

**INSTITUTO NACIONAL DE ENSINO SUPERIOR E PESQUISA**

**CENTRO DE CAPACITAÇÃO EDUCACIONAL**

**CAROLINE EUGÊNIO MARTINS**

**ANTÍGENO ERITROCITÁRIO RHD: IMPORTÂNCIA DA  
IDENTIFICAÇÃO DAS FORMAS VARIANTES**

**RECIFE**

**2017**

**CAROLINE EUGÊNIO MARTINS**

**ANTÍGENO ERITROCITÁRIO RHD: IMPORTÂNCIA DA  
IDENTIFICAÇÃO DAS FORMAS VARIANTES**

Monografia apresentada ao Instituto Nacional de Ensino Superior e Pesquisa e Centro de Capacitação Educacional, como exigência do Curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Karla Melo Ferreira da Silva

**RECIFE**

**2017**

616.1

M379a

MARTINS, Caroline Eugênio.

**Antígeno eritrocitário RHD: importância da identificação das formas variantes.** / Caroline Eugênio Martins Correia. Recife: O Autor, 2017.

38 p: il.

**Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Hematologia e Hemoterapia.**

1. SISTEMA SANGUÍNEO - RH. 2. ANTÍGENO RHD. 3. ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS – VARIANTES RHD. Título.

**CAROLINE EUGÊNIO MARTINS**

**ANTÍGENO ERITROCITÁRIO RHD: IMPORTÂNCIA DA  
IDENTIFICAÇÃO DAS FORMAS VARIANTES**

Monografia para obtenção do grau de Especialista em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial.

Recife, 01 de Fevereiro de 2017.

**EXAMINADOR:**

Nome:

Titulação:

**PARECER FINAL:**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por me conceder paciência e discernimento.

Agradeço aos meus pais, pelo suporte e por serem presentes na minha vida.

Agradeço a minha turma, por tornar os meus fins de semana de aula mais leves e ricos em aprendizado.

Agradeço aos meus professores, pelos ensinamentos e dedicação.

Agradeço a minha orientadora, Prof. Dra. Karla Melo, por me encorajar na escolha do tema, pela paciência e dedicação.

## **EPÍGRAFE**

“Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho” – Dalai Lama

## RESUMO

O antígeno RhD é altamente conformacional, qualquer alteração de aminoácido em uma parte da proteína, pode afetar a expressão na sequência de epítomos ou resultar em novos epítomos gerando variações de sua expressão fenotípica na superfície da hemácia. O fenótipo D fraco ocorre por alterações de nucleotídeos que levam a substituição de aminoácidos na região transmembranar e intracelular da proteína Rh enquanto que o fenótipo D parcial ocorre por alterações de nucleotídeos ou rearranjos gênicos que levam a substituição de aminoácidos na região extracelular da proteína Rh e o fenótipo DEL apresenta uma expressão muito reduzida do antígeno RhD, o que impossibilita sua detecção pelos testes sorológicos. Nosso objetivo foi descrever a importância da identificação das formas variantes do antígeno eritrocitário RhD. Foi realizada uma revisão de literatura enfocando na importância da identificação das formas variantes do antígeno eritrocitário RhD na medicina transfusional. Populações miscigenadas, tais como a população brasileira, apresentam uma grande variedade de alelos RHD. E como a incidência das variantes está relacionada a origem étnica, recomenda-se que cada país tenha suas próprias estratégias e políticas para seleção dos reagentes e métodos usados na tipagem RhD. Devido aos padrões de reatividade apresentados pelos antígenos RhD parcial e RhD fraco, recomenda-se o uso de dois diferentes reagentes anti-D monoclonais. Nos casos de discrepância nos resultados sorológicos é imprescindível o uso da biologia molecular. Identificar as variantes RhD evita a aloimunização, o uso desnecessário de imunoglobulina anti-D nas gestantes e permite poupar bolsas de sangue RhD negativo.

Palavras-chave: Sistema Sanguíneo Rh. Antígeno RhD. Antígenos eritrocitários. Variantes RhD. Aloimunização.

## **ABSTRACT**

The RhD antigen is highly conformational, any amino acid change in a part of the protein, can affect expression in the epitope sequence or result in new epitopes generating variations in its phenotypic expression on the surface of the erythrocyte. The weak D phenotype occurs by nucleotide changes that lead to amino acid substitution in the transmembrane and intracellular Rh protein region while the partial D phenotype occurs by nucleotide changes or gene rearrangements that lead to amino acid substitution in the extracellular region of Rh protein the DEL phenotype shows a very reduced expression of the RhD antigen, which makes it impossible to detect them by serological tests. Our objective was to describe the importance of identifying the variant forms of erythrocyte antigen RhD. A review of the literature was carried out focusing on the importance of the identification of the variant forms of RBC erythrocyte antigen in transfusion medicine. Mixed populations, such as the Brazilian population, have a large variety of RHD alleles. And since the incidence of variants is related to ethnic origin, it is recommended that each country have its own strategies and policies for the selection of reagents and methods used in RhD typing. Due to the reactivity patterns presented by partial RhD antigens and weak RhD, the use of two different monoclonal anti-D reagents is recommended. In cases of discrepancy in the serological results it is essential to use molecular biology. Identifying the RhD variants avoids alloimmunization, the unnecessary use of anti-D immunoglobulin in pregnant women and allows to save bags of RhD negative blood.

**Keywords:** Blood Rh System. RhD antigen. Erythrocyte antigens. RhD variants. Aloimmunization.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1:</b> Estrutura da proteína Rh na membrana eritrocitária.....	19
<b>FIGURA 2:</b> Proteína RhD parcial.....	21
<b>FIGURA 3:</b> Proteína RhD fraco.....	24
<b>FIGURA 4:</b> Proteína RhD DEL.....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Sigla</b>	<b>Descrição</b>
Rh	Sistema Rh
RhD	Antígeno RhD
RHD	Gene RHD
RHCE	Gene RHCE
RH	Gene RH
RHD-CE-D	Gene Híbrido RHD-CE-D
DII	Antígeno II
DIII	Antígeno III
DIV	Antígeno IV
DV	Antígeno V
DMH	Antígeno MH
DNU	Antígeno NU
DHR	Antígeno HR
DHMi	Antígeno HMi
DFW	Antígeno FW
DHAR	Antígeno HAR
DAR	Antígeno AR
DAU	Antígeno AU
DIIIb	Antígeno IIIb
DIIc	Antígeno IIc
DIVb	Antígeno IVb
DVa	Antígeno Va
DVI	Antígeno VI
DFR	Antígeno FR
DBT	Antígeno BT
DCS	Antígeno CS
IgG	Imunoglobulina G

**IgM**

Imunoglobulina M

**Kell**

Sistema Kell

**DHPN**

Doença Hemolítica do Recém-Nascido

**PCR**

Reação em cadeia de polimerase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1	JUSTIFICATIVA.....	15
1.2	OBJETIVOS.....	16
1.2.1	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>16</b>
1.2.2	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>18</b>
3.1	Sistema Rh.....	18
3.2	Variante RhD.....	20
3.2.1	RhD parcial.....	20
3.2.2	RhD fraco.....	22
3.2.3	RhD DEL.....	24
3.3	Importância Transfusional.....	25
3.4	Importância para a Gestante.....	26
3.5	Método de Diagnóstico e Reagentes Utilizados.....	28
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>37</b>
	<b>DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

A identidade biológica de cada indivíduo está expressa na diversidade da membrana eritrocitária. Esta membrana possui antígenos com características funcionais e polimórficas definidas, constituindo os sistemas dos grupos sanguíneos (MURADOR, 2007).

