



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES RESPONSABLES DE
LOS FENOTIPOS D NEGATIVO Y D VARIANTE DEL SISTEMA RH
EN LA POBLACIÓN ARGENTINA. IMPORTANCIA CLÍNICA

Presentada por: Lic. Carolina Trucco Boggione

Rosario, Argentina
2016

ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES RESPONSABLES DE LOS FENOTIPOS
D NEGATIVO Y D VARIANTE DEL SISTEMA RH EN LA POBLACIÓN
ARGENTINA. IMPORTANCIA CLÍNICA

Carolina Trucco Boggione
Licenciada en Biotecnología
UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Inmunohematología del Área Inmunología del Departamento de Bioquímica Clínica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y en el Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER-CONICET) durante el período de tiempo comprendido entre el 1° de agosto de 2012 y 1° de noviembre de 2016, bajo la dirección del Dr. Carlos Cotorruelo.

Director de Tesis:

Dr. Carlos Cotorruelo

Integrantes del jurado de Tesis:

Dra. M. Luisa Bay

Dra. Carolina Veaute

Dr. Oscar Botasso

Defendida:

Los resultados obtenidos con relación a este trabajo de Tesis fueron dados a conocer en distintas Publicaciones y Presentaciones en Congresos Científicos Nacionales e Internacionales.

PUBLICACIONES

- ✓ *Comprehensive analysis of RHD alleles in Argentineans with variant D phenotypes.* Luján Brajovich M, Trucco Boggione C, Racca A, Marcel Tarragó, Nogués N, Muñiz-Díaz E, Cotorruelo C. *Transfusion*. *Transfusion* 2012, 52(2), 389-96..
- ✓ *Molecular structures identified in serologically D- samples of an admixed population.* Trucco Boggione C, Luján Brajovich M, Tarragó M, Mattaloni S, Biondi C, Muñiz-Díaz E, Nogués N, Cotorruelo C. *Transfusion* 2014, 54:2456-2462.
- ✓ *Genotyping approach for non-invasive foetal RHD detection in an admixed population.* Trucco Boggione C, Luján Brajovich M, Mattaloni S, Di Mónaco R, García Borrás S, Biondi C, Cotorruelo C. *Blood transfusion* 2016, *Trasfusione del sangue*, 1-8.
- ✓ *Weak D antigen expression caused by a novel RHD allele in Argentineans.* Trucco Boggione C, Lujan Brajovich M, Gaspardi A, Sippert E, Mattaloni S, Leri M, Biondi C, Castilho L, Cotorruelo C. *Transfusion* 2016, 56:2895–2896.

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

- ✓ XXXIst International Congress of the ISBT. Cancún, Mexico. 7-12 junio, 2012. *Serologic reactivity and molecular analysis of samples with variant D phenotype.* Trucco Boggione C, Luján Brajovich M, Racca A, Cotorruelo C. *Vox Sanguinis* ISSN 0042-9007, 2012, 103 (1): P-486.
- ✓ XXXIst International Congress of the ISBT. Cancún, Mexico. 7-12 junio, 2012. *Association of altered E RHCE*CE(697G, 712G, 733G, 744C) with altered D RHD*46C.* Ochoa G, Nogués N, Muñiz-díaz E, Tarragó M, Cote J, Goldman M, Vege S, Westhoff C, Vietz C, Lujan Brajovich M, Trucco Boggione C, Cotorruelo C. *Vox Sang* 2012; 103(Suppl 1): 218-219.
- ✓ LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, Mar del Plata, 14-17 noviembre, 2012. *Modelización de la estructura tridimensional una proteína RhD con expresión alterada de los epitopes D.* Trucco Boggione C, Luján Brajovich M, Larroque C, Racca A, Cotorruelo C. *Medicina*, ISSN 0025 7680, 2012, 72 (II): 198.
- ✓ XXIII Regional Congress. International Society of Blood Transfusion. Amsterdam, Holanda. 2-5 junio, 2013. Oral presentation: *Molecular structures identified in serologically D negative samples of an admixed population.* Trucco Boggione C, Luján Brajovich M, Tarragó M, Racca A, Muñiz-Díaz E, Nogués N, Cotorruelo C. *Vox Sanguinis* ISSN 0042-9007, 2013, 105 (1): 21.
- ✓ International Meeting on Cell-free DNA. Special focus: fetal RHD genotyping. Copenhagen, Dinamarca. 19-21 junio, 2013. *Non-invasive diagnosis of fetal RHD status in an admixed population.* Trucco Boggione C, Luján Brajovich M, Di Mónaco R, Biondi C, Cotorruelo C.

- ✓ 25th Regional Congress of the ISBT. Londres, 27 junio-1° julio, 2015. *RHD allelic variability in north Argentine*. Trucco Boggione C; Sippert E; Luján Brajovich M; Gaspardi A; Leri M; Mattaloni S; Castilho L, Cotorruelo C.
- ✓ VI Jornada de Ciencia y Tecnología. 14 noviembre, 2012. *Relación genotipo-fenotipo del sistema Rh: investigación de alelos silentes*. Trucco Boggione C; Luján Brajovich M; Bianchini P; Biondi C; García Borrás S; Di Mónaco R; Racca A; Cotorruelo C.
- ✓ XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Casilda, 29-30 noviembre, 2012. *Asociación genética entre variantes alélicas RHD y RHCE*. Trucco Boggione C; Luján Brajovich M; Leri M; Racca A; Cotorruelo C.
- ✓ LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Los Cocos, 7-9 noviembre, 2013. *Antenatal detection of the fetal RHD status for guiding immunoprophylaxis*. Trucco Boggione C, Luján Brajovich M, Mattaloni S, García Borrás S, Biondi C, Cotorruelo C.
- ✓ XV Congreso y XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Zavalla, 28-29 noviembre, 2013. *Investigación del polimorfismo molecular del fenotipo D variante*. Trucco Boggione C, Percara L, Luján Brajovich M, Biondi C, Cotorruelo C.
- ✓ LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata del 19-22 noviembre, 2014. *Anti-D alloimmunization produced by apparently D negative red blood cells*. Trucco Boggione C, Lujan Brajovich M, Mattaloni S, Rucci A, Garcia Borrás S, Biondi C, Cotorruelo C.
- ✓ XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 4-5 diciembre, 2014. *Mutaciones de sentido equivocado responsables de expresiones débiles del antígeno D*. Trucco Boggione C; Percara L; Luján Brajovich M; Mattaloni S; Biondi C; Cotorruelo C. Missense mutations responsible for weak D antigen expression. Biocell ISSN 0327-9545, 2014; 38 (5), A10.
- ✓ XV Congreso Argentino de Medicina Transfusional. CABA, 16-18 septiembre, 2015. *Discrepancia en la tipificación de los antígenos D y E del Sistema Rh: estudio serológico y molecular en un grupo familiar*. Iñiguez E, Luján Brajovich M, Longo E, Trucco Boggione C, Carpentieri N, Mattaloni S, Cotorruelo C.
- ✓ XVII Congreso y la XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 30 noviembre-1° diciembre, 2015. *Nuevo alelo RHD responsable de un fenotipo d variante*. Trucco Boggione C; Luján Brajovich M; Mattaloni S; Racca L; Biondi C; Cotorruelo C. Novel RHD allele responsible for a D variant phenotype. ISSN 1667-5746, 2015.
- ✓ Panelista de la Mesa Redonda en el XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, 1° diciembre, 2015. *Diagnóstico prenatal no invasivo de la Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal*.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
1. Grupos sanguíneos humanos	1
2. Sistema Rh	2
2.1. Historia del sistema Rh	3
2.2. Genética del sistema Rh	4
2.3. Estructura molecular del locus <i>RH</i>	6
2.4. Complejo Rh	9
2.4.1. Proteínas Rh	11
2.4.1.1. Proteína RhD	12
2.4.1.2. Proteína RhCE	12

2.5. Antígenos del sistema Rh	14
2.5.1. Antígeno D	14
2.6. Fenotipos D	15
2.6.1. Fenotipo D positivo	15
2.6.2. Fenotipo D variante	15
2.6.2.1. Bases moleculares de las variantes D	17
2.6.2.2. Definiciones de fenotipo D débil y D parcial	19
2.6.3. Fenotipo DEL	21
2.6.4. Fenotipo D negativo	22
2.6.4.1. Alelo pseudogen: <i>RHD</i> ψ	22
2.6.4.2. Alelo <i>RHD-CE-D^s</i>	23
2.7. Aspectos Clínicos del sistema Rh	24
2.7.1. Importancia clínica de la genotipificación <i>RH</i>	24
2.7.2. Diagnóstico prenatal de la EHFN	26
3. Sistema Diego	27
3.1. Historia del grupo sanguíneo Diego	27
3.2. Estructura molecular y proteica del grupo sanguíneo Diego	28
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. Estudio del fenotipo y genotipo <i>RH</i> en muestras con fenotipo D negativo y D variante	30
1.1. Muestras	30
1.2. Estudios serológicos	31
1.2.1. Determinación del antígeno D	31
1.2.1.1. Prueba directa en tubo	31
1.2.1.2. Prueba de la antiglobulina indirecta (PAI)	32
1.2.1.3. Prueba de la antiglobulina directa (PAD)	32
1.2.1.4. Técnica de adsorción-elución	32
1.2.1.4.1. Adsorción	32
1.2.1.4.2. Elución por Glicina-HCl/EDTA	33

1.2.1.5. Otros estudios serológicos	33
1.2.2. Determinación de los antígenos C, c, E, e	33
1.2.2.1. Prueba directa en tubo	33
1.3. Estudios moleculares	33
1.3.1. Obtención de ADN genómico a partir de sangre periférica: micro método de salting-out modificado	33
1.3.1.1. Control de la extracción de ADN	34
1.3.2. Detección del gen <i>RHD</i>	35
1.3.2.1. PCR multiplex: amplificación enzimática del intrón 4 y de la región 3' no codificante del gen <i>RHD</i>	35
1.3.2.2. Control de la amplificación enzimática por electroforesis en geles de agarosa	37
1.3.3. Estudio de muestras con fenotipo D negativo C/E positivo	38
1.3.3.1. PCR SSP: Escaneo de exones	38
1.3.3.2. Caracterización de la estructura molecular de los exones 3 y 5 del gen <i>RHD</i> y del intrón 2 del gen <i>RHCE</i>	41
1.3.3.2.1. Detección de exón 3 híbrido: <i>5'RHD-RHCE3'</i>	41
1.3.3.2.2. Detección del polimorfismo c.733C>G	42
1.3.3.2.3. Detección de la presencia del alelo <i>RHC</i>	43
1.3.3.3. Estudio de alelos <i>RHD</i> nulos no caracterizados	43
1.3.3.3.1. Análisis por microarreglos de ADN	43
1.3.3.3.2. Secuenciación del gen <i>RHD</i>	44
1.3.3.3.2.1. Purificación de los productos amplificados	45
1.3.3.3.2.2. Determinación de la concentración de ADN	45
1.3.3.3.2.3. Preparación de los productos de amplificación para secuenciar	46
1.3.3.3.2.4. Interpretación de los resultados	47
1.3.3.4. Otros estudios moleculares	47
1.3.3.4.1. Caracterización molecular de los intrones 1 y 2 en muestras con estructura <i>RHD-CE(3-9)-D</i>	47
1.3.3.4.1.1. Estudio de la región 3' del intrón 1 del gen <i>RHD</i>	47

