anti-e com eritrócitos expressando haplótipos variantes ¹⁸

Haplótipos	MS16	MS21	MS62/MS63	MS69	MS70
hr ^S - (ceMo)	W	W	0	0	0
hr ^S - (ceAR)	+	+	0	W	+
hr ^S - (ceEK)	+	+	+	+	+
hr ^B - (ce ^S)	+	+	+	+	0
Cys16 (ce)	0	+	W	o	NT
$\bar{R}^N$	W	0	0	W	0

O antígeno hr^S é responsável por um aparente anti-e, possuindo a terminologia RH18 (Hr).⁶⁵ Geralmente não é clinicamente significativo, no entanto, devido aos anticorpos anti-e-*like* serem chamados incorretamente de anti-hr^S, a resposta imune de alguns indivíduos hr^S pode ampliar para o clinicamente anti-Hr significativo (anti-Rh18).⁶⁵

O anti-hr^S reage preferencialmente com haplótipos contendo Rhce e pode ser confundido com anti-ce.⁸⁰ Anticorpos feitos por hr^S não são necessariamente anti-hr^S e, a menos que sejam testados com células raras e variantes, são mais corretamente chamados de anti-e-*like*. Haplótipos *RHcE* não expressam hr^S.⁸⁰

O antígeno hr^B é responsável pela formação do Anti-HrB. As adsorções mostraram duas especificidades: anti-hr^B e um anticorpo que reage com hemácias de todos os fenótipos comuns, que foi chamado anti-Hr^{B1}, possuindo a terminologia RH34.⁸¹

Não há dados disponíveis sobre sua relevância clínica devido à semelhança com o anti-Rh18.⁸¹ Exemplos de anti-Hr^B lembram anti-C em que os eritrócitos RhC positivo possuem reações mais fortes, eritrócitos Rhc

positivo dão reações de força intermediária e células RhDcE/RhDcE (R2R2) originam as reações mais fracas.⁸¹

Alguns indivíduos não possuem o antígeno de alta prevalência hr^B e, em conduta transfusional, unidades de hemácias hr^B selecionadas por testes sorológicos nem sempre são compatíveis com os anticorpos produzidos por esses pacientes.⁸²

Existem diversas técnicas moleculares para se avaliar as variantes de *RHD* e *RHCE*, a dificuldade é que esses genes são muito homólogos, com diferença de 34-37 aa (Figura 18).¹⁵

Figura 18 - Diferenças nucleotídicas entre os genes *RHD* e *RHCE*. Na figura, caixas em negrito representam os éxons. As diferenças de nucleotídeos entre *RHD* e *RHCE*^{*ce} são significativas. A alta homologia entre os éxons 1, 2, 6, 8, 9 e 10 de *RHD* e *RHCE* é importante para destacar e justificar por que os testes baseados em *NGS* projetados para identificação molecular de Rh devem ser adaptados para que os *amplicons* específicos de *RHD* e *RHCE* sejam sequenciados individualmente, ou algoritmos devem ser projetados para a interpretação dos resultados¹⁵

3.6 Estratégias moleculares

Os procedimentos moleculares atualmente empregados na genotipagem de grupos sanguíneos baseiam-se na PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) por hidrólise com enzima de restrição e em PCR alelo específico.⁸³

As técnicas de genotipagem convencionais são bastante eficientes, porém só utilizadas em pequena escala para resolução de casos isolados.⁸³ São muito úteis para a identificação de variantes comuns de Rh, mas não são assertivas na exclusão da presença de alelos variantes, pois mesmo em reações multiplex projetadas para identificar múltiplas variantes RhD não confirmam com precisão a especificidade da variante ou excluem a presença de proteínas variantes em casos com resultado negativo, especialmente considerando a alta frequência de novos alelos *RHD* e *RHCE* entre os pacientes com DF.^{15,84}

A tecnologia de microarranjos (*microarray*) permite a identificação de diversos antígenos em um único procedimento, sendo alternativa para a genotipagem em larga escala, com excelente discriminação alélica e redução no número de procedimentos isolados (execução de um único PCR multiplex).^{83,85}

Em 1977 o inglês *Frederick Sanger* publicou o método de sequenciamento por terminação de cadeia, que se tornou o primeiro método popular e ficou conhecido como sequenciamento de *Sanger*. No ano de 1986 foi apresentado o ABI 370, o primeiro sequenciador automático de DNA, e em 1998 foi lançado o ABI 3700, que foi o primeiro sequenciador de eletroforese capilar. A primeira iniciativa a nível internacional de sequenciamento em larga escala foi o Projeto Genoma Humano, que em 2003 utilizou como técnica principal, exatamente este método.⁸⁶

A utilização da metodologia *Sanger* para o sequenciamento dos genes *RHD* e *RHCE* é indicado para pesquisa de variantes genéticas do

Sistema Rh, porém, os resultados são de difícil interpretação, principalmente em casos de inclusões, deleções e alelos híbridos.⁸⁷

Com o decorrer dos anos e a introdução de novas tecnologias, ficou nítido já em 2006 que, para projetos de utilização em larga escala, o método de sequenciamento de *Sanger* apresentava diversas limitações. Sendo assim, foi iniciada uma busca pela obtenção de técnicas de sequenciamento genético mais rápidas e com menor custo.

Com o surgimento de diversas novas plataformas de sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing – *NGS*), o custo do sequenciamento genético diminuiu drasticamente, tornando-se bem mais acessível aos inúmeros laboratórios de diagnóstico ou de pesquisa, e transformando o *NGS* em uma atividade bastante rotineira, o que por sua vez, impulsionou o ritmo de novas descobertas científicas de modo exponencial.⁸⁸ No entanto, ressaltando a elevada homologia entre os genes *RHD* e *RHCE*, os ensaios moleculares devem ser adaptados de modo que os *amplicons* desses genes sejam sequenciados individualmente para melhor acurácia na interpretação dos resultados.^{89,90}

3.7 Next Generation Sequencing – *NGS*

Com o passar dos anos, o *NGS* passou a ser amplamente utilizado na elaboração de diagnósticos em laboratórios clínicos, deixando de ser utilizado somente em pesquisas de pequeno porte. Atualmente existem diversas plataformas de *NGS* que possuem tecnologia sofisticada. Dentre estas, entretanto, uma se destaca das demais por ter atingido o mais elevado nível de fabricação com alta qualidade em larga escala, trata-se da produção de *chips* de computador.⁹¹ Seguindo nesta linha, a *Ion Torrent* introduziu uma tecnologia capaz de criar *chips* de matriz de sensor metal óxido semicondutor de simetria complementar (*complementary metal oxide semiconductor* – *CMOS*) que possuem a capacidade de armazenar em seu interior, toda a coleta de dados necessária à realização da química de sequenciamento.^{92,93}

É importante salientar que os *chips* de sequenciamento atuais são considerados os primeiros *arrays* de biossensores comerciais que podem ser utilizados para qualquer finalidade, incorporados como dispositivo *CMOS*. De modo mais genérico, podemos afirmar que se trata de uma prática de unificação de todas as indústrias que desenvolvem trabalhos correlatos em um único espaço comum, adotando-se um roteiro tecnológico unificado e possibilitando o desenvolvimento de melhorias econômicas sustentáveis de longo prazo.^{92,93}

Os sequenciadores de DNA são equipamentos que desenvolvem um arquivo eletrônico a partir de amostras de DNA compostas por símbolos (A) Adenina, (C) Citosina, (G) Guanina, (T) Timina que representam a sequência de bases nitrogenadas contidas nas amostras.

O *NGS* pode ler simultaneamente bilhões de fragmentos, pois seu método está baseado no processamento de fragmentos de DNA em paralelo. Concomitantemente ao crescimento da geração de dados com o auxílio do *NGS*, também ocorreu o desenvolvimento de diversas ferramentas computacionais, devido à necessidade de analisar os dados obtidos e aumentar cada vez mais a interação entre a informática e a biologia molecular. A junção de diversos processos computacionais levou ao aparecimento das *pipelines*, que são programas de encadeamento de dados específicos para o *NGS* e que se tornou fundamental para melhorar, não somente o tipo, mas também a qualidade final da análise.⁹⁴

O sequenciamento de exoma completo, e o sequenciamento alvo, são as principais aplicações do *NGS* no que diz respeito aos cuidados com a saúde humana e encontrar alterações em regiões codificantes onde se possa atribuir causalidade direta a um fenótipo que se está observando é a principal finalidade de ambas.^{95,96} No entanto, é necessário desenvolver novas estratégias que possibilitem uma maior objetividade e rapidez na interpretação e também no retorno dos resultados obtidos, assim como, propiciem um melhor desempenho no que diz respeito à cobertura de sequenciamento dos genes de interesse.⁹⁵

Embora todas as tecnologias de sequenciamento apresentem diferentes estratégias, podemos identificar características comuns a todos os sequenciadores, sendo elas: o preparo da amostra, a amplificação da biblioteca e a execução do sequenciamento. O instrumento que realiza uma sequência de reações químicas que geram sinais para serem detectados é o sequenciador e, estas reações, determinam a sequência de bases do *amplicon* que vem sendo analisado.⁹⁷

Uma grande quantidade de sequenciadores utiliza uma enzima DNA polimerase para gerar a fita complementar ao *template*, assim como, bases marcadas por fluoróforos e também câmeras de detecção. No entanto o *Ion Torrent*, que é a metodologia utilizada neste estudo, é diferente, pois a detecção da sequência de DNA é feita de forma direta e decorrente da reação de polimerização gerada no processo.⁹⁸

3.7.1 Plataforma *Ion Torrent PGM*TM

No fim de 2010, o *Ion Torrent* lançou a plataforma *PGM*. Neste é utilizada a tecnologia de sequenciamento de semicondutores, tendo sido apresentado como um sequenciador de bancada (*benchtop*) direcionado para a realização do sequenciamento de pequenos genomas ou grupos de genes. Esta tecnologia foi a primeira a apresentar uma química de sequenciamento totalmente independente de moléculas modificadas, sem a necessidade de utilizar nucleotídeos fluorescentes e dispensando o uso de aparatos ópticos, o que propicia a diminuição do preço, tanto do equipamento, quanto de seus reagentes.

Para a efetivação do sequenciamento, é necessária a realização de três processos: construção da biblioteca, preparo do *template* e preenchimento do chip condutor. Ao final destes processos são geradas sequências que, posteriormente, serão analisadas por um software de análise de dados. O tempo de sequenciamento pode chegar a até 5 horas, no entanto ao término, mais de um bilhão de pares de bases (>1Gb) podem ser lidos, o que permite

que esta plataforma seja classificada como uma técnica extremamente eficaz, levando-se em consideração o consumo de tempo na geração de dados brutos.

Devido às condições genéticas que estão relacionadas à homologia entre os genes *RHD* e *RHCE*, a técnica de NGS é extremamente eficaz no que concerne a investigação de polimorfismos associados aos fenótipos Rh variantes.⁹⁹

3.7.2 Tecnologia do *chip Ion Torrent*

A tecnologia do chip Ion Torrent apresenta como conceito básico a realização do sequenciamento com detecção eletroquímica de síntese e também cada reação acoplada ao próprio sensor. Estas reações são organizadas em um *chip CMOS* por intermédio de uma matriz de sensores paralelos.^{92,93}

A incorporação da polimerase, que é o subproduto químico fundamental da síntese apresentada, gera de forma natural um íon H^+ , que ao ser liberado do local de incorporação de 3'OH, acaba por alterar o meio.⁹⁸ Desta forma, utilizar um sensor que seja capaz de detectar H^+ é suficiente para identificar de forma direta a incorporação. O modo de detecção baseado em transistores de H^+ tornou-se uma tecnologia muito bem estabelecida, sendo o componente funcional dos medidores de pH de estado sólido mais utilizado.

O paralelismo, tanto da reação quanto da detecção, é um elemento de suma importância e que diferencia os sequenciadores da nova geração. Esse paralelismo, no *Ion Torrent*, é alcançado por intermédio do uso de *chips* de silício, constituídos de milhões de poços microscópicos que possibilitam a inserção de apenas uma esfera com fragmentos de DNA por poço. Nestes *chips*, se encontram ainda os transistores, que realizam a detecção da alteração do potencial hidrogeniônico (pH) e que é feita pelo pH-gâmero existente em cada poço.¹⁰⁰

Ao se obter uma biblioteca de fragmentos, torna-se possível detectar os *SNPs*, assim como pequenas inserções ou deleções, chamados de *indels*, e

que estão presentes nos *amplicons* analisados. Do mesmo modo, também é possível detectar algumas variações estruturais, como por exemplo, a de grandes *indels* ou inversões.¹⁰¹

Para conseguir um paralelismo maciço, uma matriz retangular com milhões desses sensores é formada em um *chip*, usando processos padrão de CMOS (Figura 19).

Figura 19 - Principais elementos de design de *chips*, fabricação e arquitetura. Os *chips* são projetados usando ferramentas padrão de projeto CMOS. Os *chips* são cortados em cubos e embalados, incluindo a célula de fluxo externa, usando processos padrão de embalagem de *chips*, resultando no chip mostrado, um chip Ion Torrent 314. Os principais blocos funcionais do *chip* iônico são: a) *chip* com registradores de seleção de linha para endereçar sequencialmente cada linha e matriz de sensores, mostrando o fechamento das placas flutuantes de metal individuais, interface de sensor e circuito de leitura, contendo circuitos de polarização, para definir a corrente de operação; b) receptor de coluna para definir a tensão de operação, amostra e espera, assim como um mux para capturar a

tensão de saída e registro de seleção de coluna para endereçar sequencialmente cada coluna¹⁰²

3.7.3 Pipeline de análise

A plataforma de sequenciamento é acompanhada por soluções de processamento e análise de dados de ponta a ponta, desenvolvidas para os elementos exclusivos desse processo. O processo geral de análise de dados até o ponto de chamada de variantes é descrito a seguir (Figura 20).

Figura 20 - O *pipeline* de informática. Esta figura mostra os principais elementos do *pipeline* de informática primária, que consistem em: (A) aquisição de dados, transferência e redução de dados de largura de banda muito alta; (B) processamento de sinal, que é necessário para remover variação de pH de fundo e ajustar o modelo de incorporação aos dados; (C) *base calling*, que requer correção de fase e normalização dos sinais de incorporação, e, no caso onde um genoma de referência está disponível; (D) alinhamento das leituras à referência, através de um processo de alinhamento otimizado e local indexado para acomodar variantes e erros de sequenciamento, seguido por chamada de variantes com base na cobertura agregada fornecida pelas leituras em cada *lôcus*¹⁰³

O *pipeline* de análise primária consiste em sequência de *flows* que passam por processamento de sinal para o modo computacional, seguido por *base calling*, o qual transforma o dado elétrico em dado bruto (sequências).¹⁰³ Todo este processo é realizado em um *hardware* de computador personalizado, que é otimizado para atender a largura de banda e as cargas computacionais, resultando em arquivos de dados da análise primária, que são os arquivos DAT, WELLS e SFF.¹⁰³

Durante a análise secundária e terciária, todos os dados *basecall* são encapsulados em dois formatos de arquivo padrão fundamentais que permitem a análise *downstream*, o formato *Small Form Factor (SFF)*, e o formato *Business Activity Monitoring (BAM)*, que são bastante utilizados para os dados de NGS.¹⁰⁴ Nos dois casos, as informações relevantes e de nível mais elevado, as chamadas de base, os índices de qualidade, os sinais de fluxo normalizados subjacentes e a ordem de fluxo, são inseridas com o intuito de fornecer informações completas para uma posterior análise.^{103,104}

Como forma de análise adicional, principalmente no que diz respeito ao domínio das anotações e interpretações do genoma humano, foi desenvolvido o *software Ion Reporter™* que é apresentado e fornecido como sendo solução para um *software* comercial que possibilita o sequenciamento do genoma humano, isto inclui também o alinhamento, as chamadas variantes, as anotações e as diferentes análises adicionais, assim como, as ferramentas de suporte interpretativo que são relevantes para viabilizar o estudo de doenças genéticas humanas, no que diz respeito ao sequenciamento.¹⁰⁵

4 Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Desenho do estudo

Estudo de corte transversal, conduzido de acordo com a resolução 466 de 2012, Conselho Nacional de Saúde.

4.1.2 Local

Instituto de Medicina Tropical (IMT), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e Laboratório de Imunohematologia avançada da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (FPS-HSP)

4.1.3 Amostra

Foram selecionados 35 pacientes com DF atendidos pela FPS-HSP e que apresentavam anticorpos Rh inesperados, ou seja, tinham a presença de determinado anticorpo direcionado contra antígeno Rh para o qual a fenotipagem resultava positiva. Estes indivíduos foram convidados a realizar a genotipagem, na busca da identificação das possíveis variantes dos genes *RHD* e *RHCE*. As amostras de sangue anti-coaguladas foram coletadas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid* - *EDTA*) 5mL, composto orgânico que age como agente quelante que sequestra íons metálicos agregando-os em sua estrutura química. Todos os participantes somente foram incluídos após consentimento no Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), ANEXO A, aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da FMUSP (Protocolo

de Pesquisa nº 2014-259 – ANEXO B) e aprovação pela Plataforma Brasil (62572016.7.0000.0065).

4.1.3.1 Seleção das amostras

No período de maio de 2014 a maio de 2016, foram testadas na rotina sorológica e molecular as amostras de aproximadamente 200 pacientes com diagnóstico de DF. Foram selecionadas 35 amostras de pacientes atendidos na Agência Transfusional com anticorpos Rh inesperados. Os pacientes selecionados apresentavam suspeita sorológica de variantes do sistema Rh, ou seja, exibiam aloanticorpos direcionados para o sistema Rh com positividade para os antígenos correspondentes à fenotipagem ou genotipagem convencional.

Os dados referentes ao fenótipo antigênico de hemácias e o desenvolvimento de aloanticorpos, ou autoanticorpos, de hemácias, foram obtidos dos arquivos eletrônicos do banco de sangue.

4.1.4 Critérios de inclusão

Pacientes com DF (HbSS, Hb S/ β^0 talassemia e Hb S/ β^+ talassemia), os quais tivessem suspeita sorológica de variantes do sistema Rh conforme descrito anteriormente.

4.1.5 Critérios de exclusão

Pacientes com dados de cadastro incompletos, sem endereço residencial fixo e pacientes sem suspeita sorológica de variantes do sistema Rh.

4.1.6 Justificativas para a realização do projeto

As variantes do sistema Rh são causa importante de aloimunização eritrocitária em pacientes com DF. A técnica de sequenciamento de nova geração mostra-se promissora para identificação acurada de variantes Rh e pode ser aplicada nesta população de paciente, a fim de melhorar o suporte transfusional.

4.2 Fluxograma do estudo

A síntese do estudo e dos métodos utilizados está representada no fluxograma a seguir (Figura 21).

Figura 21 - Representação esquemática do estudo realizado

4.3 Padronização do ensaio de NGS

Seis amostras de DNA com o genótipo *RHD* variante conhecido foram testadas em paralelo com a estratégia de NGS proposta e a metodologia padrão de sequenciamento tipo *Sanger*. Este sequenciamento foi realizado utilizando *amplicons* e *primers* idênticos ao da metodologia NGS, além do *kit*

ABI BigDye Terminator v3.1 kit, Applied Biosystems. Os testes foram executados em equipamento de sequenciamento automático (*ABI 310, Applied Biosystems*), que consiste em um sistema de eletroforese capilar para a separação dos fragmentos de DNA utilizando *kit* contendo nucleotídeos livres (dNTP's), nucleotídeos marcados com fluorescência (ddNTP's), e a enzima *Taq* polimerase, cujas corridas são feitas em capilares utilizando o polímero POP7 (*Applied Biosystems*).

Esses sequenciadores empregam uma técnica de sequenciamento em ciclos nas reações, que inclui uma técnica de PCR onde apenas o *primer* sentido 5'-3' (*forward*) ou 3'-5' (*reverse*) é utilizado para síntese das fitas. No processo em que o *primer* é ligado à sequência complementar, aos nucleotídeos livres de marcação e aos marcados com fluoróforos, conhecidos como nucleotídeos de terminação, são incorporados de acordo com a fita molde. O sistema de sequenciamento utiliza quatro fluorocromos com diferentes comprimentos de ondas que correspondem às cores azul, vermelho, amarelo e verde. Cada vez que um nucleotídeo de terminação é incorporado, a leitura da fita molde é interrompida, gerando um fragmento de tamanho correspondente ao local onde o nucleotídeo de terminação foi incorporado. Ao final da reação existem fragmentos de diversos tamanhos permitindo a identificação das cadeias resultantes e determinação da sequência de todos os nucleotídeos das duas fitas de DNA para o fragmento de interesse.

Para realização do protocolo de reação de sequenciamento *Sanger*, foi utilizado um *mix* de reagentes inseridos em cada poço da placa de sequenciamento, chegando a 11 µL totais de amostra (Figura 22).

Figura 22 - Descrição dos reagentes utilizados para reação de sequenciamento Sanger

Foi realizado um PCR convencional no equipamento de termociclagem (*Mastercycler®Pro-Eppendorf™, Hamburg, Germain*), a ciclagem utilizada na amplificação dos éxons de *RHD* e *RHCE* está descrita na Figura 23 e os *primers* para sequenciamento desses genes foram os mesmos utilizados na etapa de amplificação de seus éxons, todos em concentração de 50ng/µL.

Figura 23 - Ciclagem utilizada na amplificação dos éxons *RHD* e *RHCE* para protocolo de sequenciamento Sanger

A purificação segue como etapa posterior ao protocolo de sequenciamento, assim como as fases subsequentes de incubação e finalização do processo, que estão devidamente descritas na Figura 24.

Purificação	Incubação
<ul style="list-style-type: none"> • 40µL de etanol a 70% 	<ul style="list-style-type: none"> • 15 minutos à temperatura ambiente, sob proteção de luz
<ul style="list-style-type: none"> • Inserir em cada amostra para remover os dNTPs, ddNTPs, <i>primers</i> e enzimas que não foram incorporados 	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifugar as placas a 4.000rpm por 50 minutos
Finalização do Processo	
<ul style="list-style-type: none"> • Inversão da placa sobre papel absorvente 	
<ul style="list-style-type: none"> • Realizar nova centrifugação, com a placa invertida, a 700rpm por 1 minuto 	
<ul style="list-style-type: none"> • Inserir a placa no termociclador <i>Mastercycler gradient</i> (Perkin-Elmer®, Foster City, CA, USA), a 95°C por 10 minutos, para remover os resíduos de etanol 	
<ul style="list-style-type: none"> • Ressuspender, as amostras na placa, em 10µL de formamida e desnaturar a 95°C por 5 minutos 	
<ul style="list-style-type: none"> • Realizar imersão em gelo por 2 minutos 	

Figura 24 - Descrição dos processos inerentes à purificação e finalização da placa de sequenciamento (*MicroAmp® Fast Optical 96-Well-Applied Biosystems*)

Nesta etapa, foram selecionadas amostras cujos resultados de sequenciamento *Sanger* eram difíceis de interpretar. A análise foi realizada pelo *software Sequencer®*, que compara as sequências de nucleotídeos geradas de cada éxon, com as sequências padrões inseridas do *GenBank®*, e exigiram repetições, com os resultados sendo comparados entre as duas metodologias.