Segundo a *International Society of Blood Transfusion* (ISBT), 339 antígenos já foram reconhecidos, dentre os quais, 297 estão descritos em 33 sistemas de grupos sanguíneos (STORRY *et al.*, 2014). A identificação desses antígenos é de extrema importância na medicina transfusional, pois estão presentes, não apenas na hemácia, mas em diferentes tecidos (LUDWIG, 2007).

O Sistema Rh é considerado o mais polimórfico e mais complexo de todos os sistemas sanguíneos, constituído atualmente de 51 antígenos que são codificados por dois genes homólogos, RHD e RHCE. Na prática clínica, cinco antígenos são considerados os principais: o RhD codificado pelo gene RHD e os codificados pelo gene RHCE C/c e E/e (WESTHOFF, 2005; STORRY *et al.*, 2011). Destes, o antígeno RhD é o mais importante devido a sua alta imunogenicidade e envolvimento com reações transfusionais hemolíticas, na incompatibilidade materno-fetal, nas anemias hemolíticas autoimunes e em transplantes de órgãos (BARROS *et al.*, 2006; MOLLISON, 2005).

As hemácias Rh positivo e Rh negativo referem-se à presença ou ausência do antígeno D. Os indivíduos RhD negativos que recebem sangue RhD positivo provavelmente irão produzir anticorpos anti-D após o primeiro contato (KUMAR *et al.*, 2005). Além disso, se uma mulher RhD negativo for sensibilizada e conceber um feto RhD positivo, a passagem de anticorpos anti-D através da placenta durante a gestação resultará em Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) que tem expressiva morbidade e mortalidade (BOWMAN 2003; KLEIN 2014).

O antígeno RhD é considerado como um mosaico composto por 37 epítomos, onde pelo menos nove desses determinantes antigênicos já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais (CASTILHO, 2007). Como são altamente conformacionais, qualquer alteração de aminoácido em uma parte da proteína, pode afetar a expressão na sequência de epítomos ou resultar em novos epítomos (AVENT, 2000). Por esse motivo, os antígenos RhD podem apresentar variações de

sua expressão fenotípica na superfície da hemácia. Sendo classificados em três grupos: variantes D parcial, D fraco e DEL (DENOMME *et al.*, 2008).

O antígeno RhD parcial é caracterizado pela ausência de um ou mais epítopos do antígeno RhD. Essas alterações são promovidas por mutações ou rearranjos gênicos entre os genes RHD e RHCE, modificando os segmentos extracelulares da proteína RhD. Portanto, indivíduos D parcial podem frequentemente produzir anti-D contra aqueles epítopos ausentes quando exposto à proteína RhD completa (GIRELLO, 2002; WAGNER *et al.*, 2005). Na clínica transfusional o ideal é que indivíduos com antígeno RhD parcial receba hemácias de doadores RhD negativos para se evitar a aloimunização. Na raça negra, a variante RhD parcial tem uma incidência um pouco maior em relação ao fenótipo RhD fraco (GIRELLO, 2002; WESTHOFF, 2005).

A variante RhD fraco apresenta menor expressão da proteína RhD na membrana eritrocitária, ou seja, todos os epítopos RhD estão presentes, mas com uma redução dos níveis de antígenos RhD. Esta alteração decorre da variação na porção intramembranar (segmento não reconhecido pelos anticorpos) (WESTHOFF, 2005). Indivíduos pertencentes aos fenótipos RhD fraco não produzem aloanticorpo anti-D, mas podem possuir auto anticorpo anti-D. Na clínica, transfusões com hemácias RhD fraco em indivíduos RhD negativos pode induzir a uma aloimunização. Estima-se que a frequência de RhD fraco na população seja inferior a 1% (KUMAR *et al.*, 2005; GIRELLO, 2002).

O fenótipo RhD DEL, outra variante do antígeno RhD apresenta uma expressão muito reduzida do antígeno RhD, o que impossibilita sua detecção pelos testes sorológicos. Este fenótipo ocorre em 10 a 30% dos chineses e asiáticos. Indivíduos com este fenótipo são geralmente classificados na rotina como RhD negativos, o problema é que doadores com este fenótipo podem estimular o desenvolvimento de anti-D em pacientes RhD negativo (KORMOCZI *et al.*, 2005; QUIN *et al.*, 2005).

Na rotina laboratorial a distinção sorológica entre os antígenos RhD fraco e RhD parcial é muito difícil e mesmo com a grande variedade de monoclonais anti-D disponíveis, ainda se classifica alguns RhD parciais como RhD fraco. Técnicas moleculares permitem distinguir as hemácias que perdem ou apresentam epítopos alterados (RhD parcial) daquelas que possuem níveis reduzidos do antígeno RhD

(RhD fraco). A identificação e diferenciação das variantes D é importante para prevenir a aloimunização e evitar o uso desnecessário de hemácias RhD-Negativo em pacientes que não estão em risco de aloimunizar. (CASTILHO *et al.*, 2005; POLIN *et al.*, 2007; DENOMME *et al.*, 2008; CAMPOS *et al.*, 2016). No entanto, são poucos os laboratórios que dispõem desta metodologia e, por isso a classificação sorológica ainda é extremamente importante.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A aloimunização Rh consiste na sensibilização ao antígeno D presente na superfície do eritrócito, que pode ocorrer nas transfusões de sangue incompatíveis e na gestação.

O antígeno RhD por ser altamente imunogênico e pelo seu extenso polimorfismo, podendo se apresentar com uma fraca expressão (D fraco) ou como um antígeno modificado (D parcial), torna sua identificação na prática clínica de grande relevância.



## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Descrever a importância da identificação das formas variantes do antígeno eritrocitário RhD.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar o Sistema Rh em sua composição e importância clínica.
- Descrever as Variantes RhD parcial, fraco e Del.
- Relatar a importância que o antígeno RhD exerce na prática transfusional.
- Explicar a importância da identificação dos antígenos do sistema Rh para gestantes.
- Descrever os métodos de Diagnóstico usados para a identificação do antígeno RhD e seus variantes, e a eficácia dos reagentes utilizados nos testes.

## **2 METODOLOGIA**

Foi realizada uma revisão de literatura enfocando na importância da identificação das formas variantes do antígeno eritrocitário RhD na medicina transfusional. Para fomentar a construção da revisão, foram realizadas buscas em artigos de revistas indexadas em acervos eletrônicos como, os sites da Scientific Electronic Library Online (SciELO), Bireme, banco de dados da Publisher Medline (PubMed), Google Acadêmico e acervo literário.

Foram utilizadas as palavras-chaves: sistema sanguíneo Rh, antígeno RhD, antígenos eritrocitários, variantes RhD e aloimunização.

A pesquisa considerou artigos publicados entre os anos de 2001 a 2016, incluindo-se publicações no idioma português e inglês.

Foi realizada uma análise exploratória para reconhecimento dos artigos que interessavam à pesquisa de maneira geral.

### 3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

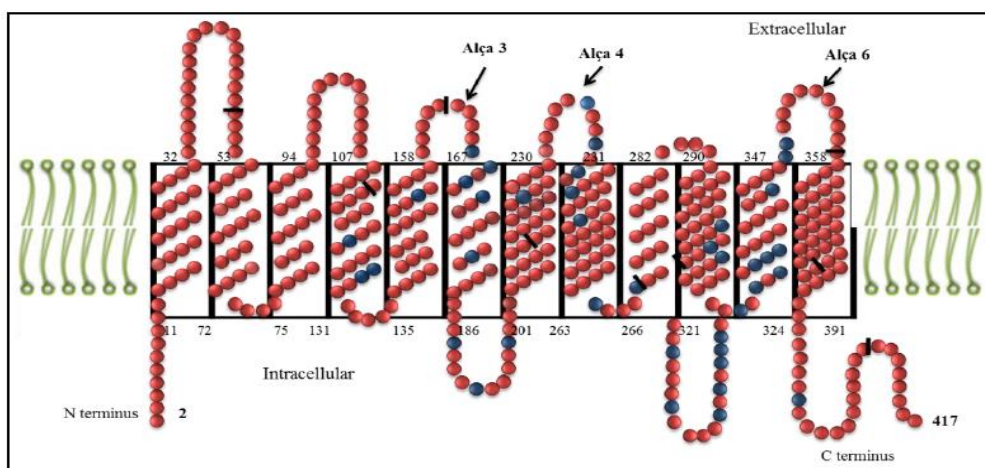
#### 3.1 Sistema Rh

Descoberto em 1939, o sistema Rh é o mais complexo, polimórfico e imunogênico sistema de grupo sanguíneo já conhecido. Após o ABO, é o mais importante na prática transfusional (KLEIN, 2014).

