



**COMITÉ DE EDUCACIÓN CONTINUA Y CONTINUADA**  
**COORDINADORA: DRA ANA CLAUDIA PERÓN**

**PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO**  
**COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ**

**“IMPLICACAO DOS ALELOS *RH* VARIANTES NA TERAPIA  
TRANSFUSIONAL”**

**PROFESORA INVITADA: DRA LILIAN CASTILHO**

**Especialista en Inmunohematología por la CNRGS, París, Francia.  
Maestra en Inmunología y Doctora en Ciencias por la UNIFESP,  
Sao Paulo, Brasil. Postdoctora en Inmunohematología Molecular  
por NYBC, Nueva York EEUU. [http://orcid.org//0000-0002-3104-  
647X](http://orcid.org//0000-0002-3104-647X) [castilho@unicamp.br](mailto:castilho@unicamp.br)**

## 1. Introdução

O sistema Rh é um dos sistemas de grupos sanguíneos mais imunogênicos e polimórficos, composto por 56 antígenos codificados por dois genes homólogos localizados no cromossomo 1, *RHD* e *RHCE*. A maioria dos antígenos é codificada pelo gene *RHCE*, enquanto um pequeno número é codificado por *RHD* ou pelo gene híbrido *RHCE-RHD*. Os antígenos mais comuns são D (RH1), C (RH2), c (RH4), E (RH3) e e (RH5), detectados por reagentes comerciais. Existem mais de 400 alelos *RHD* e mais de 150 alelos *RHCE* reconhecidos pela ISBT (1), mas muitos mais alelos podem ser encontrados em outros bancos de dados, como o RhesusBase (2), o RHeference (3) e o ErythroGene (4). Esses alelos resultam de variantes de único nucleotídeo, inserções/deleções, rearranjos gênicos e deleção gênica (5).

Esse nível de complexidade pode resultar na expressão alterada dos antígenos D e CE nos glóbulos vermelhos com consequências graves para transfusões e altas taxas de aloimunização. Evidências clínicas ou biológicas desses efeitos não estão claras para todos os alelos *RH* variantes, uma vez que nem todos os antígenos Rh foram associados à formação de anticorpos, e nem todos os aloanticorpos produzidos são considerados clinicamente significativos (6,7).

Existem dois tipos de variantes Rh: os antígenos Rh fracos, que conceitualmente não perdem epítomos imunogênicos e têm expressão fraca, e os antígenos Rh parciais, que conceitualmente perdem epítomos imunogênicos e têm expressão fraca ou normal (8, 9). Historicamente, os antígenos fracos não induzem aloimunização, e os antígenos parciais induzem aloimunização, sendo considerados clinicamente significativos, pois o portador de antígenos parciais exposto a um antígeno completo pode produzir anticorpos contra os epítomos ausentes e contra antígenos de alta frequência, como RH31 (hrB) e RH19 (hrS) (10-12). No entanto, o limite desses dois conceitos não é simples de estabelecer, como demonstrado por Daniels et al. (13), uma vez que não é possível prever que todos os pacientes com antígenos fracos não produzirão anticorpos e que todos os pacientes com antígenos parciais estão em risco de formação de anticorpos.

Embora o significado clínico das variantes Rh não seja fácil de estabelecer, a genotipagem RH tem sido recomendada para resolver fenótipos fracos ou discrepâncias encontradas na rotina e para diferenciar antígenos Rh fracos e parciais (8, 10-16). Nos últimos anos, um número crescente de novos alelos *RH* tem surgido, mas suas descrições sorológicas, risco de formação de anticorpos e implicação na transfusão sanguínea ainda são difíceis de demonstrar, pois muitos desses alelos foram observados apenas uma vez em um doador ou em um paciente não aloimunizado. Além disso, o tipo de variante, formas alélicas e a conformação trimérica das proteínas Rh influenciam o significado clínico dos anticorpos. Em muitos casos, análises funcionais e interações intraproteínas têm sido usadas para caracterizar o efeito das variações ao nível molecular (17-20). Uma compreensão melhor do risco de aloimunização e do significado clínico dos anticorpos produzidos pelas variantes Rh é necessária para aumentar a segurança transfusional e preservar os estoques de sangue RhD-negativo.