1.3.3.4.1.2. Estudio de la región 5' del intrón 2 del gen <i>RHD</i>	48
1.3.3.5. Diseño de estrategias de PCR	49
1.3.3.5.1. PCR SSP para la detección del alelo <i>RHD(46T>C)</i>	49
1.3.3.5.2. PCR SSP para la detección del alelo <i>RHD(581insG)</i>	50
1.3.3.5.3. PCR SSP para la detección del alelo <i>RHD(IVS3+1g>a)</i>	51
1.3.3.5.4. PCR RFLP para la detección del alelo <i>RHD(M295I)</i>	52
1.3.3.6. Estudios de modelización del Complejo Rh	53
1.3.4. Estudio de muestras con fenotipo D variante	53
1.3.4.1. Estudio de cigosidad <i>RHD</i>	54
1.3.4.2. PCR SSP la detección de alelos <i>D débil tipo 1, 2, 3 y 4</i>	55
1.3.4.3. PCR SSP para la detección del alelo <i>DVII</i>	56
1.3.4.4. Estudio de los alelos no caracterizados	57
1.3.4.4.1. PCR SSP: Escaneo de exones	57
1.3.4.4.2. Microarreglos de ADN	57
1.3.4.4.3. Secuenciación de los exones del gen <i>RHD</i>	57
1.3.4.5. Diseño de estrategias de PCR	57
1.3.4.5.1. PCR SSP para la detección del alelo <i>D débil tipo 93</i>	57
1.3.4.6. Estudios de modelización del Complejo Rh	58
1.3.4.7. Estudio de los niveles de expresión del antígeno D	58
1.4. Estudios moleculares complementarios	59
1.4.1. Detección del alelo <i>RHDψ</i>	59
1.4.2. Genotipificación del grupo sanguíneo Diego	60
1.4.3. Determinación prenatal del genotipo <i>RHD</i>	62
1.4.3.1. Estudios serológicos	62
1.4.3.1.1. Determinación del fenotipo RhD	62
1.4.3.2. Estudios moleculares	63
1.4.3.2.1. Extracción de ADN genómico	62
1.4.3.2.2. Estudios moleculares en muestras de ADN materno	62
1.4.3.2.3. Separación del plasma materno	63
1.4.3.2.4. Extracción de ADN fetal libre en plasma materno	63
1.4.3.2.5. Genotipificación <i>RHD</i> fetal	63

1.4.3.2.6. Genotipificación <i>RHD</i> de muestras paternas	64
1.4.3.2.7. Criterios para inferir el genotipo <i>RHD</i> fetal	64
1.4.3.3. Análisis serológicos y moleculares de muestras de sangre de cordón	66
1.5. Análisis estadísticos	66
RESULTADOS	67
1. Determinación del antígeno D	67
2. Estudio del fenotipo Rh completo y genotipo <i>RH</i> en muestras D negativo	67
2.1. Estudios serológicos	67
2.1.1. Determinación del fenotipo Rh completo	67
2.2. Estudios moleculares	68
2.2.1. Obtención de ADN genómico de sangre periférica	68
2.2.2. PCR multiplex: amplificación del intrón 4 y de la región 3' no codificante del gen <i>RHD</i>	69
2.2.3. Caracterización molecular de las variantes alélicas halladas	71
2.2.3.1. Escaneo de exones	71
2.2.3.2. Caracterización de la estructura molecular del alelo <i>RHD-CE-D^s</i>	73
2.2.4. Estudio de las muestras <i>D-/RHD+</i> no caracterizadas	74
2.2.4.1. Análisis por microarreglos de ADN	74
2.2.4.2. Secuenciación de los 10 exones del gen <i>RHD</i>	75
2.2.5. Otros estudios moleculares	79
2.2.5.1. Caracterización de la estructura genética del alelo <i>RHD-CE(3-9)-D</i>	79
2.2.5.2. Caracterización molecular del alelo <i>RHCE(1-2)-RHD(3_{361_371del11}-10)</i>	81
2.2.6. Estudios complementarios en las muestras portadoras de alelos nuevos	82
2.2.6.1. Nuevos estudios serológicos	82
2.2.6.2. Estudio de muestras portadoras del alelo <i>RHD*46C</i>	83
2.2.6.3. Modelo de la estructura tridimensional del trímero RhD-RhCE-RhAG	84

3. Estudio del fenotipo Rh completo y genotipo <i>RH</i> en muestras con expresión disminuida del antígeno D	88
3.1. Estudios serológicos	88
3.1.1. Determinación del fenotipo Rh completo	88
3.2. Estudios moleculares	89
3.2.1. Obtención de ADN genómico de sangre periférica	89
3.2.2. PCR multiplex: amplificación del intrón 4 y de la región 3' no codificante del gen <i>RHD</i>	89
3.2.3. Estudios de cigosidad	90
3.2.4. PCR SSP para la detección de alelos <i>D débil tipo 1, 2, 3 y 4</i>	90
3.2.5. PCR SSP para la detección del alelo <i>RHD*DVII</i>	91
3.2.6. Estudio de muestras no caracterizadas	92
3.2.6.1. Escaneo de exones	92
3.2.6.2. Análisis por microarreglos de ADN	93
3.2.6.3. Secuenciación de los 10 exones del gen <i>RHD</i>	94
3.2.7. Frecuencias de muestras con fenotipo D variante	97
3.3. Estudios complementarios en las muestras portadoras del alelo <i>D débil tipo</i>	
93	101
3.3.1. Modelo de la estructura tridimensional del complejo RhD-RhCE-RhAG	101
3.3.2. Estudio de los niveles de expresión del antígeno D	102
3.4. Estudios moleculares complementarios	104
3.4.1. Detección del alelo pseudogen <i>RHDψ</i>	104
3.4.2. Genotipificación del grupo sanguíneo Diego	106
4. Determinación prenatal del genotipo <i>RHD</i>	106
4.1. Estudios moleculares	106
4.1.1. Obtención de ADN genómico de sangre periférica	106
4.1.2. Análisis de la presencia de variantes <i>RHD</i> en ADN materno	106
4.1.3. Genotipificación <i>RHD</i> fetal	107
4.1.3.1. Estudio de plasmas de embarazadas D-/RHD-	107
4.1.3.2. Estudio de plasmas de embarazadas RhD-/RHD+	110
4.1.3.3. Estudios de sangre de cordón de recién nacido	112

DISCUSIÓN	114
1. Estudio de muestras con fenotipo D negativo C/E positivo	115
2. Estudio de muestras con expresión débil del antígeno D	122
3. Genotipificación prenatal	126
4. Mecanismos moleculares pendientes de caracterización	130
CONCLUSIÓN	132
BIBLIOGRAFÍA	136

ABREVIATURAS

GR:	Glóbulo rojo
ISBT:	Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (en inglés: International Society of Blood Transfusion)
EHFN:	Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal
PAI:	Prueba de la antiglobulina indirecta
PAD:	Prueba de Coombs indirecta
SNP:	Polimorfismo de nucleótido único
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
RFLP:	polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
AHAI:	Anemias Hemolíticas Autoinmunes
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
TBE:	Tris-Borato-EDTA
TE:	Tris-EDTA
CTAB:	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
V/V:	volumen en volumen
P/V:	peso en volumen
g/dl:	gramos por decilitros
rpm:	revoluciones por minuto
M:	molar
ml:	mililitros
V/cm:	voltios por centímetro
pb:	pares de bases
PCR SSP:	reacción en cadena de la polimerasa alelo específica
HGH:	hormona de crecimiento humana (en inglés: Human Growth Hormone)
mAb:	anticuerpos monoclonales

INTRODUCCIÓN

1. Grupos sanguíneos humanos

Los sistemas de grupos sanguíneos se definen como variaciones o polimorfismos heredados en la superficie de células sanguíneas. Estas variantes son codificadas por un gen o un complejo de 2 o más genes contiguos altamente homólogos, denominados haplotipos, que se transmiten independientemente durante la meiosis de una generación a la siguiente (1,2).

Los antígenos de los grupos sanguíneos son estructuras polimórficas presentes en las proteínas, las glicoproteínas y los glicolípidos de la membrana del GR y son reconocidos por aloanticuerpos. Aunque es posible detectar polimorfismos presentes en el ADN mediante técnicas de biología molecular y teniendo en cuenta todas las estructuras presentes en la membrana eritrocitaria, solamente se consideran “grupos sanguíneos” a los reconocidos por un aloanticuerpo. Las determinantes antigénicas de los grupos sanguíneos están formadas por:

- ✓ **Carbohidratos:** unión de estas moléculas a precursores presentes en glicoproteínas o glicolípidos, catalizada por la acción de glicosiltransferasas presentes en la membrana del aparato de Golgi (por ejemplo ABO, Hh, Lewis, I/i, P1, P/Pk, Cad/Sd^a) (3, 4).
- ✓ **Estructuras proteicas:** representan productos directos de los genes de grupo sanguíneo (por ejemplo Banda 3, RhD/RhCE, MNS, K/k, Fy^a/Fk^b, Jk^a/Jk^b) (3, 4).

Las funciones que desempeñan estas moléculas son heterogéneas: transportadores de membrana, moléculas de adhesión y receptores, enzimas, glicoproteínas reguladoras del complemento, componentes estructurales del citoesqueleto y del glicocálix (4, 5). Hasta la actualidad se han definido más de 300 antígenos que codifican 35 sistemas de grupos sanguíneos reconocidos por el Comité de Terminología de Antígenos de Superficie de Glóbulos Rojos, perteneciente a la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (ISBT) (6, 7).

2. Sistema Rh

El sistema Rh (ISBT- 004 – RH) (7) es el grupo sanguíneo más complejo y polimórfico de la membrana eritrocitaria. Presenta un gran interés clínico en Medicina Transfusional, Obstetricia y Hematología, debido a la participación de sus anticuerpos en los procesos de destrucción inmune de los glóbulos rojos (GRs). Los antígenos Rh desempeñan un papel central en las reacciones hemolíticas transfusionales, en la inmunización de pacientes politransfundidos, en la patogénesis de la Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal (EHFN) y en algunas Anemias Hemolíticas Autoinmunes (AHAI) (8).

Este sistema de grupo sanguíneo actualmente está compuesto por 54 antígenos identificados con anticuerpos específicos. La complejidad del sistema Rh también se evidencia en su estructura molecular, ya que se han definido más de 250 alelos de importancia clínica (9). Los epitopes D, C, c, E y e constituyen el grupo de antígenos principales del sistema Rh y son responsables, debido a su elevada inmunogenicidad, de la mayoría de los anticuerpos clínicamente significativos que se identifican en la práctica transfusional y obstétrica (4-6,10-14). Los antígenos del sistema Rh sólo se encuentran en humanos y algunos primates y se expresan únicamente en la membrana de los hematíes y en las células precursoras de estirpe eritroide (15).

2.1. Historia del sistema Rh

El sistema Rh fue identificado en 1939 luego de la descripción del sistema ABO en el año 1900. Su descubrimiento, o la autoría del mismo, resultó controvertida durante algunos años debido a la confusión generada entre éste y el que hoy en día se conoce como sistema Landsteiner-Wiener (LW).

En 1939 Levine y Stetson estudiaron la reacción hemolítica sufrida por una mujer que había sido transfundida con sangre ABO compatible de su esposo y que previamente había dado a luz a un feto muerto. Los investigadores hallaron, en el suero materno, anticuerpos que aglutinaban los GRs del 80% de la población ABO compatible escogida al azar, incluidos los del esposo. Los científicos atribuyeron la incompatibilidad transfusional a la presencia en la madre de un anticuerpo formado por inmunización a un antígeno fetal, el cual era heredado del padre. Este anticuerpo fue el responsable de la reacción frente a los GRs del esposo así como también del cuadro clínico desarrollado por su hijo, el que hoy se conoce como EHFN (16).