O sistema Rh é o maior de todos os sistemas, constituído atualmente por 51 antígenos (STORRY *et al.*, 2011). Cinco principais e importantes antígenos, D(RH1), C(RH2), E(RH3), c(RH4) e e(RH5), podem ser distinguidos e são considerados mais significativos na prática clínica (GIRELLO, 2002). Destes, o antígeno RhD é considerado o mais imunogênico seguido dos antígenos c, E, C, e, dentre outros (CASTILHO, 2007). As hemácias Rh positivo e Rh negativo referem-se à presença ou ausência do antígeno D, porém ambas expressam os antígenos C/c e E/e (KLEIN, 2014).

Os antígenos do sistema Rh são carregados por duas proteínas transmembranares: RhD e a RhCE, que carregam respectivamente os antígenos D e os C, c, E, e (MOTA *et al.*, 2005). Ambas são hidrofóbicas, não glicosiladas, e compostas de 417 aminoácidos que se distribuem em seis segmentos extracelulares, 12 transmembranárias e sete intracelulares (FIGURA 1). E são produzidas por dois genes ligados e homólogos, o RHD e RHCE (WAGNER, 2004; WESTHOFF, 2005).

Figura 1: Estrutura da proteína Rh na membrana eritrocitária



Fonte: MOTA, 2012. Cada aminoácido é representado por um círculo e os círculos em azul representam os aminoácidos que diferem a proteína RhD da RhCE.

Os genes RHD e RHCE estão localizados no braço curto do cromossomo 1, locus 34-36, em sentidos opostos e separados por uma sequência de 30.000pb. São altamente homólogos, complexos e originam os numerosos antígenos do sistema Rh. Estudos do gene RH demonstram mais de 200 alelos RHD descritos e mais de 50 diferentes alelos RHCE. Apesar da quantidade de alelos já relatado os genes RH ainda não foram completamente caracterizados (WAGNER, 2004; FLEGEL, 2007).

Todo indivíduo herda uma cópia dos genes correspondentes às regiões RhD e RhCE de cada um dos seus progenitores. Entretanto, nos indivíduos RhD negativo, normalmente há uma deleção completa deste gene, que poderá ser transmitida hereditariamente (COUTINHO, 2008). Existem basicamente três mecanismos moleculares de negatividade do RHD: deleção total do gene RHD, pseudogene RHD e gene híbrido. O primeiro caso está presente em pessoas Rh negativo e é mais comumente causado pela homozigose de um haplótipo no qual o gene RHD foi deletado. No segundo, uma proteína Rh não funcional é produzida e nenhum polipeptídeo D atinge a superfície eritrocitária (WAGNER, 2004). No terceiro caso, partes de um gene é trocada por partes correspondentes de outro gene (partes do gene RHD em RHCE e vice-versa), resultando em alelos híbridos responsáveis por algumas variantes dos antígenos RhD e RhCE (PHAM *et al.*, 2009).

Anticorpos Rh em sua maioria são IgG, não fixam complemento e atravessam a placenta. Raramente ocorrem de forma natural, ou seja, são imunes, resultantes de transfusão ou gravidez anterior (FLEGEL, 2007; HOFFBRAND, 2013). Como a imunização pode ocorrer em receptores RhD negativos, o antígeno RhD é de grande importância clínica, pois tem papel relevante na destruição imune das hemácias em transfusões alogênicas, na incompatibilidade materno-fetal, nas anemias hemolíticas e em transplantes de órgãos (KUMAR *et al.*, 2005).

O antígeno RhD é o mais prevalente na população, sendo também considerado o mais antigênico dos antígenos do sistema Rh. A probabilidade de imunização por RhD é muito mais alta quando comparada com outros antígenos de grupos sanguíneos humano que ocasionalmente produzem anticorpos irregulares. Aproximadamente 80% dos indivíduos Rh negativo que recebem sangue Rh positivo irão produzir anticorpos anti-D após o primeiro contato (FROHN *et al.*, 2003; ASFOUR *et al.*, 2004).

Considerado como um mosaico, o antígeno RhD é composto por 37 epítomos altamente conformacionais. Alterações na expressão da sequência de aminoácidos em uma parte da proteína que compõe os epítomos, pode afetar sua sequência ou resultar em novos epítomos. Por esse motivo, os antígenos do grupo sanguíneo RhD podem apresentar variações de sua expressão na membrana eritrocitária (CASTILHO, 2007; AVENT, 2000). Sendo classificados em três grupos: variantes D parcial, D fraco e DEL (DENOMME *et al.*, 2008).

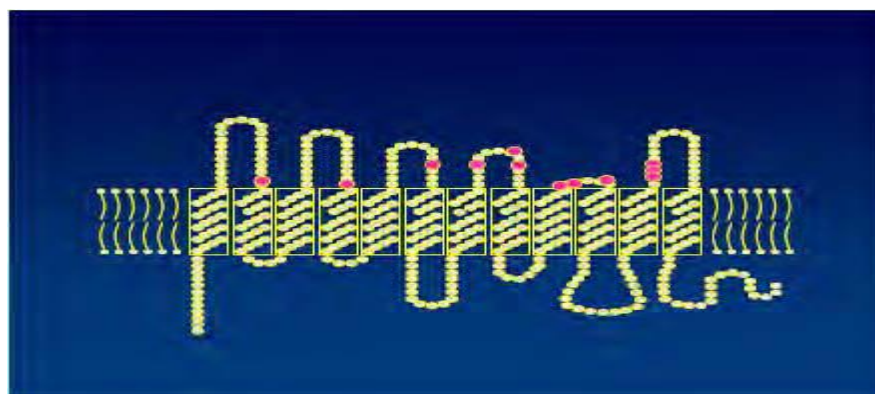
### 3.2 Variantes RhD

#### 3.2.1 RhD parcial

Os antígenos D parcial são caracterizados pela ausência de um ou mais epítomos da proteína D. Do ponto de vista molecular, o fenótipo D parcial pode resultar de quatro mecanismos genéticos: genes híbridos RHD/RHCE, pontos de mutação no gene RHD levando a troca de um único aminoácido na região extracelular da proteína D, com subsequente perda de alguns epítomos ou expressão de um antígeno de baixa incidência, mutações sem sentido e deleção de nucleotídeos (GIRELLO, 2002; WAGNER *et al.*, 2005).

Estas alterações ocorrem nos segmentos extracelulares da proteína RhD, nas alças onde estão localizados os epítomos Rh, mudando sua conformação e a exposição dos epítomos de RhD (FIGURA 2) (RODRIGUES, 2005). Este fato explica por que os indivíduos com fenótipo RhD parcial perdem a expressão de alguns epítomos do antígeno D e podem desenvolver aloanticorpo anti-D, ao entrarem em contato com hemácias RhD positivo normais (WAGNER *et al.*, 2005).

Figura 2: Proteína RhD parcial



Fonte: SABINO, 2008. Aminoácidos em rosa indicam que as substituições na proteína RhD parcial ocorrem nas alças extracelulares onde se localizam os epítomos RhD.