4.4 Extração do DNA

O DNA genômico foi isolado a partir de amostras de sangue EDTA periférico utilizando o *kit PureLink Genomic comercial* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), extraído individualmente da camada leucocitária (*buffy coat*) e de acordo com as instruções do fabricante, conforme descrito na Figura 25.

Descrição do Protocolo de Extração de DNA Genômico
• Inversão da placa sobre papel absorvente
• Adicionar um volume de 20µL de Protease (ou Proteinase K) e 20µL de RNase a 200µL do <i>buffy coat</i> , isolado das amostras sanguíneas dos indivíduos incluídos na pesquisa, utilizando microtubo de 1,5mL
• Agitar por 120 segundos em agitador automático, <i>Vortex</i>
• Adicionar 200µL do tampão de lise, <i>Buffer AL</i>
• Agitar novamente em <i>Vortex</i> por 15 segundos
• Incubar os tubos por 10 minutos a 56°C
• Realizar uma centrifugação rápida
• Adicionar 200µL de etanol absoluto (<i>Merk-Germany</i>) ao microtubo
• Agitar por 15 segundos
• Realizar novamente uma centrifugação rápida
• Transferir as amostras para tubos de 1,5mL com filtro de sílica <i>Invitrogen™</i> (coluna)
• Centrifugar por 1 minuto a 10.000 xg
• Desprezar o filtrado e transferir o tubo contendo filtro (coluna) para um novo microtubo de 1,5mL
• Adicionar 500µL do tampão de lavagem (<i>Buffer AW1</i>)
• Centrifugar as amostras por 1 minuto a 10.000 xg
• Desprezar novamente o filtrado e transferir a coluna para um novo microtubo de 1,5mL estéril
• Adicionar 500µL do segundo tampão de lavagem (<i>Buffer AW2</i>)
• Realizar centrifugação por 3 minutos a 20.000 xg
• Desprezar novamente o filtrado e transferir a coluna para um novo microtubo de 1,5mL estéril e devidamente identificado
• Adicionar 50µL do tampão de eluição (<i>Buffer AE</i>)
• Incubar à temperatura ambiente por 10 minutos
• Centrifugar as amostras por 1 minuto a 10.000 xg, e assim obter o eluato (DNA genômico)

Figura 25 - Descrição do protocolo de extração do DNA genômico

As regiões de interesse dos genes *RHD* e *RHCE* foram amplificadas cobrindo todos os éxons, incluindo sequências curtas de íntrons próximos a estes éxons, utilizando *primers* gene-específicos. Os *primers* específicos foram selecionados levando em consideração as diferenças de nucleotídeos entre os genes *RHD* e *RHCE*.^{106,107}

4.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Foi realizada amplificação das regiões codificantes de *RHD* e *RHCE* com *primers* previamente descritos, abrangendo os 10 éxons de cada gene e as sequências de íntrons que os flanqueiam. A verificação do produto amplificado foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 2%. Os *primers* utilizados para a amplificação foram específicos para os genes *RHD* e *RHCE* e estão descritos por *Legler* em 2001 e por *St-Loius* em 2007 respectivamente (Tabelas 7 e 8), além das condições de ciclagem de cada éxon (Tabela 9).^{106,108}

Tabela 7 - Primers de amplificação e sequenciamento para gene *RHD*¹⁰⁶

RHD (éxon)		Sequências de Oligonucleotídeos 5'-3'	Amplicon em pb
Denotação do Primer			
1	Ds1-s	TCAACTGTGTAAGTATGAGGAGTCAG	767
	Ds1-a	GCTATTTGCTCCTGTGACCACTT	
	Ds1-seq	TCCATAGAGAGGCCAGCACAA	
2	Ds2-s	TGACGAGTGAACTCTATCTCGAT	1602
	Ds2-a	GGCATGTCTATTTCTCTCTGTCTAAT	
	Ds2-seq	CCTGGATTCCCTTGTGATACACG	
3	Ds3-s	GTCGTCCTGGCTCTCCCTCTCT	2019
	Ds3-a	CTTTTCTCCCAGGTCCCTCCT	
	Ds3-seq	GGTCCCTCCTCCCAGCAC	
4	Ds4-s	GCCGACACTCACTGCTCTTAC	378
	Ds4-a	TGAACCTGCTCTGTGAAGTGC	
	Ds4-seq	GGGAGATTTTTTCAGCCAG	
5	Ds5-s	TACCTTTGAATTAAGCACTTCACAG	1458
	Ds5-a	TTATTGGCTACTTGGTGCC	
	Ds5-seq	AGACCTTTGGAGCAGGAGTG	
6	Ds6-s	CAGGGTTGCCTTGTTCCCA	274
	Ds6-a	CTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG	
	Ds6-seq	CTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG	
7	Ds7-s	CATCCCCCTTTGGTGGCC	405
	Ds7-a	AAGGTAGGGGCTGGACAC	
	Ds7-seq	GTCTCACCTGCCAATCTGCT	
8	Ds8-s	GGTCAGGAGTTCGAGATCAC	708
	Ds8-a	TGGCAATGGTGAAGAAAGG	
	Ds8-seq	AGTCCTTTTTGTCCCTGATGACC	
9	Ds9-s	TGCAGTGAGCCGAGGTCAC	697
	Ds9-a	CACCCGCATGTCAGACTATTTGGC	
	Ds9-seq	GAGATTAAAAATCCTGTGCTCCAAAC	
10	Ds10-s	CAAGAGATCAAGCCAAAATCAGT	381
	Ds10-a	AGCTTACTGGATGACCACCA	
	Ds10-seq	CAGTCTGTTGTTTACCAGATGTTGTTAT	

Tabela 8 - Primers de amplificação e sequenciamento para gene *RHCE*¹⁰⁸

<i>RHCE</i> (éxon)	Sequências de Oligonucleotídeos	Amplicon em pb
1	5'ACTTTCCACCTTCCACTTCCCTGT 3' 3'GCACCGAAATTCAGTCAACAATGT 5'	1457pb
2	5'ATTAGCCGGGCACGGTGGTG 3' 3'GCCTACATTCTCCTGCATCCTTT 5'	1633pb
3	5'AGGCCACCTTAACGGGAGAAGAG 3' 3'AGATGAACCTGGGCAATATAGC 5'	664pb
4/5	5'AAGGACCATCAGGGCTTTCCCCTGG 3' 3'AAGAATGCTGGGTGGTCACAGGGG 5'	1635pb
6	5'AGGCAGTAGTGAGCTGGCCCACCG 3' 3'AGGCAGTAGTGAGCTGGCCCACCG 5'	416pb
7	5'CTCTTCATTTCAACAACTCCCCAT 3' 3'CTTTGCTGTGGACGTGCTCCCA 5'	665pb
8	5'TGGAGGCTCTGAGAGGTTAAA 3' 3'CTGCTGCTAATGTGGACTGTGAGGC 5'	602pb
9	5'TGAGACACTGTCGTTTTGACACACAATATTTT 3' 3'GGGTATATATGTTGACTTGCTGTTTATGAGTAAAAC 5'	270pb
10	5'CACTCCAGCCTGAGACAAGAGCGAAAC 3' 3'GAAACAAGGTCAGAGACAGATTTG 5'	610pb

Tabela 9 - Especificação das condições de ciclagem de cada éxon ^{106,108}

Éxon		Programa de Ciclagem
<i>RHD</i>	1	95°C por 10'; 92°C por 20" , 64°C por 30" e 68°C por 90" (40 ciclos); 72°C por 5' e 4°C.
	2	
	3	
	4	
	5	95°C por 10'; 92°C por 20" , 60°C por 30" e 68°C por 90" (40 ciclos); 72°C por 5' e 4°C.
	6	95°C por 10'; 92°C por 20" , 64°C por 30" e 68°C por 90" (40 ciclos); 72°C por 5' e 4°C.
	7	
	8	
	9	
	10	
<i>RHCE</i>	1	95°C por 10'; 95°C por 30" , 60°C por 60" e 72°C por 120" (35 ciclos); 72°C por 5' e 4°C
	2	95°C por 10'; 95°C por 30" , 68°C por 60" e 72°C por 120" (32 ciclos); 72°C por 5'
	3	95°C por 10'; 95°C por 30" , 65°C por 90" e 72°C por 90" (10 ciclos); 95°C por 30" , 61°C por 60" e 72°C por 120" (25 ciclos) 72°C por 5' e 4°C
	4/5	
	6	
	7	
	8	
	9	
	10	

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados 2,5 µL de DNA, exceto para o éxon 5 do gene *RHD*, onde foram utilizados 4 µL de DNA, além de *primers*, dNTPs, magnésio, *Taq platinum* e tampão para um volume final de 25µL. Todas as reações de PCR foram feitas seguindo um protocolo padrão, com variações na temperatura de anelamento, e realizadas em termociclador *Master Cycler Gradient 96 Well Thermal Cycler* (EPPENDORF®, Germany).

Em todas as amostras de DNA dos pacientes incluídos no estudo, foi realizada técnica de PCR-multiplex baseada na amplificação de éxons selecionados de *RHD* (3-7 e 9), visando à detecção de algumas variantes de Rh mais frequentes.¹⁰⁹ Os éxons 1, 2 e 8, assim como a região codificadora do éxon 10, são correspondentes aos éxons de *RHCE*, não sendo assim específicas para *RHD*. Dessa forma, a chance de pacientes portadores de antígenos D parciais serem tipificados erroneamente como portadores de antígeno D normal é significativamente reduzida.¹⁰⁹

Seis *primers* específicos para *RHD* foram selecionados para amplificação dos éxons 3, 4, 5, 6, 7 e 9 (Tabela 10). Os *primers* BACTs (*Foward*: 5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG-3') e BACTas (*Reverse*: 5'-GGAGCAATWCITWm-3'), foram incluídos como controle interno, gerando um produto de 200pb no intuito de evitar resultados falso-negativos. O protocolo utilizado para a execução do PCR Multiplex se encontra descrito na figura 26.¹⁰⁹

Tabela 10 - Sequências dos *primers* de *RHD*. Os nucleotídeos específicos para *RHD* estão em **negrito**, as incompatibilidades introduzidas para aumentar a especificidade estão sublinhadas e as sequências não codificantes estão em letras minúsculas. Adaptado ¹⁰⁹

Éxon <i>RHD</i>	<i>Primer</i>	Sequências de Oligonucleotídeos 5'-3'	<i>Amplicon</i> em pb
3	R364 - <i>Foward</i> R474M - <i>Reverse</i>	TCGGTGCTGATCTCAGTGGA ACTGTAGACCATCCTCA <u>IGT</u>	111
4	R496 - <i>Foward</i> R621 - <i>Reverse</i>	CACATGAACATGATGCACA CAAACGGGTATCGTTGCT G	126
5	R648 - <i>Foward</i> Rex5AD2 - <i>Reverse</i>	GTGGATGTTCTGGCCAAGTT cacCTTGCTGATCTT <u>ACC</u>	157
6	R898M - <i>Foward</i> Rex6AD3 - <i>Reverse</i>	GTGGCTGGGCTGATCT <u>ACG</u> tgtctagtttcttacCGGCA <u>AGA</u>	57
7	R973 - <i>Foward</i> R1068 - <i>Reverse</i>	AGCTCCATCATGGGCTACAA ATTGCCCC GCTCCGACGGTATC	96
9	Rex9SD2 - <i>Foward</i> R1219M - <i>Reverse</i>	aaacagGTTTGCTCCTAAAT <u>ATT</u> AAACTTGGTCATCAAAATATTTA <u>ACCT</u>	71

Figura 26 - Descrição do protocolo multiplex baseado na amplificação de éxons específicos de *RHD* (3-7 e 9) ¹⁰⁹

A zigosidade *RHD* foi realizada em todas as amostras incluídas no estudo. O método adotado foi o de *PCR-RFLP*, que utiliza uma abordagem de sistema de mutação refratária de dupla amplificação para discriminar entre *RHD+* e *RHD-* por diferentes sítios de restrição (Figura 27).¹¹⁰

Estratégia de diagnóstico para determinação da zigosidade de *RHD*

Figura 27 - Fluxograma de diagnóstico da zigosidade para *RHD* pelo método de *PCR-RFLP* ¹¹⁰

Existem dois segmentos de DNA altamente homólogos denominados como caixa *Rhesus* (*downstream* e *upstream*), estes possuem um comprimento de aproximadamente 9000pb e compartilham 98,6% de homologia, dentro da qual existe uma região de identidade (*identity region*), ou seja, uma sequência completamente idêntica de 1463pb. Na extremidade 5' dessa região de identidade, a caixa *Rhesus downstream*, difere em 1 pb na sequência das caixas *Rhesus upstream* e híbridas. O último par de bases do *primer forward* (HYB2-U), corresponde à sequência das caixas *Rhesus upstream* e híbridas, mas não à *downstream*. O *primer reverse* (HYB2-L), foi projetado para anelar na extremidade 3' da região de identidade, onde há uma inserção de 1 pb na caixa *Rhesus upstream* (Figura 28).¹¹¹

Figura 28 - (A) Representação esquemática da estrutura genética no *lócus RH*. Linhas tracejadas representam os pontos de interrupção nas caixas *Rhesus* que causam a exclusão de *RHD*. (B) Orientação e sequências dos *primers* HYB2-U e HYB2-L. As sequências de *primers* estão descritas na parte inferior e a especificidade do alelo é conferida pelas bases identificadas em negrito, além de uma incompatibilidade adicional, que se encontra em letra maiúscula e sublinhada, que pode ser identificada na terceira base a partir da extremidade 3' de cada *primer*¹¹¹

A sequência do *primer reverse* corresponde à das caixas *Rhesus* híbridas e *downtream*, mas não à sequência *upstream*, portanto, os *primers* amplificam seletivamente um segmento de 1507 pb da caixa *Rhesus*. (Tabela 11).¹¹²

Tabela 11 - Os *primers* HYB2-U/HYB2-L são específicos e foram projetados para detectar o alelo deletado por *RHD* (caixa *Rhesus* híbrida) ¹¹²

Direção do <i>Primer</i>	Sequências de Oligonucleotídeos 5'-3'
<i>Foward</i> HYB2-U	CAAAACCATTTTTTCCTGAGAC
<i>Reverse</i> HYB2-L	AATTAATGGCTTTTCATTATCGG

A técnica é baseada na detecção específica da deleção de *RHD* por meio da amplificação de um fragmento de 1507 pb (Figura 29).

Figura 29 - Descrição do protocolo de zigosidade de *RHD* ¹¹²

Referente ao alelo *RHD*ψ*, o método para a triagem da inserção de 37 pb no éxon 4 de *RHD*, foi um PCR com um *primer* sense no íntron 3 e um *primer* anti-sense específico para *RHD* no íntron 4, assim como, também foi realizado para *RHC* e *RHc*, conforme descrito na Tabela 12. O protocolo multiplex detecta regiões do gene *RHCE* que codificam os antígenos RhC/Rhc e também o éxon 3 híbrido *RHD-RHCE*, comum em indivíduos com ancestralidade africana. ⁷⁹

Tabela 12 - Sequências de *primers* específicos para o protocolo multiplex *RHD* (intron 4 / éxon 7), pseudogene, RhC/Rhc ⁶³

<i>Primer</i>	Sequências de Oligonucleotídeos 5'-3'	<i>Amplicon</i> em pb
Éxon 7 - <i>foward</i> Éxon 7 - <i>reverse</i>	AGCTCCATCATGGGCTACAA ATTGCCGGCTCCGACGGTATC	95
Íntron 3 - <i>foward</i> 1 Íntron 4 - <i>reverse</i>	GGGTTGGGCTGGGTAAGCTCT GAACCTGCTCTGTGAAGTGCT	498 ou 535
Íntron 3 - <i>foward</i> 2 Éxon 4 - inserção/rotação	AACCTGGGAGGCAAATGTT AATAAACCCAGTAAGTTCATGTGG	250
C - <i>foward</i> C - <i>reverse</i>	CAGGGCCACCACCATTTGAA GAACATGCCACTTCACTCCAG	320
c - <i>foward</i> c - <i>reverse</i>	TCGGCCAAGATCTGACCG TGATGACCACCTTCCCAGG	177

A ausência da banda de 320pb e a presença da banda 111pb com alelo *RHCE*ce^S*, é indicativo da associação em *cis* com o alelo híbrido *RHD*DIIla-CE(4-7)-D*. Neste alelo, os éxons 1, 2 e, parte do 3, são derivados de *RHD*, bem como os éxons 8, 9 e 10, mas toda a região entre eles é derivada de *RHCE*, codificando os antígenos RhD e RhC parciais.¹¹³

A reação e a eletroforese de produtos de amplificação gerados de acordo com o protocolo especificado na Figura 30, correu em gel de agarose a 2,5%, revelando um produto de 381 pb de *RHD* para tipo selvagem e um produto de 418 pb de *RHD* com a inserção de 37 pb.¹¹²

Figura 30 - Descrição do protocolo multiplex que codifica *RHD* (íntron 4 / éxon 7), pseudogene e RhC/Rhc⁶³

Todos os 35 pacientes tiveram *RHD* e *RHCE* sequenciados por protocolo de NGS utilizando a plataforma *Ion Torrent PGM TM* (Thermo Fisher Scientific).

4.6 Quantificação e purificação do DNA

Os *amplicons* obtidos a partir da amplificação dos éxons de *RHD* e *RHCE* foram quantificados no *Fluorometer Qubit* (Thermo Fisher Scientific) com um *kit* comercial específico (*Qubit dsDNA BR Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific), através de leitura óptica de absorbância (DO260/280nm) padronizada em 100 ng/µL e o quociente de pureza do DNA foi considerado aceitável quando a leitura de absorbância foi maior ou igual a 1,8. Cada valor

obtido foi dividido pelo menor valor de quantificação existente, levando em consideração o peso molecular dos *amplicons*.

Todos esses *amplicons* foram diluídos para atingir a concentração do *amplicon* com a menor molaridade. Em seguida, os *amplicons* diluídos foram reunidos em dois *pools* equimolares para cada amostra estudada: um contendo os *amplicons RHD* e o outro contendo os *amplicons RHCE*.

4.7 Preparação da biblioteca

Os *pools* foram submetidos à fragmentação mecânica por meio do *Biorruptor® Sonication System*, ou seja, um processo de quebra do DNA, onde cada um desses *templates*, estivessem fragmentados de forma tal que todo o genoma fosse coberto pelo sequenciamento da maneira mais uniforme possível. Neste estudo, o protocolo utilizado foi de fragmentação em 200pb (*Sonicate the DNA with the Biorruptor® UCD-200 TS Sonication System*), tendo sido os fragmentos selecionados, individualmente, por meio de técnica de eletroforese em E-gel (*E-Gel® SizeSelect™ a 2% Thermo Fisher Scientific*). Posteriormente, os fragmentos foram submetidos ao reparo das extremidades por meio da enzima *Nick Repair Polymerase*, que fornece o corte da fita sobressalente. Os *Barcodes* (adaptadores com sequências específicas) *Ion Xpress™* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*) foram adicionados com o objetivo de rotular as amostras, bem como os produtos derivados de genes *RHD* e *RHCE*, de acordo com as instruções do fabricante. O objetivo desse processo era permitir que, no momento da análise, cada produto proveniente desses genes homólogos fosse devidamente identificado independente da presença de alta homologia entre eles. Importante salientar a necessidade das ligações, assim como as corridas, terem sido realizadas separadamente, devido à homologia dos genes estudados.

As bibliotecas foram novamente amplificadas por PCR convencional e quantificadas por PCR em tempo real, utilizando a tecnologia *TaqMan* (*IonLibrary TaqMan Quantitation Kit, Thermo Fisher Scientific*). Neste processo

foram geradas bibliotecas independentes, as quais puderam ser avaliadas, individualmente, com diferentes produtos (*AmpliSeq*).

4.8 Reação em cadeia de polimerase (PCR) em emulsão e enriquecimento

A amplificação clonal por PCR em emulsão *One Touch* ocorreu com a inserção dos fragmentos em micelas (microreator) geradas em uma solução emulsionada, sendo que dentro de cada uma existia uma *bead* (grânulo magnético), com sequências de DNA na superfície. O enriquecimento da amostra separou as *beads* acopladas dos fragmentos não acoplados, sendo então os selecionados inseridos no *chip* semicondutor (*Ion 318 Chip v2*), o qual apresentava desempenho esperado de 1 Gigabase (Gb) de resultado, e encaminhados para o sequenciador. O carregamento do *chip* foi realizado no *Ion Chef System* (*Thermo Fisher Scientific*).

4.9 Sequenciamento pelo método *Ion Torrent* (*Life Technologies* TM)

O sequenciamento foi realizado com o *Hi-Q™ Sequencing Kit* (*Thermo Fisher Scientific*) no sistema *One Touch2* (*Thermo Fisher Scientific*). O *chip* era constituído ousequenciamento, havendo abaixo de cada poço um semicondutor que detectava as variações elétricas. O equipamento passou a fornecer às *beads* os quatro nucleotídeos Adenina (A), Citosina (C), Timina (T) ou Guanina (G) soltos, sempre um de cada vez e nunca misturado. Quando houve a incorporação de algum nucleotídeo em um fragmento de DNA, a ligação fosfodiéster gerada liberou íons de Hidrogênio H^+ no meio, alterando o pH e fazendo com que essa variação fosse detectada pelos semicondutores, ou seja, sempre que houvesse o fornecimento de um nucleotídeo seguido de variação de pH, significava que aquela base tinha sido incorporada, permitindo a geração de sequências. Quando utilizadas 8 amostras em paralelo, permitiu leituras de 200 pb em 2 horas e um tempo de preparação inferior a 6 horas.

4.10 Análise de dados de NGS

Ao final do processo de sequenciamento, as leituras geradas no equipamento foram alinhadas com o genoma humano (hg19) e, a partir dessa etapa, foi gerado um arquivo de alinhamento passível de ser analisado pelo *Software Ion Reporter* versão 5.0. As leituras de cada gene foram analisadas de forma individual e um *workflow* personalizado foi criado para mascarar regiões homólogas entre os genes, na tentativa de mitigar possíveis alinhamentos inespecíficos. O *Ion Reporter*, por sua vez, gerou um arquivo de chamada de variantes a partir do arquivo de alinhamento, o qual continha as variantes encontradas nas amostras sequenciadas.

Dessa maneira, a partir dos polimorfismos relatados pelo *Ion Reporter*, foi possível descrever o genótipo dos pacientes e a presença de possíveis variantes nos alelos dos genes *RHD* e *RHCE* dos pacientes analisados. A representação das etapas do NGS está ilustrada na Figura 31.

Figura 31 - Representação das etapas do sequenciamento pela plataforma *IonTorrent®*. 1) Uma biblioteca de sequenciamento foi produzida pela geração de fragmentos de DNA flanqueados pelos adaptadores *Ion Torrent*; 2) Esses fragmentos foram amplificados como clones nas partículas *Ion Sphere* por PCR; 3) As partículas *Ion Sphere* com o DNA molde amplificado foram aplicadas no *chip Ion Torrent*; 4) O *chip* foi colocado no *Ion Torrent PGM* e a corrida de sequenciamento foi realizada; 5) Os resultados do sequenciamento foram fornecidos em arquivos em formato padrão; 6) A análise de dados *downstream* foi realizada utilizando o *Ion Reporter™ Software 5.10* ⁹⁹

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Etapa de padronização

Os resultados obtidos na etapa de validação foram concordantes entre a metodologia *Sanger* e a metodologia de *NGS*, ambas sendo acuradas na determinação do genótipo *RHD* em todas as amostras analisadas (Tabela 13). No entanto, o sequenciamento baseado em *NGS* foi assertivo na interpretação de todos os polimorfismos inerentes aos alelos híbridos *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D*, em contraste com o sequenciamento realizado por meio da metodologia de *Sanger*, em que a interpretação do éxon 5 foi difícil quando este alelo estava em *trans* com o alelo *RHD*Ψ*. Com relação a isso, mesmo levando em consideração o fato de as amostras terem sido corridas em lotes diferentes, os gráficos de resultados inerentes ao éxon 5 tinham ruídos, ou não emparelharam com a sequência *RHD* padrão. (Figura 32).