En 1940 Landsteiner y Wiener aislaron anticuerpos generados por conejos y cobayos inmunizados con sangre de mono *Macacus rhesus*, los cuales aglutinaban no solo los eritrocitos de mono sino también el 85% de los GRs humanos. Los individuos cuyos eritrocitos eran aglutinados por el suero anti-rhesus se clasificaron como Rh positivo, y el 15% restante, como Rh negativo. En ese momento, los investigadores creyeron que éste era el mismo anticuerpo descrito en el caso de Levine un año antes, y consideraron que los anticuerpos de origen animal y humano identificaban un mismo factor presente en los eritrocitos humanos y de monos. Al nuevo antígeno lo llamaron factor Rh. El motivo de la confusión fue que el anticuerpo hallado por Landsteiner y Wiener reacciona con GRs que en la actualidad se los clasifica como D positivo y también con los D negativo, pero preferentemente con los primeros. Al diluir el suero para eliminar la reactividad anti-especie, la única reacción que persistía era con los eritrocitos D positivo creando la falsa impresión de que ésta era la especificidad del anticuerpo (17). Hasta 1961 no quedó completamente aclarada dicha confusión. Se necesitaron casi 20 años para que Levine y *col.* demostraran que el anticuerpo de origen humano y el anticuerpo anti-rhesus de origen animal no reaccionaban con el mismo antígeno. Sin embargo, en aquel momento ya se había extendido tanto el término Rh en la práctica transfusional que resultaba imposible modificarlo. Levine sugirió entonces dar el nombre de anti-LW al anticuerpo anti-rhesus de conejo, en honor a sus descubridores (18). Hoy en día se sabe que se trata de dos sistemas genéticamente independientes, cuyos antígenos son reconocidos por anticuerpos diferentes

(19). El anticuerpo humano descubierto por Levine y Stetson está dirigido contra el antígeno "D" del sistema Rh. En la práctica médica, el término "Rh positivo" y "Rh negativo" sigue definiendo la presencia o ausencia del antígeno D en un individuo.

A mediados de los años cuarenta cuatro antígenos más fueron identificados, dos pares de antígenos antitéticos (C/c y E/e) estrechamente relacionados entre sí y a su vez con el antígeno D.

A finales de los años ochenta se consiguió el aislamiento a gran escala de las proteínas Rh por cromatografía seguido de la secuenciación de la región N-terminal. Este hecho permitió en 1990 la clonación del gen *RHCE* en Francia (20), y dos años después, la clonación del gen *RHD* (21). La definición de los diferentes alelos responsables de los antígenos C ó c y E ó e se completó en 1994 (22).

Durante los últimos 20 años han sucedido diversos hallazgos en cuanto a la variabilidad genética del locus *RH*, los cuales han contribuido a la descripción de numerosos alelos. Los estudios en diferentes poblaciones han puesto de manifiesto las distintas prevalencias de estos alelos con las consiguientes implicancias clínicas, tanto en la práctica transfusional, como en el control inmunohematológico de las embarazadas.

2.2. Genética del sistema Rh

Según la teoría propuesta por Fisher y Race (23) en 1943, el sistema Rh estaría compuesto por 3 genes estrechamente ligados, cada uno con dos alelos. Los productos de estos genes serían los antígenos D/d, C/c y E/e. Los tres loci estarían estrechamente ligados en cada cromosoma formando los haplotipos Dce, Dce, DCE, DcE, dce, dCe, dcE y dCE que se transmiten de una generación a otra como una unidad o complejo génico. Cada gen controlaría la presencia del antígeno correspondiente en los eritrocitos.

Wiener (24) propuso en 1951 que la herencia del sistema Rh dependería de un solo gen con múltiples alelos. Cada gen produciría un antígeno sobre el cual podrían identificarse varios factores, capaces de reaccionar con los anticuerpos específicos.

Estas dos teorías permiten interpretar los hallazgos del Laboratorio Inmunohematológico, pero proponen dos nomenclaturas distintas para un mismo sistema y no son suficientes para explicar el elevado polimorfismo asociado al sistema Rh.

Con la intención de facilitar la comunicación, Rosenfield (25) propuso en 1962 una nomenclatura de tipo numérico independiente de la genética del sistema Rh. En esta

nomenclatura, cada antígeno es identificado con un número asignado previamente al antisuero con el cual reacciona. De tal manera, para expresar un determinado fenotipo, el símbolo Rh es seguido por el número del antisuero utilizado, demostrando así la reacción positiva y la presencia del antígeno. En el caso de una reacción negativa, se anota el número del antisuero precedido de un signo menos.

En 1986, Tippett (26) propuso un modelo que, aunque no totalmente correcto, se aproximaba mucho a lo que actualmente se conoce. Formuló la teoría sobre la existencia de dos loci estrechamente relacionados: D y CcEe, con dos alelos en el primer locus: D y no D, y cuatro alelos en el segundo locus, CcEe, que incluyen ce, Ce, cE y CE. Si exceptuamos la falla con respecto a la existencia de un antígeno no D (o d) el resto del modelo coincide con el que posteriormente fue demostrado por Colin y col en 1990 (27). Estos últimos investigadores demostraron la presencia de dos genes altamente homólogos con similar organización molecular en el genoma de individuos D positivo que denominaron *RHD* y *RHCE*. También reportaron que en el locus *RH* de individuos D negativo solo se encuentra el gen *RHCE*. La ausencia del gen *RHD* en el genoma de individuos D negativo se confirmó después por clonado del mismo (21, 28, 29). Estudios moleculares posteriores permitieron demostrar que un individuo *RHD* positivo es portador de ambos genes *RHD* y *RHCE* mientras que en individuos *RHD* negativo sólo se encuentra presente el gen *RHCE*. Los individuos D positivo poseen uno o dos genes *RHD* por célula, mientras que el fenotipo D negativo resulta de la ausencia del gen *RHD*, siendo las personas D negativo homocigotas para la delección del gen *RHD*.

Posteriormente, la ISBT propuso una nueva nomenclatura para el sistema Rh. Este sistema tiene asignado el número 004 y cada antígeno tres dígitos más. Por ejemplo al antígeno D le corresponde 001, al C 002, al E 003, al c 004, al e 005, y así sucesivamente. Por otra parte, la terminología empleada para referirse por escrito a los antígenos, genes y proteínas Rh está sujeta a las siguientes reglas: los antígenos se expresan empleando sus correspondientes letras (D, C, c, E, e), los genes *RH* se expresan empleando mayúsculas y, generalmente, en bastardilla (*RHD* y *RHCE*) y, finalmente, las proteínas se expresan como RhD, o Rhce, RhCe, RhcE y RhCE, según los antígenos presentes en ellas (30).

En la Tabla I se detallan las equivalencias de las nomenclaturas propuestas por Fisher-Race, Wiener, Rosenfield y de la ISBT para los principales antígenos del sistema Rh.

Tabla I. Nomenclatura para los 5 antígenos principales del sistema Rh

Fisher-Rice	Wiener	Rosenfield	ISBT
D	Rho	Rh1	004001
C	rh'	Rh2	004002
E	rh''	Rh3	004003
c	hr'	Rh4	004004
e	hr''	Rh5	004005

2.3. Estructura molecular del locus *RH*

El locus *RH* está constituido por dos genes homólogos, *RHD* y *RHCE* dispuestos en tándem. Se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1, en la posición p34.3-36.13 y ocupa aproximadamente 450 Kb del ADN genómico. El gen *RHD* está ubicado en posición 5' con respecto al gen *RHCE*. Sus marcos de lectura se encuentran en orientación opuesta, es decir 5'-*RHD*-3'- 3'-*RHCE*-5' (20, 31, 32). Estos genes comparten un 93,8% de homología en sus secuencias nucleotídicas codificantes, lo que indica que surgieron de la duplicación de un gen ancestral común (33). Están compuestos por 10 exones cada uno, ocupando, cada gen, aproximadamente 69 Kb de ADN. Los genes *RHD* y *RHCE* codifican las proteínas RhD y RhCE portadoras de los antígenos D y C, c, E, e, respectivamente. Los extremos 3' de los genes están separados por aproximadamente 30 Kb donde se encuentra un pequeño gen de siete exones, llamado *SMP1* (del inglés Small Membrane Protein 1), en igual orientación que el gen *RHD*. La proteína codificada por el gen *SMP1* no tendría función relacionada con el sistema Rh y no se expresa en la membrana eritrocitaria (34).

El gen *RHD* está flanqueado por dos segmentos de ADN, denominados caja Rhesus 5' y caja Rhesus 3', con una longitud de aproximadamente 9 Kb, las cuales tienen un 98,6% de homología y se encuentran en idéntica orientación. Algunas evidencias sugieren que la delección del gen *RHD*, responsable del fenotipo D negativo, surgió por el entrecruzamiento desigual (recombinación no homóloga) de las cajas Rhesus entre dos haplotipos *RH* mal alineados en "trans", dando lugar a una caja Rhesus híbrida (Figura 1) (8, 34, 35).

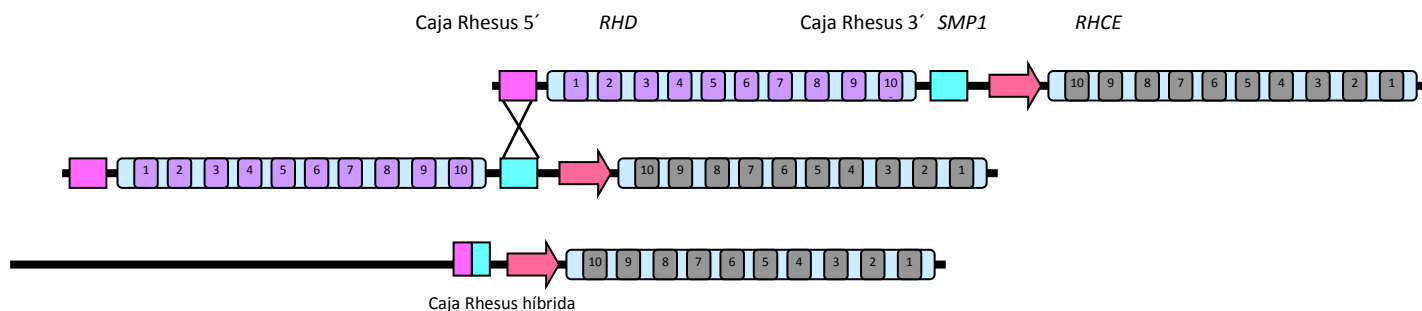
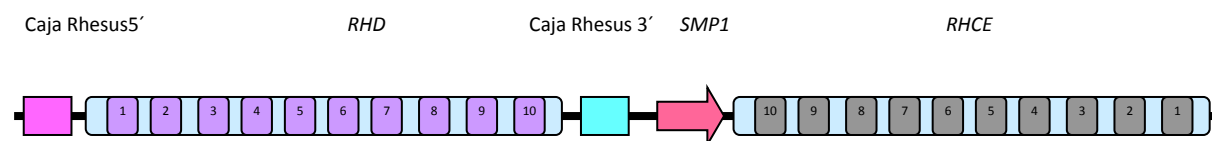


Figura 1: Delección del gen *RHD*. En la figura se representan el gen *RHD* flanqueado por las cajas Rhesus 5' y 3', el gen *SMP1* y el gen *RHCE* ubicado en orientación opuesta. Un entrecruzamiento desigual entre las Cajas Rhesus 5' y 3' (representadas en forma de rectángulos fucsia y celeste, respectivamente) causa la delección del gen *RHD* y la generación de una Caja Rhesus híbrida.