As categorias RhD parcial são diferenciadas em DII, DIII, DIV, DV, DMH, DNU, DHR, DHMi, DFW, R<sub>0</sub><sup>Har</sup>, DAR e DAU que ocorrem pela presença de mutações de ponto *missenses* do gene RHD, enquanto as variantes DIIIb, DIIc, DIVb, DVa, DVI, DFR, DBT e DCS ocorrem pela formação de genes híbridos, em que um fragmento do gene RHD é substituído por um fragmento do gene RHCE. Estes genes codificam proteínas híbridas RhD-CE-D de 417 aminoácidos que conservam alguns epítomos RhD, mas que podem, ocasionalmente, expressar novos epítomos detectáveis sorologicamente (HUANG *et al.*, 1996; WESTHOFF, 2005; CASTILHO, 2007).

A identificação sorológica de D parcial é possível através do uso de anticorpos monoclonais específicos ou técnicas de biologia molecular. Os soros monoclonais anti-D IgG e IgM são usados para a identificação das variantes RhD (CASTILHO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2016). Porém, podem apresentar resultados discrepantes, uma vez que, a reatividade dos reagentes anti-D monoclonal depende da concentração de anticorpo e da avidéz do anticorpo. Tornando a diferenciação de D fraco e D parcial difícil de ser caracterizada na rotina sorológica (MOULDS, 2006; BARROS *et al.*, 2006).

Testes moleculares são mais úteis para confirmação das discrepâncias na tipagem de RhD, pois permitem distinguir as hemácias que perdem ou apresentam epítomos alterados daquelas que possuem níveis reduzidos do antígeno. Além de possibilitar a diferenciação dos subtipos das variantes RhD (BARROS *et al.*, 2006; SABINO, 2008).

O fenótipo D parcial é encontrado com uma incidência um pouco maior na raça negra quando comparado ao D fraco, este fato ocorre devido aos genes híbridos presentes na maioria dos fenótipos D parcial serem comuns em indivíduos de origem africana (SABINO, 2008). Já a incidências das variantes D parcial está associada a origem étnica da população (KULKARNI, 2007). Em Marrocos, há uma prevalência dos tipos DVII, DVI e DVa (KABIRI, 2014). Na Holanda, as variantes DAR, DVI e DRF prevalecem (JONG, 2007).

Em estudo realizado no Brasil, na cidade de São Paulo, com 223 amostras que apresentaram resultados de sorologia discrepantes para antígeno D, as análises moleculares confirmaram a presença de variantes RhD. Das 223 amostras, 55

(24,6%) foram caracterizadas como D parcial, com prevalência dos tipos DAR, DVI e DIVa (CAMPOS *et al.*, 2016).

Em um outro estudo, realizado no Hemocentro da cidade de Botucatu, de um total de 72 amostras testadas sorologicamente, 36 destas amostras foram classificadas como D parcial. Sendo identificado os subtipos DII, DIII, DV, DVII, DFR com uma prevalência das variantes DFR, DIII e DV (SABINO, 2008). Em 2011, Credidio *et al.*, realizou um estudo com 306 amostras de sangue de doadores brasileiros e pacientes que apresentavam resultados discrepantes para antígeno D. Destas amostras, 136 (44,4%) foram identificadas como D parcial, com uma maior prevalência dos tipos DAR, DFR e DVa (CREDIDIO, *et al.*, 2011). Estes dados comprovam que devido à grande miscigenação a população brasileira apresenta uma grande variedade de subtipos D parcial (ARNONI *et al.*, 2013).

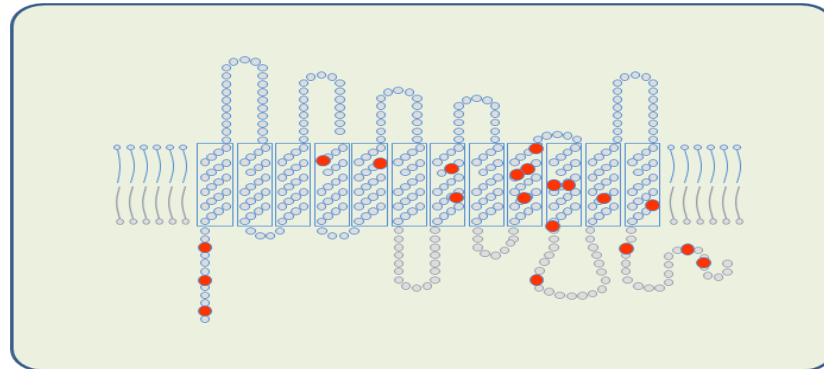
Os indivíduos que apresentam D parcial, embora frequentemente sejam rotulados como Rh positivos nos testes convencionais, podem ser aloimunizados por transfusões de sangue Rh positivo ou na gestação de fetos Rh positivos (WESTHOFF, 2007). Na clínica transfusional, receptores D parcial devem receber hemácias RhD negativas, independente da categoria do antígeno RhD parcial presente. Pacientes e gestantes com o fenótipo D parcial devem ser classificados como RhD-negativo (SABINO, 2008; CREDIDO, 2010).

### **3.2.2 RhD fraco**

O antígeno RhD fraco é uma variante fenotípica do antígeno Rh que apresenta menor expressão da proteína RhD na membrana eritrocitária em decorrência de mutações pontuais. Estas alterações ocorrem na região intracelular ou na região transmembrana e não na superfície externa da hemácia (FIGURA 3) (WESTHOFF, 2005; GIRELLO, 2011).

As hemácias com fenótipo RhD fraco não apresentam falta de epítomos RhD extracelulares, as alterações que acontecem afetam a eficiência de inserção com subsequente redução da quantidade do antígeno RhD na membrana. Este fato explica a redução do número de sítios antigênicos nessas hemácias, bem como a ausência de aloanticorpos anti-D nos indivíduos RhD fracos (WESTHOFF, 2005; WAGNER *et al.*, 2000; MULLER *et al.*, 2001).

Figura 3: Proteína RhD fraco



Fonte: CREDIDIO, 2010. Os aminoácidos em vermelho indicam que as alterações na proteína RhD ocorrem nos segmentos intracelulares e transmembranares.

A densidade antigênica do antígeno RhD normal no eritrócito varia entre 10.000 a 25.000 sítios por eritrócito, enquanto que, os antígenos RhD fraco apresentam densidades antigênicas que variam de 53 a 4.000 sítios antigênicos por hemácias (WESTHOFF, 2004). A diminuição da expressão destes antígenos na membrana dificulta consideravelmente a sua identificação sorológica, que depende das características do reagente utilizado e da técnica de hemaglutinação (MOTA *et al.*, 2005; WESTHOFF, 2005). Devido a esta expressão variável a identificação de uma variante D nunca deve ter como base apenas os critérios sorológicos (B-N PHAM *et al.*, 2013).

O método mais confiável para identificar variantes RhD é a análise molecular. Atualmente, por meio destas análises, foram descritos 100 tipos diferentes de D fraco (B-N PHAM *et al.*, 2013; WAGNER, 2016). As combinações de alelos D fraco variam de acordo com a raça, estima-se que sua frequência na população seja inferior a 1%. Em populações caucasianas os tipos 1, 2 e 3 são os mais prevalentes, e os tipos 4.0 e 4.2.2 há mais relatados em populações de origem africana (GIRELLO, 2002; RODRIGUES, 2005; FLEGEL *et al.*, 2009).

As populações miscigenadas, tais como a população brasileira, podem apresentar uma alta variedade de alelos RHD (CAMPOS, 2016). No Brasil, os tipos 1, 2 e 4 são o mais frequentes. A nossa população difere da população europeia por apresentar uma maior frequência do antígeno D fraco tipo 4 quando comparado com a frequência do D fraco tipo 3 na Europa, uma vez que o tipo 4 é mais frequente em indivíduos de origem africana e seus descendentes (CREDIDIO, 2011).



