

# BASES MOLECULARES DO SISTEMA RH E SUAS APLICAÇÕES EM OBSTETRÍCIA E MEDICINA TRANSFUSIONAL

LUCIANO MARCONDES MACHADO NARDOZZA<sup>1\*</sup>, ALEXANDRE SZULMAN<sup>2</sup>, JOSE AUGUSTO BARRETO<sup>3</sup>, EDWARD ARAUJO JUNIOR<sup>4</sup>, ANTONIO FERNANDES MORON<sup>5</sup>

Trabalho realizado na Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP

## RESUMO

O sistema Rh é o mais polimórfico e imunogênico de todos os sistemas de grupos sanguíneos. Atualmente mais de 49 antígenos foram identificados sendo cinco principais os antígenos D, C, c, E, e. O conhecimento das bases moleculares do sistema Rh desde a sua primeira clonagem há 17 anos possibilitou o entendimento tanto do mecanismo do fenótipo Rh negativo quanto das variantes dos antígenos RHD e RHCE. As deleções, rearranjos gênicos e as inserções são as principais mutações encontradas. Nos caucasianos, o mecanismo principal do fenótipo Rh negativo é a completa deleção do gene RHD, enquanto nos afrodescendentes é a presença do pseudogene RHD $\Delta$  e do gene híbrido RHD-CE (4-7)-D. Os autores analisam a estrutura do complexo Rh nas hemácias, as bases moleculares do Sistema Rh, os mecanismos de negatividade RHD, além da Expressão fraca e parcial de D.

UNITERMOS: Sistema do Grupo Sanguíneo Rh-Hr. Isoimunização Rh. Complexo Antígeno-Anticorpo.

## \*Correspondência:

Av. Lopes de Azevedo, 888  
Cidade Jardim  
São Paulo – SP  
CEP:05603-001  
Tel: 38151-390  
lunardozza@uol.com.br

O sistema Rh apresenta um grande interesse clínico por seus anticorpos estarem envolvidos em destruição eritrocitária imunomediadas, isto é, reação transfusional hemolítica e doença hemolítica perinatal (DHPN)<sup>1</sup>. Os primeiros relatos sobre sua importância começam por volta de 1600 como uma possível causa de icterícia severa e morte fetal referida como “eritroblastose fetal”<sup>2</sup>. Uma mulher francesa deu à luz a gêmeos: um estava hidrópico e o outro icterício, falecendo mais tarde por *kernicterus*.

Esta grande variedade de sinais e sintomas fetais que vai desde icterícia leve até a hidropisia fatal não foi realmente associada a um único agente. A primeira correlação de um anticorpo antieritrocitário envolvido contra o antígeno Rh foi relatada por Levine et al. em 1939 por meio da investigação de uma reação hemolítica transfusional em uma puérpera devido à transfusão de hemácias ABO compatível de seu marido, após dar à luz a um natimorto<sup>3</sup>. O soro desta mulher aglutinava as hemácias de seu marido e cerca de 80% dos doadores caucasianos ABO compatíveis. Demonstrou-se que este novo anticorpo era independente do sistema ABO, MN e P, sugerindo que a mulher foi imunizada provavelmente por um antígeno fetal de origem paterna.

No ano seguinte, Landsteiner et al.<sup>4</sup> descreveram um anticorpo obtido por meio da imunização de cobaias e coelhos com hemácias de *macaco rhesus*. Este soro aglutinava cerca de 85% das hemácias humanas testadas e o determinante correspondente foi denominado de fator Rh. O estudo com 60

famílias mostrou que o Rh positivo era herdado como um caráter dominante.

Também em 1940, Wiener et al.<sup>5</sup> observaram a mesma especificidade no soro de pessoas com ausência do mesmo determinante e que tinham recebido transfusões ABO compatíveis no passado.

No ano seguinte, Levine et al.<sup>6</sup> encontraram anticorpos similares nos soros de várias puérperas e estes apresentavam reações semelhantes ao soro de animal anti-Rhesus.

Posteriormente, em 1942, Fisk et al.<sup>7</sup> demonstraram a diferença entre o anti-Rh humano e animal e concluíram que não se tratava do mesmo anticorpo, porém a nomenclatura Rh foi mantida.