Tabela 13 - Comparação entre os resultados da metodologia *NGS* e *Sanger* na etapa de padronização

Etapa de Padronização (comparação entre os resultados da metodologia <i>NGS</i> e <i>Sanger</i>)							
Amostra	Ensaio <i>NGS</i>		Sequenciamento <i>Sanger</i>				
	Conclusão	Perda de Alelos	Conclusão	Sobreposição Parcial	Falha de Sequência Direta (<i>Forward</i>)	Falha de Sequência Reversa (<i>Reverse</i>)	Falha da Sequência Seq
#1	<i>RHD*</i> Fraco tipo 45/D Deletado	Nenhum	<i>RHD*</i> Fraco tipo 45/D Deletado	Éxon 9	Nenhum	Éxon 5	Não testada
#2	<i>RHD*Ψ/RHD*</i> Fraco tipo 38	Nenhum	<i>RHD*Ψ/RHD*</i> Fraco tipo 38	Nenhum	Éxon 4	Éxon 4	Não testada
#3	<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D/RHD*</i> Fraco D tipo 5	Nenhum	<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D/RHD*</i> Fraco D tipo 5	Éxon 1	Éxon 2	Éxon 2	Não testada
#4	<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D/RHD*Ψ</i>	Nenhum	<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D/RHD*Ψ</i>	Nenhum	Éxon 5	Éxon 5	Éxon 5
#5	<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D/RHD*Ψ</i>	Nenhum	<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D/RHD*Ψ</i>	Nenhum	Éxon 5	Éxon 5	Éxon 5
#6	<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D/RHD*Ψ</i>	Nenhum	<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D/RHD*Ψ</i>	Nenhum	Éxon 5	Éxon 5	Éxon 5

Figura 32 - Gráficos emitidos pelo sequenciamento *Sanger*. Contém ruídos, impossibilitando a leitura da sequência padrão de *RHD* pelo *software*, dificultando a interpretação do éxon 5 quando em heterozigose com o alelo *RHD*ψ*

5.2 Alinhamento com o genoma referência

As leituras geradas nas duas corridas foram alinhadas com o genoma de referência humano, hg19, gerando um relatório de usuário para cada corrida efetuada, correspondente aos *chips* SN2-201-Ingrid e SN2-202-Ingrid (Tabela 14). Ao alinhar as sequências de *RHCE*, foi necessário mascarar as sequências de *RHD* para análise e vice-versa.

Tabela 14 - Demonstrativo dos relatórios de usuário gerados após a primeira e a segunda corridas com alinhamento de acordo com o genoma de referência hg19 relacionada aos *chips* SN2-201-Ingrid e SN2-202-Ingrid, demonstrando a densidade de carga, o histograma de comprimento de leitura e as estatísticas de resumo obtidas do *Ion Torrent Suite*™ após uma execução de sequenciamento representativa do *Ion Torrent PGM*™ Fonte: *Ion Torrent (PGM™) System*

		Relatórios de Usuário					
		SN2-201-Ingrid			SN2-202-Ingrid		
Profundidade Média Referência de Cobertura		0,2X			0,1X		
Bases de Alinhamento	Alinhadas	98%			98%		
	Não Alinhadas	2%			2%		
	Total	621 M			380 M		
Leituras	Alinhadas	3.394.073	99,8%		2.197.650	99,3%	
	Não Alinhadas	8.216	0,2%		16.287	0,7%	
	Total	3.402.289	100%		2.213.937	100%	
Média Bruta de Precisão 1x		99,3%			99,1%		
Total de Bases		646 M			398 M		
Sinal Chave		68			94		
Densidade de Carga Aproximada ISP		91%			87%		
Quantidade de Poços n x n		3.392	2.120		3.392	2.120	
Leituras	Viáveis	61%			42%		
	Total	3.485.765			2.290.646		
Resumo ISP	Carregamento	91%			87%		
	Poços Vazios	9%			13%		
	Enriquecimento	100%			100%		
	Sem Fragmentos	0%			0%		
	Clonal	65%			48%		
	Policlonal	35%			52%		
	Biblioteca Final	93%			86%		
	Fragmentos de Teste	2%			1%		
	Dímero Adaptador	0%			0%		
	Baixa Qualidade	5%			13%		
Hiatograma de Comprimento de Leitura	Mediana	185 bp	198 bp	219 bp	174 bp	193 bp	219 bp

5.3 Genotipagem baseada em *NGS* dos genes *RHD* e *RHCE*

A genotipagem *NGS* foi realizada na segunda etapa do estudo, com o objetivo de testar sua eficácia na identificação da diversidade de alelos *RH* variantes entre os pacientes com DF com anticorpos Rh inesperados. Nas tabelas 15, 16 e 17 estão descritas as coberturas obtidas (geral e por éxon sequenciado) com o ensaio de *NGS* realizado.

Tabela 15 - Porcentagem média dos éxons de interesse que estavam cobertos em pelo menos 50 vezes

<i>RHD</i>	Éxon	Média	DP	<i>RHCE</i>	Éxon	Média	DP
Porcentagem	<i>RHD</i> _1	95,92	17,1	Porcentagem	<i>RHCE</i> _10	49,1	15,8
	<i>RHD</i> _2	89,74	30,7		<i>RHCE</i> _9	93,9	24,2
	<i>RHD</i> _3	100,00	0,0		<i>RHCE</i> _8	90,9	29,2
	<i>RHD</i> _4	94,77	22,3		<i>RHCE</i> _7	92,0	26,3
	<i>RHD</i> _5	78,46	40,3		<i>RHCE</i> _6	93,9	24,2
	<i>RHD</i> _6	97,44	16,0		<i>RHCE</i> _5	96,5	17,5
	<i>RHD</i> _7	98,51	6,8		<i>RHCE</i> _4	96,7	17,4
	<i>RHD</i> _8	97,44	16,0		<i>RHCE</i> _3	91,5	27,6
	<i>RHD</i> _9	93,87	22,5		<i>RHCE</i> _2	89,0	29,7
	<i>RHD</i> _10	18,95	2,7		<i>RHCE</i> _1	93,9	24,2

Tabela 16 - Valor médio de cobertura de cada éxon sequenciado (*RHD* e *RHCE*)

<i>RHD</i>	Éxon	Média	DP	<i>RHCE</i>	Éxon	Média	DP
Valor Absoluto	<i>RHD</i> _1	1435,3	2602,8	Valor Absoluto	<i>RHCE</i> _10	643,1	545,3
	<i>RHD</i> _2	1203,295	1652,7		<i>RHCE</i> _9	4760,6	4903,7
	<i>RHD</i> _3	13981,84	20411,5		<i>RHCE</i> _8	1994,6	3289,7
	<i>RHD</i> _4	6985,46	14068,6		<i>RHCE</i> _7	1813,6	1656,5
	<i>RHD</i> _5	540,7651	529,8		<i>RHCE</i> _6	1873,5	2501,7
	<i>RHD</i> _6	1823,88	2000,6		<i>RHCE</i> _5	1197,0	1378,0
	<i>RHD</i> _7	2565,82	5260,0		<i>RHCE</i> _4	1308,2	1665,3
	<i>RHD</i> _8	1663,975	3276,8		<i>RHCE</i> _3	1592,0	3013,9
	<i>RHD</i> _9	962,0249	1251,3		<i>RHCE</i> _2	606,7	999,8
	<i>RHD</i> _10	447,2079	712,7		<i>RHCE</i> _1	1111,9	1501,0

Tabela 17 - Porcentagem dos genes de interesse com valor de *cutoff* de pelo menos 50 vezes de cobertura

	Porcentagem	Desvio Padrão
<i>RHD</i>	86,5 %	7,5 %
<i>RHCE</i>	91,6 %	12,5 %

5.4 Desempenho geral

O genótipo *RHCE**C foi identificado em 21 amostras e estava de acordo com os resultados referentes ao ensaio convencional de PCR especificado na seção de materiais e métodos, atestando que as regiões de interesse de *RHD* e *RHCE* foram amplificadas por *primers* gene específicos. O resumo da execução do NGS está exposto na Tabela 18. Em outros estudos, as análises realizadas por meio de NGS, nas quais as bibliotecas foram construídas utilizando *primers* projetados pelo sistema *Ion AmpliSeq™ Designer*, o alelo *RHCE**C não foi identificado, pois a homologia entre os genes *RHD* e *RHCE* não foi levada em consideração.¹⁴

Tabela 18 - Resumo do desempenho do ensaio baseado em NGS para cada gene estudado

	Total de Leituras	Comprimento Médio de Leitura
<i>RHD</i>	1.289,373	188
<i>RHCE</i>	1.373,151	193

A discriminação entre alelos *RH* variante homozigotos e heterozigotos foi feita calculando a porcentagem de leituras portadoras de uma posição variante no resultado do sequenciamento NGS. Este resultado de zigosidade foi comparado à metodologia molecular convencional de bancada ,

conforme descrito na seção materiais e métodos, com 100% de precisão no caso do gene *RHD*.

5.5 Alelos *RHD* e *RHCE* identificados na amostra estudada

Diferentes alelos que codificam alterações de aminoácidos foram identificados e estão representados na Figura 33. Entre os 35 pacientes estudados, 10 amostras com alelos que codificavam fenótipo variante RhD foram identificados (*RHD*fraco D 4.2.2*, *RHD*DVII*, *RHD*D fraco parcial D 4.0*, *RHD*DAU0.01* e *RHD*609A*, *654C*, *667G*, *674T*, *807G*). *RHD*fraco D 4.2.2* foi o alelo variante mais comum de *RHD* (50%), seguido por *RHD*D4 fraco parcial D 4.0* (20%), *RHD*DVII* (10%) e *RHD*DAU0.01* (10%), conforme demonstrado na Tabela 19. Em relação ao gene *RHCE*, 45 dos 70 alelos sequenciados exibiram sequência padrão (*RHCE*ce*, *RHCE*Ce* e *RHCE *cE*) (64,3%), enquanto 25 amostras apresentaram alelos variantes (35,7%). Os alelos variantes *RHCE* mais frequentemente identificados foram: *RHCE*ce48C* (14,3%), *RHCE*ceAR* (7,1%), *RHCE*ce48C,733G*(2,9%), *RHCE*ceEK* (1,4%), *RHCE*ce48C, 1024G* (1,4%), *RHCE*ce105T, 733G, 744C, 1025T* (1,4%), *RHCE*(C)ce^S* (1,4%) e *RHCE*ceCF* (1,4%) (Figura 34).

Figura 33 - Descrição dos alelos das variantes *RHD* e *RHCE* identificados utilizando o ensaio baseado em NGS em pacientes com DF exibindo anticorpos anti-Rh inesperados. À esquerda, a sequência genética padrão é representada pelas caixas na cor cinza, sendo que cada caixa representa um éxon. Quando as caixas estão na cor preta, significa substituição completa, formando alelos híbridos. Quando as caixas possuem uma linha dentro, isso representa mutações pontuais. À direita, são descritas as alterações nucleotídicas em comparação à sequência padrão e à identificação do éxon afetado,

assim como, o número de alelos identificados com a variação genética e a frequência alélica na população estudada

Tabela 19 - Alelos *RHD* codificante de antígeno variante identificados no estudo

Denominação do Alelo	Fenótipo Presumido
<i>RHD</i> *Fraco tipo 4.2.2	D variante
<i>RHD</i> *Fraco parcial 4.0	D variante
<i>RHD</i> *DVII	D variante
<i>RHD</i> *DAU 0,01	D variante
<i>RHD</i> *609A,654C,667G,674T,807G	D negativo ou variante
<i>RHD</i> *DIIIa-CE(4-7)-D	D negativo

Alelos <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> identificados nos 35 pacientes																					
45 apresentaram sequência padrão (64,3%)	25 apresentaram alelos variantes (35,7%)																				
<div><i>RHCE</i>*ce</div> <div><i>RHCE</i>*Ce</div> <div><i>RHCE</i>*cE</div>	<table> <tr> <th>Denominação do alelo (ISBT)</th><th>Antígenos</th></tr> <tr> <td><i>RHCE</i>*ce48C</td><td>e fraco/variante</td></tr> <tr> <td><i>RHCE</i>*ceAR</td><td>hr^S-, e parcial, c parcial</td></tr> <tr> <td><i>RHCE</i>* Ce48C,733G</td><td>e parcial, c parcial, hr^B-</td></tr> <tr> <td><i>RHCE</i>*ceEK</td><td>hr^S-, e parcial, c parcial</td></tr> <tr> <td><i>RHCE</i>*ce48C,1024G</td><td>e fraco/variante</td></tr> <tr> <td><i>RHCE</i>*ce105T,733G,744C,1025T</td><td>e parcial Provável (hr^B-)</td></tr> <tr> <td><i>RHCE</i>*ceS</td><td>e parcial c parcial (hr^B-)</td></tr> <tr> <td><i>RHCE</i>*ceCF</td><td>e parcial c parcial (Crawford+) hr^S, hr^B (CELO-)</td></tr> <tr> <td><i>RHCE</i>*ce733G ou <i>RHCE</i>*cE733G</td><td>hr^B+w/-, e parcial, c parcial</td></tr> </table>	Denominação do alelo (ISBT)	Antígenos	<i>RHCE</i> *ce48C	e fraco/variante	<i>RHCE</i> *ceAR	hr ^S -, e parcial, c parcial	<i>RHCE</i> * Ce48C,733G	e parcial, c parcial, hr ^B -	<i>RHCE</i> *ceEK	hr ^S -, e parcial, c parcial	<i>RHCE</i> *ce48C,1024G	e fraco/variante	<i>RHCE</i> *ce105T,733G,744C,1025T	e parcial Provável (hr ^B -)	<i>RHCE</i> *ceS	e parcial c parcial (hr ^B -)	<i>RHCE</i> *ceCF	e parcial c parcial (Crawford+) hr ^S , hr ^B (CELO-)	<i>RHCE</i> *ce733G ou <i>RHCE</i> *cE733G	hr ^B +w/-, e parcial, c parcial
Denominação do alelo (ISBT)	Antígenos																				
<i>RHCE</i> *ce48C	e fraco/variante																				
<i>RHCE</i> *ceAR	hr ^S -, e parcial, c parcial																				
<i>RHCE</i> * Ce48C,733G	e parcial, c parcial, hr ^B -																				
<i>RHCE</i> *ceEK	hr ^S -, e parcial, c parcial																				
<i>RHCE</i> *ce48C,1024G	e fraco/variante																				
<i>RHCE</i> *ce105T,733G,744C,1025T	e parcial Provável (hr ^B -)																				
<i>RHCE</i> *ceS	e parcial c parcial (hr ^B -)																				
<i>RHCE</i> *ceCF	e parcial c parcial (Crawford+) hr ^S , hr ^B (CELO-)																				
<i>RHCE</i> *ce733G ou <i>RHCE</i> *cE733G	hr ^B +w/-, e parcial, c parcial																				

Figura 34 - Resumo dos alelos *RHD* e *RHCE* identificados nos pacientes estudados

Uma alta porcentagem de pacientes exibindo o alelo *RHCE**C foi observada na coorte estudada (54,3%). A explicação mais plausível é que a população brasileira é altamente miscigenada, mesmo entre os pacientes com

DF. Esses dados foram confirmados em uma coorte diferente de pacientes brasileiros com DF, em que 53% dos pacientes exibiram alelo *RHCE**C.³ Além disso, em outro estudo, observou-se que a frequência do alelo *RHCE**C entre doadores de sangue, que normalmente se autodeclaram caucasianos, não era tão superior à exibida pelos pacientes com DF (65% versus 53%, respectivamente).

5.6 Novos alelos de *RHCE*

Dois alelos *RHCE*, não descritos na literatura, foram identificados entre as amostras estudadas. Ainda há necessidade de realização de outros ensaios sorológicos para determinar se estes alelos codificam antígenos parciais.

a) *RHCE***ce48C*, 1024G: O paciente 7 foi sorologicamente classificado como R₀r, porém exibia anticorpo anti-e e anti-C. O NGS revelou *RHCE***ce48C* em homozigose e *RHCE* c.1024A>G em heterozigose. A mutação *RHCE* c.1024A>G nunca foi descrita anteriormente e leva a uma substituição de Thr para Ala no aminoácido 342.

b) *RHCE***ce105T*, 733G, 744C, 1025T em *cis* a *RHD***DAR3.01*: O paciente 11 foi sorologicamente classificado como R₁r. A análise molecular de *RHCE* revelou um alelo *RHCE***ce* variante, compreendendo as seguintes alterações nucleotídicas: c.105C>T c.733C>G c.744T>C c.1025C>T em *trans* com o alelo *RHCE**Ce. O polimorfismo c.105C>T já foi descrito associado a c.48G>C e em *trans* ao alelo *ce48C*, 733G, 744C, 1025T, este último considerado como uma variação do *RHCE***ceTI*. Aqui descrevemos o c.105C>T como uma alteração de nucleotídeo T associada a c.733C>G, c.744T>C e c.1025C>T e sem a mutação c.48G>C. Além disso, esse novo alelo *RHCE***ce* foi vinculado ao *RHD***DAR3.01* (D 4.0 fraco parcial), que são novos dados, pois o *RHCE***ceTI* é descrito em associação com o *RHD***DIVa-2*. A hipótese é que esse alelo codifique antígenos D parciais e variantes Rhce.

5.7 Correlação entre dados moleculares e sorológicos de Rh

Inspecionamos cada anticorpo irregular Rh e correlacionamos com o genótipo *RH* do paciente (Figura 35). O anti-D foi identificado nos soros de 18 pacientes positivos para RhD e no eluato de um paciente, este último representa o único caso inicialmente classificado como autoanticorpo anti-D. Presumiu-se que todos esses pacientes exibissem fenótipo variante RhD e foram transfundidos com hemácias negativas para RhD somente (fenótipo rr). Alelos variantes *RHD* justificando o antígeno variante RhD foram identificados em apenas 5 desses pacientes (27,8%). Os 13 pacientes restantes com anti-D tinham um, ou até dois alelos *RHD* convencionais.

ID	Genótipo RH				Fenótipos Deduzidos	Aloanticorpo	Autoanticorpo
	RHCE		RHD				
1	RHCE*ce	RHCE*cE	RHD	RHD	D+C-E+c+e+	D, C, alo IgG	e
2	RHCE*ceAR	RHCE*ceEK	DAR1.2 (D fraco 4.2.2)	RHD	D+C-E-, c parcial, e parcial	D, C, E, alo IgG	-
3	RHCE*ce4BC	RHCE*cE	RHD	D deletado	D+C-E+c+e+ ^{faco}	D, C, alo IgG	e
4	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	RHD	D+C+E-c+e+	D, E, V	-
5	RHCE*ce4BC	RHCE*ce4BC, 733G	DVII	D deletado	D parcial, C-E-, c parcial, e parcial	D, provável C, E	-
6	RHCE*ce4BC	RHCE*cE	RHD	D deletado	D+C-E+c+e+ ^{faco}	provável D, C, provável E	IgG
7	RHCE*ce4BC	RHCE*ce4BC, 1024G	RHD	D deletado	D+C-E-c+e+ ^{faco}	D, C, alo IgG	e
8	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	D deletado	D+C+E-c+e+	D	e
9	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	D deletado	D+C+E-c+e+	D, E	IgG
10	RHCE*Ce	RHCE*cE	RHD	RHD	D+C+E+c+e+	D	-
11	RHCE*Ce	RHCE*ce105T, 733G, 744C, 1025T	DAR3.1 (D fraco parcial 4.0)	RHD	D+C+E-, c parcial, e parcial	provável D	-
12	RHCE*Ce	RHCE*ce733G	RHD	RHD	D+C+E-, c parcial, e parcial	provável C, cw, E, alo IgG	IgG
13	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	D deletado	D+C+E-c+e+	provável C, alo IgG	-
14	RHCE*Ce	RHCE*Ce	RHD	RHD	D+C+E-c-e+	E, c	e, IgG
15	RHCE*Ce	RHCE*ce733G	RHD	RHD	D+C+E+, c parcial, e parcial	C	e
16	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	D deletado	D+C+E-c+e+	E, alo IgG	D (eluato)
17	RHCE*ceAR	RHCE*(C)ceS	DAR1.2 (D fraco 4.2.2)	DIIIa-CE(4-7)-D	D parcial, C parcial, E-, c parcial, e parcial	D, C, E, alo IgG	-
18	RHCE*ce4BC	RHCE*ce4BC	RHD	D deletado	D+C-E-c+e+ ^{faco}	provável D	-
19	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	D deletado	D+C+E-c+e+	-	e, IgG
20	RHCE*ce4BC	RHCE*cE	RHD	D deletado	D+C-E+c+e+ ^{faco}	C, provável e, alo IgG, auto IgG	IgG
21	RHCE*Ce	RHCE*ceAR	DAR1.2 (D fraco 4.2.2)	D deletado	D parcial, C+E-, c parcial, e parcial	D	-
22	RHCE*Ce	RHCE*ceCF	DAR3.1 (D fraco parcial 4.0)	RHD	D+C+E-, c parcial, e parcial	E, c, alo IgG	-
23	RHCE*ceAR	RHCE*ce	DAR1.2 (D fraco 4.2.2)	D deletado	D parcial, C-E-c+e+	D	-
24	RHCE*ceAR	RHCE*ce	DAR1.2 (D fraco 4.2.2)	D deletado	D parcial, C-E-c+e+	D	-
25	RHCE*ce4BC	RHCE*cE	RHD	RHD	D+C-E+c+e+ ^{faco}	C	e, IgG
26	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	D deletado	D+C+E-c+e+	C	e, IgG
27	RHCE*ce4BC	RHCE*cE	DAU0.01	D deletado	D parcial, C-E+c+e+ ^{faco}	C, e	IgG
28	RHCE*ce4BC	RHCE*ce4BC, 733G	RHD	RHD	D+C-E-, c parcial, e parcial	C, E	e, IgG
29	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	D deletado	D+C+E-c+e+	C	-
30	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	RHD	D+C+E-c+e+	E, c	-
31	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	D deletado	D+C+E-c+e+	D, E	-
32	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	D deletado	D+C+E-c+e+	-	C, e
33	RHCE*Ce	RHCE*ce	RHD	RHD*609A, 654C, 667G, 674T, 807G	D+C+E-c+e+	D, E	-
34	RHCE*Ce	RHCE*cE	RHD	RHD	D+C+E+c+e+	E	-
35	RHCE*Ce	RHCE*ce733G	RHD	D deletado	D+C+E-, c parcial, e parcial	E	e

Figura 35 - Resumo do genótipo *RHD/RHCE* e correlação com dados sorológicos de todos os pacientes com DF estudados

O anticorpo anti-e foi identificado nos soros de 14 pacientes com fenótipo e⁺. Desses, 85,7% (12 casos) foram classificados sorologicamente como autoanticorpo anti-e, enquanto 14,3% (2 casos) foram classificados como aloanticorpo anti-e associado a antígeno e parcial. A genotipagem de *RHCE* revelou que 57,1% dos anti-e identificados eram, de fato, prováveis aloanticorpos (8 em 14) e que 42,8% classificações sorológicas iniciais estavam inacuradas, visto que os anticorpos anti-e foram interpretados como auto-direcionados, mas a genotipagem revelava presença de antígeno e

parcial. Tal fato demonstra que a análise sorológica, à ocasião, era incapaz de discernir entre auto e aloanticorpos, muito provavelmente por transfusão recente. Os pacientes classificados sorologicamente como tendo autoanticorpos anti-e receberam unidades de hemácias cujo fenótipo era positivo para esse antígeno, mas nenhuma reação hemolítica tardia foi relatada. No entanto, a transfusão de unidades compatíveis com o antígeno e poderia ter melhorado o incremento transfusional e aumentado a segurança transfusional em todos os pacientes, exceto dois, que também tinham anti-E.