## **2. Alelos *RHD* e risco de formação de anti-D**

É importante estar ciente de que nem todos os portadores de alelos *RHD* variantes desenvolverão anti-D. A distinção entre alelos *RHD* que codificam antígenos D fracos e antígenos D parciais pode ser importante para prever o risco de aloimunização e sua implicação na terapia transfusional. Existem mais de 700 alelos *RHD* registrados no banco de dados RHeference, mas apenas 30% deles foram associados à formação de anti-D (3). Em uma revisão narrativa de alelos e anticorpos RH, Floch (21) relatou os alelos *RHD* mais comuns associados à produção de anti-D de acordo com a literatura. A maioria são alelos *RHD* que codificam D parcial, mas os tipos 11, 15, 21, 41, 42 e 45, que codificam D fraco, também foram associados à formação de anti-D.

Devido à falta de evidências sobre aloimunização em portadores dos 5 tipos de D fracos mais comuns (tipos 1, 2, 3, 4.0, 4.1), tem sido recomendado tratá-los como RhD-positivo para preservar o estoque limitado de sangue RhD-negativo, enquanto os tipos menos comuns, incluindo o D fraco tipo 4.2, comum em africanos, devem ser tratados como RhD-negativo (22). Esta é uma das razões pelas quais a genotipagem *RHD* está sendo recomendada para diferenciar antígenos D fracos e antígenos D parciais em pacientes transfundidos (8, 16, 23-25). Em um estudo recente, Miranda et al. (11), realizando

genotipagem *RHD* sistemática em pacientes transfundidos sorologicamente tipados como D fraco e recebendo unidades de hemácias RhD-positivo, mostraram que 63,2% deles tinham alelos *RHD* que codificam antígenos D parciais e, portanto, deveriam ser tratados como RhD-negativo.

A prevalência de alelos *RHD* variantes pode variar significativamente entre diferentes populações, e ainda existem relatos raros de aloimunização anti-D dos alelos *RHD* variantes esporádicos. Portanto, na ausência de informações clínicas sobre a formação de anti-D, pacientes portadores de raros alelos *RHD* têm sido tratados como RhD-negativo (21). Testar hemácias com diferentes clones de anti-D pode fornecer informações potenciais sobre o perfil de epítomos de D, pois a ausência de epítomos sugere que esses alelos codificam fenótipos D parciais com risco potencial de formação de anti-D (26, 27). Estudos de bioinformática também revelaram os efeitos de substituições de aminoácidos em interações dentro da molécula RhD e podem ser úteis na avaliação de novas variantes (20, 28). O tipo de variação de nucleotídeos também fornece informações, por exemplo, mudanças que ocorrem em um local de splicing de exon podem resultar em um nível reduzido de transcritos responsáveis por fenótipos D fraco, mas não uma substituição de aminoácido, e, portanto, esses alelos não estariam associados à aloimunização (29).

Estudos prospectivos sobre o risco de formação de anti-D de alelos *RHD* variantes, especialmente aqueles relatados em muitos portadores, são necessários para entender sua significância clínica. A expressão de epítomos de D determinada por testes sorológicos e estudos de expressão in vitro também seriam úteis. Sem esses estudos, parece prematuro excluir a implicação de uma variante Rh na transfusão sanguínea. Além disso, existem alguns alelos que codificam antígenos com uma densidade antigênica muito baixa, e os portadores desses antígenos podem ser tipados como RhD-negativo (30). Existem também algumas situações intrigantes quanto à produção de anticorpos por antígenos RhD variantes, como, por exemplo, indivíduos com alelos *RHD* variantes heterozigotos compostos. Mesmo na presença de um alelo que codifica um antígeno parcial, dependendo do outro alelo, da associação com formas alélicas de *RHCE* e da conformação trimérica das proteínas Rh, o risco de formação de anti-D pode variar (10, 12, 23).

Alelos *RHD* variantes frequentemente produzem resultados sorológicos e moleculares discrepantes ou inconclusivos, e as causas dessas discrepâncias devem ser identificadas em benefício do cuidado ao paciente e do avanço dos bancos de dados de alelos. A análise da proteína RhD por bioinformática pode nos ajudar a entender o impacto das variantes RhD nas diferenças antigênicas e orientar estratégias de transfusão sanguínea (17, 31, 32). A decisão de tratar um paciente como RhD+ ou RhD- para fins transfusionais deve considerar, além do alelo específico, a idade do paciente, gênero, histórico de produção de anticorpos, necessidades de transfusão e o estoque de sangue.