Los estudios del ADN genómico han demostrado que el locus *RH* está compuesto, en individuos D positivo, por los dos genes estructurales *RHCE* y *RHD*, mientras que en individuos D negativo se encuentra únicamente el gen *RHCE* (Figura 2).

Individuos *RHD*+



Individuos *RHD*-

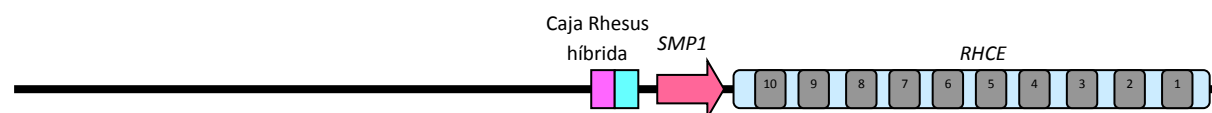


Figura 2. Organización de los genes *RHD* y *RHCE* en el locus *RH*. En la parte superior de la figura se representa el locus *RH* y la organización de los genes *RHD* y *RHCE* para un individuo *RHD* positivo. En la parte inferior de la figura se representa el locus *RH* para un individuo *RHD* negativo, donde debido a la delección del gen *RHD*, solo se muestra el gen *RHCE*.

El gen *RHCE* posee cuatro formas alélicas más comunes denominadas *RHCE*ce*, *RHCE*Ce*, *RHCE*cE* y *RHCE*CE*, responsables de los distintos fenotipos Rh. El alelo que codifica para el antígeno C difiere en seis nucleótidos del alelo que codifica para el antígeno c. Los alelos E y e, en cambio, se diferencian en un solo nucleótido (36, 37).

La presencia o ausencia del gen *RHD* en el ADN determina las bases moleculares del polimorfismo asociado a los fenotipos D positivo y D negativo. Los individuos que expresan el antígeno D pueden ser homocigotas (dos copias del mismo alelo *RHD*), hemicigotas (un solo

alelo *RHD*) o heterocigotas (dos alelos *RHD* diferentes) para el gen *RHD*. Los individuos con el fenotipo D negativo resultan, principalmente, de la ausencia del gen *RHD* debido a un evento de delección, siendo las personas D negativo homocigotas para esta delección. Sin embargo se ha reportado que existen numerosas variantes alélicas responsables de fenotipos D negativo, mayoritariamente de poblaciones no caucásicas, que dan origen a proteínas RhD que no expresan los epitopes del antígeno D o no se ensamblan en la membrana eritrocitaria (29-33, 35). Además, se han descrito fenotipos D variante generados por distintos eventos moleculares que conducen a una expresión alterada de la proteína RhD.

El gran polimorfismo observado en el sistema Rh es producto de diferentes rearrreglos genéticos que ocurren en el locus *RH* (38-41). Las variantes fenotípicas observadas se originan principalmente por los siguientes mecanismos moleculares:

- **Mutación puntual (SNP)**
 - ✓ **Por sustitución de base**
 - ❖ **Mutación silenciosa:** sustitución en la secuencia de nucleótidos que no provoca cambios aminoacídicos.
 - ❖ **Mutación de cambio de sentido:** sustitución de un único nucleótido (SNP) que produce el cambio de un aminoácido (AA) en la proteína correspondiente.
 - ❖ **Mutación sin sentido:** sustitución de un codón codificante por un codón de terminación, provocando la finalización del proceso de traducción.
- **Mutación puntual (SNP)**
 - ✓ **Por inserción o delección de base**
 - ❖ **Mutación de cambio de fase:** cambio en la secuencia de ADN por adición o delección de una base que provoca un cambio en el marco de lectura de los tripletes y altera, en consecuencia, los AAs codificados.
- **Inserciones o delecciones de más de un nucleótido:** puede afectar varios nucleótidos, un gen entero o un fragmento de cromosoma. Puede alterar el marco de lectura de una secuencia codificante.
- **Entrecruzamiento o recombinación de secuencias:** intercambio de material genético que tiene lugar durante la meiosis, en la cual los cromosomas homólogos intercambian fragmentos. Este proceso posibilita la aparición de nuevas combinaciones de alelos.
- **Entrecruzamiento desigual o recombinación homóloga:** cuando la recombinación ocurre entre secuencias no pertenecientes a un mismo alelo. Las secuencias entre las que sucede el

entrecruzamiento comparten, sin embargo, una alta homología que posibilita el mal apareamiento.

- **Conversión génica:** intercambio unidireccional de fragmentos de ADN entre los genes *RHD* y *RHCE*. Este fenómeno origina alelos híbridos *RHD-CE-D* o *RHCE-D-CE* que generan proteínas quiméricas en las cuales no sólo se pierden algunos epítopes sino también se pueden expresar antígenos de baja incidencia o suprimir la expresión de antígenos de alta prevalencia. Este mecanismo tiene un rol fundamental en la variabilidad antigénica de muchos sistemas de grupos sanguíneos. La orientación opuesta, la elevada homología y la disposición en tándem de ambos genes *RH* facilitan la generación de un gran número de alelos a través de eventos de conversión génica.
- **Mutación que altera el splicing:** mutación en el ADN genómico localizada en los extremos de los intrones en los que se encuentran las secuencias consenso para el proceso de corte y empalme del gen. Las mutaciones en estos sitios son responsables de procesos de maduración de ARN incompletos o erróneos.

2.4. Complejo Rh

El complejo Rh está formado por la familia de proteínas Rh y las proteínas accesorias Rh (Figura 3) (11, 42).

- ✓ **Familia de proteínas Rh:** este grupo está constituido por las proteínas RhD/RhCE, denominadas en general proteínas Rh, y la glicoproteína RhAG. La glicoproteína RhAG está codificada por el gen *RHAG* compuesto por 10 exones, localizado en el cromosoma 6 en la posición p11-p21.1 y ocupa aproximadamente 32 Kb. Mediante secuenciación se demostró que posee un 40% de homología con los genes *RH*. Esta elevada similitud indica una relación ancestral común, donde probablemente un evento de duplicación ocurrido hace más de 300 millones de años haya causado la divergencia entre estos genes. La glicoproteína posee un peso molecular de 50 kDa y está compuesta por 409 AAs. Su topología en la membrana eritrocitaria y estructura secundaria son similares a las que poseen las proteínas Rh (43-48).
- ✓ **Proteínas accesorias:** este grupo está formado por la glicoproteína LW (ICAM-4), la proteína CD47 (IAP: Proteína Asociada a Integrinas), la glicoforina B (GBP) y la proteína Banda 3, las cuales se encuentran asociadas en el complejo Rh mediante uniones no covalentes (49).

Inicialmente, se consideraba que las proteínas del complejo Rh formaban un tetrámero con dos moléculas de RhAG y dos moléculas de proteínas Rh (49). Sin embargo, las evidencias más recientes obtenidas a través de estudios de modelización del complejo Rh sugieren una estructura trimérica del tipo RhAG₂RhD, RhAG₂RhCE, RhAGRhD₂, RhAGRhCE₂ ó el trímero RhAGRhDRhCE estabilizadas por asociaciones tanto del dominio N-terminal como del C-terminal de los polipéptidos (50-52). El modo de asociación de este complejo con las proteínas accesorias Rh, algunas de las cuales interactúan directamente con el esqueleto de la membrana, permanece indefinida. En la siguiente figura se observa un modelo del complejo Rh en la membrana eritrocitaria.

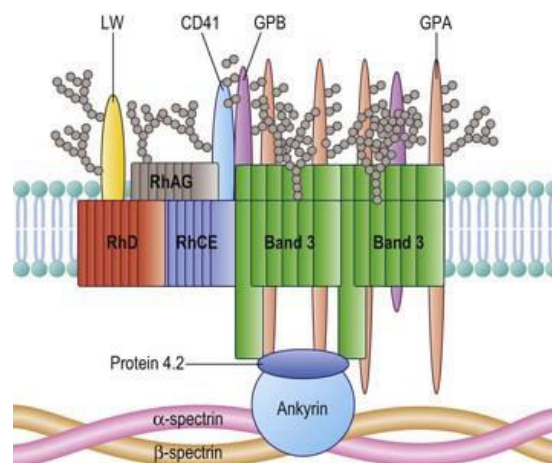


Figura 3. Representación de complejo proteico de grupo sanguíneo Rh en la membrana del GR basado en el modelo de trímero RhAG-RhD-RhCE: Se representa la asociación de la proteína Banda 3 con los polipéptidos Rh (D y CE), RhAG y glicoforinas A y B (GPA, GPB). Este complejo se une al citoesqueleto vía Ankirina. Obtenida de *Structural modelling of red cell surface proteins*. Burton NM, Daniels G. 2011. *Vox Sang*, 100, 129-39.

Las proteínas RhD y RhCE del complejo expresan los antígenos del sistema Rh en la membrana del GR, solo en presencia de la glicoproteína RhAG. Sin embargo las funciones biológicas que desempeñan las proteínas Rh y RhAG no están aún bien definidas.

El hallazgo de anemia hemolítica no inmunológica en el síndrome Rh_{null} (eritrocitos que no expresan las proteínas Rh y RhAG) sugiere que el complejo Rh participaría en el mantenimiento de las propiedades estructurales y funcionales de la membrana eritrocitaria. Sin embargo, ésta no sería su única función, ya que algunas líneas de evidencia sugieren que el complejo Rh podría participar en el transporte transmembranal. Su conformación característica de proteínas de múltiples pasos de entrada y salida en la membrana es un rasgo peculiar de las

moléculas transportadoras. Además, presentan homología estructural con las proteínas Banda 3 (transportador aniónico), AQP-1 (canal de agua) y Kidd (transportador de urea). Estudios de secuenciación del ADN revelaron que los polipéptidos Rh y, especialmente, RhAG están relacionados con la familia de proteínas transportadoras de amonio Mep/Amt de levaduras, bacterias y otros microorganismos (53,54). Sin embargo, no ha sido aún establecida la función del complejo Rh como transportador de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ en la membrana eritrocitaria. Otros autores demostraron que el complejo Rh y la proteína Banda 3 se encuentran fuertemente asociados formando un macrocomplejo que podría funcionar como unidad de intercambio gaseoso en la membrana eritrocitaria (55-57).

2.4.1. Proteínas Rh

Las proteínas RhD y RhCE están codificadas por los genes *RHD* y *RHCE* respectivamente, y presentan aproximadamente un 92% de homología. El análisis de la secuencia aminoacídica primaria (ADNc) ha demostrado que los primeros 41 AAs de la región N terminal en ambos polipéptidos son idénticos (28, 58).