Somente a partir de 1963 que Levine et al.<sup>8</sup> propuseram que o heteroanticorpo do coelho deveria ser denominado de anti-LW (homenagem a Landsteiner e Wiener) e o humano de anti-D. O nome Rh foi resultante do antígeno LW. Somente em meados dos anos 40, quatro antígenos adicionais C, c, E, e - foram reconhecidos como pertencentes ao sistema Rh. Race et al.<sup>9</sup> possuindo quatro antígenos Rh de diferentes especificidades já definiam sete alelos, enquanto Wiener<sup>10</sup> com três antígenos determinava seis.

Desde a sua descoberta suspeitava-se que esses antígenos eram transmitidos em bloco; um simples gene codificava números aglutinogênicos ou três genes intimamente ligados

1. Livre-docente - Professor associado e chefe disciplina Medicina Fetal da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP

2. Mestre – Pós-graduando do departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP

3. Doutor em Cardiologia - Diretor da COLSAN, São Paulo, SP

4. Doutor em Obstetrícia – Professor-adjunto do departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP

5. Professor titular do departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP

codificavam vários produtos. Atualmente mais de 49 antígenos foram identificados por meio de anticorpos produzidos após transfusão sanguínea ou gravidez. O principal antígeno do ponto de vista clínica é o RhD seguido pelo Rhc.

O antígeno D é o mais imunogênico do sistema Rh sendo 20 vezes mais potente que o c. Aproximadamente 80% dos indivíduos Rh negativo que recebem sangue Rh positivo irão produzir anticorpos anti-D após o primeiro contato<sup>11</sup> e somente 7% a 8% dos indivíduos Rh negativo continuarão não-respondedores<sup>12</sup>.

Anticorpos contra RhD são a principal causa de doença hemolítica fetal e do recém-nascido (DHPN)<sup>13</sup>. A determinação do tipo sanguíneo Rh é importante e deve ser feita precocemente na gestação, pois a DHRN tem expressiva morbidade e mortalidade perinatal. Gestantes RhD negativo, com feto Rh positivo, podem apresentar sensibilização durante o parto, sendo responsável por 14% dos casos de aloimunização<sup>14</sup>.

Mesmo após a introdução da imunoglobulina anti-D, no final dos anos 60, e a combinação da imunoprofilaxia pré e pós-parto no final dos anos 90, a incidência de aloimunização ao antígeno D varia de 0,8% a 1,5% nas gestantes RhD negativo decorrente da hemorragia feto-materno<sup>15</sup>.

No Brasil, a aloimunização Rh ainda é a principal causa de DHRN e o anti-D ainda é o principal responsável pela indicação de fototerapia ou exsanguíneo transfusão em recém-nascido. A profilaxia com imunoglobulina anti-D, quando administrada na dose correta e antecipada, pode evitar a sensibilização ao antígeno D<sup>16-17</sup>.

Assim, o conhecimento detalhado do Sistema Rh é de grande importância, particularmente, em Obstetrícia e em Medicina Transfusional.

### Estrutura do complexo Rh nas hemácias

O grupo sanguíneo Rh (ISBT 004) é o mais complexo, polimórfico e imunogênico sistema de grupo sanguíneo já conhecido em humanos. Após o ABO, é o mais importante em Medicina Transfusional<sup>18</sup>.

Cinco principais e importantes antígenos, D(RH1), C(RH2), E (RH3), c(RH4) e e(RH5), podem ser distinguidos e são responsáveis pela maioria dos anticorpos clinicamente significantes. Com mais de 49 diferentes antígenos caracterizados, é o maior de todos os sistemas sanguíneos.

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. C é antitético ao c enquanto que o antígeno E ao e. Cada cromossomo contém os genes C ou c e E ou e<sup>18</sup>.

Os antígenos estão localizados em duas proteínas expressas na membrana dos eritrócitos e seus percussores imediatos: **RhD (CD240D)** e **RhCE (CD240CE)**, que carregam respectivamente os antígenos **D(Rh1)** e os **C, c, E, e (Rh2-Rh5)** em várias combinações (ce, cE, Ce e CE). Ambas as proteínas RHD e RHCE são hidrofóbicas e não glicosiladas, cada uma com peso molecular de 30 a 32 KD, compostas de 417 aminoácidos que se distribuem em seis segmentos extracelulares (responsáveis diretos pela resposta imune), 12 transmembranosos e sete intracelulares. As porções N-terminal e C-terminal são intracelulares<sup>19</sup>.