### **3. Implicações dos alelos *RHCE* variantes na transfusão**

A diversidade genética do locus *RH* em populações de origem africana contribui para a alta prevalência de alelos *RHCE* alterados e com alta taxa de aloimunização em pacientes com anemia falciforme (10, 33). Além dos alelos *RHCE* variantes que codificam antígenos parciais, existem muitos alelos que também levam a perda de antígenos de alta prevalência, como hrB (RH31) e hrS (RH19), que devem ser levados em consideração na seleção de unidades de hemácias para transfusão (34).

O anti-e é o aloanticorpo mais frequente observado em pacientes com anemia falciforme que possuem alelos *RHCE* variantes, embora nem todos estejam implicados em reações transfusionais hemolíticas, sugerindo que o risco de aloimunização e o significado clínico dos anticorpos produzidos podem variar de acordo com o alelo específico herdado (21). Em um estudo recente, observamos que a maioria dos pacientes com o alelo *RHCE\*01.20.01* (*RHCE\*ce733G*), que desenvolveram anti-e, tiveram uma boa sobrevida das hemácias transfundidas quando expostos ao antígeno e convencional, enquanto pacientes com o alelo *RHCE\*01.04.01* (*RHCE\*ceAR*) produziram anti-e e anti-hrS clinicamente significativos (34). De fato, há evidências de que alguns alelos *RHCE*, como *RHCE\*01.01* (*RHCE\*ce48C*), *RHCE\*01.20.01* (*RHCE\*ce733G*) e *RHCE\*01.20.02* (*RHCE\*ce48C,733G*), têm baixo risco de formação de anticorpos ou de implicação em episódios hemolíticos graves (10, 34, 35). Além disso, foi sugerido que a presença de um alelo *RH* convencional não protege contra a aloimunização (10, 36, 37). Alelos *RHCE* anteriormente associados à formação de anticorpos aos antígenos

correspondentes foram relatados com fenótipos RH10 (V) e RH20 (VS) (10, 21), e nenhuma formação de anticorpos foi associada a alelos *RHCE* raros, como *RHCE\*02.02*, *RHCE\*02.03* e *RHCE\*02.11*, sem fenótipos RH10 ou RH20 (38-40). Embora seja extremamente importante, o significado clínico dos alelos *RHCE* variantes não é fácil de estabelecer em pacientes politransfundidos, especialmente se o anticorpo formado é um aloanticorpo ou autoanticorpo, uma vez que autoadsorções não são recomendadas para pacientes recentemente transfundidos (41). Além disso, autoanticorpos podem causar hemólise, e, portanto, a implicação do anticorpo em uma reação transfusional hemolítica pode ser difícil de determinar. A dificuldade em encontrar doadores com alelos *RHCE* bem caracterizados para selecionar unidades com base nos alelos *RH* do paciente, associada ao pouco conhecimento do risco de aloimunização e do significado clínico do anticorpo, torna a decisão transfusional difícil (42).

A fim de compreender a implicação dos alelos *RHCE* variantes na terapia transfusional, é importante conhecer sua frequência na população estudada e demonstrar que o alelo codifica um antígeno com risco de formação de anticorpos e a perda dos antígenos de alta prevalência hrB (RH31) e hrS (RH19) (21, 35, 37). É importante enfatizar que a seleção de sangue compatível para um paciente com um alelo raro também depende da disponibilidade de doadores genotipados para alelos *RH* variantes, pois essa solicitação é atendida com unidades selecionadas com base no genótipo RH.