Las proteínas Rh están compuestas por una única cadena polipeptídica de 417 residuos de AAs y poseen un peso molecular de aproximadamente 30-32 kDa. Son polipéptidos transmembranales altamente hidrofóbicos que atraviesan la membrana del GR 12 veces, con N- y C-terminales orientados hacia el citoplasma, generando 6 bucles extracelulares y 7 segmentos intracelulares (8, 50, 59). Cada uno de los exones del gen codifica un segmento de la proteína, de manera que los 10 exones dan lugar a la proteína completa. Se caracterizan por contener grupos sulfidrilos libres que no se encuentran glicosilados ni fosforilados. Sin embargo, representan el componente de la membrana con mayor cantidad de ácidos grasos acilados. Estas proteínas interactúan con la bicapa lipídica de la membrana eritrocitaria mediante la unión de residuos de ácidos palmíticos acetilados a Cys presentes en cadenas laterales de la proteína próximas al citosol. Los sitios más probables de interacción serían los motivos Cys-Leu-Pro, que se encuentran dos veces en la proteína RhD y tres veces en la proteína RhCE, aunque otros residuos de Cys en las posiciones 315 y 316 podrían ser sitios alternativos (60-62).

2.4.1.1. Proteína RhD

La proteína RhD posee 32 AAs que determinan la especificidad D. Ocho de esos AAs se localizan en la superficie de GR, mientras que 24 de los mismos se encuentran en los dominios transmembrana y citoplasmáticos (49). En la Figura 4 se representa la estructura de la proteína RhD.

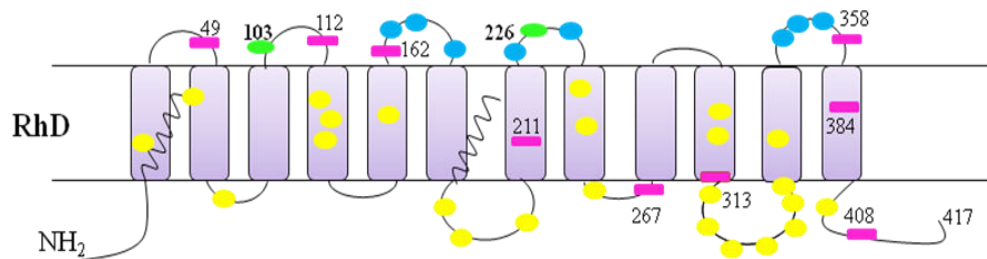


Figura 4. Estructura de la proteína RhD. Los óvalos verdes representan los AAs Ser103 y Ala226 en la proteína RhD. Las líneas en zigzag representan los motivos Cys-Leu-Pro que estarían involucrados en la unión de residuos de ácidos palmíticos acetilados. Los rectángulos rosa representan el inicio y final de cada uno de los fragmentos de la proteína RhD codificada por los 10 exones que compone el gen *RHD*. Los círculos azules representan los 8 AAs extracelulares específicos de la proteína RhD y los círculos amarillos los 24 AAs localizados en dominios transmembranales y citoplasmáticos correspondientes a la proteína.

La proteína RhD difiere de las variantes más comunes de la proteína RhCE sólo en 32-36 AAs, dependiendo del fenotipo CcEe del individuo. Sin embargo, aunque las proteínas Rh poseen un alto grado de homología; ninguna de las variantes RhCE expresa epitopes D ni la proteína RhD expresa los antígenos C y e, a pesar de la presencia de los AAs Ser y Ala en las posiciones 103 y 226, respectivamente (20, 63, 64).

2.4.1.2. Proteína RhCE

La proteína RhCE expresa los antígenos C ó c, que se encuentran en el segundo bucle extracelular, junto con los antígenos E ó e en el cuarto bucle extracelular sobre la misma proteína. De esta manera, en el mismo polipéptido existen cuatro variantes de la proteína RhCE en GRs normales: RhCe, RhCE, RhcE y Rhce.

Los polimorfismos C/c y E/e son causados por cambios de AAs debidos a sustituciones puntuales de nucleótidos en el gen *RHCE* (22, 63, 65,66).

❖ Polimorfismo C/c:

La presencia de SNPs en los exones 1 y 2 del gen *RHCE* generan las variantes antigénicas C/c, respectivamente. Las secuencias de los ADNc obtenidas de muestras con fenotipo dCCee y dcce mostraron diferencias en seis nucleótidos ubicados en la posición 48 del exón 1 y en las posiciones 150, 178, 201, 203 y 307 del exón 2. Las sustituciones nucleotídicas producidas en las posiciones 150 y 201 son silenciosas por lo tanto el polimorfismo de los antígenos C/c está asociado a cuatro sustituciones aminoacídicas: una Cys por un Trp en la posición 16 (*p.Cys16Trp*), una Ile por una Leu en la posición 60 (*p.Ile60Leu*), una Ser por una Asn en la posición 68 (*p.Ser68Asn*) y una Ser por una Pro en la posición 103 (*p.Ser103Pro*). El análisis de la estructura secundaria de la proteína RhCE realizado para predecir la topología de este polipéptido en la membrana del GR indica que de las cuatro posiciones polimórficas asociadas a los antígenos C y c, solamente el AA en la posición 103 se correlaciona estrictamente con la antigenicidad C/c, ya que está presente en el segundo dominio extracelular, mientras que las demás sustituciones corresponden a dominios transmembranales o intracelulares. El AA Pro en la posición 102 (Pro102) parece desempeñar un papel crítico en la expresión del antígeno c. La presencia de dos residuos de Pro adyacentes (102 y 103) crearían una estructura rígida, resistente a cambios debidos a posibles modificaciones de AAs ubicados en el entorno, explicando el menor número de variantes c comparado con el de otros antígenos del sistema Rh (22, 63, 66, 67).

❖ Polimorfismo E/e

Los análisis de las secuencias de los ADNc obtenidos de muestras con fenotipo dccEE y dcce mostraron un único cambio de base en la posición 676 del exón 5 del gen *RHCE*. Esta mutación puntual de cambio de sentido genera una sustitución del AA Pro por una Ala en la posición 226 (*p.Pro226Ala*) en el cuarto dominio extracelular de la proteína RhCE, la cual está asociada al polimorfismo de los antígenos E/e (63, 67).

La Figura 5 representa la estructura de la proteína RhCE.

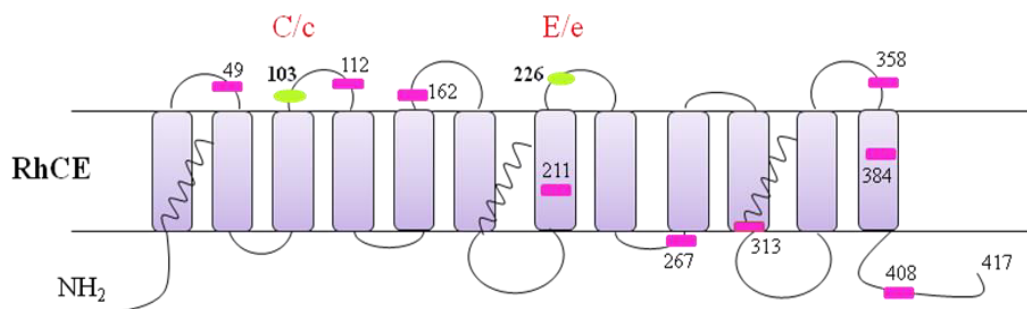


Figura 5. Estructura de la proteína RhCE. Los óvalos verdes representan los AAs críticos para el polimorfismo C/c (*p.Ser103Pro*) y para E/e (*p.Pro226Ala*). Las líneas en zigzag representan los motivos Cys-Leu-Pro que estarían involucrados en la unión de residuos de ácidos palmíticos acetilados. Los rectángulos rosa representan el inicio y final de cada uno de los fragmentos de la proteína codificada por los 10 exones que compone el gen *RHCE*.

2.5. Antígenos del sistema Rh

Los antígenos del sistema Rh se expresan en las proteínas transmembranales RhD y RhCE. La identificación del antígeno D es la más importante desde el punto de vista transfusional porque permite clasificar a un individuo como D positivo o D negativo (10, 68).

2.5.1. Antígeno D

El antígeno D presenta la mayor inmunogenicidad dentro del sistema Rh. El número total de sitios antigénicos D presentes en GRs maduros es aproximadamente constante y varía entre 13000 y 24000 copias por célula (69). Las investigaciones realizadas con anticuerpos monoclonales (mAb) demostraron que el antígeno D es un mosaico compuesto por diferentes epitopes dependientes de la estructura terciaria de la proteína RhD en la membrana eritrocitaria. El modelo inicial sugiere la existencia de 9 epitopes (epD1 a epD9) (70). Actualmente, algunos autores proponen la presencia de 16, 30 y 37 epitopes (14, 71-75). Los epitopes D son conformacionales, por lo tanto la unión de los anticuerpos anti-D no depende sólo de la secuencia lineal de AAs sino de la estructura cuaternaria de la molécula en la membrana. Para la unión de estos anticuerpos, dichos epitopes deben formar parte de los bucles extracelulares, incluso involucrar a más de uno de los bucles. Sin embargo, determinados cambios de AAs en segmentos de la molécula que no están expuestos al exterior de la membrana, tales como los que se producen en las α -hélices transmembranales o en los segmentos citosólicos, pueden debilitar la interacción con el anticuerpo al modificar los epitopes D. Estas variaciones generan los fenotipos comúnmente llamados D débil y D parcial (Figura 6) que en la actualidad se los clasifica como fenotipo D variante (8, 76).

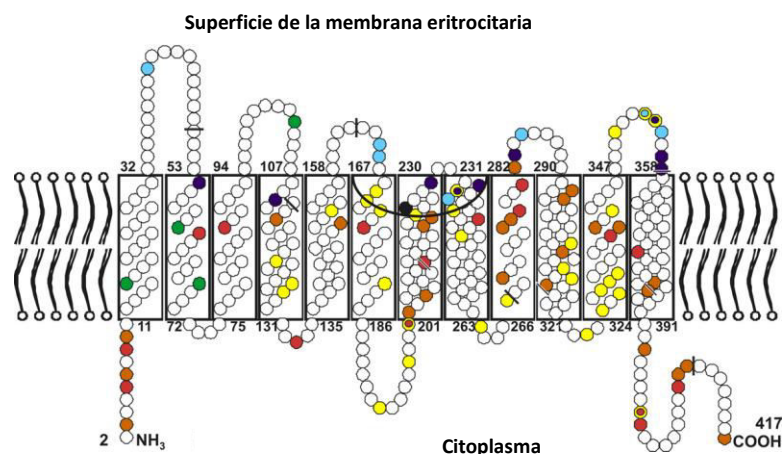


Figura 6. Modelo para las proteínas Rh en la membrana del GR. Las sustituciones aminoacídicas que distinguen las proteínas RhD y RhCE se representan en círculos amarillos. Los 4 AAs que codifican el antígeno C se señalan en verde, mientras que el círculo negro corresponde al único AA que codifica para el antígeno E. En azul simbolizan cambios puntuales que dan origen a fenotipos D parcial y en rojo los correspondientes a fenotipos D débil. Obtenida de Flegel W. *Transfusion and Apheresis Science*, 2011; 44: 81-91 (8).

2.6. Fenotipos D

2.6.1. Fenotipo D positivo

Los GRs de la mayoría de los individuos con fenotipos D positivo poseen una proteína RhD normal, codificada por el alelo *RHD* normal. Esta proteína expresa todos los epitopes del antígeno D y presenta fuertes patrones de aglutinación frente a diferentes reactivos anti-D (76).