As proteínas RhD e RhCE apresentam 92% de homologia e se diferenciam em 35/36 aminoácidos (8,4% de divergência), sugerindo que os genes correspondentes são resultado de uma

duplicação de um gene ancestral comum<sup>19-20</sup>. Este conceito é baseado no fato da identificação de genes Rh-like em primatas não-humanos. As diferenças entre RHD e RHCE ocorrem na região extracelular, nas quais são restritas as alças (porções extracelulares) 2, 3, 4 e 6 (Figura 1).

Na segunda alça, o alelo c diferencia as proteínas RhD e RhCE. As proteínas C/c e E/e são produzidas por um mecanismo de *splicing* alternativo de um RNA mensageiro pré-processamento e o polimorfismo ser103-pro e o pro226-ala e são responsáveis pela especificidade de C/c e E/e respectivamente<sup>21</sup>.

Na membrana eritrocitária, a proteína Rh, juntamente à glicoproteína associada ao Rh (**RhAG/RH50**), codificada por outro gene localizado no cromossomo 6p12-p21, formam o chamado "complexo Rh"<sup>22</sup>. Esse complexo Rh é firmemente ligado ao citoesqueleto da membrana eritrocitária. Outras proteínas adicionais como LW, glicoproteína *Duffy*, banda 3 e proteína associada a integrina (CD47) estão ligadas ao complexo Rh, porém não são necessárias para a sua expressão (Figura 2).

A expressão do Rh na superfície das hemácias depende da glicoproteína RhAG funcional. Quando há ausência da proteína RH50, os antígenos D,E,C,e,c não são expressos sendo denominado fenótipo Rh<sub>null</sub>. As proteínas Rh e RhAG por apresentar homologia com outras proteínas parecem estar envolvidas no transporte de amônia. Além disso, supõe-se que também estão envolvidas no transporte de gases O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. As mudanças na forma das hemácias, principalmente nos indivíduos com fenótipos Rh<sub>null</sub>, indicam uma forte interação entre o complexo Rh e o citoesqueleto da membrana eritrocitária<sup>22</sup>.

### Base Molecular do sistema Rh

O gene RHD foi descoberto em 1992, dois anos após o RHCE. Atualmente, apesar da existência de mais de 170 alelos RHD descritos, este gene não foi ainda completamente caracterizado. Muitos mamíferos apresentam somente um gene Rh correspondendo ao gene RHCE nos humanos.

Experimentos feitos pela técnica *Southern Blot* com sonda cDNA Rh demonstraram que somente três espécies carregam mais de um gene Rh: chimpanzés, gorilas e os humanos<sup>23</sup>.

Os dois genes do sistema Rh (RHD e RHCE) estão localizados no braço curto do cromossomo 1, lócus 34-36 (Figura 3). São genes altamente homólogos (93,8%), contendo cada um 10 éxons, com uma sequência total de aproximadamente 60.000 pb. A maior diferença está no íntron 4, em que o RHD contém uma deleção de 600 pb em relação ao RHCE. Eles estão em orientação opostas pelos terminais 3' e separados por uma sequência de 30.000pb<sup>19-20</sup>.

O gene SMP1 (*Small Membrane Protein 1*) está interposto entre o RHD e o RHCE. O SMP1 é funcionalmente relacionado ao Rh com relação à expressão deste na membrana eritrocitária. O RHD é flanqueado por dois segmentos de DNA com tamanho de 9000 pb, homologia de 98,6% e orientação idêntica, denominados *Rhesus boxes*<sup>24</sup>.

### Negatividade RHD

As hemácias D negativas não expressam a proteína RhD inteiramente na superfície do eritrócito. Existem basicamente três mecanismos moleculares de negatividade do RHD: deleção

total do gene RHD, pseudogene RHD e gene híbrido, que variam de frequência de acordo com a raça em questão<sup>19</sup>. Nos caucasianos, encontrado em 15% a 17% da população, o mecanismo mais comum é a completa deleção do gene RHD. O fenótipo RhD negativo é mais comumente causado pela homozigose de um haplótipo no qual o gene RHD foi deletado. Essa deleção ocorre nos *Rhesus boxes* em uma região idêntica de 1463 pb, provavelmente causada por um alinhamento cromossomal defeituoso durante a meiose, resultando em um *crossing-over* desigual entre os *Rhesus boxes*. O resultado é caracterizado pela presença de *Rhesus Box* híbrido<sup>24</sup>. Poucos casos podem resultar de rearranjos gênicos ou pontos de mutação levando a códon de parada.