#### **4. Novos alelos *RH*, aloimunização e riscos hemolíticos**

A genotipagem de alta resolução revelou uma infinidade de novos alelos *RH* em diferentes populações como resultado de discrepâncias sorológicas ou discordâncias entre a tipagem sorológica e o fenótipo deduzido pelo genótipo (37, 43-45). No entanto, muitos alelos foram relatados em forma de resumo, não têm prevalência associada, e poucos dos novos alelos relatados até o momento foram associados à produção de anticorpos contra o antígeno expresso. A maioria dos novos alelos *RH* foi descrita em doadores ou em pacientes não aloimunizados, e em muitos desses estudos, mesmo quando um anticorpo é produzido, a sorologia não é bem detalhada, principalmente na discriminação entre auto e aloanticorpos. O risco de aloimunização muitas vezes está

associado ao tipo de antígeno Rh variante que o novo alelo codifica, ou seja, um antígeno fraco ou um antígeno parcial, no entanto, mais estudos sorológicos e clínicos seriam valiosos para determinar o risco de formação de anticorpos. É difícil medir o risco de aloimunização de novos alelos, uma vez que a maioria dos pacientes portadores de antígenos Rh parciais não é rotineiramente reconhecida, a menos que formem anticorpos inesperados. Além disso, a formação de anticorpos Rh pode ser influenciada por características pessoais, uma vez que é conhecido que alguns indivíduos têm menos probabilidade de produzir aloanticorpos e são "maus respondedores" apesar de múltiplas transfusões (46).

Existem alguns alelos *RH* amplamente conhecidos por produzir antígenos parciais e estão associados à formação de aloanticorpos se expostos a um antígeno convencional, como o haplótipo *RHCE\*(C)ceS*, mesmo assim há variações em diferentes populações (10, 12, 34, 36). Portanto, é muito difícil estabelecer uma estratégia para reduzir o risco de aloimunização se não soubermos adequadamente as características do antígeno. Em geral, novos alelos surgiram com avanços em técnicas moleculares com muita pouca informação sobre os antígenos que codificam ou a formação de anticorpos. Além disso, já foi observado que epítomos alterados em hemácias de doadores de sangue também podem induzir aloimunização, e isso é muito difícil de controlar (47).

Na descoberta de alelos *RH* variantes, é muito importante fornecer dados sorológicos, mesmo que incompletos, informações sobre aloimunização e dados clínicos para que possamos avaliar a implicação desse alelo na terapia transfusional e propor uma estratégia para prevenir a aloimunização e reações transfusionais hemolíticas (48). Em um estudo realizado por Coleman et al (36) sobre aloimunização e implicação de anticorpos produzidos com reações transfusionais hemolíticas tardias, eles observaram que 47% dos anticorpos Rh clinicamente significativos ocorreram em pacientes com pelo menos um alelo codificando algum antígeno Rh parcial. Embora fenótipo e dados clínicos sejam determinantes para avaliar o efeito de variações genéticas, o uso de ferramentas de modelagem molecular e bioinformática evoluiu, e atualmente, estudos tridimensionais de interações intraproteínas combinados com mapeamento de epítomos e densidade do antígeno têm sido usados na avaliação do risco de aloimunização em portadores de variantes Rh (19, 20). A análise de bioinformática processada "in silico"

também pode melhorar nossa compreensão da influência de variantes genéticas na expressão de antígenos e suas implicações para a terapia transfusional (49-51).

## 5. Conclusão

Vale ressaltar que avanços da medicina e uma compreensão aprimorada do sistema Rh têm levado ao desenvolvimento de testes sorológicos e moleculares mais precisos. A genotipagem RH de alta resolução está começando a ser realizada usando tecnologias avançadas de sequenciamento, com aumento no comprimento médio de leitura que permite a identificação de variantes estruturais, sequenciamento de regiões repetitivas, faseamento de alterações de nucleotídeos e distinção de regiões genômicas altamente homólogas, melhorando assim a caracterização dos genes *RHD* e *RHCE*, e aumentando a descoberta de variantes relevantes para a transfusão sanguínea.

O potencial de imunização dos alelos RH variantes é difícil de prever. No momento, a recomendação é que em transfusões de sangue, os pacientes sejam tratados como negativos para o antígeno, até que surjam evidências que possam comprovar o risco ou não de formação de anticorpos. No manejo da gravidez, sem conhecimento do potencial risco de aloimunização, todas as mulheres com um alelo *RHD* variante que codifica um antígeno parcial serão consideradas RhD-negativo e receberão monitoramento abrangente, incluindo teste adicional de detecção de anticorpos, genotipagem *RHD* fetal e administração de IgRh.

Com sorte, mais dados sorológicos, epidemiológicos e clínicos com a incidência e gravidade de reações transfusionais hemolíticas associadas à formação de anticorpos, especialmente se documentados para coortes maiores, de modo que a recomendação transfusional e o manejo da gravidez se tornarão mais precisos.