Cerca de 90% dos indivíduos RhD fraco não produzem anti-D (WESTHOFF, 2005). Para os tipos 1, 2, e 3 a transfusão de sangue RhD positivo poderia ser considerada segura, já que não há registros na literatura de aloimunização relacionada a estas variantes (DENOMME *et al.*, 2005; FLEGEL, 2006).

Nos últimos anos vem sendo questionado o fato de certos tipos de D fraco serem mais propensos à imunização anti-D. Indivíduos D fraco tipo 4.0, 4.2.2, 11 e 15 podem produzir aloanti-D. Pacientes D fraco que apresentam estas variantes devem receber em transfusão unidades D negativo e nas mulheres grávidas a imunoprofilaxia deve ser considerada. Transfundir essas hemácias em indivíduos RhD negativo pode induzir a aloimunização (BARROS *et al.*, 2006; B-N PHAM *et al.*, 2013; CREDIDIO, 2011).

### 3.2.3 RhD DEL

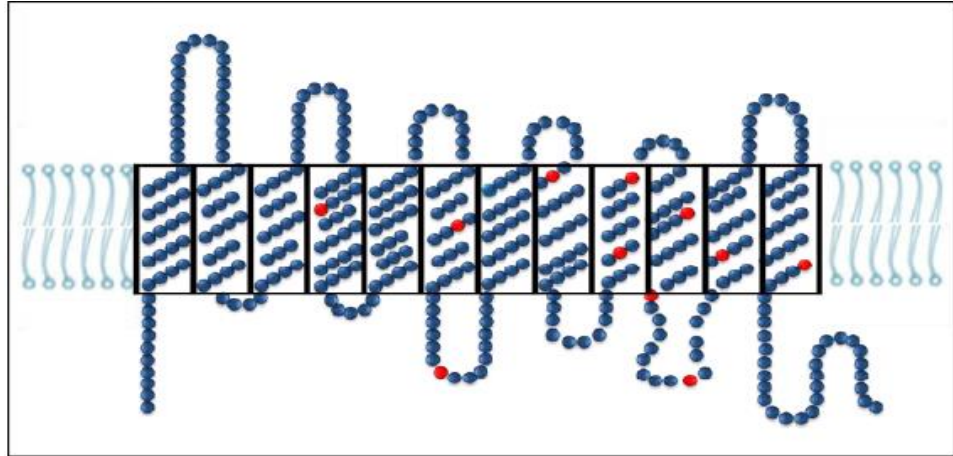
O RhD DEL é uma variante rara do sistema Rh que apresenta uma expressão muito reduzida do antígeno RhD, com densidades antigênicas inferiores a 50 antígenos por hemácia. É uma variante identificada em Asiáticos e seus descendentes. Na população chinesa quase 30% dos indivíduos RhD negativo pertence ao fenótipo DEL (CREDIDIO, 2010; WAGNER *et al.*, 2001; GU *et al.*, 2014).

O fenótipo DEL se origina de vários mecanismos. Deleção do éxon 9, mutação de ponto *missense* ou mutação splice-site e presença dos antígenos RhC e RhE. Todas estas alterações moleculares afetam a inserção da proteína RhD na membrana eritrocitária, o que reduz consideravelmente a expressão do antígeno RhD. As substituições dos aminoácidos dos antígenos DEL estão localizadas nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína RhD (FIGURA 4) (WAGNER *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2005).

Os diferentes alelos RhD DEL podem ser subdivididos em dois grupos, DEL parcial que perde epítomos de característica D causada por genes híbrido RHD-CE-D ou mutação de ponto no gene RHD afetando a expressão extracelular e o DEL que possui todos os epítomos D sugerindo uma completa expressão do antígeno D. No mapeamento dos epítomos o alelo RHD(IVS3+1g>a) está associado ao RhD parcial, destituído de epítomos e os RHD(K409K), RHD(IVS5-38del4), RHD(X418L) e RHD(M295I) possuem todos os epítomos D. Na população chinesa o alelo

RHD(1227G>A) é a mutação mais predominante nos indivíduos DEL e o alelo híbrido RHD-CE-D o segundo mais frequente (KORMOCZI *et al.*, 2005; GU *et al.*, 2014).

Figura 4: Proteína RhD Del



Fonte: MOTA, 2012. Os aminoácidos em vermelho indicam que as alterações na proteína RhD ocorrem nos segmentos intracelulares e transmembranares.

A maioria dos fenótipos DEL é mal interpretada como D negativo devido aos limites da rotina de diferenciação (YASUDA *et al.*, 2005). A identificação da variante DEL é feita somente por técnicas especiais de absorção e eluição ou por técnicas moleculares. A análise molecular é recomendada em amostra de doadores que apresentem o fenótipo RhD negativo e a presença do antígeno C por aglutinação direta e indireta e com resultado positivo por absorção e eluição. Mesmo sendo uma variante com fraca expressão, ainda não foi descartado a possibilidade de hemácias DEL provocarem reação transfusional em receptores D negativo (KORMOCZI *et al.*, 2005; CREDIDIO, 2010; GU *et al.*, 2014).

### 3.3 Importância Transfusional

A transfusão em algumas situações clínicas pode representar a única maneira de se salvar uma vida, ou melhorar rapidamente uma grave condição (VIEIRA, 2012).

A ocorrência de reações transfusionais está associado a diferentes causas, mas o efeito indesejável mais grave associado diretamente às transfusões é aquele

que resulta em hemólise do sangue transfundido, devido a anticorpos pré-formados presentes no plasma do receptor (KLEIN, 2001; CASTILHO, 2008).

As reações transfusionais hemolíticas ocorrem quando as hemácias transfundidas são destruídas. Estas reações podem ser imediatas ou tardias. As reações imediatas, com risco de morte ao paciente é associada a hemólise intravascular maciça, resultante da ação de anticorpos ativadores do complemento das classes IgM e IgG, geralmente associando ao sistema ABO. Reações tardias podem ocorrer quando a transfusão induz a uma resposta imunológica dias ou semanas após o procedimento. Geralmente estão envolvidos anticorpos dos sistemas Rh e Kell (HAMERCHLAK *et al.*, 2010; HOFFBRAND *et al.*, 2013).

No sistema Rh o antígeno RhD é altamente imunogênico e, se hemácias RhD positiva forem transfundidas em um receptor RhD negativo, o mesmo provavelmente desenvolverá aloanticorpos anti-D e posteriormente não poderá ser transfundido com sangue D positivo (KUMAR *et al.*, 2005).

A importância clínica da detecção das variantes RhD na prática transfusional está no fato de que a não detecção destes antígenos em doadores de sangue pode causar aloimunização anti-D nos pacientes RhD negativo. Pacientes D fraco tipo 4.0, 4.2.2, 11 e 15 podem produzir aloanti-D, já indivíduos com os tipos 1, 2, 3 e 4 a transfusão de sangue RhD positivo poderia ser considerada segura, uma vez que não há registros na literatura de aloimunização relacionado a estas variantes. Desta forma, o uso de unidades RhD negativo poderia ser preservado (BARROS *et al.*, 2006; CREDIDIO, 2010). Doadores com antígeno DEL, cuja imunogenicidade ainda não foi totalmente definida, não se recomenda transfundir em receptores RhD negativo. E receptores D parcial, independente da subcategoria presente, devem receber hemácias RhD negativo (YASUDA *et al.*, 2005; SABINO, 2008).

A detecção correta das variantes RhD evita as reações transfusionais, diminuindo assim, o risco para o paciente e possibilita poupar os estoques de sangue RhD negativo.