2.6.2. Fenotipo D variante

El fenotipo D variante se caracteriza por presentar una expresión alterada del antígeno D en la membrana eritrocitaria. Existen variaciones cualitativas y cuantitativas de la expresión de este antígeno en la membrana del GR. Los individuos portadores de variantes cualitativas son susceptibles de desarrollar una aloinmunización hacia los epitopes ausentes del antígeno D cuando son expuestos a GRs D positivo mientras que los portadores de variantes cuantitativas no se encuentran en riesgo de aloinmunización. Debido a que la discriminación serológica de estas variantes tiene límites confusos y depende principalmente de la sensibilidad y avidéz de los reactivos utilizados, se los agrupa bajo la denominación “variantes D” (Dvar). Los estudios de biología molecular han sido fundamentales para el conocimiento de la complejidad genética responsable de la generación de las distintas variantes D (76). Se estima que entre el 1% y 2% de los individuos caucásicos son portadores de alelos *RHD* que codifican para un fenotipo D variante. Esta incidencia es superior en poblaciones africanas (77).

Teniendo en cuenta el concepto de epitopes D desarrollado a partir de la producción de mAb en la década de 1980, se establecieron diferencias entre las variantes que tenían una expresión anómala del antígeno D (76).

Las variantes cualitativas, denominadas D parcial, se caracterizan por la ausencia de uno o más epitopes del antígeno D. Los portadores de este fenotipo son capaces de generar aloanticuerpos anti-D específicos hacia los epitopes ausentes en la membrana eritrocitaria luego de una exposición a GRs D positivo (76, 78, 79). Inicialmente, los estudios serológicos permitieron la clasificación de los antígenos D parcial en varias categorías (D^I a D^{VII}, actualmente no existe la categoría D^I) y a su vez algunos fueron subdivididos en base a diferencias en la intensidad de la hemaglutinación (80). Estudios posteriores con mAb y análisis de secuenciación de los genes que codifican para estas variantes permitieron identificar una gran variedad de fenotipos D parcial.

Los estudios serológicos con reactivos anti-D monoclonales de GRs portadores de fenotipos D parcial muestran patrones de aglutinación con diferente fuerza de reactividad. Algunos de estos fenotipos presentan reacciones de aglutinación similares a los GRs D positivo (Ej: DIIIa), mientras que otros generan patrones de aglutinación con menor (Ej: DVI) o incluso mayor (Ej: DIVa) fuerza de reactividad que los GRs D positivo normal (76, 81, 82). Dentro de las variantes D con fenotipo D parcial, el de mayor importancia clínica es el fenotipo DVI. Se presenta con una incidencia del 0,02% en ingleses y estadounidenses, 0,03% en australianos y 0,05% en holandeses (83, 84). A nivel molecular, el fenotipo DVI es producto de alelos híbridos. Los GRs portadores de esta variante carecen de la mayoría de los epitopes D (epD1, 2, 5-8, según el modelo de los 9 epitopes), entre ellos el epD6/7, el cual se caracteriza por ser altamente inmunogénico (85-87).

Por otro lado, las variantes cuantitativas del antígeno D, denominadas D débil, expresan un número menor de sitios antigénicos por eritrocito (<5000) comparado a un fenotipo D positivo normal (8, 76, 88). Generalmente, los GRs con este fenotipo presentan una reacción de aglutinación débil con mAb anti-D de clase IgM en medio salino. La caracterización molecular de los distintos alelos permitió clasificar a los mismos en diferentes “tipos” según la mutación responsable de la expresión disminuida del antígeno D (89). En la actualidad se han descrito 99 alelos responsables del fenotipo D débil, algunos de los cuales se dividen, a su vez, en varios subtipos. Estos tipos de D débil no pueden distinguirse serológicamente, a pesar de estar asociados a diferentes grados de debilidad (76). Las variantes alélicas *D débil tipo 1, 2 y 3*

representan los fenotipos más frecuentes en poblaciones europeas, superando en conjunto el 95% de todos los D débiles. Se ha reportado que individuos portadores de las estas variantes alélicas no son susceptibles de aloinmunización anti-D ante un desafío con GRs D positivo (8, 76). En la raza negra africana, el *D débil tipo 4.2.0*, también conocido como *DAR*, se detecta con una frecuencia muy superior a la encontrada en raza caucásica europea (90, 91).

2.6.2.1. Bases moleculares de las variantes D

Desde la clonación del gen *RHD* y la elucidación de las bases moleculares para el polimorfismo del antígeno D, es posible predecir el fenotipo D a partir de estudios a nivel del ADN genómico. En la actualidad se han reportado más de 250 alelos responsables de variantes D identificados por análisis de genética molecular (92).

Existen dos tipos de mecanismos moleculares responsables de las variantes D:

- ✓ Cambios en uno o unos pocos nucleótidos en el gen *RHD*, dando como resultado sustituciones de AAs en la proteína RhD.
- ✓ Conversión génica, generando genes híbridos donde un segmento del gen *RHD* se sustituye por el mismo segmento correspondiente al gen *RHCE*. La sección recombinada puede consistir en una parte de un exón, todo un exón, o varios exones de *RHCE*.

Los eventos moleculares que conducen al fenotipo D parcial comprenden intercambios de segmentos de ADN entre los genes *RHD* y *RHCE* que originan alelos híbridos *RHD-CE-D*, intercambios múltiples de nucleótidos que no involucran grandes fragmentos de ADN y mutaciones de cambio de sentido. Estos eventos genéticos producen no solamente la pérdida o sustitución de aminoácidos localizados en dominios extracelulares de la proteína RhD, modificando la estructura tridimensional del antígeno D y por lo tanto, algunos epitopes antigénicos, sino también la formación de nuevos epitopes (11, 84, 86, 93). La identificación de portadores de fenotipos D parcial es de fundamental importancia en el campo de la medicina transfusional debido a que algunos pacientes son susceptibles de desarrollar aloanticuerpos anti-D al ser expuestos a GRs D positivo normales.

Muchos individuos tipificados como D variante expresan un fenotipo D parcial, siendo la categoría DVI la más frecuente. A nivel molecular, el fenotipo DVI se caracteriza por la presencia de genes híbridos en los cuales los exones 4-5, 4-5-6, 3-4-5-6 o 3-4-5 del gen *RHD* fueron reemplazados por los exones homólogos del gen *RHCE* dando origen a los fenotipos DVI tipo 1,

DVI tipo 2, DVI tipo 3 y DVI tipo 4, respectivamente (84, 86, 87). En la Tabla II se muestran algunos ejemplos de fenotipos D parcial indicando el polimorfismo en el gen *RHD* que los originan (84, 86, 87, 93-95).

Tabla II. Bases moleculares de algunos fenotipos D parcial

Fenotipo	Polimorfismo	Alelo	Exones involucrados	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
DIV tipo 5	Conversión génica	<i>RHD</i> *DVI tipo 5	7, 8, 9	
DVI tipo 1	Conversión génica	<i>RHD</i> *DVI tipo 1	4, 5	
DVI tipo 2	Conversión génica	<i>RHD</i> *DVI tipo 2	4, 5, 6	
DVI tipo 3	Conversión génica	<i>RHD</i> *DVI tipo 3	3, 4, 5, 6	
DVI tipo 4	Conversión génica	<i>RHD</i> *DVI tipo 4	3, 4, 5	
DVII	Mutación puntual de cambio de sentido	<i>RHD</i> *DVII	2	
DFR	Conversión génica	<i>RHD</i> *DFR	4	

Los rectángulos color gris representan exones del gen *RHCE* y los lilas exones del gen *RHD*. La línea roja señala un SNP.

Flegel *y col.* propusieron que los alelos *D débil* poseen mutaciones puntuales en algunos exones responsables de sustituciones de aminoácidos en los dominios intracelulares o transmembranales de la proteína RhD. Estos cambios aminoacídicos modificarían la estructura secundaria y terciaria del polipéptido RhD o alterarían su integración a la membrana eritrocitaria, al afectar la unión a los residuos de ácido palmítico acetilados o al alterar la interacción con la glicoproteína RhAG. El resultado de estas modificaciones se traduciría en una disminución en la expresión de los epitopes D en la membrana celular de los GRs reduciendo la afinidad de los anticuerpos específicos. Estos hallazgos han permitido establecer una clasificación molecular del fenotipo D débil basada en la mutación responsable de la expresión disminuida del antígeno D (13, 78, 89, 96, 97). En la Tabla III se detallan las mutaciones puntales de los cuatro fenotipos D débil más frecuentes y su localización en la membrana eritrocitaria.

Tabla III. Fenotipos D débil más frecuentes

Fenotipo	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Exón RHD	Localización
D débil tipo 1	<i>c.809 T>G</i>	<i>p.Val270Gly</i>	6	Transmembrana
D débil tipo 2	<i>c.1154 G>C</i>	<i>p.Gly385Ala</i>	9	Transmembrana
D débil tipo 3	<i>c.8 C>G</i>	<i>p.Ser3Cys</i>	1	Intracelular
D débil tipo 4.2.0	<i>c.602 C>G</i>	<i>p.Thr201Arg</i>	4	Intracelular
	<i>c.667 T>G</i>	<i>p.Phe223Val</i>	5	Transmembrana
	<i>c.1025 T>C</i>	<i>p.Ile342Thr</i>	7	Transmembrana

Generalmente, los alelos *D débil tipo 1* y *tipo 3* están asociados a la expresión del antígeno C mientras que el alelo *D débil tipo 2* al antígeno E. Por otro lado, el alelo *D débil tipo 4* se encuentra asociado a un fenotipo ccee, al igual que algunos alelos *D débil tipo 1* (98).

Un fenotipo D débil puede producirse también en presencia de un alelo *RHD* normal, es decir, no a causa de una mutación en su secuencia nucleotídica. En estos casos, la disminución de la expresión del antígeno D es debida a un efecto de posición. Este efecto hace referencia a las modificaciones en la expresión de un determinado antígeno que puede provocar la presencia de un alelo que codifica para otro antígeno sólo cuando se encuentra en determinada posición (*cis* o *trans*) con respecto al primero. El efecto posición puede observarse en la expresión del antígeno D. Cuando un haplotipo *dCe* (*r'*) se encuentra en *trans* en relación con un haplotipo que codifica para el antígeno D (por ejemplo el genotipo *DcE/dCe* ó *Dce/dCe*), la expresión de D se reduce de manera notable dando como resultado un fenotipo con expresión débil del antígeno D. Cuando se hereda el mismo haplotipo que codifica D, ya sea con *dce* o *dcE* (por ejemplo los genotipos *DCe/dce*, *DCe/dcE*, *Dce/dce*, etc), la expresión del antígeno D es normal. La observación más frecuente de este efecto de posición sobre el gen *RHD* ocurre en individuos portadores del genotipo R_0r' aunque eventualmente también se ha descrito en R_2r' y R_1r' (1, 77).