O anti-C foi identificado no soro de 6 pacientes com C⁺. Um paciente tinha antígeno parcial C codificada pelo alelo híbrido *RHD*DIIIa-CE (4 - 7)-D*, enquanto que 5 apresentavam um alelo convencional *RHCE*Ce* (83,3%). O anti-E foi identificado no soro de um paciente E⁺ que exibia o alelo *RHCE*cE* convencional.

Em suma, dos 42 casos de anticorpos Rh inesperados, 38% foram classificados corretamente por métodos sorológicos e 62% estavam provavelmente incorretos. Dos resultados incorretos, 73,1% foram considerados importantes, pois estavam associados a potencial escassez de unidades de hemácias O- disponíveis para transfusão, como no caso de pacientes recebendo unidades de hemácias somente negativas para RhD devido à classificação incorreta da variante RhD ou à reação transfusional hemolítica tardia e pouco incremento transfusional no caso de pacientes com aloanticorpos anti-e classificados como autoanticorpos.

5.8 Impacto da genotipagem *RHD* e *RHCE* no gerenciamento de transfusões

Após os resultados da genotipagem, todos os pacientes que receberam unidades RhD negativo, devido à classificação sorológica como RhD parcial, começaram a receber unidades positivas para RhD. Este fato não apenas aumentou a quantidade de unidades fenotipadas disponíveis para transfusão, diminuindo o tempo necessário para identificar unidades compatíveis, como também poupou uma quantidade significativa de unidades

RhD negativo do inventário laboratorial de transfusão (10,1%) (Tabela 20). Nenhum dos pacientes exibiu sinais ou sintomas de reações transfusionais e, em um dos pacientes (paciente 1), houve aumento significativo do intervalo de transfusão, de 14 para 30 dias, após a implementação desta nova política. Este fato provavelmente reflete a seleção de unidades RhD positivo com fenótipo mais similar ao do paciente, visto que, na população brasileira, o fenótipo RhD negativo está presente, principalmente, em população caucasiana.

Tabela 20 - Quantidade de unidades de hemácias RhD negativo poupadas do inventário laboratorial de transfusão após o resultado da genotipagem de *RHD*

Identidade do Paciente	Número de Transfusões de Hemácias Utilizando Bolsas RhD Negativo		Número de Unidades de Hemácias RhD Negativo Disponíveis para Transfusão
	Últimos 12 meses	Mensal	Últimos 12 Meses / Mensal
1	20	1,6	-
2	42	3,5	
3	26	2,1	
4	18	1,5	
6	20	1,6	
7	16	1,3	
8	20	1,6	
9	28	2,3	
11	37	3,1	
Total de Unidades de Hemácias RhD Negativo	227	18,6	2257 / 188
Total de Unidades de Hemácias RhD Negativo que Foram Preservadas (%)			10,1% / 10%

Todos os pacientes cujo fenótipo predito do genótipo, revelado antígeno e parcial, começaram a receber unidades R2R2. Entretanto, aumento do incremento transfusional não pode ser determinado com precisão, devido à falta de coleta de amostras no período pós transfusão, com quantificação de hemoglobina A.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O presente estudo padronizou uma estratégia viável para sequenciar os genes *RHD* e *RHCE* usando o *NGS*, confirmando sua eficácia ao interpretar genótipos variantes de Rh entre os pacientes com DF. Os resultados obtidos no ensaio baseado em *NGS* foram específicos para esses genes, superando imprecisões relatadas anteriormente em relação à falta de especificidade *RHD/RHCE* dos *amplicons* sequenciados com a mesma tecnologia.¹⁴ Também foi demonstrado que a interpretação sorológica de anticorpos Rh inesperados (definidos como anticorpos contra antígenos de *RH* para os quais os glóbulos vermelhos do paciente são positivos) que justificaram a investigação molecular, eram imprecisos em 62% dos pacientes estudados. O e parcial (*RH5*), associado ao aloanticorpo anti-e, representou a maioria dos diagnósticos não concluídos amplamente interpretados como anti-e auto-direcionados (42,8% dos casos) e representando um potencial fator de risco para reações hemolíticas pós-transfusionais. Esta situação destaca o fato de ser altamente recomendável uma avaliação molecular abrangente dos genes *RHD* e *RHCE* em pacientes com DF com suspeita sorológica do fenótipo Rh variante, a fim de garantir a segurança transfusional.

Conforme já mencionado anteriormente, o surgimento de plataformas *NGS* tornou possível o sequenciamento do *lócus RH* com alta performance e custo não elevado.²⁰ O primeiro relatório de sequenciamento *RHD/RHCE* com o teste de *NGS* foi publicado em um estudo apresentado por Stabentheiner S.⁹¹ Em 2011, Noizat-Pirenne F utilizou uma estratégia semelhante ao deste estudo, ou seja, *primers* gene específicos para a amplificação de regiões de interesse na etapa da construção da biblioteca, identificando variantes dentro do gene *RHD* em 21 doadores com fenótipo D fraco.¹²

Em 2013, um estudo sobre análise genômica que busca melhorias na terapia transfusional em pacientes com DF, publicado por Reid, utilizou um protótipo *RHD* e *RHCE* *BeadChips*TM para avaliar a utilidade dos microarranjos de DNA na predição de fenótipos Rh das hemácias de doadores em pacientes politransfundidos de ascendência africana, demonstrando a partir de seus resultados a discrepância, para ambos os *BeadChips*TM, na discriminação dos alelos *RH* específicos, enfatizando a utilização da técnica como complementar a testes sorológicos e promovendo o SNG, não apenas de forma abrangente, mas também com eficiência e baixo custo.^{108, 113}

Yann Fichou e colaboradores publicaram inúmeros estudos relacionados à genotipagem do sistema Rh também utilizando a metodologia *NGS Ion Torrent*. Dentre eles, em Julho de 2016, o grupo francês genotipou 17 genes envolvidos em 14 sistemas de grupos sanguíneos em uma coorte de 48 pacientes com DF.⁸⁹ Em relação ao gene *RH*, não puderam ser interpretadas algumas regiões homólogas de *RHD* e *RHCE*, éxons 1 e 2, não fornecendo assim uma estratégia ao status Rh em um único experimento. Em 2017, o mesmo grupo francês publicou uma revisão da plataforma de sequenciamento, enfatizando a permanente dificuldade em genotipar esses genes, devido a sua estrutura complexa e homóloga, bem como a alta variabilidade de seus numerosos alelos variantes, demonstrando o quão vantajosa é a metodologia na identificação da ligação cis/trans desses polimorfismos, o que não é possível por outros métodos convencionais.¹⁴

Diferentes estudos objetivaram usar o NGS para a genotipagem completa de grupos sanguíneos usando uma variedade de abordagens. Chou e Schoeman, com seus respectivos colaboradores, usaram o sequenciamento de exoma para identificar variantes Rh, mas a alta similaridade entre os genes *RHD* e *RHCE* dificultou a análise de dados, especialmente nos éxons 8 e 10, onde não há diferenças entre os 2 genes.^{30,114} Hyland e seus colaboradores usaram a metodologia de PCR de longo alcance para amplificar o gene *RHD*, do éxon 2 ao éxon 7 e omitiram os éxons 1, 8, 9 e 10.³⁴

O estudo realizado em 2019 por Tounsi, Madgett e Avent utilizou a metodologia de Hyland para amplificar o gene completo para obtenção de toda

a sequência de *RHD*, incluindo promotores, íntrons e todos os éxons, partindo da premissa de que quando há falhas na sorologia em determinar uma variante RhD e outras plataformas não conseguem detectar o alelo *RHD*, o trabalho de acompanhamento exigiria apenas o sequenciamento do gene *RHD* para determinar as alterações exatas dos nucleotídeos, não sendo necessário o sequenciamento do gene *RHCE*.¹¹⁵ Muito embora a técnica de PCR de longo alcance tenha sido eficiente na amplificação do gene para sequenciamento, esta se mostrou ser limitada em relação à amplificação de alelos híbridos *RHD-RHCE* ou alelos D parciais. Uma possibilidade de solução futura seria a utilização de uma abordagem com *primer* híbrido, ou seja, um *primer forward* específico para *RHD* e um *primer reverse* específico para *RHCE*, nesse caso os genótipos definitivos das amostras poderiam ser confirmados pelo sequenciamento do gene *RHCE* além do *RHD*, entretanto, a ausência desta complementação, gerou uma limitação do estudo em questão.

Os estudos NGS identificaram um número maior do que o esperado de variações genéticas, especialmente para RhD, onde existe uma variedade de variantes alélicas Rh, algumas das quais são difíceis de serem detectadas sorologicamente, dando assim um falso resultado Rh negativo e levando à aloimunização se transfundido em receptores RhD negativo. No entanto, é crucial contar com o *pipeline* de análise de bioinformática compartilhado e padronizado para fornecer dados robustos sobre o genótipo, corrigindo a relação entre o genótipo e o fenótipo do paciente.¹¹⁶

De acordo com nossos resultados, os genótipos obtidos foram específicos para *RHD* e *RHCE* e superiores ao sequenciamento *Sanger* no que diz respeito à resolução da *cis/trans* de polimorfismos, bem como na detecção de inserções e deleções.¹² O alelo *RHCE**C é facilmente identificado pelo ensaio NGS proposto. Além disso, dois pacientes estudados exibiram vários polimorfismos em ligações *cis* e *trans* (os pacientes 2 e 17), sendo a interpretação alélica facilitada pelo uso da ferramenta NGS. A estratégia adotada neste estudo também está de acordo com relatórios anteriores de sequenciamento do antígeno leucocitário humano (*HLA*) usando o *Ion Torrent*

PGM™ System, que amplificava e fragmentava produtos contíguos gerados por PCRs de longo alcance com *primers* específicos para esses alelos.²¹

A principal desvantagem do ensaio proposto baseado em *NGS* é a exigência de um trabalho árduo. Com relação a este fato, já foi demonstrada que a adoção de uma estratégia *NGS* baseada na amplificação *AmpliSeq™* é uma alternativa muito mais rápida, porém imprecisa ao genotipar os éxons 1 e 2 de *RHD* e *RHCE*, originando resultados inespecíficos e ambíguos.^{13,14} Para superar esse problema, uma abordagem complementar com os éxons 1 e 2 dos *primers* específicos para os genes *RHD/RHCE* deve ser utilizada em associação com a abordagem baseada no *AmpliSeq*, ou a interpretação do resultado deve ser complementada por PCR convencional.^{13,14} Se outra metodologia baseada em *NGS* fosse utilizada, ao invés da abordada no presente estudo, mutações envolvendo os éxons 1 ou 2 de *RHCE* poderiam ter sido perdidas ou mal interpretadas. Esta situação representaria 84% de todos os alelos *RHCE* variantes aqui encontrados, uma vez que a mutação *RHCE c.48G >C* foi a variação genética *RHCE* mais frequentemente identificada envolvendo o éxon 1 do *RHCE*, e cuja homologia com o *RHD* é alta. Embora a abordagem *NGS* gene específica proposta por nosso estudo possa levar muito tempo para ser realizada, ela ainda é superior ao sequenciamento *Sanger* convencional, que requer as mesmas etapas para amplificação da região codificante de *RHD* e *RHCE*, porém, pode exigir múltiplas repetições devido à falha na sequência direta, ou reversa, bem como a sobreposição parcial, além disso, o sequenciamento *Sanger* é de difícil interpretação nos casos de inserções, deleções e alelos híbridos, que são comumente encontrados no *locus RH* de pacientes com DF.

Nossos resultados também mostram que o sequenciamento dos genes *RHD* e *RHCE* de pacientes com DF com suspeita de variantes Rh é recomendado. Em 62% dos pacientes com anticorpos Rh inesperados, a distinção sorológica entre anticorpos autodirecionados ou não autodirecionados foi imprecisa, devido à limitação do método utilizado. A classificação duvidosa de anticorpos anti-Rh expôs pacientes a adversidades, como a transfusão de unidades RhD negativo (RhD-, RhC-, RhE-, RhE+, RhC+) para pacientes sem

anormalidade no *locus RHD*, expondo-os ao desenvolvimento de anticorpos contra os antígenos Fya, S e Jkb, que são expressos pelas hemácias RhD-negativo que são, principalmente, provenientes de doadores caucasianos. Tal fato acarreta, além disso, a escassez de unidades de hemácias RhD negativo disponíveis para transfusão, com risco aumentado de privar os pacientes de sexo feminino ao suporte transfusional adequado e, ainda, ao risco aumentado de reações transfusionais hemolíticas tardias e incremento transfusional inadequado no caso de pacientes com aloanticorpos anti-e classificados como autoanticorpos.

Embora os métodos convencionais de PCR e os ensaios de *DNA-array*, projetados para cobrir algumas variações genéticas de *RHD/RHCE*, sejam eficientes na detecção das variantes parciais de Rh mais comuns, eles são incapazes de excluir a presença de anormalidades no *locus RH* e também não levam em consideração uma significativa gama de alelos nunca descritos entre pessoas de ascendência africana.^{9,10} O sequenciamento dos éxons *RHD* e *RHCE* de pacientes com DF supera essas dificuldades e, como demonstrado por nossos resultados, aumentam potencialmente a segurança e o suporte transfusional. Confiar nos resultados sorológicos para classificação dos antígenos Rh como parciais mostrou-se falho em nossas análises e isso está de acordo com relatos prévios na literatura.²² O principal fator limitante das técnicas sorológicas é a ocorrência de transfusões recentes, frequentemente omitidas pelos pacientes com DF, quando realizadas fora do banco de sangue de referência, conforme demonstrado anteriormente por nossa equipe.³ Provavelmente essa é a causa do alto percentual de anti-e classificado sorologicamente como auto anti-e de forma incorreta.

Mais importante do que nomear uma variante Rh detectada é determinar se o gerenciamento de transfusões dos pacientes precisa ser modificado após sua identificação.⁷ Após nossos resultados, todos os pacientes identificados incorretamente como variante RhD começaram a receber hemácias D-positivo e, conforme relatado anteriormente, em um caso o intervalo de transfusão aumentou significativamente, o que está sendo avaliado com critério, mas provavelmente o fato se reflete ao evitar o fenótipo

caucasiano preponderante em doadores RhD-, RhC-, RhE-, Rhc+, Rhe+. Além disso, pacientes propensos ao desenvolvimento de anticorpos contra antígenos Rh de alta frequência sofreram alterações de conduta transfusional, diminuindo a frequência de transfusões programadas, aumentando a dose de hidroxirúria e buscando doadores idênticos aos haplótipos em seus irmãos.

Este estudo confirma os desafios em pacientes com transfusão múltipla para determinar se os anticorpos Rh inesperados são alo ou autoanticorpos e mostra como a genotipagem de *RH* pode orientar a terapia transfusional. A auto-reatividade sorológica é frequentemente utilizada como substituto para prever significância clínica. No entanto, a definição se determinado anticorpo é autorreativo depende da realização de auto-adsorções com hemácias próprias, fato dificultado pela presença de transfusões recentes na população com DF. Estudos de adsorção complexos com hemácias Rh genótipo variante estão disponíveis apenas em laboratórios de referência de alta complexidade, além disso, os resultados e interpretações podem ser subjetivos e sujeitos a diluição da reatividade do anticorpo.

O presente estudo tem algumas limitações. O incremento transfusional dos pacientes que apresentam anti-e ao receber, tanto R₂R₂ quanto unidades de hemácias incompatíveis, não pôde ser determinado, uma vez que avaliação da quantidade HbA1 no pós transfusional não foi realizada nos pacientes incluídos no estudo. Além disso, os pacientes não foram reavaliados quanto aos dados sorológicos, pois a maioria deles sofreu transfusões recentes dentro e fora do centro de referência.

Recentemente, Chou e colegas avaliaram a viabilidade do fornecimento, para uma coorte de pacientes afro-americanos com *DF* em transfusão crônica, com unidades genótipo compatíveis para *RH* e *Kell* em todas as transfusões. Em seu trabalho ficou demonstrado que, para atender a este requisito seria necessário aumentar em 25% a quantidade de doações quando comparadas ao fornecimento de unidades de doadores de ascendência africana, com a combinação sorológica para CEK.¹¹⁷

Embora sejam necessários mais estudos, incluindo resultados clínicos, para determinar a importância da transfusão associada à seleção de unidades baseadas na genotipagem de *RH*, é nitidamente observado aqui que a genotipagem de *RHD* e *RHCE* é fundamental para começar a desenvolver protocolos de transfusão e alocar o uso racional de unidades RhD negativo.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

O ensaio baseado em *NGS* projetado para sequenciar regiões codificantes de *RHD* e *RHCE* provou ser eficaz e preciso na identificação de variantes de *RH* entre pacientes com DF com anticorpos Rh inesperados, bem como superior ao método convencional de sequenciamento *Sanger*. Além disso, o sequenciamento dos genes *RHD* e *RHCE* por meio de *NGS* esclareceu o fenótipo Rh da maioria dos pacientes com DF, diminuindo os riscos de reações transfusionais tardias e melhorando o suporte à transfusão.

8 ANEXOS

8.1 Anexo A - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA DE NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **“Identificação das variantes dos genes *RHD* e *RHCE* em pacientes com anemia falciforme usando estratégia de Sequenciamento de Nova Geração”**

PESQUISADORA : INGRID HELENA RIBEIRO

CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADORA

UNIDADE DO HCFMUSP: FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE HEMOCENTRO DE SÃO PAULO

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ **X** RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1 – O(A) senhor(a) está sendo convidado a participar do presente

Identificação das variantes dos genes RHD e RHCE em pacientes com anemia falciforme usando estratégia de Sequenciamento de Nova Geração

Este tem como objetivo verificar se os pacientes com anemia falciforme que recebem transfusões e tem suspeita de modificações na proteína Rh apresentam variações genéticas no gene *RHD* e no gene *RHCE*. Se estas alterações forem identificadas, há a possibilidade de selecionar unidades de hemácias mais compatíveis para a transfusão, evitando assim a ocorrência de reações transfusionais.

2 – Para este estudo será realizada a avaliação do gene em questão por meio da técnica de genotipagem do DNA (material genético obtido a partir do sangue) de pacientes que sejam transfundidos pela Agência Transfusional Central da Fundação Pró-Sangue, e que tenham idade superior a 18 anos, como o caso do senhor(a). O banco de sangue rotineiramente pesquisa se existem anticorpos contra antígenos dos glóbulos vermelhos antes de liberar qualquer transfusão e estas só são liberadas se estiverem totalmente compatíveis.

3 – Não precisaremos coletar nenhuma amostra adicional do senhor(a). Pedimos autorização para utilizar a amostra que já foi coletada para determinar seu tipo sanguíneo pelo banco de sangue, para extrair o DNA e fazer a técnica de genotipagem;

4 – Não existem, desta forma, riscos físicos para o(a) senhor(a) envolvidos com esta pesquisa;

5 – Há benefícios diretos da pesquisa para o senhor. Se identificarmos qual a exata modificação dos genes *RHD* e *RHCE*, saberemos qual o tipo de variação da proteína Rh que o senhor apresenta e poderemos evitar reações transfusionais futuras. É importante lembrar que as alterações que estamos estudando nos genes *RHD* e *RHCE* não estão associadas ao aparecimento de doenças, sendo somente associada à formação de anticorpos (defesa imune) após a exposição à proteína Rh de outros indivíduos (doação de sangue);

6– Esse estudo não interferirá com nenhum de seus tratamentos;

7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal pesquisadora é a

aluna de mestrado Ingrid Helena Ribeiro, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1º andar, laboratório de Imunohematologia; ou pelo telefone (11)45737657. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): **Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000** Tel: 3893-4401/4407 E-mail: cep.fm@usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e com isso, deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais desta pesquisa;

11 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação;

12 – Somente utilizaremos os dados e o material coletado para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o presente **“IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES RHD E RHCE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME USANDO ESTRATÉGIA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO”**

Eu discuti com a pesquisadora Ingrid Helena Ribeiro sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente

Data ____ / ____ / ____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

8.2 Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 15 de Agosto de 2016

Ilmo(a)
Dr(a). Dr. Carla Luana Dinardo
(aos cuidados de Ingrid Helena Ribeiro)

A Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, tomou ciência do projeto classificado sob o número CPE-IMT 000317 e intitulado '**IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES RHD E RHCE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME USANDO ESTRATÉGIA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**'

O projeto deverá ser enviado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para aprovação final.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES RHD E RHCE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME USANDO ESTRATÉGIA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.

Pesquisador: INGRID HELENA RIBEIRO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62572016.7.0000.0065

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO PRO-SANGUE HEMOCENTRO DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.977.112

Apresentação do Projeto:

Pacientes em regime crônico de transfusão, principalmente falcêmicos, tem uma elevada taxa de aloimunização, sendo que a alta frequência de variantes de RHD e RHCE nestes pacientes também contribui para essa alta sensibilização. A caracterização molecular das variantes Rh é recomendada aumentando a segurança transfusional destes pacientes que muitas vezes desenvolvem anticorpos após a transfusão de sangue.

Com base nesta constatação, o estudo pretende identificar variantes de antígenos do sistema de grupo sanguíneo Rh, de material proveniente de pacientes com anemia falciforme, atendidos na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, dos genes RHD E RHCE, através de sequenciamento de nova geração, permitindo traçar o perfil molecular destas variantes, bem como propiciar transfusões compatíveis para os pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar variantes de antígenos do sistema de grupo sanguíneo Rh através de sequenciamento de nova geração.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3693-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 1.977.112

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem risco, uma vez que o material utilizado neste estudo, será o mesmo que o coletado para exame de rotina.