### **3.4 Importância para a Gestante**

O sistema Rh é de grande interesse clínico na Obstetrícia, pois seus anticorpos estão envolvidos em destruição eritrocitária imunomediadas, representada pela Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) (NARDOZZA *et al.*, 2010).

Embora outros grupos sanguíneos também estejam associados a patologia, o antígeno RhD é o principal devido a sua alta imunogenicidade e ampla prevalência na população (CASTILHO, 2004; RODECK, 2005).

A DHPN pelo fator RhD é uma patologia imunológica causada pela presença de anticorpos maternos anti-D que destroem as hemácias fetais e do recém-nascido (MURRAY, 2007). A destruição prematura das hemácias fetais ocorre devido a presença de anticorpos maternos de classe IgG, que possuem a capacidade de atravessar a barreira placentária. Estes anticorpos são formados por transfusões incompatíveis, gestação ou abortos prévios (DANIELS *et al.*, 2004; RODECK, 2005).

O diagnóstico é feito por meio da pesquisa de anticorpos irregulares através do teste de Coombs indireto, que deve ser realizado em todas as gestantes na primeira visita pré-natal, e repetido na 28ª semana de gestação. Se um anticorpo é identificado e ele está associado ao desenvolvimento de DHPN, deve-se fazer o teste paterno para o tipo RhD, se negativo o feto não será afetado. Caso seja positivo, a zigosidade deve ser avaliada. Pais homozigotos sempre passam o antígeno RhD para sua prole, enquanto os heterozigotos têm 50% de chance de passar (PIRELLI *et al.*, 2006; LUBUSKY, 2010).

Normalmente, os sistemas sanguíneos materno e fetal não se misturam, mas pode ocorrer hemorragias materno-fetal durante a gestação que podem aumentar significativamente os títulos de anticorpos maternos, levando a uma maior gravidade da DHPN. O quadro clínico da DHPN é caracterizado por graus variáveis de anemia, que vai de acordo com a intensidade da hemólise (BAIOCHI, 2009; GEAGHAN, 2011).

A imunoprofilaxia Rh consiste em administrar imunoglobulina anti-D, um hemoderivado, em mães RhD negativo não aloimunizadas ao antígeno RhD. Esta imunoglobulina tem efeito profilático por se ligar a hemácias contendo o antígeno D, eliminando-as da circulação antes que o sistema imunológico materno reconheça o antígeno e inicie a produção de anti-D (DANIELS *et al.*, 2004; WESTHOFF, 2007).

A importância clínica das variantes anti-D para pacientes gestantes está no fato de que as pacientes D fraco, dos subtipos 1, 2 e 3, não produzem anti-D e, assim, podem receber transfusão de sangue Rh positivo e não necessitam receber profilaxia da aloimunização RhD na gestação. Já as pacientes com os subtipos D fraco 11, 15 e 4.2, podem produzir aloanti-D e devem receber a imunoglobulina anti-

D. Gestantes D parcial, embora sejam frequentemente rotuladas como Rh positivo pelos testes convencionais, podem se aloimunizar por transfusão de sangue Rh positivo. Esse é um exemplo clássico do subtipo DVI. Mulheres portadoras desse fenótipo podem desenvolver DHPN fatal e, portanto, devem receber profilaxia com imunoglobulina anti-D (FLEGEL, 2007; WESTHOFF, 2007).

Um diagnóstico precoce e a profilaxia adequada são essenciais para se evitar o uso desnecessário de imunoglobulina anti-D, evitar a aloimunização das gestantes e, assim, diminuir os índices da Doença Hemolítica Perinatal que tem expressiva morbidade e mortalidade.

### **3.5 Métodos de Diagnósticos e Reagentes utilizados**

Por ser o mais imunogênico e apresentar um grande número de variantes, uma das principais causas de discrepância na tipagem RhD é a existência de vários métodos e reagentes com diferentes sensibilidades. Para uma correta detecção as estratégias e políticas para seleção dos reagentes e métodos usados na tipagem RhD varia entre países (SABINO, 2008; CREDIDIO, 2011; KULKARNI *et al.*, 2013).

Anteriormente o reagente usado para detectar o antígeno RhD era produzido através de *pool* de soros humanos de mais de um doador, os anticorpos policlonais. Apesar da sua eficácia, sendo capaz de reconhecer todos os epítomos do antígeno RhD, não é recomendável o uso desse reagente na rotina. Essa conduta se justifica pela dificuldade na obtenção de reagente anti-D policlonais de boa qualidade (MOTA, 2005; SABINO, 2008; BROMILOW, 2007).

Os anticorpos monoclonais são projetados em laboratório para reconhecer especificamente marcadores proteicos especiais na superfície das hemácias. São de origem humana e, dependendo do clone, podem ser IgG ou IgM. São comercializados separadamente ou em mistura de clones (IgG + IgM). Estes reagentes têm sido amplamente produzidos para substituir os policlonais na determinação do antígeno RhD. No entanto, pouco se conhece a respeito da utilização deste reagente na detecção dos antígenos RhD fraco e RhD parcial uma vez que não existe um limite bem definido estabelecido entre estes antígenos. Mesmo com a grande variedade de monoclonais anti-D disponíveis ainda se classifica alguns RhD parciais como RhD fraco (BARROS *et al.*, 2006; DENOMME *et al.*, 2008).

Um único reagente monoclonal pode apresentar tanto reação positiva forte quanto negativa, dependendo da presença ou ausência de determinados epítomos RhD. A reatividade destes reagentes monoclonais anti-D depende da concentração de anticorpos e da avidéz do anticorpo. O número de sítios antigênicos, acessibilidade de epítomos e a concentração de imunoglobulinas, assim como a classe de imunoglobulinas afetam as reações dos antígenos RhD parcial com o reagente monoclonal. A densidade antigênica tem grande efeito no desempenho do reagente anti-D monoclonal na identificação das variantes RhD (MOULDS, 2006; KULKARNI *et al.*, 2007).

Múltiplos métodos podem ser utilizados na fenotipagem RhD, como o teste em microplacas, o gel teste e hemaglutinação em tubo. A sensibilidade do método e os reagentes anti-D podem influenciar os resultados da tipagem RhD (MOTA *et al.*, 2005; SABINO, 2008).

Quando avaliada a reatividade sorológica das variantes RhD com o uso de reagentes monoclonais e pelas técnicas de tubo e gel, associados ao grau de aglutinação obtidos à temperatura ambiente com anticorpos monoclonais IgG, IgM e a mistura de IgG + IgM (Blend), e teste da antiglobulina humana com anticorpos monoclonais IgG e blend. Os tipos de D fraco 1, 3 e 4 e o antígeno D parcial DBT foram detectados a temperatura ambiente com todos os monoclonais utilizados pelas técnicas de tubo e gel, enquanto que o D fraco tipo 2 e 5 e os alelos D parcial categoria VI não foram detectados com monoclonais anti-D IgM, já que apresentam o mesmo padrão de reatividade (CREDIDIO, 2010).

Para tipagem RhD recomenda-se a utilização de dois reagentes monoclonais anti-D, já que devido aos padrões de reatividade apresentados pelos antígenos RhD parcial e RhD fraco os reagentes anti-D IgG ou anti-D IgM não podem ser utilizados isoladamente na rotina de doadores. Por exemplo, antígenos de baixa densidade como os D fraco tipo 2 e 5 e D parcial DVI, DAR, DFR e DHMi não são detectados com monoclonais IgM enquanto que os antígenos D parcial DIVb e DVa não são detectados com monoclonal IgG pelo teste de antiglobulina humana (CREDIDIO, 2010; KULKARNI *et al.*, 2013).