O gene RHD pode ainda não ser expresso devido a um códon de parada prematuro, inserções de nucleotídeos, pontos de mutação ou RHD/CE híbrido. Quatorze diferentes alelos D- são descritos com uma frequência de 1/1500 na população caucasiana<sup>19</sup>.

A deleção do gene RHD é encontrada em apenas 18% da população afrodescendente e 60% dos asiáticos, sendo que nesta última, o gene RHD é encontrado em menos de 1% da população.

A variante mais comum nos asiáticos D negativo é fenótipo D<sub>el</sub> RHD (K409K), ou seja, 10% a 30% possuem o gene RHD intacto<sup>18</sup>. Vários mecanismos contribuem para o vasto número de alelos de Rh não funcionantes.

Nos afrodescendentes com fenótipo RhD negativo, o mecanismo mais comum é a presença do pseudogene RHD(RHD $\square$ ), associado ao alelo ce no RHCE. O pseudogene RHD contém uma sequência duplicada de 37 pb comprometendo os últimos 19 nucleotídeos do íntron 3 e os primeiros 18 nucleotídeos do éxon 4 ocasionando quatro mutações *missense* no éxon 5 (609G>A, 654G>C, 667T>G, 674C>T) e uma mutação *nonsense* no éxon 6 (807T>G) sendo responsável pela criação de um sinal de códon de parada (Y269X)<sup>25-29</sup>.

Dessa forma, uma proteína não-funcional é produzida e nenhum polipeptídeo D atinge a superfície eritrocitária. Isso gera uma proteína Rh não funcionante, representando aproximadamente 70% dos afrodescendentes com um gene inativo. Atualmente, a detecção do RHD $\square$  pelo método de reação de cadeia da polimerase (PCR) é considerada mandatória para qualquer predição do antígeno D<sup>19</sup>.

No que diz respeito ao fenótipo Rh negativo devido ao gene híbrido, a alta similaridade em direções opostas e a proximidade no mesmo cromossomo, favorece a conversão gênica em *cis* e a formação de alça de *hairpin* em que a parte interna de um gene é trocada por partes correspondentes de outro gene. Os resultados dessa mutação são os alelos híbridos RHD-CE-D e RHCE-D-CE.

O gene híbrido RHD-CE (4-7)D (Ce<sup>s</sup>) contém os dois genes alterados: um gene híbrido *RHD-CE-D* segregado como alelo ce<sup>s</sup> do RHCE. O haplótipo (C)ce<sup>s</sup> possui duas bases moleculares diferentes<sup>30</sup>.

- Tipo 1 que consiste em éxons 1, 2, terminal 5' do éxon 8, 9 e 10 do gene RHD, unidos com o terminal 3' do éxon 3 iniciando no nucleotídeo 455, éxons 4 a 7 do gene RHCE.

- Tipo 2 em que o gene híbrido possui fusão dos éxons 1, 2, 3 completo, 8, 9 e 10 do gene RHD, unidos com éxons 4 a 7 do gene RHCE.

Ambos codificam dois nucleotídeos 733C>G (éxon 5) e 1006G>T (éxon 7) carregados pelo RHCE, gerando respectivamente duas substituições: Leu245Val na oitava região

transmembranosa e Gly336Cys na 11<sup>a</sup>. O haplótipo (C)ce<sup>s</sup> codifica um C,c parcial associado a um e fraco e ao antígeno VS.

Esse mecanismo é o segundo mais frequente dos fenótipos RhD negativo afrodescendentes associado ao fenótipo VS V- com uma frequência de 0,03%. Já nos asiáticos, o gene híbrido RHD-CE (2-9) é o mais comum nos doadores Rh negativos após o fenótipo D<sub>el</sub><sup>31-32</sup>.

### Fraca Expressão de D

Normalmente hemácias RhD positivas possuem uma densidade antigênica variando entre 15000 a 33000 antígenos por célula, dependendo do haplótipo. Contudo, alguns fenótipos foram identificados com densidade variando entre 70 e 5200 antígenos RhD. Esses fenótipos são denominados de D fracos e são causados pela substituição de aminoácidos nas porções transmembranosas e intracelulares da proteína RhD devido a uma única mutação *missense* no gene RHD. Hemácias com fenótipo D fraco expressam um antígeno RhD intacto ocorrendo em 0,2% a 1% dos caucasianos<sup>33</sup>.