Benefício: A identificação do tipo de variação da proteína Rh poderá evitar reações transfusionais futuras.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A caracterização molecular das variantes Rh se torna importante para uma segurança transfusional destes pacientes que muitas vezes desenvolvem anticorpos após a transfusão de sangue.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No TCLE, foi incluído item destacando o direito do paciente à indenização, conforme previsto na resolução 466/2012.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas neste segundo relato, aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_831242.pdf	20/02/2017 14:28:14		Aceito
Outros	folhaderostoonline.PDF	20/02/2017 14:27:48	INGRID HELENA RIBEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	cartasanuencia.pdf	15/12/2016 14:00:27	INGRID HELENA RIBEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	15/12/2016 13:56:32	INGRID HELENA RIBEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	29/11/2016 11:06:43	INGRID HELENA RIBEIRO	Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.977.112

Outros	aprovação.PDF	29/11/2016 11:05:00	INGRID HELENA RIBEIRO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.PDF	29/11/2016 10:57:40	INGRID HELENA RIBEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO PAULO, 22 de Março de 2017

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

8.3 Anexo C - Relatório de Usuário dos *Chips* SN2-201-Ingrid e SN2-202-Ingrid

Relatório do usuário

_SN2-201-Ingrid_20102016_hg19

Resumo do Alinhamento (Alinhado com *Homo sapiens*)

_SN2-201-Ingrid_20102016_hg19

Relatório do usuário

SN2-202-Ingrid_chip2_20102016_hg19

Resumo do Alinhamento (Alinhado com *Homo sapiens*)

SN2-202-Ingrid_chip2_20102016_hg19

398 M

94

Total de bases

Sinal chave

87%

carregamento ISP

Densidade ISP

Histograma de Comprimento de
leitura

9 Referências

9 REFERÊNCIAS

- 1 – Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 2000;95:3662-8.
- 2 – Ferreira SBP, et al. Sick cell anemia in Brazil: personal, medical and endodontic patterns. *Braz Oral Res*. 2016;30:386-92.
- 3 – Murao M, Viana M. Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38:675-82. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2005000500004>. Acesso em: 29 nov. 2019.
- 4 – Moreira Junior G, Bordin JO, Kuroda A, Kerbaux J. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: the influence of racial and antigenic pattern differences between donors and recipients in Brazil. *Am J Hematol*. 1996;52:197-200.
- 5 – Zalpuri, Saurabh. Ntensive red blood cell transfusions and riskof alloimmunization. *Transfusion*. 2014; 54: 278-84.
- 6 – Chou ST, Liem RI, Thompson AA. Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. *Br J Haematol*. 2012;159: 394-404.
- 7 – Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood*. 2012;120:528-37.
- 8 – Dezan MR. et al. Effectiveness of a red cell antigen-matching transfusion protocol in sickle cell disease patients – São Paulo. *Inter Soc Blood Transf*. 2016:1-8.
- 9 – Hendrickson JE, Chadwick TE, Roback JD, Hillyer CD, Zimring JC. Inflammation enhances consumption and presentation of transfused RBC antigens by dendritic cells. *Blood*. 2007;110:2736-43.
- 10 – Dinardo CL, Ito GM, Sampaio LR, Mendrone Junior A. Study of possible clinical and laboratory predictors of alloimmunization against red blood cell antigens in cancer patients. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2013;35:414-6.

- 11 – Vichinsky EP, Luban NL, Wright E, Olivieri N, Driscoll C, Pegelow CH, Adams RJ. A stroke prevention trial in sickle cell, prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. *Transfusion*. 2001;41:1086-92.
- 12 – Noizat-Pirenne F, Tournamille C. Relevance of RH variants in transfusion of sickle cell patients. *Transf Clin Biol*. 2011;18:527-35. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2011.09.001>. Acesso em: 11 mar. 2020.
- 13 – 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. *Transf Med*. 2005;15:49-55. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3148.2005.00548.x>. Acesso em: 24 jan. 2020.
- 14 – Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol*. 2005;14:143-53.
- 15 – Dezan MR, et al. RHD and RHCE genotyping by next-generation sequencing is an effective strategy to identify molecular variants within sickle cell disease patients. *Blood Cell Mol Dis*. 2017;65:8-15. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.03.014>. Acesso em: 17 fev. 2020.
- 16 – Lomas-Francis C. Testing for rare blood donors by DNA analysis. *ISBT Sc Series*. 2006;1:213-9.
- 17 – Avent ND. Large-scale blood group genotyping - clinical implications. *Brit J Haematol*. 2008; 144:3-13.
- 18 – Reid ME, Francis CL, Olsson ML. *The blood group antigen: Rh blood group system*. 3ª ed. New York, Academic Press; 2012.
- 19 – Reid ME. From DNA to blood groups. *Immunohematology*. 2008;24:166-9.
- 20 – ISBT, International Society of Blood Transfusion. Disponível em: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>. Acesso em: 19 dez. 2017.
- 21 – Daniels G, Van Der Schoot CE, Gassner C, Olsson ML. Report of the third international workshop on molecular blood group genotyping. *Vox Sanguinis*. 2009;96:337-43.
- 22 – Galiza Neto GC de, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J Bras Patol Med Lab*. 2003:51-6.
- 23 – Daniels G, Reid ME. Blood groups: the past 50 years. *Transfusion*. 2010;50:281-9.

- 24 – Orlina AR, Unger PJ, Koshy M. Post-transfusion alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*. 1978;5:101-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.2830050204>. Acesso em: 20 mar. 2020.
- 25 – Helman R, Olivatto C, Cançado RD. Incidence of alloimmunization in sickle cell disease: experience of a center in São Paulo. *Hosp Israelita Albert Einstein*. 2011;9:160-4.
- 26 – Murphy MF, Pamphilon DH. *Practical transfusion medicine*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2009.
- 27 – Zheng Y, Maïtta RW. Alloimmunization rates of sickle cell disease patients in the United States differ from those in other geographical regions. *Transf Med*. 2016;26:225-30.
- 28 – Castilho L, Pellegrino Junior J, Reid ME. Fundamentos de imunohematologia. São Paulo: Atheneu; 2016:232.
- 29 – Orlina AR, Sosler SD, Koshy M. Problems of chronic transfusion in sickle cell disease. *J. Clin. Apheresis*. 1991;6:233-40.
- 30 – Coles SM, Klein HG, Holland PV. Alloimmunization in two multitransfused patient populations. *Transfusion*. 1981;21:462-6.
- 31 – Salmon CH, Cartron JP, Rouger PH. Les groupes sanguins. Masson. *Chez l'Homme*. 1990;371-93.
- 32 – Fasano RM, Booth GS, Miles M, Du L, Koyama T, Meier ER, Luban NLC. Red blood cell alloimmunization is influenced by recipient inflammatory state at time of transfusion in patients with sickle cell disease. *Brit J Haematol*. 2014;168:291-300.
- 33 – Sins JWR, Biemond BJ, Van Den Bersselaar SM, et al. Early occurrence of red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2016;91:763-9.
- 34 – Allali S, Peyrard T, Amiranoff D, Cohen JF, Chalumeau M, Brousse V, et al. Prevalence and risk factors for red blood cell alloimmunization in 175 children with sickle cell disease in a French university hospital reference center. *Brit J Haematol*. 2017;177:641-7.
- 35 – Papay P, Hackner K, Vogelsang H, et al. High risk of transfusion-induced alloimmunization of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Med*. 2012; 125:717.
- 36 – Chou ST, Evans P, Vege S, et al. RH genotype matching for transfusion support in sickle cell disease. *Blood*. 2018;132:1198-207.

- 37 – Gomes EG da Cunha, Machado LAF, Oliveira LC de, N Neto JF. The erythrocyte alloimmunization in patients with sickle cell anaemia: a systematic review. *Transf Med.* 2018;29:149-61. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/tme.12543>. Acesso em: 15 jan. 2020.
- 38 – Fasano RM, Miller MJ, Chonat S, Stowell SR. Clinical presentation of delayed hemolytic transfusion reactions and hyperhemolysis in sickle cell disease. *Trans Clin Biol.* 2019;26:94-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.traccli.2019.02.002>. Acesso em: 28 fev. 2020.
- 39 – Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel WA, Garratty G, Francis CL, et al. International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetic and blood group terminology. *Berlin report. Vox Sang.* 2011;101:77-82.
- 40 – Race RR. Modern concepts of the blood group system. *Ann NY Acad Scienc.* 1965;127:884-91.
- 41 - Mollison PL. Immunology of red cells. In: Mollison PL. *Blood Transfusion in Clinical Medicine.* 2005:48-113.
- 42 – Le Van Kim C, Mouro I, Chérif-Zahar B. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;89:925-9.
- 43 – Chérif-Zahar B, et al. Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:6243-7.
- 44 – Daniels G. Human blood groups: Rh and RHAG blood group systems. *Bristol.* 2013.
- 45 – Simsek S, Jong CA, Cuijpers HT. Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNAs coding for Rh polypeptides and demonstration of E/e and C/c polymorphisms. *Vox Sang.* 1994;67:203-9.
- 46 – Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood.* 2000;95:375-87.
- 47 – Bortolotto NA, et al. Frequência do sistema Rh e Kell nos doadores do hemocentro de Santa Maria. *Rev. Saúde, Periódicos.UFSM.BR.* 2011;37:49-56.
- 48 – Mota MA. Identificação do gene RHD em doadores voluntários de sangue fenotipados como RHD negativo utilizando pools de DNA (tese). Campinas: Universidade Estadual Campinas, 2012.

- 49 – Hue-Roye K, Hipsky CH, Velliquette RW, et al. A novel RHCE*ce 48C, 733G allele with Nucleotide 941C in Exon 7 encodes an altered red blood cell e antigen. *Transfusion*. 2011; 51:32-5.
- 50 – Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, Castro O, Dosik H, Moohr J, et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. 1990;76:1431-7.
- 51 – González B, Alfredo H. El sistema Rh, una mirada a fondo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2005;43:3-8.
- 52 – Westhoff CM. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. *Transfusion*. 2004;44:1663-73. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0041-1132.2004.04237.x>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- 53 – Lomas C, Tippet P, Thompson KM. Demonstration of seven epitopes on the D antigen using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang*. 1984;57:261-4.
- 54 – Tippet P, Lomas-Francis C, Wallace M. The Rh antigen D: partial D antigen and associated low incidence antigen. *Vox Sanguinis*. 1996;70:123-31.
- 55 – Müller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel W, Schönitzer D, Schunter F, Gassner C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central Europeans populations. *Transfusion*. 2001;41:45-52.
- 56 – Sandler SG, Chen LN, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *Brit J Haematol*. 2017;179:10-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.14757>. Acesso em: 22 jan. 2020.
- 57 – Sandler SG, et al. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*. 2015;55:680-9.
- 58 – Huang CH, Ye M. The Rh protein family: gene evolution, membrane biology, and disease association. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:1203-18.
- 59 – Körmöcz GF, Gassner C, Shao PS, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion*. 2005;45:1561-7.
- 60 – Colin Y, et al. Genetic basis of the RhD positive and RhD negative blood group polymorphism as determined by southern analysis. *Blood*. 1991;78:2747-52.

- 61 – Gassner C, et al. Presence of RHD in serologically D–, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*. 2005;45:527-38.
- 62 – Flegel WA, Von Zabern I, Wagner FF. Six years experience performing RHD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion*. 2009;49:465-71.
- 63 – Singleton BK, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000;95:12-8.
- 64 – Mouro I, Le Van Kim C, Rouillac C. Rearrangements of the blood group RhD gene associated with the DVI category phenotype. *Blood*. 1994;83:1129-35.
- 65 – Issitt PD. Recent advances in the Rh blood group system. *Vox Sanguinis*. 1996;70:26-30.
- 66 – Faas B, Beuling EA, Christiaens GC, Von Dem Borne AE, Van Der Shoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet*. 1998;352:1196.
- 67 – Carritt B, Kemp TJ, Poulter M. Evolution of the human Rh (Rhesus) blood group genes: A 50 years old prediction (partially) fulfilled. *Human Molecular Genetic*. 1997;6:843-50.
- 68 – Poulter M, Kemp T, Carritt B. DNA-based Rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHD status using the polymerase chain reaction. *Vox Sanguinis*. 1996;70:164-8.
- 69 – Wolter LC, Hyland CA, Saul A. Refining the DNA polymorphisms that associate with the rhesus c phenotype. *Blood*. 1994;84:985-6.
- 70 – Daniels GL, Faas BH, Green CA, Smart E, Maaskantvan Wijk PA, Avent ND, Ondervan HA, Von Dem Borne AE, Van Der Schoot CE. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion*. 1998;38:951-8.
- 71 – Daniels G, Poole G, Poole J. Partial D and weak D: can they be distinguished? *Transf Med*. 2007;17:145-6.
- 72 – Flegel WA, Curin-Serbec V, Delamaire M, Donvito B, Ikeda H, Jorgensen J, et al. Section 1B: Rh flow cytometry. Coordinator's report. Rhesus index and antigen density: an analysis of the reproducibility of flow cytometric determination. *Transf Clin Biol*. 2002;9:33-42.

- 73 – Flegel WA, Von Zabern I, Doescher A, Wagner FF, Strathmann KP, Geisen C, et al. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. *Transfusion*. 2009;49:1059-69.
- 74 – Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Muller TH, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*. 2000;95:2699-708.
- 75 – Noiza-Pirenne F, Bachir D, Chadebech P, Michel M, Plonquet A, Lecron JC, et al. Rituximab for prevention of delayed hemolytic transfusion reaction in sickle cell disease. *Haematologica*. 2007;92:132-5.
- 76 – Pham BN, Peyrard T, Juszczak G, Beolet M, Deram G, Martin-Blanc S, et al. Analysis of RhCE variants among 806 individuals in France: considerations for transfusion safety, with emphasis on patients with sickle cell disease. *Transfusion*. 2011;51:1249-60.
- 77 – Chou ST, Jackson T, Vege S, Smith-Whitley K, Friedman DF, Westhoff CM. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood*. 2013;122:1062-71. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-03-490623>. Acesso em: 03 fev. 2020.
- 78 – Noizat-Pirenne F, Lee K, Pennec PY, Simon P, Kazup P, Bachir D, et al. Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety. *Blood*. 2002;100:4223-31.
- 79 – Noizat-Pirenne F, Mouro I, Le Pennec PY, Ansart-Pirenne H, Juszczak G, Patereau C, et al. Two new alleles of the RHCE gene in black individuals: the RHce allele ceMO and the RHcE allele cEMI. *Br J Haematol*. 2001;113:672-9.
- 80 – Phyllis Moores DSC. Rh18 and hrS Blood Groups and Antibodies. *Vox Sanguinis: Int J Transf Med*. 2009;66:225-30.
- 81 – Marais I, Moores P, Smart E, Martell R. STEM, a new low-frequency Rh antigen associated with the e-variant phenotypes hrS– (Rh: 18, 19) and hrB– (Rh: 31, 34). *Transfusion*. 1993;3:35-41.
- 82 – Reid ME, Hipsky CH, Hue-Royce K, Hoppe C. Genomic analyses of RH alleles to improve transfusion therapy in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2014;52:195-202. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.11.003>. Acesso em: 10 ago. 2019.
- 83 – Ribeiro KAR. Genotipagem eritrocitária em larga escala: Impacto na medicina transfusional. 97 f. Tese (Doutorado) - *Curso de Ciências Básicas, Universidade Estadual de Campinas*. 2009.

- 84 – Maaskant-Van Wijk PA, Faas BH, Ruijter JA de, Overbeeke MA, Von Dem Borne AE, Van Rhenen DJ, et al. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion*. 1998;38:1015-21.
- 85 – Anstee DJ. Goodbye to agglutination and all that? *Transfusion*. 2005;45:652-3.
- 86 – Frequently Asked Questions About The Human Genome Project. Disponível em: <http://www.genome.gov/11006943>. Acesso em: 27 Jan. 2017.
- 87 – Stabentheiner S, Danzer M, Niklas N, Atzmüller S, Proll J, Hackl C, et al. Overcoming methodical limits of standard RHD genotyping by next-generation sequencing. *Vox Sang*. 2011;100:381-8.
- 88 – Mardis ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*. 2011.
- 89 – Fichou Y, Mariez M, Le Marechal C, Ferec C. The experience of extended blood group genotyping by next-generation sequencing (NGS): investigation of patients with sickle-cell disease. *Vox Sang*. 2016;111:418-24.
- 90 – Fichou Y, Audrezet MP, Gueguen P, Le Marechal C, Ferec C. Next-generation sequencing is a credible strategy for blood group genotyping, *Br. J. Haematol*. 2014;167:554-62.
- 91 – Leamon JH, Rothberg JM, Chem. Rev. 2007;107:3367-76.
- 92 – The International Technology Roadmap for Semiconductors Consortium, International Technology Roadmap for Semiconductors. 2011. Disponível em: <http://www.itrs.net>, <http://www.itrs.net/Links/2011ITRS/Home2011.htm>. Acesso em 05 fev. 2020.
- 93 – Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM. *Nature*. 2011;475:348-52.
- 94 – Pabinger S, Dander A, Fischer M, Snajder R, Sperk M, Efremova M, et al. A survey of tools for variant analysis of nextgeneration genome sequencing data. *Brief Bioinform*. 2014;15:256-78.
- 95 – Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*. 2011;12:745-55.
- 96 – Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet*. 2013:295-300.
- 97 – Menck CFM. Genética molecular básica: dos genes aos genomas. *Guanabara Koogan*. 2007:528.

- 98 – Varuzza L. Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração. 2013.
- 99 – Life Technologies Corporation (Germany) (Comp.). Ion Xpress™ Plus gDNA Fragment Library Preparation. *User Guide*. 2015. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0009847_IonXpressPlus_gDNA_FragLibraryPrep_UG.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2016.
- 100 – Jonathan MR, Wolfgang H, Todd MR. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2014;475:348-52.
- 101 – Quail MA, Smith M, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina Mi Seq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13:341. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>. Acesso em: 11 dez. 2019.
- 102 – Merriman B, Team Ion Torrent R&d, Rothberg JM. Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*. 2012;33:3397-417. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201200424>. Acesso em: 18 mar. 2020.
- 103 – Margulies M, Egholm M. Altman, *Nature*. 2005;437:376-80.
- 104 – Rothberg JM, Leamon JH. *Nat Biotechnol*. 2008;26:1117-24.
- 105 – Scientific, Thermo Fisher. Ion Reporter™ Software 5.10. *User Guide*. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017605_IonReporter5_10_UG.pdf. Acesso em: 23 jul. 2018.
- 106 – Legler TJ, Maas JH, Köhler M, et al. RHD sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. *Transfus Med*. 2001;11:383-8.
- 107 – Legler TJ, Maas JH, Köhler M, et al. Sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. *Transf Med*. 2001;11:383-88.
- 108 – St-Louis M, Perreault J, Lemieux R. Extended blood grouping of blood donors with automatable PCR-ELISA genotyping. *Transfusion*. 2003;43:1126-32.
- 109 - Wijk PA Maaskant-van, et al. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion*. 1998;38:1015-21.
- 110 - Perco P, et al. Testing for the D zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. *Transfusion*. 2003;43:335-9.

- 111 - Chiu RWK, et al. Determination of RhD Zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin Chem*. 2001;47:667-72. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/47.4.667>. Acesso em: 7 jan. 2020.
- 112 - Singleton BK, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000;95:12-8.
- 113 - Tax MG, Van Der Schoot CE, Van Doorn R, Douglas-Berger L, Van Rhenen DJ, Maaskant-Van Wijk PA. RhC and Rhc genotyping in different ethnic groups. *Transfusion*. 2002;42:634-44.
- 114 - Schoeman EM, Roulis EV, Liew YW, et al. Targeted exome sequencing defines new and rare variants in complex blood group serology cases for a red blood cell reference laboratory. *Transfusion*. 2018;58:284-93.
- 115 - A Tounsi W. Complete RHD Next-Generation Sequencing: Establishment of Reference RHD Alleles. *Blood*. 2018;20:2713-23.
- 116 - Belsito A, Magnussen K, Napoli C. Emerging strategies of blood group genotyping for patients with hemoglobinopathies. *Trans Apheresis Sci*. 2017;56:206-13.
- 117 – Chou ST, Evans P, Vege S, et al. RH genotype matching for transfusion support in sickle cell disease. *Blood*. 2018;132:1198-207.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice A - Artigo publicado no Blood Cells, Molecules and Diseases, 2017

Blood Cells, Molecules and Diseases 65 (2017) 8–15

Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd

RHD and *RHCE* genotyping by next-generation sequencing is an effective strategy to identify molecular variants within sickle cell disease patients

Marcia R. Dezan^a, Ingrid Helena Ribeiro^a, Valéria B. Oliveira^a, Juliana B. Vieira^a, Francisco C. Gomes^a, Lucas A.M. Franco^b, Leonardo Varuzza^b, Roberto Ribeiro^b, Karen Ziza Chinoca^c, José Eduardo Levi^a, José Eduardo Krieger^c, Alexandre Costa Pereira^d, Sandra F.M. Gualandro^c, Vanderson G. Rocha^{a,c}, Alfredo Mendrone-Junior^a, Ester Cerdeira Sabino^b, Carla Luana Dinardo^{a,d,*}

^a Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Institute of Tropical Medicine, Department of Infectious Disease, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Discipline of Hematology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

^d Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo school of Medicine

ARTICLE INFO

Editor: Mohandas Narla

ABSTRACT

Background: The complexity of Rh genetic variation among sickle cell disease (SCD) patients is high. Conventional molecular assays cannot identify all genetic variants already described for the RH locus as well as foresee novel alleles. Sequencing *RHD* and *RHCE* is indicated to broaden the search for Rh genetic variants. **Aims:** To standardize the Next Generation Sequencing (NGS) strategy to assertively identify Rh genetic variants among SCD patients with serologic suspicion of Rh variants and evaluate if it can improve the transfusion support.

Methods: Thirty-five SCD patients with unexplained Rh antibodies were enrolled. A NGS-based strategy was developed to genotype *RHD* and *RHCE* using gene-specific primers. Genotype and serological data were compared.

Results: Data obtained from the NGS-based assay were gene-specific. Ten and 25 variant *RHD* and *RHCE* alleles were identified, respectively. Among all cases of unexplained Rh antibodies, 62% had been inaccurately classified by serological analysis and, of these, 73.1% were considered as relevant, as were associated with increased risk of hemolytic reactions and shortage of units suitable for transfusion.

Conclusion: The NGS assay designed to genotype *RH* coding regions was effective and accurate in identifying variants. The proposed strategy clarified the Rh phenotype of most patients, improving transfusion support.

1. Introduction

Alloimmunization against red blood cell (RBC) antigens is a major post-transfusion complication among sickle cell disease (SCD) patients that significantly hampers the pre-transfusion process, as it is associated with transfusion delays, late extravascular hemolysis and hyperhemolysis [1,2]. RBC alloimmunization rates vary between 7% and 62.1% in SCD patients [3], and the most important risk factors for alloantibody development are the lifetime number of transfusions and the pre-transfusion recipient inflammation status [3–5]. Providing antigen-matched RBC units is the best prophylaxis for preventing alloimmunization [6], but there are multiple factors that can make this strategy ineffective, represented mainly by the occurrence of transfusions outside the original blood bank and the presence of *RHD* and *RHCE*

variants, whose frequency is high among SCD patients and which are not revealed at the beginning of the prophylaxis [3,7].