Quando existe resultados discrepantes na fenotipagem RhD, mesmo utilizando dois reagentes anti-D diferentes ou quando amostras de doadores aparentemente RhD negativo são submetidas a testes adicionais para investigação

da presença do antígeno RhD, recomenda-se utilizar um painel constituído de anti-soros monoclonais. Este painel auxilia na diferenciação das categorias de D parciais. O seu uso é a opção mais acessível para os serviços que não realizam os testes moleculares, e desta maneira têm a possibilidade de diferenciar alguns tipos de RhD parcial do fenótipo RhD fraco. Caso não seja possível caracterizar o fenótipo Rh através deste painel, a amostra deve ser submetida a análise molecular (SABINO, 2008; KULKARNI *et al.*, 2013).

Devido à alta homologia existentes entre os genes RHD e RHCE, a estratégia usada na genotipagem RHD leva em consideração as diferenças existentes entre eles em duas regiões genômicas: intron 4 e éxon 10. Assim, são utilizados *primers* que permite determinar a presença do gene RHD pela análise em PCR (BARROS *et al.*, 2006).

A grande importância em caracterizar molecularmente o antígeno RhD fraco deve-se ao fato de não ser possível distinguir sorologicamente o antígeno RhD fraco de alguns antígenos RhD parciais. É comum ao se realizar a genotipagem RhD parcial constatar que muitas amostras fenotipadas como D fraco eram na verdade D parcial. Muitos pacientes têm produzido anti-D pelo fato de terem sido considerados D positivos (SABINO, 2008; CREDIDIO, 2010).

A genotipagem RhD deve ser realizada quando os resultados sorológicos não forem claros ou quando se tratar de paciente politransfundido ou gestantes. Caracterizar molecularmente as variantes RhD contribui significativamente para paciente e gestantes na prevenção da aloimunização anti-D e na indicação da profilaxia Rh (CREDIDIO, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2015).

Devido à grande miscigenação brasileira, com um número bastante diversificado de variantes RhD, recomenda-se que cada centro tenha suas próprias estratégia de diagnósticos melhor adaptadas as condições locais (KULKARNI *et al.*, 2013; SCHMIDT *et al.*, 2015).

## 4 CONCLUSÃO

Por ser o mais prevalente na população e o mais imunogênico do sistema Rh, identificar as formas variantes do antígeno RhD é de grande relevância na prática clínica, pois a não detecção destes antígenos em doadores de sangue pode causar aloimunização anti-D em pacientes RhD negativo.

Populações miscigenadas, tais como a população brasileira, apresentam uma grande variedade de alelos RHD. E devido a incidência das variantes RhD está relacionada a origem étnica, recomenda-se que cada país tenha suas próprias estratégias e políticas para seleção dos reagentes e métodos usados na tipagem RhD.

Devido a reatividade apresentada pelos antígenos RhD parcial e RhD fraco, os reagentes anti-D IgG e IgM não podem ser utilizados separadamente, então recomenda-se o uso de dois reagentes monoclonais anti-D. E se mesmo utilizando os dois reagentes a tipagem RhD apresentar discrepância, pode-se usar um painel constituído de anti-soros monoclonais, que auxilia na diferenciação de algumas categorias D parcial.

A genotipagem RhD permite distinguir as hemácias que perdem ou apresentam epítomos alterados daquelas que possuem níveis reduzidos do antígeno. Esta técnica molecular deve ser realizada quando os resultados sorológicos não forem claros ou quando se tratar de pacientes politransfundido ou gestantes. Combinar as técnicas sorológicas com a biologia molecular permite distinguir de maneira mais eficaz as variantes RhD, em especial os tipos D fraco e D parcial.

A importância de se identificar as formas variantes do antígeno RhD para a medicina transfusional nos permite saber que alguns subtipos D fraco podem causar aloimunização, que o antígeno DEL ainda não tem a sua imunogenicidade totalmente definida e por este motivo não se recomenda transfundir em receptores D negativo. Receptores D parcial independente da subcategoria presente só deve receber hemácias RhD negativo. Para a gestante, permite que seja feita uma profilaxia adequada evitando assim a aloimunização, o uso desnecessário da imunoglobulina anti-D e possibilita a diminuição na incidência da DHPN.



## REFERÊNCIAS

ARNONI, C. *et al.* How do we identify RHD variants using a practical molecular approach?. **Transfusion**, v. 54(4), p. 962-969, 2014.

ASFOUR, M.; NARVIOS, A.; LICHTIGER, B. Transfusion of Rh Dincompatible blood components in Rh D-negative blood marrow transplant recipients. **Med. Gen. Med**, v. 6, p. 22, 2004.

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

BAIOCHI, E. NARDOZZA LMM. Aloimunização. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 31(6), p. 311-9, 2009.

BARROS, C. *et al.* Avaliação de reagentes na detecção dos antígenos D fraco e D parcial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, p. 269-274, 2006.

BROMILOW, I. D ou não D: Eis a Questão (DIAMED AG). **ABO Rev. Méd. Transfus.**, v. 31, p.15-21, 2007.

B-N PHAM, M. *et al.* Molecular analysis of patients with weak D and sorologic analysis of those with anti-D (excluding type 1 and type 2). **Immunohematology**, v. 29(2), p. 55-62, 2013.

BOWMAN, J. Five years of Rh prophylaxis. **Transfusion**, v. 43, p. 1661-1666, 2003.

CAMPOS, F. *et al.* Variant RHD types in Brazilians with discrepancies in RHD typing. **Journal of Clinical Lab. Analysis**, v. 00, p. 1-4, 2016.

CASTILHO, L. PELLEGRINO Jr J. Blood group genotyping. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 26, p. 135-40, 2004.

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

CASTILHO, L. Sistema de Grupo Sanguíneo Rh. In: BORDIN, J.O.; LANGHI JR., D.; COVAS, D. (Eds). **Hemoterapia fundamentos e práticas**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 137-146.

CASTILHO, L. O futuro da aloimunização eritrocitária. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 30(4), p. 259-265, 2008.

COUTINHO, C. M. **Diagnostico do fator RhD utilizando a reação em cadeia da polimerase convencional**. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

CREDIDIO, C. **Variantes do antígeno RhD: estudo sorológico e molecular**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

CREDIDIO, C. PELLEGRINO J Jr, CASTILHO L. Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: impact for typing and transfusion strategy. **Immunohematology**, v. 27(1), p. 6–11, 2011.

DANIELS, G. *et al.* Fetal blood group genotyping from DNA plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. **Vox Sang**, v. 87(4), p. 225-32, 2004.

DENOMME, G. *et al.* Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. **Transfusion**, v. 45, p.1554-1560, 2005.

DENOMME, G. *et al.* Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. **Transfusion**, v. 48, p. 473-478, 2008.

FLEGEL, WA. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. **Curr. Opin. Hematol**, v. 13, p. 476-483, 2006.

FLEGEL, W, DENOMME G, YAZER M. On the complexity of D antigen typing: a handy decision tree in the age of molecular blood group diagnostics. **J Obstet Gynaecol Can**, v. 29, p. 746-52, 2007.

FLEGEL, WA. The genetics of the rhesus blood group system. **Dtsch Arztebl**, v. 104, p. 651-657, 2007.

FLEGEL, W. *et al.* D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. **Transfusion**, v. 49, p. 1059-69, 2009.

FROHN, C. *et al.* Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. **Transfusion**, v. 43, p. 893-898, 2003.

GEAGHAN, SM. Diagnostic laboratory technologies for the fetus and neonate with isoimmunization. **Seminars in perinatology**, v. 35(3), p. 148-54, 2011.

GIRELLO, A.L. Sistema Rh (ISBT 004). In: GIRELLO, A.L.; KÜHN, T.I.B.B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. São Paulo: Editora Senac, 2002. p.107-116.

GIRELLO, A.L. **Fundamentos de Imuno-hematologia eritrocitária**. São Paulo: Editora Senac, 2011.