Uma melhor compreensão do envolvimento dos alelos *RH* variantes com a produção de anticorpos e com um potencial risco de causar reações transfusionais hemolíticas pode aprimorar a compatibilidade RH genética e aumentar a segurança transfusional. A



bioinformática desses alelos pode expandir nosso conhecimento sobre variantes Rh e ajudar a avaliar suas implicações na terapia transfusional.

Em resumo, atualizações regulares e avanços nos protocolos de bancos de sangue são cruciais para inserir o conhecimento da evolução sobre os alelos *RH* variantes e reduzir o risco de aloimunização. A determinação precisa do fenótipo RhD, a identificação de variantes RhCE e o monitoramento do risco de aloimunização são essenciais para fornecer uma terapia transfusional segura e eficaz aos pacientes politransfundidos. As técnicas moleculares desempenham um papel crucial na identificação dos alelos *RH* e no aprimoramento das práticas transfusionais.

## 6. Referências

1. Available online: <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>
2. Available online: <http://www.rhesusbase.info/introduceRhesusBase.htm>
3. Available online: <https://www.rheference.org/>
4. Available online: <http://www.erythrogene.com/>
5. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci* 2011; 44:81-91
6. Noizat-Pirenne F, Tournamille C. Relevance of RH variants in transfusion of sickle cell patients. *Transfus Clin Biol* 2011; 18:527-35
7. 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:e115-7
8. Daniels G. Variants of RhD-current testing and clinical consequences. *Br J Haematol* 2013; 161:461-70
9. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999; 93:385-93

10. 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
11. Miranda MR, Santos TD, Castilho L. Systematic RHD genotyping in Brazilians reveals a high frequency of partial D in transfused patients serologically typed as weak D. *Transfus Apher Sci* 2021; 60:103235
12. Sippert E, Fujita CR, Machado D, et al. Variant RH alleles and Rh immunization in patients with sickle cell disease. *Blood Transfus* 2015; 13;72-7
13. Daniels G, Poole G, Poole J. Partial D and weak D: can they be distinguished? *Transfus Med* 2007; 17: 45–146
14. Noizat-Pirenne F, Lee K, Le Pennec PY, et al. Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety. *Blood* 2022; 100:4223-31
15. Westhoff CM. Blood group genotyping. *Blood* 2019; 133:1814-20
16. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, et al. It's time to phase RHD genotyping for patients with serologic weak D phenotype. College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. *Transfusion* 2015; 55:680-9
17. Raud L, Ka C, Gourlaouen I, et al. Functional analysis of novel RHD variants: splicing disruption is likely to be a common mechanism of variant D phenotype. *Transfusion* 2009; 59:1367-1375
18. Conroy MJ, Bullough PA, Merrick M, et al. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *Br J Haematol* 2005; 131:543-551
19. Floch A, Pirenne F, Barrault A, et al. Insights into anti-D formation in carriers of RhD variants through studies of 3 D intraprotein interactions. *Transfusion* 2021; 61: 1286-1301
20. De Brevern AG, Floch A, Barrault A, et al. Alloimmunization risk associated with amino acid 223 substitution in the RhD protein: analysis in the light of molecular modeling. *Transfusion* 2018;58;2683–2692

21. Floch A. Molecular genetics of Rh blood group system: alleles and antibodies-a narrative review. *Ann Blood* 2021; 6: 29
22. Flegel WA, Denomme GA, Queenan JT, et al. It's time to phase out "serologic weak D phenotype" and resolve D types with RHD genotyping including weak D type 4. *Transfusion* 2020; 60: 855-9
23. Westhoff CM. Rh complexities: serology and DNA genotyping. *Transfusion* 2007; 47:175-225
24. Clarke G, Hannon J, Berardi P, et al. Resolving variable maternal d typing using serology and genotyping in selected prenatal patients. *Transfusion* 2016; 56:2980-5
25. Floch A, Barrault A, De Brevern AG, et al. Molecular characterization of 13 new RHD alleles. *Transfusion* 2017; 57:1089-1091
26. Jones J, Scott ML, Voak D. Monoclonal anti-D specificity and rhD structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagentes for routine typing of patients and donos. *Transfus Med* 1995; 5:171-84
27. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, et al. Three molecular structures cause rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features. *Blood* 1998; 91:2157-68
28. Zhang X, Li G, Zhou Z, et al. Molecular and computational analysis of 45 samples with a serologic weak D phenotype detected among 132,479 blood donors in northeast China. *J Transl Med* 2019; 17:393-404
29. Chun S, Yun JW, Park G, et al. The synonymous nucleotide substitution RHD 1056C>G alters mRNA splicing associated with serologically weak D phenotype. *J Clin Lab Anal* 2017; 32: e22330
30. Mota M, Fonseca NL, Rodrigues A, et al. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox sang* 2005; 88:130-5
31. Fichou Y, Gehannin P, Corre M, et al. Extensive functional analyses of *RHD* splice site variants: Insights into the potential role of splicing in the physiology of Rh. *Transfusion* 2015;55:1432–1443