There are some molecular strategies currently used to identify *RHD* and *RHCE* genetic variants in daily routine. Bench-made conventional polymerase chain reactions (PCR) are useful for the identification of common Rh variants, but are not assertive in excluding the presence of variant alleles. Even multiplex reactions, designed to screen for multiple *RHD* variants, cannot precisely confirm the variant specificity or exclude the presence of variant proteins in case of negative results [8]. High-throughput DNA-arrays are comprehensive regarding the number of variant alleles included in each assay, taking into consideration the most immunogenic *RHD* and *RHCE* alleles [9]. However, even this strategy does not exclude the presence of variant proteins, especially considering the high frequency of new *RHD* and *RHCE* alleles

* Corresponding author at: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1st floor, Cerqueira César, São Paulo, SP 05403-000, Brazil.
E-mail address: cdinardo@sp.gov.br (C.L. Dinardo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.03.014>

Received 24 January 2017; Received in revised form 21 March 2017; Accepted 21 March 2017

Available online 31 March 2017

1079-9796/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Fig. 1. Nucleotide differences between *RHD* and *RHCE* genes. In the figure, boxes in bold represent the exons. The nucleotide differences between *RHD* and *RHCE* are signed. The high homology between *RHD* and *RHCE* exons 1, 2, 6, 8, 9 and 10 are important to highlight and justify why NGS-based assays designed for the molecular Rh typing have to be adapted so that *RHD* and *RHCE* specific amplicons are individually sequenced or algorithms must be designed for result interpretation.

among sickle cell disease (SCD) patients [10,11].

The complexity of Rh genetic variation among SCD patients poses challenges, as they are a population at-risk of RBC alloimmunization and the development of alloantibodies directed to high frequency RhCE antigens can make the transfusion program, cornerstone of their treatment, unfeasible [7]. Sequencing all *RHD* and *RHCE* coding-regions by Sanger method is indicated to broaden the search for Rh genetic variants, but the results may be difficult to interpret, especially in cases of insertions, deletions and hybrid alleles [12]. Recent advances in next-generation sequencing technologies offer a more comprehensive DNA sequence-based approach to determine Rh variants [13,14], overcoming the limitations of Sanger methodology. However, due to the high homology between *RHD* and *RHCE* genes (Fig. 1), NGS-based assays designed for the molecular Rh typing have to be adapted so that *RHD* and *RHCE* specific amplicons are individually sequenced or algorithms must be designed for result interpretation [13,14].

Based on the exposed, our aim was 1) to standardize a NGS strategy to assertively identify Rh genetic variants among SCD patients with serologic suspicion of RhD or RhCE variant antigens and 2) to evaluate if sequencing *RHD* and *RHCE* genes using the NGS assay would change the transfusion management for this group of SCD patients.

2. Materials and methods

2.1. Study design

The study design is exposed on Fig. 2.

2.2. Standardization step

Six DNA samples with known variant *RHD* genotype were tested in parallel with the proposed NGS-based strategy and the standard Sanger methodology, the latter using cycle sequencing (ABI BigDye Terminator v3.1 kit, Applied Biosystems) and run on an automated sequencer equipment (ABI310, Applied Biosystems), as previously described [15].

In this step, our team selected samples whose Sanger sequencing results were hard to interpret, demanding repetitions. Results were compared.

2.3. *RHD* and *RHCE* genotyping through NGS-based strategy

2.3.1. Patient recruitment

This study was conducted in accordance to Helsinki principles and approved by our local ethical committee (Institute of Tropical Medicine Research and Ethics, protocol number 2014-259). Thirty five sickle cell disease (SCD) patients transfused at Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo between May 2014 and May 2016 with serologic suspicion of Rh variant were included in the study. The inclusion criteria were the presence of unexplained Rh alloantibodies, i.e. patients with positive RBC phenotype for certain Rh antigen exhibiting an antibody directed against it in the sera.

Data referring to RBC antigenic phenotype and development of RBC alloantibodies or autoantibodies were obtained from the blood bank electronic files. All 35 patients were genotyped using bench-made conventional PCR for determining Rh antigens and by next-generation sequencing (NGS) in the Ion Torrent PGM™ System (Thermo Fisher Scientific). Both methodologies are described below and a schematic representation of the NGS workflow is available in the Supplemental material (Fig. 1).

2.3.2. DNA purification and library preparation

Genomic DNA was isolated from peripheral EDTA blood samples using the commercial PureLink Genomic kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. *RHD* and *RHCE* regions of interest (ROI) were amplified as described elsewhere, covering all exons and including short flanking intron sequences [16,17]. Gene-specific primers were selected taken into consideration the nucleotide differences between *RHD* and *RHCE* genes (Fig. 1). Primers and PCR condition are described in the Supplemental material (Table 1). Amplicons were quantified in the Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) with a commercial specific kit (Qubit dsDNA BR Assay Kit,

Fig. 2. Study design representation.

Table 1
Comparison between NGS and Sanger methodology results in the standardization step.

Sample ID	NGS assay		Sanger sequencing				
	Conclusion	Allele drop-out	Conclusion	Partial overlap	Failure of forward sequence	Failure of reverse sequence	Failure of seq sequence
#1	RHD*weak D type 45/Deleted D	None	RHD*weak D type 45/Deleted D	Exon 9	None	Exon 5	Not tested
#2	RHD*Ψ/RHD*weak D type 38	None	RHD*Ψ/RHD*weak D type 38	None	Exon 4	Exon 4	Not tested
#3	RHD*DIlla-CE(4-7)-D/ RHD*weak D type 5	None	RHD*DIlla-CE(4-7)-D/ RHD*weak D type 5	Exon 1	Exon 2	Exon 2	Not tested
#4	RHD*DIlla-CE(4-7)-D/RHD*Ψ	None	RHD*DIlla-CE(4-7)-D/RHD*Ψ	None	Exon 5	Exon 5	Exon 5
#5	RHD*DIlla-CE(4-7)-D/RHD*Ψ	None	RHD*DIlla-CE(4-7)-D/RHD*Ψ	None	Exon 5	Exon 5	Exon 5
#6	RHD*DIlla-CE(4-7)-D/RHD*Ψ	None	RHD*DIlla-CE(4-7)-D/RHD*Ψ	None	Exon 5	Exon 5	Exon 5

Thermo Fisher Scientific) and converted from ng/μL to molecules/μL taking into consideration the approximate molecular weight of each amplicon. All amplicons were diluted to reach the concentration of the amplicon with the lowest molarity. Then, the diluted amplicons were gathered in two equimolar pools: one containing the *RHD* amplicons and the other containing the *RHCE* amplicons for each studied sample. Pools were subjected to mechanical fragmentation and nick repair. Two-hundred-base read libraries were individually selected on an E-Gel® Select™ 2% agarose gel (Thermo Fisher Scientific). Ion Xpress™ Barcode adapters (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) were added aiming to label the samples as well as the homologous gene-derived products (*RHD* and *RHCE*), according to the manufacturer's instructions. Libraries were quantified by real-time PCR using the TaqMan technology (IonLibrary TaqMan Quantitation Kit, Thermo Fisher Scientific).

2.3.3. Emulsion polymerase chain reaction (PCR) and sequencing

Clonal amplification by emulsion PCR and chip loading (Ion 318 Chip v2) were performed in the Ion Chef System (Thermo Fisher Scientific), as described elsewhere [13]. Sequencing was held in the Hi-q Kit (Thermo Fisher Scientific) in the One Touch2 System (Thermo Fisher Scientific).

2.3.4. Data analysis

Data analyses were performed using the Ion Reporter Software version 5.0. For each gene (*RHD* and *RHCE*) a custom workflow was created masking the other gene to avoid ambiguous read mapping.

2.3.5. Bench-made conventional PCR for genotyping Rh antigens

RHD zygosity was confirmed for all included samples using the double amplification refractory mutation system approach with allele-specific primers designed to detect the *RHD* deletion, as previously described [18]. PCR analyses aiming to identify possible partial D and some weak D alleles were performed by amplifying *RHD* exons 3–7 and 9, using *RHD* sequence specific primers [8]. *RHD**Ψ, *RHC* and *RHC* genotyping were performed as described elsewhere [19].

3. Results

3.1. Standardization step

Results obtained from the NGS-based strategy were concordant with the known *RHD* genotype in all analyzed samples (Table 1). However, NGS was assertive in interpreting all polymorphisms inherent to the hybrid allele *DIlla-CE(4-7)-D*, in contrast to Sanger sequencing, in which the exon 5 interpretation was difficult when this allele was in heterozygosis to the *RHD**Ψ allele. Regarding this, even taking into consideration samples ran on different batches, exon 5 result graphs were noisy or the pairing with the standard *RHD* sequence could not be performed by the software for sequence analysis (Supplemental material, Fig. 1).

3.2. NGS-based genotyping of *RHD* and *RHCE* genes

NGS genotyping was performed in this second step aiming to test its

Table 2
Summary of the NGS-based assay performance for each studied gene.

	Total reads	Mean read length
<i>RHD</i>	1,289,373	188
<i>RHCE</i>	1,373,151	193

efficacy in identifying *RH* variant allele diversity among SCD patients already investigated by conventional molecular methods.

3.3. Overall performance

The NGS run summary is exposed on Table 2. The genotype *RHCE**C was identified in 21 samples and was in accordance with the results of the conventional PCR assay specified in the Materials and methods section, attesting that the *RHD* and *RHCE* regions of interest (ROI) were amplified by gene-specific primers. In other NGS experiments in which the library was constructed using primers designed by the Ion Ampli-Seq™ Designer system (www.ampliseq.com), the *RHCE**C allele was not identified, as the homology between the *RHD* and *RHCE* genes was not taken into consideration [14].

Discrimination between homozygous and heterozygous variant *RH* alleles was made by calculating the percentage of reads carrying a variant position in the NGS sequencing result. This zygosity result was compared to conventional bench-made molecular methodology, as described in the Materials and methods section, with 100% accuracy in the case of *RHD* gene.

3.4. *RHD* and *RHCE* alleles identified among the studied sample

Different alleles encoding amino acid changes were identified and are represented on Fig. 3. Among the 35 studied patients, 10 samples with alleles encoding variant RhD phenotype were identified (*RHD**weak D 4.2.2, *RHD**DVII, *RHD**weak partial D 4.0, *RHD**DAU0.01 and *RHD**609A, 654C, 667G, 674T, 807G). *RHD**weak D 4.2.2 was the most common *RHD* variant allele (50%), followed by *RHD**weak partial D 4.0 (20%), *RHD**DVII (10%) and *RHD**DAU0.01 (10%). Regarding the *RHCE* gene, 45 out of 70 sequenced alleles exhibited standard sequence (*RHCE**ce, *RHCE**Ce and *RHCE**cE) (64.3%) while 25 samples had variant alleles (35.7%). The most frequently identified *RHCE* variant alleles were: *RHCE**ce48C (40%), *RHCE**ceAR (20%), *RHCE**ce48C,733G (8%), *RHCE**ceEK (4%), *RHCE**ce48C,1024G (4%), *RHCE**ce105T,733G,744C,1025T (4%), *RHCE**(C)ce^S (4%) and *RHCE**ceCF (4%).

A high percentage of patients exhibiting the *RHCE**C allele was observed within the studied cohort (54.3%). The most plausible explanation is that Brazilian population is highly admixed, even among SCD patients. This data was confirmed in a different cohort of Brazilian SCD patients, in which 53% of the SCD patients exhibited *RHCE**C allele [3]. Also, in this other study, it was observed that the frequency of *RHCE**C allele among blood donors, who are typically self-declared as Caucasian, was not so superior to that exhibited by SCD patients (65% versus 53%, respectively).

3.5. Novel alleles

Two undescribed *RHCE* alleles were identified among the studied samples:

a) *RHCE**ce48C,1024G

Patient 7 was serologically classified as R₀r and exhibited anti-e and anti-C. NGS revealed *RHCE**ce48C in homozygosis and *RHCE**c.1024A > G in heterozygosis. The mutation *RHCE* c.1024A > G has never been previously described and leads to a Thr to Ala substitution

in aminoacid 342.

b) *RHCE**ce105T,733G,744C,1025T linked to *RHD**DAR3.01

Patient 11 was serologically classified as R1r. *RHCE* molecular analysis revealed a variant *RHCE**ce allele, comprising the following nucleotide changes: c.105C > T c.733C > G c.744T > C c.1025C > T in trans to *RHCE**Ce allele. The c.105C > T polymorphism has already been described linked to c.48G > C and in trans to ce48C, 733G, 744C, 1025T allele, this last considered as a variation of ceTI. We here describe the c.105C > T nucleotide change associated with c.733C > G c.744T > C c.1025C > T and without the c.48G > C mutation. Also, this new *RHCE**ce allele was linked to *RHD**DAR3.01 (weak partial D 4.0), which is novel data, as ceTI is described in association with *RHD**DIVa-2. The hypothesis is that this allele encodes partial D and variant ce antigens.

3.6. Correlation between Rh molecular and serological data

We inspected each Rh irregular antibody and correlated with the patient's *RH* genotype (Table 3). Anti-D was identified in the sera of eighteen RhD positive patients and in the eluate of one patient; this last representing the only case initially classified as anti-D autoantibody. All these patients were presumed to exhibit RhD variant phenotype and were transfused with RhD negative RBC units-only (rr phenotype). *RHD* variant alleles justifying RhD variant antigen were identified in only five of these patients (27.8%). The remaining thirteen patients with anti-D had one or even two conventional *RHD* alleles. The fact that 46.2% of the patients phenotypically classified as RhD variants but lacking variant *RHD* genotype exhibited positive direct antiglobulin test (DAT) is important to highlight, as it suggests the diagnosis of self-directed anti-D may have been missed.

Anti-e was identified in the sera of fourteen patients with e + phenotype. Of these, 85.7% (12 cases) have been serologically classified as 'anti-e autoantibody', whereas 14.3% (2 cases) were classified as 'anti-e alloantibody' associated with variant RhCE protein. *RHCE* genotyping revealed that 57.1% of the identified anti-e were, in fact, alloantibodies (8 out of 14) and that 42.8% of the serological classification (cases interpreted as self-directed anti-e but with partial e predicted by the genotyping) was probably inaccurate or did not have the ability, by the time the samples were evaluated, to distinguish between auto or alloantibody (i.e., recent transfusion). Patients classified serologically as having anti-e autoantibody received RBC units whose phenotype did not match this antigen, but no overt delayed hemolytic reactions were reported. However, transfusion of antigen matched units could have improved transfusion increment and increased transfusion safety in all but two patients, who had also anti-E.

Anti-C was identified in the serum of six C + patients. One patient had partial C antigen encoded by a hybrid *DIIIa-CE*(4-7)-D, whereas five had one conventional *RHCE**Ce allele (83.3%). Anti-E was identified in the serum of one E + patient who exhibited conventional *RHCE**cE allele.

In sum, of forty-two cases of abnormal Rh antibodies, 38% were correctly classified by serological methods and 62% were incorrect. Of the incorrect results, 73.1% were considered as important, as were associated with shortage of RBC units available for transfusion, as in the case of patients receiving RhD negative-only units due to the incorrect 'RhD variant' label, or to delayed hemolytic transfusion reaction/poor transfusion increment in the case of patients with anti-e alloantibodies classified as autoantibodies.

3.7. Impact of the *RHD* and *RHCE* genotyping on transfusion management

After the genotyping results, all patients receiving RhD negative units due to the inaccurate 'RhD partial' labelling started receiving RhD-positive units. This not only increased the amount of phenotyped

Fig. 3. Description of the *RHD* and *RHCE* variant alleles identified using the next-generation sequencing (NGS)-based assay within Brazilian sickle cell disease (SCD) patients. On the left, the standard gene sequence is represented by the grey boxes, each box representing one exon. When boxes are black, it means complete substitution forming hybrid alleles. When the boxes have a line inside, it represents point-mutations. On the right, the nucleotide changes in comparison to the standard sequence are described, as well as the identification of the affected exon, the number of alleles identified with the genetic variation and the allele frequency among the studied population.

units available for transfusion, decreasing the time needed to identify compatible units, but also spared a significant amount of the RhD-negative units from the transfusion laboratory inventory (10.1%) (Table 4). Considering that RhD-negative units are needed in case of emergencies involving pediatrics or female patients and for intrauterine/neonatal transfusion, significantly diminishing unnecessary indications for those units was noteworthy. None of the patients exhibited any signs or symptoms of transfusion reactions and one of the patients (patient 1) significantly increased the transfusion interval (from every 14 days to every 30 days) after the implementation of this new policy, what is further being evaluated but probably reflects the avoidance of the phenotype D – C – E – c + e +, which is mostly Caucasian within our donor population.

Even though all patients whose partial e phenotype had been serologically missed started receiving R₂R₂ units, an increase in the transfusion increment could not be precisely determined because the post-transfusion control was collected after pre-established interval for all of them (30 days).

4. Discussion

The present study standardized a feasible strategy for sequencing *RHD* and *RHCE* genes using Next Generation Sequencing (NGS), confirming its efficacy in interpreting Rh variant genotypes among

sickle cell disease (SCD) patients. The results obtained from the NGS-based assay were gene-specific, overcoming previous reported inaccuracies regarding the lack of specificity *RHD*/*RHCE* of the sequenced amplicons with the same technology [14]. It was also demonstrated that the serological interpretation of unexpected Rh antibodies, which justified the molecular investigation, was inaccurate in 62% of the studied patients. Partial e (RH5) in association with anti-e alloantibody represented the most missed diagnosis, largely interpreted as self-directed anti-e (42.8% of the cases) and representing a potential risk factor for post-transfusion hemolytic reactions. This highlights that a comprehensive molecular evaluation of *RHD* and *RHCE* genes in SCD patients with serological suspicion of Rh variant phenotype is highly recommended in order to assure transfusion safety.

The emergence of NGS platforms has made it possible to scale sequencing projects to include higher sample throughput while decreasing costs [20]. The first report of *RHD*/*RHCE* sequencing with NGS assay was published by Stabentheiner, S. et al. (2011), whose chosen strategy was similar to ours: gene-specific primers were used for the amplification of regions of interest in the library construction step [12]. In accordance to our results, the obtained genotypes were *RHD* and *RHCE* specific and superior to Sanger sequencing regarding the resolution of cis/trans linkage of polymorphisms, detection of insertions and deletions, as well as throughput [12]. Considering population of SCD patients studied in the present study, it was expected that the resolution

Table 3
Summary of the *RHD*/*RHCE* genotype and serological data of all sickle cell disease studied patients.

ID	RH genotype		Predicted phenotypes		Alloantibodies	Autoantibodies	
	<i>RHCE</i>	<i>RHD</i>					
1	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHCE</i> *cE	<i>RHD</i>	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> – <i>E</i> + <i>c</i> + <i>e</i> +	D, C, allo IgG	e
2	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>RHCE</i> *ceEK	<i>DAR1.2</i> (weak <i>D</i> 4.2.2)	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> – <i>E</i> –, <i>partial c</i> , <i>partial e</i>	D, C, E, allo IgG	–
3	<i>RHCE</i> *ce48C	<i>RHCE</i> *cE	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> – <i>E</i> + <i>c</i> + <i>e</i> + <i>weak</i>	D, C, allo IgG	e
4	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	D, E, V	–
5	<i>RHCE</i> *ce48C	<i>RHCE</i> *ce48C,733G	<i>DVII</i>	Deleted <i>D</i>	<i>partial D</i> , <i>C</i> – <i>E</i> –, <i>partial c</i> , <i>partial e</i>	D, probable C, E	–
6	<i>RHCE</i> *ce48C	<i>RHCE</i> *cE	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> – <i>E</i> + <i>c</i> + <i>e</i> + <i>weak</i>	probable D, C, probable E	IgG
7	<i>RHCE</i> *ce48C	<i>RHCE</i> *ce48C,1024G	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> – <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> + <i>weak</i>	D, C, allo IgG	e
8	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	D	e
9	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	D, E	IgG
10	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *cE	<i>RHD</i>	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> + <i>c</i> + <i>e</i> +	D	–
11	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce105T,733G,744C,1025T	<i>DAR3.1</i> (weak <i>partial D</i> 4.0)	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> –, <i>partial c</i> , <i>partial e</i>	probable D	–
12	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce733G	<i>RHD</i>	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> –, <i>partial c</i> , <i>partial e</i>	probable C, CW, E, allo IgG	IgG
13	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	probable C, allo IgG	–
14	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHD</i>	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> – <i>e</i> +	E, c	e, IgG
15	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce733G	<i>RHD</i>	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> +, <i>partial c</i> , <i>partial e</i>	C	e
16	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	E, allo IgG	D (eluate)
17	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>RHCE</i> *(C)ceS	<i>DAR1.2</i> (weak <i>D</i> 4.2.2)	<i>DIIa-CE(4-7)-D</i>	<i>partial D</i> , <i>partial C</i> , <i>E</i> –, <i>partial c</i> , <i>partial e</i>	D, C, E, allo IgG	–
18	<i>RHCE</i> *ce48C	<i>RHCE</i> *ce48C	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> – <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> + <i>weak</i>	probable D	–
19	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	–	e, IgG
20	<i>RHCE</i> *ce48C	<i>RHCE</i> *cE	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> – <i>E</i> + <i>c</i> + <i>e</i> + <i>weak</i>	C, probable e, allo IgG, auto IgG	IgG
21	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>DAR1.2</i> (weak <i>D</i> 4.2.2)	Deleted <i>D</i>	<i>partial D</i> , <i>C</i> + <i>E</i> –, <i>partial c</i> , <i>partial e</i>	D	–
22	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ceCF	<i>DAR3.1</i> (weak <i>partial D</i> 4.0)	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> –, <i>partial c</i> , <i>partial e</i>	E, c, allo IgG	–
23	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>RHCE</i> *ce	<i>DAR1.2</i> (weak <i>D</i> 4.2.2)	Deleted <i>D</i>	<i>partial D</i> , <i>C</i> – <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	D	–
24	<i>RHCE</i> *ceAR	<i>RHCE</i> *ce	<i>DAR1.2</i> (weak <i>D</i> 4.2.2)	Deleted <i>D</i>	<i>partial D</i> , <i>C</i> – <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	D	–
25	<i>RHCE</i> *ce48C	<i>RHCE</i> *cE	<i>RHD</i>	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> – <i>E</i> + <i>c</i> + <i>e</i> + <i>weak</i>	C	e, IgG
26	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	C	e, IgG
27	<i>RHCE</i> *ce48C	<i>RHCE</i> *cE	<i>DAU0.01</i>	Deleted <i>D</i>	<i>partial D</i> , <i>C</i> – <i>E</i> + <i>c</i> + <i>e</i> + <i>weak</i>	C, e	IgG
28	<i>RHCE</i> *ce48C	<i>RHCE</i> *ce48C,733G	<i>RHD</i>	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> – <i>E</i> –, <i>partial c</i> , <i>partial e</i>	C, E	e, IgG
29	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	C	–
30	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	E, c	–
31	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	D, E	–
32	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	–	C, e
33	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce	<i>RHD</i>	<i>RHD</i> *609A,654C,667G,674T,807G	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> – <i>c</i> + <i>e</i> +	D, E	–
34	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *cE	<i>RHD</i>	<i>RHD</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> + <i>c</i> + <i>e</i> +	E	–
35	<i>RHCE</i> *Ce	<i>RHCE</i> *ce733G	<i>RHD</i>	Deleted <i>D</i>	<i>D</i> + <i>C</i> + <i>E</i> –, <i>partial c</i> , <i>partial e</i>	E	e

of all cases in which the *RHCE**C allele was identified would be harder using Sanger technique in comparison to NGS, as multiple polymorphisms were involved. Also, two patients exhibited multiple SNPs in cis and trans linkage (patients 2 and 17) and allelic interpretation was facilitated by the use of NGS tool. The strategy adopted in this manuscript is also in agreement with previous reports of human leucocyte antigen (HLA) sequencing using the Ion Torrent PGM™ System [21], which amplified and fragmented contiguous products generated by long-range PCRs with allele-specific primers.