2.6.2.2. Definiciones de fenotipo D débil y D parcial

Los términos D débil y D parcial frecuentemente se han utilizado para establecer una conducta transfusional u obstétrica adecuada. Estos términos, sin embargo, no han sido definidos de forma apropiada y, muchas veces, resultan ambiguos. Se han elaborado tres definiciones, pero ninguna es satisfactoria (76):

- ✓ *Los GRs con fenotipo D débil expresan todos los epitopes D, los GRs con fenotipo D parcial carecen de uno o más epitopes D. Esta clasificación es difícil de definir serológicamente, debido a que una reacción negativa con un mAb anti-D particular o un método específico utilizado podría resultar de la expresión débil de un epitope en lugar de su ausencia. Los GRs con fenotipo DIIIa aparentan tener todos los epitopes del antígeno D, sin embargo, individuos portadores de este fenotipo frecuentemente producen aloanticuerpos anti-D y por lo tanto, sus GRs carecerían al menos de un epitope D.*
- ✓ *Los individuos portadores de fenotipos D parcial pueden producir aloanticuerpos anti-D, mientras que los que poseen GRs con fenotipo D débil no producen anti-D. Esta es la interpretación usual de esta división de fenotipos, sin embargo depende de una respuesta inmune. Si no se ha identificado la presencia de anti-D en personas portadoras de una variante D particular, no significa que otro individuo portador de la misma variante no desarrolle una aloinmunización anti-D luego de un desafío con GRs D positivo. Por ejemplo, los fenotipos D débil tipo 4.2 y tipo 15 han sido clasificados como D débil, sin embargo, se han identificado numerosos pacientes portadores de estos fenotipos que han sufrido aloinmunización anti-D (76, 99).*
- ✓ *Las proteínas RhD presentes en los GRs con fenotipo D parcial poseen sustituciones de AAs localizadas en los dominios extracelulares, mientras que las proteínas RhD en GRs con fenotipo D débil poseen sustituciones aminoacídicas en los dominios transmembranales o citosólicos (76, 97, 99). Un error importante en esta definición es que no se conocen con exactitud las ubicaciones de los residuos aminoacídicos de la proteína RhD dentro de la membrana del GR. Distintos modelos predicen diferentes ubicaciones para ciertos AAs. Por otro lado, esta definición no es aplicable a la práctica transfusional, ya que la genotipificación RHD no se realiza en forma rutinaria en los hospitales o incluso en laboratorios de referencia (76).*

La clasificación en fenotipos D débil y D parcial es por lo tanto inexacta y la terminología utilizada para describir estas variantes es confusa. Por este motivo los términos D débil y D parcial deberían ser reemplazados con un solo nombre colectivo como variantes D ó fenotipo D variante (76).

2.6.3. Fenotipo DEL

Las variantes DEL se caracterizan por presentar una expresión mínima del antígeno D en la membrana eritrocitaria. Se ha reportado que el número de epitopes D que expresan los GRs portadores de un fenotipo DEL varía entre 20 y 40 sitios antigénicos por célula (100). Debido a la escasa densidad antigénica, donantes portadores de este fenotipo son tipificados erróneamente como D negativo mediante los métodos inmunohematológicos utilizados en los estudios de rutina (101). Solo una pequeña cantidad de anti-D puede ser recuperada de GRs DEL utilizando pruebas especializadas de adsorción-elución. Por lo tanto, los receptores D negativo corren el riesgo de desarrollar una aloinmunización anti-D si son transfundidos con unidades DEL (102-104).

El fenotipo DEL es muy frecuente en poblaciones asiáticas, con una prevalencia de aproximadamente 30% en donantes con fenotipo D negativo, mientras que se expresa excepcionalmente en caucásicos (0,1%) (101, 105, 106).

Las bases moleculares que dan origen a los fenotipos DEL han sido ampliamente estudiadas, principalmente en poblaciones asiáticas. La identificación de los polimorfismos responsables de la generación de estas variantes es de fundamental importancia para la medicina transfusional, debido a la capacidad que presentan estos fenotipos de inducir una respuesta aloinmune en individuos D negativo (107). Estudios moleculares han revelado que los fenotipos DEL derivan de diferentes arreglos genéticos como mutaciones puntuales de cambio de sentido, cambios en los sitios de corte y empalme del ARNm, inserciones y deleciones de nucleótidos en la secuencia codificante del gen *RHD* (29, 107, 108).

El fenotipo DEL está fuertemente asociado a la expresión concomitante del antígeno C o E, es decir suele detectarse, generalmente, en individuos tipificados por los métodos de rutina como *r'r* o *r''r* (77). En poblaciones asiáticas el alelo *RHD(1227G>A)* es el responsable de más del 95% de los portadores de un fenotipo DEL. Este cambio nucleotídico se encuentra en el exón 9 del gen *RHD* y genera la mutación silente *p.K409K* (107, 108-110). El polimorfismo está localizado en el sitio de corte y empalme ubicado en el límite exón 9-intrón 9, generando un transcrito de ARNm que carece del exón 9. La forma completa del transcrito, si ocurriese, representaría una mínima proporción para la traducción de un polipéptido D normal. Se considera que este polimorfismo puede ser utilizado como marcador genético de raza asiática (109). Por otra parte, los alelos *RHD(IVS3+1g>a)* y *RHD*M295I* sólo han sido identificados en poblaciones caucásicas, siendo este último el alelo *DEL* más frecuentemente hallado (1:6493) (29, 111).

2.6.4. Fenotipo D negativo

El fenotipo D negativo en individuos de raza caucásica muestra una prevalencia aproximada del 15%, en negros africanos del 3-5%, y en asiáticos y amerindios es menor al 0.1% (77). En la mayoría de los casos, este fenotipo es causado por la delección de ambos alelos del gen *RHD* y se encuentra frecuentemente formando parte de un haplotipo junto con el alelo *RHCE*ce* (10, 27, 29, 35).

Sin embargo, se ha reportado que existen numerosas variantes alélicas responsables de fenotipos D negativo que dan origen a proteínas RhD que no expresan los epitopes del antígeno D o no se ensamblan en la membrana eritrocitaria. Estos individuos fenotípicamente D negativo son portadores de alelos *RHD* nullos, también denominados alelos silentes (29, 112-114).

Se han descrito dos tipos de alelos nullos, cuya prevalencia difiere en los distintos grupos étnicos:

- ✓ **Alelos nullos portadores de mutaciones inactivadoras, que producen un codón de terminación prematuro y originan proteínas RhD truncas que no se expresan en la membrana eritrocitaria.** En la etnia africana el alelo característico es la variante pseudogen (*RHDψ*) la cual presenta un codón de finalización prematuro de la traducción (115). Por otro lado, se ha reportado al alelo nulo *RHD(361_371del11)*, característico de la población caucásica. Esta variante alélica presenta una delección de 11 nucleótidos en el exón 3 del gen *RHD* que altera el marco de lectura originando también un codón de terminación prematuro (116).
- ✓ **Alelos nullos con estructuras moleculares híbridas *RHD-RHCE* que codifican proteínas quiméricas que se integran en la membrana del GR pero no expresan epitopes D.** El alelo *RHD-CE-D^s*, característico de la etnia africana, posee un segmento *RHCE* específico en la región comprendida entre los exones 3 y 7 de un alelo *RHD*. Si bien esta proteína quimérica no expresa epitopes D, se caracteriza por una expresión débil y parcial del antígeno C (117). En la población caucásica el alelo *RHD-CE(3-9)-D* es la estructura híbrida más frecuentemente encontrada entre los alelos nullos (29).

2.6.4.1. Alelo pseudogen: *RHDψ*

Es un alelo característico de individuos de la etnia africana, donde el fenotipo D negativo es originado por un gen *RHD* inactivo. Se observó que en los africanos nativos identificados serológicamente como D negativo, el 66% es portador del alelo pseudogen (115).

Estudios moleculares realizados en muestras de sangre entera de individuos portadores del alelo *RHDψ*, revelaron que no se genera un transcrito a partir del mismo, probablemente por degradación del ARNm aberrante. El alelo *RHDψ* presenta un desequilibrio de ligamiento, donde el haplotipo más común en individuos africanos D negativo es *RHDψ* con el alelo *RHCE*ce*, es decir *RHDψ-RHCE*ce* (29, 115, 118).

La secuenciación de este alelo *RHD* inactivo reveló una inserción de 37 pb en la región intrón 3–exón 4 responsable del corrimiento en el marco de lectura y de la generación de un codón de terminación de la traducción en el exón 4. Esta inserción es una duplicación de una secuencia que comprende los extremos 3' del intrón 3 y 5' del exón 4 del gen *RHD*. Además se encontraron mutaciones puntuales de cambio de sentido en los exones 4 (*c.609G>A*), 5 (*c.654G>C*, *c.667T>G*, *c.674C>T*) y 6 (*c.807T>G*) (115, 118).

En la Figura 7 se representa la estructura molecular del alelo *RHDψ*.

Alelo *RHDψ*

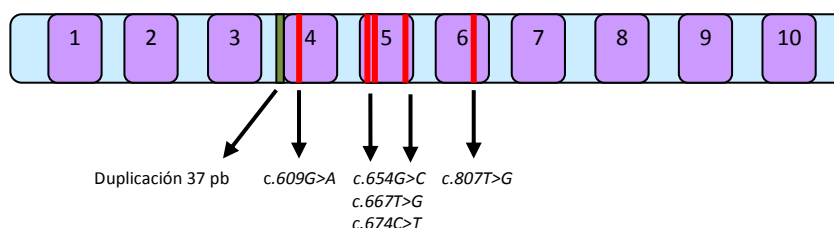


Figura 7. Representación de la estructura del alelo *RHDψ*. En lila se indican los exones del gen *RHD*. La línea verde señala la inserción de 37 pb en el extremo 3' del intrón 3 y 5' del exón 4. Las líneas rojas indican las mutaciones de cambio de sentido en los diferentes exones reportadas para esta variante alélica.

2.6.4.2. Alelo *RHD-CE-D^s*

El haplotipo *d(C)ce^s*, originalmente denominado *r^s*, fue descrito por primera vez a nivel molecular por Faas y *col* en 1996 (119). Este haplotipo se encuentra principalmente en poblaciones negras y contiene dos alelos alterados: un alelo híbrido *RHD-CE-D^s* segregado junto con el alelo *RHCE*ce^s*. El haplotipo *r^s* está asociado a la expresión de un antígeno C débil (117, 120).

Estudios moleculares demostraron que la variante alélica *RHD-CE-D^s* puede exhibir dos estructuras moleculares distintas denominadas “*RHD-CE-D^s* tipo 1” y “*RHD-CE-D^s* tipo 2”. La variante tipo 1 está constituida por los exones 1, 2, parte del 3, 8, 9 y 10 pertenecientes al gen *RHD*, y el fragmento restante del exón 3 y los exones del 4 al 7 del gen *RHCE*. El alelo híbrido

RHD-CE-D^s tipo 2 está compuesto por los exones 1 al 3 y los exones 8 al 10 provenientes del gen *RHD*. Los exones 4 al 7 corresponden al gen *RHCE*. Ambos alelos híbridos poseen las sustituciones nucleotídicas *c.733C>G* y *c.1006G>T* y segregan junto con un alelo *RHCE*ce^s* (1, 121, 122). En la Figura 8 se representa la estructura molecular del alelo *RHD-CE-D^s* tipo 1.

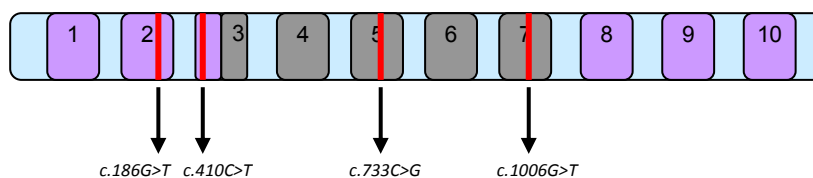


Figura 8. Estructura molecular del alelo *RHD-CE-D^s* tipo 1. En lila se indican los exones provenientes del gen *RHD*, mientras que en gris se señalan los provenientes del gen *RHCE*. Las líneas verticales rojas indican los SNPs característicos de esta variante.