Atualmente mais de 40 tipos de D fracos foram identificados a nível molecular, nas quais o D fraco tipo 1 e 2 são os mais frequentes (70% e 18%, respectivamente). Devido ao fato de que o fenótipo D fraco carrega o antígeno RhD intacto, a probabilidade de formar aloanticorpo anti-D é pouco provável. Porém, a presença de anti-D em alguns casos de D fraco (tipo 1, 4.2 e 15) foi relatado<sup>34-35</sup>.

A distinção entre D fraco e D parcial não deve ser feita pela produção de anti-D. Para a predição do risco de imunização em indivíduos D fraco, foi proposto o índice *Rhesus*<sup>34</sup>. Esse índice é baseado na densidade antigênica de diferentes anticorpos monoclonais dependendo da quantidade de sítios antigênicos e na afinidade do anticorpo e pode teoricamente variar de 1 (risco baixo, ex: RhD normal) a 0 (alto risco ex: parcial RhD faltando epítomos). D fraco tipo 4.2 e 15 apresentam o menor índice *Rhesus* (0,21), com exceção do tipo 7 (0,03).

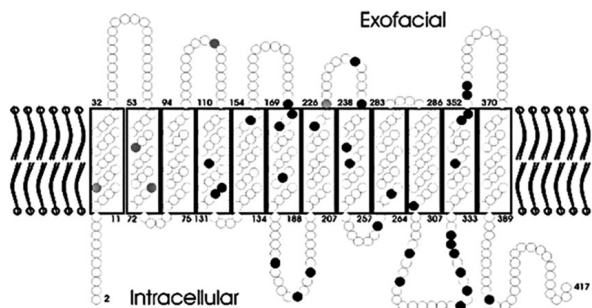
### Expressão parcial de D

O antígeno D é composto de numerosos epítomos e a expressão parcial de D foi originalmente definida por indivíduos D que apresentaram formação de anti-D. Estudos com anticorpos monoclonais definiram mais de 30 epítomos<sup>36</sup> altamente conformacionais, que envolvem várias alças extracelulares.

Hemácias D parciais são definidas pela ausência de um ou mais epítomos causados pelos rearranjos dos genes RHD e RHCE. Essa configuração genética propicia microconversões e trocas unidirecionais de fragmentos de gene RHD e RHCE, ou parte deles, levando a formação de alelos RHD-CE-D ou RHCE-D-CE respectivamente<sup>37</sup>. Esses novos alelos aberrantes de Rh não somente produzem proteínas híbridas, regiões de RhD unidas com RhCE levando a perda de epítomos de D, como também geram novos antígenos.

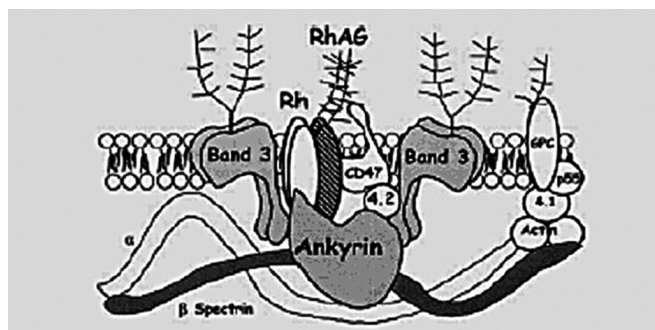
Poucos fenótipos D parciais resultam de trocas de um aminoácido apenas. Porém, em contraste ao D fraco, o polimorfismo ocorre nos segmentos extracelulares da proteína RhD. Indivíduos D parciais podem frequentemente produzir anti-D contra aqueles epítomos ausentes quando expostos à proteína RhD completa.