The major drawback of the proposed NGS-based assay is that it is labor-intensive. Regarding this, it has already been demonstrated that adopting a NGS strategy based on AmpliSeq™ amplification, which is a faster alternative, fails to genotype *RHD* and *RHCE* exons 1 and 2, giving rise to unspecific and inaccurate results [13,14]. To overcome this problem, either a complementary approach using gene-specific exons 1 and 2 *RHD*/*RHCE* primers should be used in association with the AmpliSeq-based approach or the result interpretation should be

complemented by bench-made conventional PCR [13,14]. If other NGS-based methodology was used instead of ours in the present study, mutations involving exons 1 or 2 of *RHCE* could have been missed or misinterpreted. This would represent 84% of all variant *RHCE* alleles found in this study, because the mutation *RHCE* c.48G > C, which was the most frequently identified *RHCE* genetic variation, involves the *RHCE* exon 1 whose homology to *RHD* is high. Even though the gene-specific NGS approach proposed by our manuscript may be time-consuming, it still superior to conventional Sanger sequencing, which requires the same steps for *RHD* and *RHCE* exon amplification, frequently demands repetitions due to forward or reverse sequence failure as well as to partial overlap and whose interpretation of *indels* and hybrid alleles, prevalent in the case of *RHD*/*RHCE* loci, has a high level of difficulty.

Our results also show that sequencing *RHD* and *RHCE* loci of SCD patients with suspicion of Rh partial variants is recommended. In 62% of the patients with unexpected Rh antibodies, the serological distinc-

Table 4
Amount of RhD-negative RBC units spared from the transfusion laboratory inventory after the *RHD* genotyping result.

Patient ID	Number of RBC transfusions using RhD- units	Number of RBC transfusions using RhD- units	Number of RhD- units available for transfusion
	Last 12 months	Per month	Last 12 months/ per month
1	20	1.6	
2	42	3.5	
3	26	2.1	
4	18	1.5	
6	20	1.6	
7	16	1.3	
8	20	1.6	
9	28	2.3	
11	37	3.1	
Total amount of RhD- RBC units	227	18.6	2257/188
Amount of RhD- RBC units spared (%)			10.1%/10%

tion between self-directed or non-self-directed antibodies was inaccurate due to method's limitation. The doubtful classification of Rh antibodies has exposed patients to adverse situations, represented by 1) transfusion of RhD negative units (D – C – E – e + c +) to patients with no abnormal *RHD* locus, exposing them to the development of antibodies against Fya, S and Jkb antigens, which are expressed by the D-negative RBCs that are mainly from Caucasian donors; 2) shortage of RBC units available for transfusion, also in the cases of partial RhD but standard *RHD* locus, with increased risk of depriving patients of appropriate transfusion support and 3) increased risk of delayed hemolytic transfusion reactions and poor transfusion increment in the case of patients with anti-e alloantibodies classified as autoantibodies.

Even though conventional PCR methods and DNA-array assays designed to cover some *RHD/RHCE* genetic variations are efficient in detecting the most common Rh partial variants [9], they are unable to exclude the presence of abnormalities in *RH* locus and also do not take into consideration the considerable rate of never-described alleles among people of African descent [10]. Sequencing *RHD* and *RHCE* exons and flanking intron sequences of SCD patients overcome these difficulties and, as demonstrated by our results, potentially increase transfusion safety and ameliorate transfusion support. Trusting serological results has shown to be failure in our analyses and is in accordance with previous literature reports [22]. The main factor limiting serological techniques is the occurrence of recent transfusions, which are frequently omitted by SCD patients if taking place outside the reference blood bank, as previously demonstrated by our team [3]. This is probably the cause of the high percentage of anti-e inaccurately classified as self-directed found in our study.

More important than giving a name to one detected Rh variant is to determine whether the patients' transfusion management needs to be modified after its identification [7]. After our results, all patients mislabeled as RhD variant started receiving D-positive RBCs and, in one case, the transfusion interval increased significantly, which is further being evaluated but probably reflects that when avoiding the preponderant Caucasian phenotype D – C – E – c + e +, antibodies of unknown specificity are more likely to be respected. Also, patients prone to the development of antibodies against high-frequency Rh antigens underwent modifications in their care, decreasing the frequency of programmed transfusions, increasing hydroxyurea dosage and searching for haplotype-identical donors within their siblings. Considering that, evaluating *RHD* and *RHCE* genes in depth, using the

NGS-based assay, allows definite changes in the transfusion support of SCD patients with Rh variant suspicion.

This study has some limitations. The transfusion increment of the patients exhibiting anti-e when receiving either R₂R₂ or incompatible RBC units could not be determined as the blood count was not systematically performed after the transfusions. Also, patients were not re-evaluated regarding their serological data as most of them had recent transfusions inside and outside the center of reference.

In conclusion, the NGS-based assay designed to sequence gene-specific *RHD* and *RHCE* coding regions proved to be effective and accurate in identifying *RH* variants among SCD patients with unexplained Rh antibodies, as well as superior to conventional Sanger sequencing method. Also, sequencing *RHD* and *RHCE* loci through NGS clarified the Rh phenotype of most patients, decreasing the risks of delayed transfusion reactions and improving transfusion support.

Author contribution

Designed the study: MRD, IHR, CLD, ECS; Performed the experiments: MRD, IHR, VBO, JBV, FCG, LAMF, LV, RR, KZC; Analyzed the data: MRD, IHR, LV, JEL, JEK, ACP, SFMG, VGR, AMJ; Wrote the manuscript: MRD and CLD.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by Grant #2014/50250-6, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Acknowledgements

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.03.014>.

References

- [1] S.T. Chou, R.I. Liem, A.A. Thompson, Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies, *Br. J. Haematol.* 159 (2012) 394–404.
- [2] K. Yazdankhah, R.E. Ware, F. Noizat-Pirenne, Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management, *Blood* 120 (2012) 528–537.
- [3] V.B.O.M.R. Dezan, J.V.S. Bianchi, V. Rodrigues, J.H. Solano, F.C. Gomes, S.L. Bonifácio, J.E. Levi, S.F.M. Guallandro, J.E. Krieger, A.C. Pereira, E.C. Sabino, A. Mendrone-Júnior, C.L. Dinardo, Effectiveness of a red cell antigen-matching transfusion protocol in sickle cell disease patients, *ISBT Sci. Ser. Int. J. Intracell. Transp.* 11 (2016) 132–139.
- [4] J.E. Hendrickson, T.E. Chadwick, J.D. Roback, C.D. Hillyer, J.C. Zimring, Inflammation enhances consumption and presentation of transfused RBC antigens by dendritic cells, *Blood* 110 (2007) 2736–2743.
- [5] C.L. Dinardo, G.M. Ito, L.R. Sampaio, A. Mendrone Junior, Study of possible clinical and laboratory predictors of alloimmunization against red blood cell antigens in cancer patients, *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 35 (2013) 414–416.
- [6] E.P. Vichinsky, N.L. Luban, E. Wright, N. Olivieri, C. Driscoll, C.H. Pegelow, R.J. Adams, A. stroke prevention trial in sickle cell, prospective RBC phenotype matching in a stroke prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial, *Transfusion* 41 (2001) 1086–1092.
- [7] F. Noizat-Pirenne, C. Tournamille, Relevance of RH variants in transfusion of sickle cell patients, *Transfus. Clin. Biol.* 18 (2011) 527–535.
- [8] P.A. Maaskant-van Wijk, B.H. Faas, J.A. de Ruijter, M.A. Overbeek, A.E. van den Bome, D.J. van Rhenen, C.E. van der Schoot, Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons, *Transfusion* 38 (1998) 1015–1021.
- [9] E. Sippert, C.R. Fujita, D. Machado, G. Guelins, A.C. Gaspardi, J. Pellegrino Jr., S. Gilli, S.S. Saad, L. Castilho, Variant RH alleles and Rh immunisation in patients with sickle cell disease, *Blood Transfus.* 13 (2015) 72–77.

- [10] M.E. Reid, C. Halter Hipsky, K. Hue-Roye, C. Hoppe, Genomic analyses of RH alleles to improve transfusion therapy in patients with sickle cell disease, *Blood Cells Mol. Dis.* 52 (2014) 195–202.
- [11] S.T. Chou, T. Jackson, S. Vege, K. Smith-Whitley, D.F. Friedman, C.M. Westhoff, High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors, *Blood* 122 (2013) 1062–1071.
- [12] S. Stabenheiner, M. Danzer, N. Niklas, S. Atzmüller, J. Proll, C. Hackl, H. Polin, K. Hofer, C. Gabriel, Overcoming methodical limits of standard RHD genotyping by next-generation sequencing, *Vox Sang.* 100 (2011) 381–388.
- [13] Y. Fichou, M. Mariez, C. Le Marechal, C. Ferec, The experience of extended blood group genotyping by next-generation sequencing (NGS): investigation of patients with sickle-cell disease, *Vox Sang.* 111 (2016) 418–424.
- [14] Y. Fichou, M.P. Audrezet, P. Gueguen, C. Le Marechal, C. Ferec, Next-generation sequencing is a credible strategy for blood group genotyping, *Br. J. Haematol.* 167 (2014) 554–562.
- [15] M.J. Percy, Y.J. Chung, C. Harrison, J. Mercieca, A.V. Hoffbrand, C.L. Dinardo, P.C. Santos, G.H. Fonseca, S.F. Gualandro, A.C. Pereira, T.R. Lappin, M.F. McMullin, F.S. Lee, Two new mutations in the HIF2A gene associated with erythrocytosis, *Am. J. Hematol.* 87 (2012) 439–442.
- [16] T.J. Legler, J.H. Maas, M. Kohler, T. Wagner, G.L. Daniels, P. Perco, S. Panzer, RHD sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis, *Transfus. Med.* 11 (2001) 383–388.
- [17] F.F. Wagner, C. Gasner, T.H. Müller, D. Schöntzer, F. Schunter, W.A. Flegel, Three molecular structures cause rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features, *Blood* 91 (1998) 2157–2168.
- [18] R.W. Chiu, M.F. Murphy, C. Fidler, B.C. Zee, J.S. Wainscoat, Y.M. Lo, Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach, *Clin. Chem.* 47 (2001) 667–672.
- [19] B.K. Singleton, C.A. Green, N.D. Avent, P.G. Martin, E. Smart, A. Daka, E.G. Narter-Olaga, L.M. Hawthorne, G. Daniels, The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype, *Blood* 95 (2000) 12–18.
- [20] J.M. Johnsen, Using red blood cell genomics in transfusion medicine, *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2015 (2015) 168–176.
- [21] D. De Santis, D. Dinauer, J. Duke, H.A. Erlich, C.L. Holcomb, C. Lind, K. Mackiewicz, D. Monos, A. Moudgil, P. Norman, P. Parham, A. Saxon, R.J. Alcock, 16(th) IHIW: review of HLA typing by NGS, *Int. J. Immunogenet.* 40 (2013) 72–76.
- [22] J. Casas, D.F. Friedman, T. Jackson, S. Vege, C.M. Westhoff, S.T. Chou, Changing practice: red blood cell typing by molecular methods for patients with sickle cell disease, *Transfusion* 55 (2015) 1388–1393.

ORIGINAL RESEARCH

Diversity of *RH* and transfusion support in Brazilian sickle cell disease patients with unexplained Rh antibodies

Carla L. Dinardo^{1,2}, Shannon Kelly,^{3,4} Marcia R. Dezan^{5,1}, Ingrid H. Ribeiro,¹ Shirley L. Castilho,⁵ Luciana C. Schimidt,⁶ Maria do C. Valgueiro,⁷ Liliana R. Preiss,⁸ Brian Custer,³ Ester C. Sabino,² Connie M. Westhoff,⁹ for the NHLBI Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS)-III

BACKGROUND: Genetic diversity in the *RH* genes among sickle cell disease (SCD) patients is well described but not yet extensively explored in populations of racially diverse origin. Transfusion support is complicated in patients who develop unexpected Rh antibodies. Our goal was to describe *RH* variation in a large cohort of Brazilian SCD patients exhibiting unexpected Rh antibodies (antibodies against RH antigens to which the patient is phenotypically positive) and to evaluate the impact of using the patient's *RH* genotype to guide transfusion support.

STUDY DESIGN AND METHODS: Patients within the Recipient Epidemiology and Evaluation Donor Study (REDS)-III Brazil SCD cohort with unexpected Rh antibodies were selected for study. *RHD* and *RHCE* exons and flanking introns were sequenced by targeted next-generation sequencing.

RESULTS: Fifty-four patients with 64 unexplained Rh antibodies were studied. The majority could not be definitively classified as auto- or alloantibodies using serologic methods. The most common altered *RH* were *RHD**DIIla and *RHD**DAR (*RHD* locus) and *RHCE**ce48C, *RHCE**ce733G, and *RHCE**ceS (*RHCE* locus). In 53.1% of the cases (34/64), patients demonstrated only conventional alleles encoding the target antigen: five of 12 anti-D (41.7%), 10 of 12 anti-C (83.3%), 18 of 38 anti-e (47.4%), and one of one anti-E (100%).

CONCLUSION: *RHD* variation in this SCD cohort differs from that reported for African Americans, with increased prevalence of *RHD**DAR and underrepresentation of the DAU cluster. Many unexplained Rh antibodies were found in patients with conventional RH allele(s) only. *RH* genotyping was useful to guide transfusion to determine which patients could potentially benefit from receiving *RH* genotyped donor units.

Alloimmunization is a serious transfusion complication, as antibodies to red blood cell (RBC) antigens can cause delays in the identification of compatible blood, hemolytic disease of the fetus/newborn, and posttransfusion hemolytic reactions, which can be severe or even fatal. Patients with sickle cell disease (SCD) are particularly prone to alloantibody development because of multiple factors including frequency of exposures and antigenic differences between blood donors and SCD recipients, reflecting race disparity between these two groups.¹⁻³ The background inflammatory pathophysiology of SCD may also contribute to increased alloimmunization, enhancing antigen presentation and stimulating a B-cell response.^{4,5} Prospective transfusion of antigen-matched RBC units before the development of alloantibodies is the most effective prophylaxis, reducing the risks of alloantibody formation and minimizing the occurrence of post-transfusion hemolytic reactions.⁶⁻⁸ However, the occurrence of transfusions outside centers with a phenotypic matching policy,

ABBREVIATION: SCD = sickle cell disease.

From the ¹Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo; the ²Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo; ³Fundação HEMORIO, Rio de Janeiro; ⁴Fundação HEMOMINAS, Belo Horizonte; ⁵Fundação HEMOPE, Recife, Brazil; the ⁶Vitalant Research Institute, San Francisco; ⁷UCSF Benioff Children's Hospital Oakland, Oakland, California; the ⁸RTI-Research Triangle Institute International, Triangle Park, North Carolina; and the ⁹Laboratory of Immunohematology and Genomics, New York Blood Center, New York, New York.

Address reprint requests to: Carla L. Dinardo, Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, São Paulo 05403000, Brazil; e-mail: carluana@usp.br

This work was supported by Grant #2014/50250-6, São Paulo Research Foundation (FAPESP), and NHLBI Recipient and Evaluation Donor Study (REDS)-III. CMW is supported by the Doris Duke Innovations in Clinical Research Award 2015133.

Received for publication November 6, 2018; revision received June 7, 2019, and accepted June 17, 2019.

doi:10.1111/rtf.15479

© 2019 AABB

TRANSFUSION 2019;9999;1-8

as well as the prevalence of *RHD* and *RHCE* variation among SCD patients and minority blood donors, are important factors contributing to prophylaxis failure.⁹

The complexity and diversity of *RH* in SCD patients make the Rh phenotype difficult to define by routine serologic methods. In recent reports, approximately 85% of patients with SCD treated with chronic transfusion therapy exhibit at least one *RHD*/*RHCE* altered allele and this variation at the *RH* locus also extends to blood donors of African descent.^{10,11} Most transfusion protocols do not consider *RH* genetic variation at the beginning of the transfusion protocol; therefore, alloimmunization events due to *RH* variants can occur despite serologic phenotype-matched transfusions.^{9,12}

While there are many reports in the literature outlining the benefits of prospectively transfusing patients with SCD who are negative for the most relevant RBC antigens (C, c, E, e; K; Jka, Jkb; Fya, Fyb; S,s) with antigen-negative donor units,^{2,7,8,13} there is no consensus regarding the benefit of *RH* genotyping before initiating a transfusion protocol or of the feasibility of selecting *RH* variant-matched units when genetic variation is detected. The major problem is that the likelihood or risk of formation of an Rh antibody in individuals with altered Rh proteins when exposed to conventional Rh proteins is not precisely known. Significant resources could be needlessly used by providing *RH* genotype-matched units, which would be difficult to find, when the risk of alloimmunization is not clear.¹⁴

Patients who present with unexplained or unexpected Rh antibodies pose a transfusion dilemma. Efforts to determine whether the antibody is an auto- or alloantibody are often inconclusive as patients have been recently transfused. Our goal was to describe the diversity of *RH* alleles in a large, multi-center cohort of Brazilian SCD patients exhibiting unexpected Rh antibodies, defined here as antibodies against RH antigens to which the patient is phenotypically positive, by direct sequencing of *RHD* and *RHCE* coding regions. A secondary goal was to develop a transfusion protocol for the patients with Rh antibodies that were associated with inheritance of *RH* genetic variants and those associated with conventional alleles that considers which patients would be predicted to benefit from the transfusion with *RH* genotype-matched units to optimize transfusion outcomes and potentially avoid further Rh alloimmunization or delayed hemolytic transfusion reactions.

MATERIALS AND METHODS

Patient recruitment and sample selection

The details of the Recipient Epidemiology and Evaluation Donor Study (REDS)-III Brazilian SCD cohort have been previously reported.¹⁵ Patients were randomly selected to be eligible for the REDS-III cohort from the active SCD patient population (clinical visit within the past 3 years) at four transfusion centers in six cities in Brazil: HEMOPE (Recife); Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto da Criança (São Paulo); HEMORIO (Rio de Janeiro);

and HEMOMINAS (Belo Horizonte, Juiz de Fora, and Montes Claros). Patients were enrolled from November 2013 to March 2015. A total of 2793 patients with SCD were enrolled, and 2272 (81%) had been transfused. RBC antibody and patient RBC phenotype data were extracted from each participating center's electronic blood bank records.

Fifty-four patients within the REDS-III cohort were selected for the present study based on having a history of unexplained Rh antibodies, that is, their RBCs are phenotypically positive for a Rh antigen (D, C, c, E, e) with plasma-reactive antibodies identified to have the same specificity. The antibodies were classified as autoantibodies, alloantibodies, or indeterminate based on the records of the immunohematology reference laboratories at each site. The antibody was classified as autoantibody if it reacted with the patients' own RBCs and if it had been either recovered in the eluate or removed by autoadsorption in the absence of recent transfusions (<120 days from the last transfusion). The classification of the antibodies as alloantibodies was based on the following criteria: negative direct antiglobulin test, negative autocontrol, and last transfusion more than 120 days apart from the serologic investigation. For the cases in which the serologic investigation was inconclusive, especially due to recent transfusions, the antibodies were classified as indeterminate.

DNA extraction, polymerase chain reaction amplification, and next-generation sequencing-based assay

Genomic DNA was isolated from EDTA blood samples using a commercial genomic kit in the sample preparation equipment (QIAamp and QIAasymphony, respectively, Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland), following the manufacturer's instructions. Samples were *RHD* and *RHCE* genotyped by targeted next-generation sequencing as previously reported.¹⁶ All *RHD* and *RHCE* exons and flanking intron regions were amplified as described using gene-specific primers.¹⁷

Library construction was performed as described.¹⁶ In brief, amplicons were quantified, diluted, and mixed into two equimolar pools (*RHD* and *RHCE*) for each sample. Pools were subjected to mechanical fragmentation and the fragments sizing 200-bp were selected. Barcode adapters (Ion Xpress) were added to each pool. Emulsion polymerase chain reaction and massively parallel DNA sequencing were performed on the a personal genome machine (Ion Torrent) using a sequencing kit and chip (Ion PGM 200 and Ion 318, respectively). Data analysis was performed by with computer software (Ion Reporter Version 5.0). For each RH gene, a custom workflow was created to mask the homologous RH gene to avoid ambiguous read mapping. Samples with a change in *RHD* were tested for *RHD* zygosity using allele-specific primers designed to detect the common *RHD* deletion.¹⁸ In cases of possible r'S haplotype, allele-specific amplification was performed to confirm the presence of the hybrid *RHD***DIIIa-CE*(4-7)-*D* allele.

TABLE 1. RH genotyping results of patients with SCD exhibiting unexpected anti-D

Antibody specificity	Concurrent antibodies	RH genotype				Serologic classification of the Rh antibody
		RHD		RHCE		
D+ patients without conventional RHD* (n = 6)		Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	
		RHD*DAR1.02	Deleted RHD	RHCE*ceAR	RHCE*ce	Autoanti-D
		RHD*D1Va	Deleted RHD	RHCE*ceTI	RHCE*ce	Indeterminate
		RHD*541T*	Deleted RHD	RHCE*ce48C, 733G, 1006T	RHCE*ce	Alloanti-D
		RHD*DAR2.00	RHD*DAR3.01	RHCE*ceAR	RHCE*ce	Alloanti-D®
		RHD*D1IIa	Deleted RHD	RHCE*ceS	RHCE*ce	Alloanti-D
D+ patients with one or more conventional RHD (n = 6)		RHD*D1IIa	RHD*ψ	RHCE*ce733G	RHCE*ce	Alloanti-D
	Anti-e	RHD*DVII	RHD	RHCE*Ce	RHCE*ce	Indeterminate
		RHD	RHD or deleted D ^L	RHCE*Ce	RHCE*ce	Indeterminate
		RHD	RHD or deleted D ^L	RHCE*ce48C	RHCE*ce	Indeterminate
		RHD	RHD or deleted D ^L	RHCE*ce48C	RHCE*ceE48C	Indeterminate
		RHD	RHD or deleted D ^L	RHCE*ce48C	RHCE*ce48C, 733G	Indeterminate
RHD		RHD or deleted D ^L	RHCE*ce	RHCE*ce733G	Autoanti-D	

Use of D- blood for transfusion indicated.
* Allele has not been described previously.
@ Adsorption of the antibody with RHD*DAR3.01 RBCs was not possible.
L RHD zygosity was not performed in samples with no alterations on RHD genotyping as the presumed phenotype would not change.

Use of D- blood for transfusion indicated.

* Allele has not been described previously.

® Adsorption of the antibody with RHD*DAR3.01 RBCs was not possible.

L RHD zygosity was not performed in samples with no alterations on RHD genotyping as the presumed phenotype would not change.

RESULTS

Overall cohort

There were 392 alloimmunized patients in the REDS-III cohort (14% of 2793). This included 269 patients who made a total of 348 RH antibodies (142 anti-E, 108 anti-C, 45 anti-e, 31 anti-D, and 22 anti-c). Fifty-four patients were Rh antigen positive but demonstrated the corresponding Rh antibody in their plasma (n = 64 antibodies) and were included in the study. These included 12 patients whose RBCs were D+ with anti-D in the plasma (Table 1), 12 who typed C+ but anti-C was identified in

the plasma, and one who was c+ with anti-c identified (Table 2) as well as 1 E+ patient with anti-E (Table 3) and 38 with RBCs typing e+ with anti-e plasma reactivity (Table 3). Of the included patients, 49 (90.7%) were HbSS, 3 (5.6%) were HbSC and 2 (3.7%) were HbSβ0.