32. Raud L, Le Tertre M, Vigneron L, et al. Missense RHD single nucleotide variants induce weakened D antigen expression by altering splicing and/or protein expression. *Transfusion* 2021; 61:2468–2476
33. Chou ST, Westhoff CM. Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 1: 178-84
34. Arnoni CP, Vendrame TAP, Silva FS, et al. *RHCE* variant alleles and risk of alloimmunization in Brazilians. *Immunohematology* 2022; 28:38:123-129
35. Noizat-Pirenne F, Tournamille C. Relevance of RH variants in transfusion of sickle cell patients. *Transfus Clin Biol* 2011; 18: 527-35
36. Coleman S, Westhoff CM, Friedman DF, et al. Alloimmunization in patients with sickle cell disease and underrecognition of accompanying delayed hemolytic transfusion reactions. *Transfusion* 2019; 59:2282-91
37. 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; 3:1414-22
38. Buger P, Scharberg EA, Geisen C, et al. RhCE protein variants in Southwestern Germany detected by serologic routine testing. *Transfusion* 2009; 49:1793-802
39. Scharberg EA, Green C, Daniels GL, et al. Molecular basis of the JAHK (RH53) antigen. *Transfusion* 2005; 45:1314-8
40. Vrignaud C, Ramelet S, Joffrin C, et al. RHCE\*Ce286A is a novel RHCE allele that causes a weak C expression and codes for the low-prevalence LOCR (RH55) antigen. *Transfusion* 2017; 57 156A.
41. Gaspardi AC, Sippert EA, 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
42. Santos TD, Macedo MD, Menegati SFP, et al. Challenges in providing compatible blood with Rh genotype-matching in Brazilian patients with sickle cell disease. *Transfus Med* 2019; 29:423-429

43. Wheeler MM, Lannert KW, Huston H, et al. Genomic characterization of the RH locus detects complex and novel structural variation in multi-ethnic cohorts. *Genet Med* 2019;21:477-486
44. Zhang Z, An Hyung H, Vege S, et al. Accurate long-read sequencing allows assembly of the duplicated RHD and RHCE genes harboring variants relevant to blood transfusion. *Am J Hum Genet* 2022;109:180-191
45. Chang T-C, Haufear KM, Yu J, et al. A novel algorithm comprehensively characterizes human RH genes using whole-genome sequencing data. *Blood Adv* 2020; 4:4347-4357
46. Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood* 2012; 120: 528–537
47. Macedo MD, Miranda MR, Santos TD, et al. Rh antibodies as a result of altered Rh epitopes on transfused red cells: a case series of seven Brazilian patients. *Blood Transfus* 2021; 19:413-419
48. Keller MA. RH genetic variation and the impact for typing and personalized transfusion strategies: a narrative review. *Ann Blood* 2023; 8:18
49. Castilho, C Arnoni, T Vendrame, et al. From genotyping to the functional and clinical interpretation of variations in blood group genes by 3D-protein structure investigation: two novel variant alleles in the RHD gene *Vox Sang* 2019; 114 (Suppl 1):185
50. Ying Y, Zhang J, Hong X, et al. The Significance of *RHD* Genotyping and Characteristic Analysis in Chinese RhD Variant Individuals. *Front Immunol.* 2021; 12: 755661.
51. Floch A, Vege S, Cai C, et al. Serologic and molecular investigation of five samples uncovers four novel RHD alleles. *Transfusion* 2022; 62 (S2):20A