**Figura 1 - Representação esquemática das proteínas Rh na membrana eritrocitária**



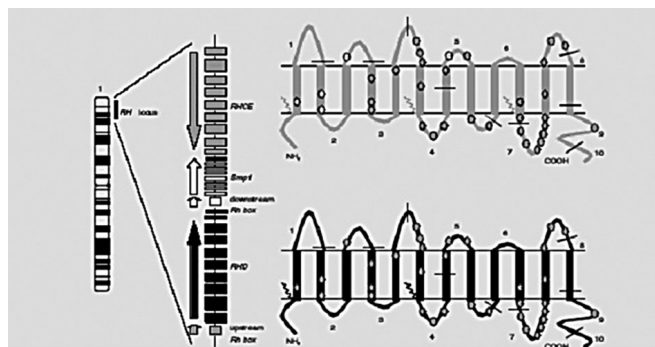
Legenda: Adaptado de Wagner EF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohaematology* 2004;20:23-35

**Figura 2 - Representação esquemática do complexo Rh na membrana eritrocitária**



Legenda: Adaptado de Kim CLV, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Reviews* 2006;20:93-110

**Figura 3- Estrutura do gene RHD e RHCE e seus respectivos polipeptídios**



Legenda: Adaptado de Martine GHM Tax. Rh variabiliteit vanuit multi-etnisch perspectief Consequenties voor RH genotyping. © 2005, Rotterdam, The Netherlands. ISBN 90-9020176-9

Essa elucidação da base molecular do sistema Rh permitiu o desenvolvimento de técnicas sorológicas e moleculares para determinação dessas variantes nas diversas populações. No

campo da Obstetrícia permite desvendar o fenótipo Rh negativo nas gestantes, auxiliando a entender a correlação entre o fenótipo, genótipo e a aloimunização Rh. Apesar de existir alta concordância entre a fenotipagem e a genotipagem na população caucasiana, são observados resultados falso-positivos em afro-descendentes e asiáticos, que podem frequentemente ocorrer, dependendo da estratégia utilizada.

Outra vantagem do estudo molecular, seria evitar a imunoprofilaxia anti-D desnecessária (3% a 5%)<sup>38</sup> nas gestantes RhD negativa com tipo específico de D fraco bem como a identificação das gestantes D parciais que apresentam alta probabilidade de aloimunização e necessidade de imunoprofilaxia Rh.

Este pensamento pode também ser estendido para a Medicina Transfusional, evitando-se assim muitas complicações e reações após as transfusões.

**Conflito de interesse:** não há

**SUMMARY**

**THE MOLECULAR BASIS OF RH SYSTEM AND ITS APPLICATIONS IN OBSTETRICS AND TRANSFUSION MEDICINE**

*The Rh system is the most polymorphic and immunogenic for all blood group systems. Currently more than 49 antigens were identified with five major antigens D, C, c, E, e. Knowledge of the Rh system's molecular basis, since its first cloning 17 years ago, allowed to understand the mechanism of Rh-negative phenotype and the variants of antigens as RHD and RHCE. Deletions, gene rearrangements and insertions are the main mutations. In Caucasians the primary mechanism of Rh-negative phenotype is the complete RHD gene deletion, while in African descendants it is the presence of pseudogene and gene RHDψ hybrid RHD-CE (4-7)-D. The authors analyze the structure of the Rh complex in red cells, molecular basis of the Rh system, mechanisms of Negativity RHD and weak and incomplete expression of RHD. [Rev Assoc Med Bras 2010; 56(6): 724-8]*

**KEY WORDS:** Rh-Hr blood-group system. Rh isoimmunization. Antigen-Antibody complex.

**REFERÊNCIAS**

1. Simsek S, Faas BH, Bleeker PM, Overbeeke MA, Cuijpers HT, Van der Schoot CE, et al. Rapid RhD genotyping by polymerase chain reaction-based amplification of DNA. *Blood*. 1995;29:75-80.
2. Race RR, Sanger R. *Blood groups in man*. 6<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell; 1975.
3. Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. *J Am Med Assoc* 1939;113:126-7.
4. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for Rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol NY*. 1940;43:223.
5. Wiener AS, Peters HR. Hemolytic reactions following transfusions of blood of the homologous group, with three cases in which the same agglutinin was responsible. *Ann Intern Med*. 1940;13:2306-22.
6. Levine P, Burnham L, Katzin WM, Vogel P. The role of isoimmunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. *Am J Obstet Gynecol*. 1941;42:925-37.
7. Fisk RT, Foord AG. Observations on the Rh agglutinin of human blood. *Am J Clin Pathol*. 1942;12:545.
8. Levine P, Celano MJ, Wallace J, Sanger R. A human 'D-like' antibody. *Nature*. 1963;198:596-7.
9. Race RR, Taylor GL, Cappell DF, McFarlane MN. Recognition of a further common Rh genotype in man. *Nature*. 1944;153:52-3.
10. Wiener AS. Genetic theory of the Rh blood types. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1943;54:316-19