GU, J. *et al.* Molecular basis of DEL phenotype in the Chinese population. **BMC Med Genet**, v. 15, 2014.

HAMERSCHLAK, N. **Manual de hematologia: programa integrado de hematologia e transplante de medula óssea**. Barueri, SP: Manole, 2010.

HOFFBRAND, A.; MOSS, H. **Fundamentos em Hematologia**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HUANG, CH. Genetic recombination at the human RH locus: a family study of the red cell Evans phenotype reveals a transfer of exons 2-6 from the to the RHCE gene. **American Journal Genetic**, v. 59, p. 825-33, 1996.

KABIRI, Z. *et al.* Testing for partial RhD with a D-Screen Diagast Kit in Moroccan Blood Donors with Weak D Expression. **Jor. of Blood Trnsfusion**, v. 2014, ID. 204301, p. 1-4, 2014.

KLEIN, H. Will blood transfusion ever be safe enough? **Transfusion Medicine**, v. 11, p. 122-124, 2001.

KLEIN, H.; ANSTEE, D. **Mollinson's blood transfusion in clinical medicine**. 12th ed. New York: Wiley-Blackweel, 2014.

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

KULKARNI, S. *et al.* Potencial of commercial anti-D reagents in the identification of partial D variants in Indian population. **Indian J. Med. Res**, v. 125, p. 641-644, 2007.

KULKARNI, S. KASIVISWANATHAN, V. GHOSH, K. A simple diagnostic strategy for RhD typing in discrepant cases in the Indian population. **Blood Transfus**, v. 11(1), p. 37-42, 2013.

KUMAR, H. *et al.* Difficulties in Immunohaematology: The Weak D Antigen. **MJAFI**, v. 61, n. 4, p. 348-350, 2005.

JONG, L. D(etectar)ou não d(etectar) (reagents sanquin). **ABO Rev. Med. Transfus**, v. 31, p. 11-14, 2007.

LUBUSKY, M. Prevention of RhD alloimmunization in RhD negative women. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 154(1), p. 3-7, 2010.

LUDWIG, L.; ZILLY, A. Reações transfusionais ligadas ao sistema ABO. **Newslab**, v. 84, p. 102 – 102, 2007.

MOLLISON, PL. Immunology of red cells. In: Mollison PL. **Blood Transfusion in Clinical Medicine**. London: UK Blackwell, 2005. p. 48-113.

MOTA, M. *et al.* Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. **Vox Sang**, v.88, p. 130-135, 2005.

MOULDS, M. Review: monoclonal reagents and detection of unusual or rare phenotypes or antibodies. **Immunohematology**, v. 22, p. 52-57, 2006.

MÜLLER, T. *et al.* PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. **Transfusion**, v. 41, p. 45–52, 2001.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 168-178, 2007.

MURRAY, N.; ROBERTS, I. Haemolytic Disease of the Newborn. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 92, p. 83-88, 2007.

NARDOZZA, L. *et al.* Bases moleculares do sistema Rh e suas aplicações em obstetrícia e medicina transfusional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 724-8, 2010.

PHAM, B. *et al.* Alloanti-c (RH4) revealing that the (C)ces haplotype encodes a partial c antigen. **Transfusion**, v.49, p.1329-34, 2009.

PIRELLI, K. *et al.* Molecular determination of RhD zygosity. **Am J Obstet Gynecol**, v. 195, p. 172, 2006.

POLIN, H. *et al.* Effective molecular RHD typing strategy for blood donations. **Transfusion**, v. 47, p. 1350-1355, 2007.

QUIN, X. *et al.* Systemic analysis and zygosity determination of the RHD gene in a D negative Chinese Han population reveals a novel D- negative RHD gene. **Vox Sang**, v. 88, p. 35-40, 2005.

RODECK, CH. WHITTLE MJ. Aloimunização das células vermelhas. In: RODECK CH, WHITTLE MJ. Medicina fetal: Fundamentos e prática clínica. Rio de Janeiro: **Livraria e editora Revinter LTDA**, 2005. p. 785-804.

RODRIGUES, A. **Caracterização molecular dos antígenos RhD (RhD fraco e RhD parcial) e sua aplicação na prática transfusional**. 2005. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SABINO, J. **Determinação da incidência de RhD fraco e RhD parcial na população da área de abrangência do Hemocentro de Botucatu**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo, 2008.

SCHIMIDT, L. *et al.* Impact of confirmatory RhD test on the correct serologic typing of blood donors. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 37(5), p. 302-305, 2015.

STORRY, J. *et al.* International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Berlin report. **Vox Sang**, v.101(1), p. 77-82, 2011.

STORRY, J. *et al.* International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Cancun report (2012). **Vox Sanguinis**, v. 107, p. 90–96, 2014.

VIEIRA, M. **Conhecimento da equipe enfermagem sobre hemoterapia**. 2012. Monografia – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2012.

XU, Q. *et al.* Systemic analysis and zygosity determination of the *RHD* gene in a D-negative Chinese Han population reveals a novel D-negative *RHD* gene. **Vox Sanguinis**, v. 15, p. 35–40, 2005.

WAGNER, F. *et al.* Weak D alleles express distinct phenotypes. **Blood**, v. 95, p. 2699–708, 2000.

WAGNER, F. FROHMAJER, A. FLEGEL, WA. *RHD* positive haplotypes in D negative Europeans. **BMC Genet**, v. 2, 2001.

WAGNER, F.; FLEGEL, WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. **Immunohematology**, v.20, p.23-36, 2004.

WAGNER, F. *et al.* Anti-D immunization by DEL red blood cells. **Transfusion**, v. 45, p. 520-526, 2005.

WAGNER, F. **RhesusBase**. Disponível em: < <http://www.rhesusbase.info/>>. Acesso em 18 de novembro 2016.

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

WESTHOFF, C. Review: The Rh blood group D antigen...dominant, diverse, and difficult. **Immunohematology**, v. 21, p. 155-163, 2005.

WESTHOFF, C. The structure and function of the Rh antigen complex. **Semin Hematol**, v. 44(1), p. 42-50, 2007.

YASUDA, H. *et al.* Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. **Transfusion**, v. 45, p. 1581-1584, 2005.

**ANEXO A**  
**DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS**

Eu, Caroline Eugênio Martins, portadora do documento de identidade RG 7.565.498, CPF nº 094.740.704-90, aluna regularmente matriculada no curso de Pós-Graduação em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial, do programa de *Lato Sensu* da INESP – INSTITUTO NACIONAL DE ENSINO SUPERIOR E PESQUISA, sob o nº HC1301418 declaro a quem possa interessar e para todos os fins de direito, que:

1. Sou a legítima autora da monografia cujo título é: “Antígeno eritrocitário RhD: importância da identificação das formas variantes”, da qual esta declaração faz parte, em seus ANEXOS;
2. Respeitei a legislação vigente sobre direitos autorais, em especial, citado sempre as fontes as quais recorri para transcrever ou adaptar textos produzidos por terceiros, conforme as normas técnicas em vigor.

Declaro-me, ainda, ciente de que se for apurado a qualquer tempo qualquer falsidade quanto às declarações 1 e 2, acima, este meu trabalho monográfico poderá ser considerado NULO e, conseqüentemente, o certificado de conclusão de curso/diploma correspondente ao curso para o qual entreguei esta monografia será cancelado, podendo toda e qualquer informação a respeito desse fato vir a tornar-se de conhecimento público.

Por ser expressão da verdade, dato e assino a presente DECLARAÇÃO,

Em Recife, \_\_\_\_/\_\_\_\_ de 2017.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) aluno (a)

Autenticação dessa assinatura, pelo  
funcionário da Secretaria da Pós-  
Graduação *Lato Sensu*