Unexpected anti-D

In the 12 patients typing as D+ but presenting with unexpected anti-D, eight different variant alleles were identified (Table 1): RHD*DAR1, RHD*DAR2, RHD*DAR3, RHD*D1IIa (n = 2),

TABLE 2. RH genotyping results of patients with SCD exhibiting unexpected anti-C or anti-c*

Antibody specificity	Concurrent antibodies	Number of samples	RH genotype				Serologic classification of the Rh antibody
			RHCE		RHD		
C+ patients with anti-C without conventional RHCE*Ce [†] (n = 2)			Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	
	Anti-e	1	RHCE*ceS	RHCE*ce	RHD*DIIIa-CE(4-7)-D	RHD	Indeterminate
	Anti-e	1	RHCE*ceS	RHCE*cE	RHD*DIIIa-CE(4-7)-D	RHD	Indeterminate
C+ patients with anti-C with one conventional RHCE*Ce (n = 10)							
	Anti-e	5	RHCE*Ce	RHCE*ce	Without mutation		Autoanti-C (1)
		2	RHCE*Ce	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate (4)
	Anti-e	1	RHCE*Ce	RHCE*cE	RHD*DUC2	RHD	Indeterminate (2)
		1	RHCE*Ce	RHCE*ceAG	Without mutation		Indeterminate
	Anti-e	1	RHCE*Ce	RHCE*ce733G	Without mutation		Autoanti-C
c+ patients with anti-c without conventional RHCE*ce (n = 1)							
		1	RHCE*ceS	RHCE*ce733G	RHD*DIIIa-CE(4-7)-D	RHD	Indeterminate

* The numbers in parentheses represent the samples with the described classification.

† Use of C- blood for transfusion indicated.

* The numbers in parentheses represent the samples with the described classification.

† Use of C- blood for transfusion indicated.

TABLE 3. RH genotyping results of patients with SCD exhibiting unexpected anti-e or anti-E

Antibody specificity	Concurrent antibodies	Number of samples	RH genotype				Serologic classification of the Rh antibody
			Allele 1	RHCE	Allele 2	RHD	
e+ patients with anti-e without conventional RHCE*ce (n = 12)		2*	RHCE*ce48C				Indeterminate (2)
		1*	RHCE*ce48C	RHCE*ce48C	Without mutation		Autoanti-e
		1*	RHCE*ce48C	RHCE*ce48C,733G	Without mutation		Indeterminate
		1†	RHCE*ce48C	RHCE*ce48C	Without mutation		Indeterminate
		2‡	RHCE*ce48C,733G	RHCE*ce48C	Without mutation		Autoanti-e (2)
		1‡	RHCE*ceMO	RHCE*ce	Without mutation		Autoanti-e
		1‡	RHCE*ceS	RHCE*ce	RHD*Di/la-CE(4-7)-D		Indeterminate
	Anti-C	1	RHCE*ce	RHCE*ceAG	Without mutation		Indeterminate
	Anti-C	1	RHCE*ce	RHCE*ce733G	Without mutation		Autoanti-e
		1	RHCE*ce	RHCE*ce733G	Without mutation		Indeterminate
e+ patients with anti-e and one conventional RHCE*ce or with RHCE*ce either homozygous or heterozygote to RHCE*ce (n = 26)		2	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation		Autoanti-e (1)
		5	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate (1)
	Anti-C	3	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate (4)
		1	RHCE*ce	RHCE*ce	RHD*DVII		Indeterminate (3)
	Anti-D	2	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate (2)
		1	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation	RHD	Indeterminate
		1	RHCE*ce	RHCE*ce	RHD*DU2		Indeterminate
	Anti-C	1	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation	RHD	Indeterminate
		1	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate
		1	RHCE*ce48C	RHCE*ce	RHD*DAU3	Deleted D	Indeterminate
E+ patient with anti-E (n = 1)		3	RHCE*ce48C	RHCE*ce	Without mutation		Autoanti-e (1)
		1	RHCE*ce122G	RHCE*ce	RHD*DA3.01	Deleted D	Indeterminate (2)
		1	RHCE*ceS	RHCE*ce	RHD*Di/la-CE(4-7)-D	RHD	Autoanti-e
	Anti-C	1	RHCE*ceS	RHCE*ce	RHD*Di/la-CE(4-7)-D	Deleted D	Indeterminate
		1	RHCE*ceTI	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate
		1	RHCE*ce733G	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate
		1	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate
		1	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate
		1	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate
		1	RHCE*ce	RHCE*ce	Without mutation		Indeterminate

* At risk for alloanti-E if transfused with e-; RH genotype matching for transfusion may be required if decreased survival of e+ transfused RBCs is observed.

† Possibly at risk for alloanti-E if transfused with e-; RH genotype matching for transfusion may be required if decreased survival of E+ or e+ transfused RBCs is observed.

‡ Use of e- blood for transfusion indicated; predicted to have h^{1a} phenotype.

*RHD**DVII, *RHD**541T, *RHD** ψ , and *RHD**DIVa. The serologic classification of the unexpected anti-D (alloantibody, autoantibody, or indeterminate) determined by the referring hospital is also shown. Six of 12 individuals had *RHD* encoding known, or presumed based on serologic alloreactivity (*RHD**541T), partial D phenotypes explaining the production of anti-D. Five (41.7%) had only conventional alleles (homozygous or hemizygous), and one was homozygous with one conventional *RHD* and one allele encoding a partial D phenotype, *RHD**DVII (Table 1). Of the *RHD* evaluated in these 12 samples, eight encoded known partial D or variant D phenotypes and six conventional D. There were four deleted *RHD*, one *RHD** ψ (not encoding D antigen), and five samples in which the *RHD* was either deleted or conventional and in trans to a normal *RHD*.

Altered RHCE alleles were also detected in most of the patients with unexpected anti-D (83.3%, 10/12) with many presumed in cis to altered *RHD* (Table 1) as has been previously reported. Altered RHCE alleles in descending order of frequency included: *RHCE**ce48C (n = 3), *RHCE**ceAR (n = 2), *RHCE**ce733G (n = 2), *RHCE**ce48C,733G (n = 1), *RHCE**ceTI (n = 1), *RHCE**ceS (n = 1), *RHCE**ce48C,733G,1006T (n = 1), and *RHCE**ce48C (n = 1). The presumed altered RH haplotypes in this subset of patients with anti-D were *RHD**DAR/*RHCE**ceAR (n = 2), *RHD**DIIIa/*RHCE**ceS (n = 1), *RHD**DIIIa/*RHCE**733G (n = 1), *RHD**DIVa/*RHCE**ceTI (n = 1), and *RHD**541T/*RHCE**ce48C,733G,1006T (n = 1). One patient with *RHD**DVII/D exhibited concurrent anti-e but had conventional *RHCE**Ce/ce.

Unexpected anti-C and anti-c

Twelve patients with C+ RBCs had anti-C in the plasma and one c+ patient had anti-c, as shown in Table 2 with the serologic classification. Among the 12 with anti-C, 10 (83.3%) inherited one or more conventional *RHCE**Ce, but for two the C+ RBC phenotype was due to inheritance of the hybrid allele encoding partial C antigen (*RHD**DIIIa-CE(4-7)-D) with known risk for clinically significant alloanti-C.¹⁹ In the 10 patients with anti-C, despite having conventional *RHCE**Ce, one had altered *RHD* (*DUC2) and two had altered *RHCE**ce (*ceAG and *ce733G). A total of nine patients in this group also had anti-e, despite the presence of conventional *RHCE**ce in six. The patient with anti-c had two altered *RHCE**ce encoding partial c and partial e and associated with a hr^B- phenotype (*RHCE**ceS/ce733G) and also had the hybrid *RHD**DIIIa-CE(4-7)-D encoding partial C antigen.

Unexpected anti-e and anti-E

Of the 38 e+ individuals with unexpected anti-e shown in Table 3 along with the serologic classification, 17 (44.7%) exhibited only conventional *RHCE* (*Ce, *ce, and/or *cE), and nine (21.1%) had one conventional *RHCE**ce in trans to an altered allele including *ceS, *ce48C, *ce733G, *ceTI, or *ceI22G. In contrast, 12 of the 38 (31.6%; Table 3, top) had either two altered *RHCE**ce (n = 4), or one altered *RHCE**ce in trans to altered *RHCE**ce48C (n = 3), or to conventional *RHCE**cE (n = 2), or to *RHCE**Ce (n = 3).

Eleven of the 38 (28.9%) patients with anti-e demonstrated additional unexplained antibodies noted in Tables 1 and 2. Of the 76 RHCE alleles in 38 patients with anti-e, 28 were altered RHCE alleles (36.8%) and 48 were conventional alleles (63.2%; Table 3). In three, anti-f (anti-ce) was suspected associated with genotypes *RHCE**Ce/ceAG (n = 1) and *RHCE**Ce/ce733G (n = 2). Only one patient had unexpected anti-E, but RH genotyping revealed conventional RHCE alleles, *RHCE**Ce/cE (Table 3).

In summary, in this patient population with unexplained Rh antibodies the variant RHCE alleles in descending order of frequency included: *RHCE**ce48C (11/28), *RHCE**ce733G (4/28), *RHCE**ce48C,733G (3/28), *RHCE**ceS (3/28), *RHCE**ce48C (3/28), *RHCE**ceMO (1/28), *RHCE**ceAG (1/28), *RHCE**CeI22G (1/28), and *RHCE**ceTI (1/28).

DISCUSSION

In this study, patients with unexpected Rh antibodies (defined as antibodies against RH antigens for which the patient RBCs type as positive) from a large cohort of Brazilian SCD patients were RH genotyped and demonstrated that: 1) The most common altered RH alleles were: *RHD**DIIIa and *RHD**DAR (*RHD* locus) and *RHCE**ce48C, *RHCE**ce733G, and *RHCE**ceS (*RHCE* locus); 2) patients who had an unexpected Rh antibody identified in the plasma often had only conventional RH alleles encoding the antigen under evaluation (34/64, 53.1%), consistent with other reports;^{10,20,21} and 3) the number of Rh antibodies that could not be classified as auto- or alloantibodies by the referring laboratory using serologic methods was high (71.9%; 46/64); and 4) RH direct sequencing was effective in identifying RH variants in patients with unexpected Rh antibodies. The RH genotype information can be used to guide the transfusion support of this highly transfused population when the clinical significance of the unexpected Rh antibody is unknown and the serologic investigation to determine allo- or autoreactivity is inconclusive or uncertain.

The specific alleles associated with anti-D identified in our studied population of RH-alloimmunized Brazilian SCD patients differs somewhat from reports of RH diversity in SCD patients of different ethnic backgrounds. In this Brazilian cohort, *RHD**DAR and *RHD**DIIIa were the most common altered *RHD*, while the *DAU* allele cluster was underrepresented. In studies of SCD patients of African American origin, the *DAU* allele cluster represents the largest proportion of *RHD* variation.^{10,22} *DAU* alleles identified in previous SCD cohorts, such as *RHD**DAU0, are not strongly associated with anti-D development, while *RHD**DIIIa and *RHD**DAR carriers are known to be at risk for clinically significant anti-D.^{14,20} We compared the RH genotype results to that of previous Brazilian SCD and blood donor cohorts including both Rh-alloimmunized and non-Rh-alloimmunized individuals.^{21,23,24} Consistent with our data, *RHD**DAR and *RHD**DIIIa were prevalent among Rh-alloimmunized SCD patients, and *RHD**DAU were not

commonly found. When nonalloimmunized SCD patients and blood donors were studied, the higher frequency of *RHD***DAR* and the relatively lower frequency of *RHD***DAU* persisted. The *RHD* variation distribution identified in our present cohort reflects the Brazilian distribution of *RHD*.

The *RHCE* alleles identified in these patients with unexplained Rh antibodies were similar to those previously encountered in African American and African Caribbean SCD patients.^{10,22} *RHCE***ce48C*, *RHCE***ce733G*, and *RHCE***ceS* were the most prevalent altered alleles, either as compound heterozygotes or in trans to a conventional *RHCE* alleles. *RHD***DIIIa-CE* (4-7)-*D* in cis to *RHCE***ceS* (r'S haplotype Type 1) was also seen in two of 12 C+ patients with anti-C, similar to what was found in African American and African Caribbean patients who were RhC alloimmunized.^{10,25,26} As reported previously, *RHCE***Ce* is more common in Brazilian patients with SCD than in African American.^{10,27}

Transfusion for patients with unexplained Rh antibodies based on the RH genotype

A secondary goal was to consider how information on the RH genotype could inform a transfusion protocol for the patients with unexplained Rh antibodies (defined above) that also considers which patients might be better transfused with *RH* genotype-matched units if possible. In this study, six anti-D and two anti-C (8/64, 12.5%) were confirmed by genotyping to be associated with clinically significant partial D phenotypes (*DIIIa*, *DIVa*, *DAR*) or with a partial C phenotype, with clear indication for transfusion with D- or C- units (or alternatively *RH* genotype-matched units), respectively, despite the observation that the serologic workup was indeterminate for anti-D associated with *RHD***DIVa* and for both samples with partial anti-C. Six anti-D and 10 anti-C, with indeterminate or autoreactivity patterns were in patients confirmed to have one or more conventional *RHD* or *RHCE***Ce* and therefore not predicted to be at risk for clinically significant alloanti-D or anti-C, respectively. The only unexpected anti-c, indeterminate by serologic investigation, was associated with inheritance of two altered *RHCE***ce* encoding a hr^B- phenotype with potential for clinically significant alloantibody production. Transfusion with *RH*-genotype matched units would be indicated if decreased survival of c+ RBCs is observed (Table 2).

Anti-e identified in patients with e+ RBCs is not uncommon in this patient population. Among 38 samples with anti-e, one demonstrated alloreactivity, 30 were indeterminate, and seven were classified as autoreactive. *RH* genotyping found only conventional alleles in 17, and one conventional allele in 14 and as such 31 of 38 are not predicted to be at risk for alloanti-e. Genotyping confirmed that the anti-e with characteristics of an alloantibody was associated with partial e antigen encoded by *RHCE***ceMO/cE*, while anti-e associated with partial e encoded by *RHCE***ceS/cE* was indeterminate in serologic testing, and anti-e in two samples with partial e encoded by *RHCE***ce48C*, 733/*ce48C* were autoreactive. The inheritance of

*RHCE***cE* in trans allows transfusion of e- donor units for these patients without risk for anti-E. The risk for anti-E in patients with *RHCE***ce48C* requires further study.

*RHCE***ce48C* is a common allele in this population and was identified in 23.7% of samples with anti-e. Two were homozygous *RHCE***ce48C/ce48C*, and one example each in trans to **ce733G*, **ce48C*, 733*G*, or **ce48C*. *RHCE***ce48C* encodes weak e antigen without evidence of epitope loss and, in the present cohort, most (77.8%) of the antibodies associated with *RHCE***ce48C* were indeterminate and could not be serologically classified as auto- or alloantibodies. The clinical significance of anti-e identified in patients with this allele requires further study.²⁸ In all but five patients in this cohort, *RHCE***ce48C* was in trans to conventional *RHCE* and patients could be transfused with units homozygous for the conventional allele.

This study confirms the challenges in multiply transfused patients to determine if unexplained Rh antibodies are allo- or autoantibodies and shows how RH genotyping can guide transfusion therapy. Serologic autoreactivity is often used as a surrogate to predict clinical significance. However, sufficient serum or plasma and pretransfusion autologous RBCs are needed, but patient samples are almost always not adequate in volume to do multiple adsorptions and patients often have been recently transfused. Testing is time-consuming, and laborious methods are required to separate transfused from patient cells and are often not successful. Complex adsorption studies are only available in high complexity reference laboratories, and results and interpretations can be subjective and subject to dilution of the antibody reactivity.

One limitation of this study is that the data do not give information on the likelihood of alloimmunization associated with specific alleles as the numbers of specific RH genotypes are small and data regarding the frequency of the identified RH variant alleles in our nonimmunized patient population was not collected. Determination of risk for alloimmunization would require a much larger longitudinal study with follow-up on outcomes on *RH*-genotyped patients. The number of different RH allele combinations alone precludes any conclusions about likelihood of alloimmunization.

Future perspectives

The strategy of identifying *RH* variants before the beginning of the transfusion protocol and prospectively providing *RH* genotype-matched transfusions would be anticipated to reduce Rh alloimmunization.⁹ However, this strategy would require having enough donors and there are cost considerations associated with genotyping enough donors to meet the transfusion needs of recipients with Rh variant phenotypes. Additionally, the risk for an immune response to conventional Rh antigen in patients with altered alleles is not always known,¹⁴ especially for e antigen. Further studies are needed to define the immunogenicity and clinical relevance of antibodies associated with *RH* variation, realizing these

may be patient or episode specific. Recently, Chou and colleagues²⁸ have evaluated the feasibility of supplying a cohort of African American SCD patients on chronic transfusion therapy with RH genotype-matched units and have demonstrated that providing RH genotype and K-matched units prophylactically for all transfusions would require 25% additional donations compared to serologic CEK matching when units from donors of African ancestry are selected.²⁸

In conclusion, this study performed RH genotyping on Brazilian SCD patients with unexpected Rh antibodies. The majority of serologic investigations performed in local reference laboratories were inconclusive as to allo- or auto-characteristics mainly due to the fact that the patients were heavily transfused, a not uncommon occurrence and a significant confounding factor when attempting to select units for transfusion. The majority of the Rh antibodies identified in the studied cohort was associated with inheritance of only conventional RH alleles or were associated with inheritance of one conventional RH allele. These patients are not predicted to be at risk for clinically significant alloreactivity and can be transfused with donor units matched to their conventional RH allele(s). A small number of unexpected Rh antibodies were associated with inheritance of RH variants known to encode partial Rh antigens of clinical significance (D, C) and potential significance (hr^B). Although more studies are needed including clinical outcomes to determine the significance for transfusion associated with inheritance of some RH variant alleles with the selection of units based on RH genotyping, we show here that RHD and RHCE genotyping is helpful to begin to develop transfusion protocols and allocate use of RH genotyped unit resources.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

- Hendrickson JE, Hod EA, Perry JR, et al. Alloimmunization to transfused HOD red blood cells is not increased in mice with sickle cell disease. *Transfusion* 2012;52:231-40.
- Vichinsky EP, Luban NL, Wright E, et al. Prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. *Transfusion* 2001;41:1086-92.
- Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1990;76:1431-7.
- Smith NH, Hod EA, Spitalnik SL, et al. Transfusion in the absence of inflammation induces antigen-specific tolerance to murine RBCs. *Blood* 2012;119:1566-9.
- Hendrickson JE, Chadwick TE, Roback JD, et al. Inflammation enhances consumption and presentation of transfused RBC antigens by dendritic cells. *Blood* 2007;110:2736-43.
- Lasalle-Williams M, Nuss R, Le T, et al. Extended red blood cell antigen matching for transfusions in sickle cell disease: a review of a 14-year experience from a single center (CME). *Transfusion* 2011;51:1732-9.
- Sakhalkar VS, Roberts K, Hawthorne LM, et al. Alloimmunization in patients receiving multiple blood transfusions. *Ann NY Acad Sci* 2005;1054:495-9.
- Tahhan HR, Holbrook CT, Braddy LR, et al. Antigen-matched donor blood in the transfusion management of patients with sickle cell disease. *Transfusion* 1994;34:562-9.
- Dezan MR, Oliveira VB, Bianchi JV, et al. Effectiveness of a red cell antigen-matching transfusion protocol in sickle cell disease patients. *ISBT Sci Ser* 2016;11:132-9.
- Chou ST, Jackson T, Vege S, et al. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood* 2013;122:1062-71.
- Reid ME, Halter Hipsky C, Hue-Roye K, et al. Genomic analyses of RH alleles to improve transfusion therapy in patients with sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis* 2014;52:195-202.
- O'Suoi C, Liem RJ, Mack AK, et al. Alloimmunization in sickle cell anemia in the era of extended red cell typing. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:1487-91.
- Casas J, Friedman DF, Jackson T, et al. Changing practice: red blood cell typing by molecular methods for patients with sickle cell disease. *Transfusion* 2015;55:1388-93.
- Noizat-Pirenne F, Toumamil C. Relevance of RH variants in transfusion of sickle cell patients. *Transfus Clin Biol* 2011;18:527-35.
- Carneiro-Proietti AB, Kelly S, Miranda Teixeira C, et al. Clinical and genetic ancestry profile of a large multi-centre sickle cell disease cohort in Brazil. *Br J Haematol* 2018;182:895-908.
- Dezan MR, Ribeiro IH, Oliveira VB, et al. RHD and RHCE genotyping by next-generation sequencing is an effective strategy to identify molecular variants within sickle cell disease patients. *Blood Cells Mol Dis* 2017;65:8-15.
- Legler TJ, Maas JH, Kohler M, et al. RHD sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. *Transfus Med* 2001;11:383-8.
- Chiu RW, Murphy MF, Fidler C, et al. Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin Chem* 2001;47:667-72.
- Tournamille C, Meunier-Costes N, Costes B, et al. Partial C antigen in sickle cell disease patients: clinical relevance and prevention of alloimmunization. *Transfusion* 2010;50:13-9.
- Wagner FF, Ladewig B, Angert KS, et al. The DAU allele cluster of the RHD gene. *Blood* 2002;100:306-11.
- Castilho L, Rios M, Rodrigues A, et al. High frequency of partial DIIIa and DAR alleles found in sickle cell disease patients suggests increased risk of alloimmunization to RhD. *Transfus Med* 2005;15:49-55.
- Chou ST, Flanagan JM, Vege S, et al. Whole-exome sequencing for RH genotyping and alloimmunization risk in children with sickle cell anemia. *Blood Adv* 2017;1:1414-22.

23. Gaspardi AC, Sippert EA, De Macedo MD, et al. Clinically relevant RHD-CE genotypes in patients with sickle cell disease and in African Brazilian donors. *Blood Transfus* 2016;14: 449-54.
24. Prisco Arnoni C, Guilhem Muniz J, de Paula Vendrame TA, et al. RHCE variants inherited with altered RHD alleles in Brazilian blood donors. *Transfus Med* 2016;26:285-90.
25. Silvy M, Tournamille C, Babinet J, et al. Red blood cell immunization in sickle cell disease: evidence of a large responder group and a low rate of anti-Rh linked to partial Rh phenotype. *Haematologica* 2014;99:e115-e7.
26. Silvy M, Di Cristofaro J, Beley S, et al. Identification of RHCE and KEL alleles in large cohorts of Afro-Caribbean and Comorian donors by multiplex SNaPshot and fragment assays: a transfusion support for sickle cell disease patients. *Br J Haematol* 2011;154:260-70.
27. Dinardo CL, Ito GM, Sampaio LR, et al. Study of possible clinical and laboratory predictors of alloimmunization against red blood cell antigens in cancer patients. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013;35:414-6.
28. Chou ST, Evans P, Vege S, et al. RH genotype matching for transfusion support in sickle cell disease. *Blood* 2018;132:1198-207.