11. Urbaniak SJ, Robertson AE. A successful program of immunizing Rh-negative male volunteers for anti-D production using frozen/thawed blood. *Transfusion*. 1981;21:64.
12. Issitt PD. The Rh blood group system. In: Garratty G, editor. *Immunobiology of transfusion medicine*. New York: Marcel Dekker Inc; 1974, p.111-47.
13. Bianchi DW, Avent ND, Costa JM, Schoot CE. Noninvasive fetal Rh genotyping. *Obstet Gynecol*. 2005;106:682-3.
14. Bowman JT. Five years of Rh prophylaxis. *Transfusion*. 2003;43:1661-6.
15. Pertl B, Pieber D, Panzitt T, Haeusler MC, Winter R, Tului L, et al. RhD genotyping by quantitative fluorescent polymerase chain reaction: a new approach. *BJOG*. 2000;107:1498-502.
16. Vicent LF, Pinto G, Serrano F. Profilaxia da isomunização RHD. *Acta Méd Port*. 2003;16:225-60.
17. Fung FK, Eason E, Crane J, Armson A, De La Ronde S, Farine D, et al. Maternal-Fetal Medicine Committee, Genetics Committee. Prevention of Rh alloimmunization. *J Obstet Gynaecol Can* 2003;25:765-73.
18. Klein HG, Anstee DJ Mollinson's blood transfusion in clinical medicine. 11<sup>th</sup> ed. New York: Blackwell Science; 2005.
19. Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology* 2004;20:23-36.
20. Flegel WA. The genetics of the rhesus blood group system. *Dtsch Arztebl* 2007;104:A 651-7.
21. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000;95:375-87.
22. Kim CLV, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev*. 2006;20:93-110.
23. Westhoff CM, Wylie DE. Investigation of the human Rh blood groups system nonhuman primates and other species with serologic and southern blot analysis. *J Mol Evol*. 1994;39:87-92.
24. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 2000;95:3662-8.
25. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a non sense mutation in Africans with the Rh negative blood group phenotype. *Blood*. 2000;95:12-18.
26. Rodrigues A, Rios M, Pellegrino Jr, Costa FF, Castilho L. Presence of the RHD pseudogene and hybrid RHD-CE-D gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:767-73.
27. Westhoff CM. The structure and function of the Rh antigen complex. *Semin Hematol*. 2007;44:42-50.
28. Avent ND. High variability of the RH locus in different ethnic backgrounds. *Transfusion*. 2005;45:293-4.
29. Daniels G, Finning K, Martin P, Summers J. Fetal blood group genotyping: present and future. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1075:88-95.
30. Pham BN, Peyrard T, Juszczyk G, Auxerre C, Godin S, Bonin P, et al. Alloanti-c (RH4) revealing that the (C)ces haplotype encodes a partial c antigen. *Transfusion*. 2009;49:1329-34.
31. Okuda H. RHD gene is highly detectable in RHD-negative Japanese donors. *J Clin Invest*. 1997;100:373-9.
32. Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eicher NI, Legler TJ, et al. Presence of RHD in serologically D-,C/E individuals: a European multicenter study. *Transfusion*. 2005;45:527-38.
33. Muller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schonitzer D, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three central European populations. *Transfusion*. 2001;41:45-52.
34. 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.
35. Roxby D, Coloma M, Flegel WA, Poole J, Martin P, Abbott R. Observation of an anti-D after D-positive transfusion in an individual with weak D type-1 phenotype. *Vox Sang*. 2003;87(Suppl 3):17-44.
36. Scott ML, Voak D, Liu W, Jones JW, Avent ND. Epitopes on Rh proteins. *Vox Sang*. 2000;78 (Suppl 2):117-20.
37. Flegel WA, Wagner FF. Molecular Biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin Lab*. 2002;48:53-9.
38. Flegel WA. Blood group genotyping in Germany. *Transfusion*. 2007;47:47S-53S.

---

Artigo recebido: 14/04/10  
Aceito para publicação: 25/08/10

---