2.7. Aspectos Clínicos del sistema Rh

2.7.1. Importancia clínica de la genotipificación *RH*

El antígeno D es el más inmunogénico de la membrana eritrocitaria (76). La capacidad del polipéptido RhD para estimular el desarrollo de una respuesta inmune puede explicarse sólo parcialmente por el conocimiento de las estructuras primarias de las proteínas Rh. Los polipéptidos codificados por los alelos *RHCE*Ce*, *RHCE*cE*, *RHCE*ce* y *RHCE*CE* del gen *RHCE* tienen gran homología y difieren en 5 aminoácidos como máximo. El polipéptido RhD se diferencia de los anteriores en aproximadamente 32-36 aminoácidos dependiendo del alelo del gen *RHCE* considerado. Si un individuo D positivo C+ c- es transfundido con sangre D+ c+ ó una persona D positivo E+ e- es transfundida con GRs D+ e+, el sistema inmunológico reconoce una proteína que se diferencia de la propia en pocos aminoácidos. En cambio, cuando un individuo D negativo es transfundido con sangre D positivo, la respuesta inmune se produce a una proteína totalmente desconocida que difiere en por lo menos 32 aminoácidos de la presente en el huésped (RhCE) (10, 11, 68, 123).

Debido a la elevada inmunogenicidad que presentan los antígenos del sistema Rh, principalmente el antígeno D, desempeñan un papel central en las reacciones hemolíticas transfusionales, en la inmunización de pacientes politransfundidos, en la patogénesis de la EHFN y en algunas AHAI (68, 124-127). El antígeno D estimula la formación de anti-D en el 80% de las personas D negativo que son transfundidas con sangre D positivo (128, 129).

La Ley Nacional de Sangre N° 22.990, establece la obligatoriedad de la determinación serológica del antígeno D y del fenotipo Rh cuando corresponda, en dadores y receptores de

sangre. Sin embargo, estas pruebas inmunohematológicas no permiten investigar las variantes alélicas del sistema Rh de importancia en la compatibilidad transfusional. La identificación de alelos que originan fenotipos con expresión aberrante de la proteína RhD optimizará la selección de unidades hemocompatibles. El gran número de variantes fenotípicas descritas y la elevada variabilidad en los patrones de reactividad que éstas presentan con los antisueros monoclonales restringen la aplicación de métodos serológicos para su correcta determinación. Además, la caracterización del fenotipo Rh en pacientes recientemente transfundidos presenta serias limitaciones debido a que las reacciones de hemaglutinación detectan antígenos presentes tanto en los GRs del dador como del receptor. La dificultad para asignar el fenotipo Rh impide también una correcta identificación de los posibles aloanticuerpos en pacientes politransfundidos (130-132). Por otro lado, los autoanticuerpos que recubren los GRs de pacientes con AHAI dificultan la detección de los antígenos Rh. Además, los antisueros con alto contenido proteico pueden inducir una aglutinación espontánea de los eritrocitos sensibilizados, siendo necesario disociar el autoanticuerpo sin dañar la integridad de la membrana ni modificar la expresión de los antígenos. En la mayoría de los casos se obtienen resultados incorrectos porque la afinidad del autoanticuerpo es elevada y la elución resulta incompleta (133-138). La discriminación serológica de estos fenotipos depende actualmente de la sensibilidad y disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos. Por lo tanto, la utilización de técnicas de biología molecular, como estrategias de PCR SSP, PCR RFLP y secuenciación, resulta un recurso apropiado para tipificar un gran número de antígenos y resolver polimorfismos con gran precisión en casos donde la caracterización inmunohematológica de los GRs no es concluyente (108, 114, 139).

Debido a que el sistema Rh presenta una elevada variabilidad genética interpoblacional (140), es de fundamental importancia establecer el polimorfismo molecular del locus *RH* en individuos de nuestro país con miras a implementar un abordaje inmunohematológico basado en estudios moleculares. La población argentina actual es el resultado del aporte de diferentes etnias que comenzó en el siglo XVI entre los conquistadores españoles, los pueblos originarios y africanos traídos como esclavos. A comienzos del siglo XX la población en crecimiento recibió el aporte de la inmigración masiva de europeos, principalmente españoles e italianos, y posteriormente de inmigrantes de países limítrofes (141, 142). Este complejo proceso de mestizaje ha dejado una impronta en la composición genética de la población argentina que es desconocida en muchos aspectos. Por lo tanto, el conocimiento de la variabilidad alélica que subyace en el locus *RHD* en individuos de nuestra población sentará las bases para el desarrollo

de herramientas de tipificación molecular que permitirán implementar mejoras en el campo de la medicina transfusional y obstétrica.

2.7.2 Diagnóstico prenatal de la EHFN

La EHFN es un desorden causado por anticuerpos maternos, presentes en la circulación fetal a través de un transporte activo transplacentario, dirigidos frecuentemente contra el antígeno D del sistema Rh. Estos anticuerpos se forman en respuesta a una aloinmunización provocada por la presencia de eritrocitos incompatibles en la circulación materna, causada frecuentemente por embarazos y transfusiones previas. La incidencia de la aloinmunización por antígeno D ha disminuido, en gran medida, debido al uso prenatal de la profilaxis con inmunoglobulina anti-D en todas las mujeres embarazadas con fenotipo D negativo y por su administración posparto luego del nacimiento de un hijo D positivo. Sin embargo, esta enfermedad aún persiste como una causa importante de morbimortalidad fetoneonatal (143, 144).

La caracterización de la variabilidad alélica del sistema Rh ha permitido desarrollar técnicas de biología molecular útiles para la identificación de fetos en riesgo de EHFN en embarazadas sensibilizadas con aloanticuerpos anti-D. Los fetos D positivo estarían afectados por la EHFN, mientras que los fetos D negativo no padecerían esta patología. Mediante estrategias moleculares se logró analizar la presencia del gen *RHD* en el ADN genómico obtenido de amniocitos y células trofoblásticas (145, 146, 147). Sin embargo, procedimientos como la amniocentesis y la toma de muestra de vellosidades coriónicas para la obtención de ADN fetal presentan objeciones debido al riesgo que implican para el embarazo (10, 145, 148).

A partir de 1996, investigadores comenzaron a realizar la genotipificación *RHD* prenatal utilizando células fetales obtenidas de la circulación materna, evitando así los riesgos asociados a los procedimientos invasivos (149). El principal problema de esta metodología es la utilización de técnicas laboriosas y costosas. Además, se ha observado que las células fetales pueden permanecer en la circulación materna hasta por 10 años o más, interfiriendo en el análisis prenatal de mujeres multíparas (150).

La perspectiva cambió cuando en 1997, Lo y *col* demostraron la presencia de ADN fetal libre circulante en el plasma de mujeres embarazadas (151). Este hallazgo provee una nueva posibilidad para la determinación prenatal del estado *RHD* fetal en muestras obtenidas por procedimientos no invasivos. Se ha demostrado una elevada proporción de ADN fetal,

aproximadamente 3% del ADN libre total, en el plasma de mujeres durante el segundo trimestre de gestación. Este ADN fetal es depurado rápidamente del plasma materno luego del nacimiento permitiendo su análisis en mujeres multíparas (152). La genotipificación *RHD* fetal no invasiva resulta una metodología útil para establecer en etapas tempranas del embarazo el riesgo real de EHFN. Sin embargo, debido a la gran heterogeneidad molecular del sistema Rh, es fundamental conocer las principales variantes *RHD* en la población a estudiar para diseñar estrategias de genotipificación que disminuyan la posibilidad de resultados falsos positivos y falsos negativos para un manejo adecuado del embarazo. La determinación prenatal del antígeno D evitaría la utilización de métodos diagnósticos invasivos y estrategias terapéuticas expansivas y costosas, como el tratamiento con gammaglobulina hiperinmune en embarazadas sensibilizadas cuando el feto es D negativo (153-157).

3. Sistema Diego

3.1 Historia del grupo sanguíneo Diego

El grupo sanguíneo Diego (ISBT- 010 – DI) (7) fue el primer marcador genético en relacionar a las poblaciones amerindias con las siberianas (158, 159). Este sistema fue descubierto en 1953 cuando Larysse y *col* estudiaron el suero de un recién nacido aparentemente normal. Los estudios realizados en el neonato demostraron una anemia hemolítica severa debido a una inmunización causada por un anticuerpo irregular. Muestras de sangre de la madre y del infante, Rh compatibles, fueron enviadas a Levine para ser analizadas. Los GRs del neonato se encontraban coagulados cuando llegaron al laboratorio del investigador pero no se detectaron anticuerpos en el suero materno al ser analizado utilizando un extenso panel de células. Debido a que las incompatibilidades por ABO y Rh se encontraban excluidas, se sospechó de un factor sanguíneo de “baja incidencia” con su correspondiente anticuerpo. Luego, Levine enfrentó los GRs paternos con el suero materno y observó la presencia de un fuerte aglutinado. El anticuerpo descubierto junto al correspondiente antígeno fueron designados Factor Sanguíneo Diego: Di^a y anti-Di^a (160).

Luego de su descubrimiento, el suero anti-Diego fue utilizado alrededor del mundo para identificar individuos cuyos GRs aglutinaran en presencia del Factor Diego (Di^a). Los resultados mostraron que el Di^a se encuentra sólo en poblaciones asiáticas de Mongolia y en América del Sur. Está totalmente ausente en poblaciones africanas y Europeas, siendo algunas poblaciones amerindias las que presentan la mayor frecuencia mundial de este antígeno (161, 162). Se ha

reportado que la prevalencia del antígeno Di^a en aborígenes sudamericanos es del 36%. La alta frecuencia de este antígeno en ciertas poblaciones destaca su importancia en el campo de la medicina transfusional, debido a su participación en la generación de reacciones hemolíticas transfusionales, como la AHAI y la EHFN (163, 164).

3.2. Estructura molecular y proteica del grupo sanguíneo Diego

Las determinantes antigénicas del grupo sanguíneo Diego se expresan en la glicoproteína de membrana eritrocitaria Banda 3. Esta proteína está codificada por el gen *SLC4A1* (del inglés Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger Member 1) y se encuentra en el cromosoma 17 (ubicación 17q21-q22) (165). El sistema de grupo sanguíneo Diego está compuesto por 22 antígenos: 3 pares de antígenos antitéticos (Di^a y Di^b , Wr^a y Wr^b , W^u y DISK) y 16 antígenos de baja frecuencia (7, 165).

Los análisis de secuenciación de los alelos DI^*A y DI^*B mostraron que estas variantes son el resultado de la mutación puntual de cambio de sentido *c.2561C>T* responsable de la sustitución aminoacídica *p.Leu854Pro* (166, 167). El alelo DI^*A tiene una T en la posición 2561 del gen *SLC4A1* mientras que el alelo DI^*B tiene una C.

El conocimiento de las bases genéticas del sistema Diego ha permitido el desarrollo de estrategias de biología molecular para inferir el fenotipo a través del estudio del genotipo. Estas estrategias han sido ampliamente utilizadas para analizar movimientos migratorios y el aporte de algunas etnias amerindias con ascendencia asiática al acervo genético de diferentes poblaciones (160).

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue investigar el polimorfismo molecular del locus *RH* en nuestra población para aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos responsables de los diferentes fenotipos.

Los objetivos específicos fueron:

- ✓ Caracterizar los eventos genéticos que originan el fenotipo D negativo.
- ✓ Investigar las bases moleculares responsables de fenotipos con expresión débil del antígeno D.
- ✓ Diseñar y evaluar un protocolo de genotipificación *RHD* prenatal no invasivo para identificar fetos en riesgo de Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudio del fenotipo y genotipo *RH* en muestras con fenotipo D negativo y D variante

1.1 Muestras

Se estudiaron 1120 muestras de sangre periférica de donantes voluntarios sanos, provenientes de los siguientes bancos de sangre y efectores de salud de nuestro país: Banco Central de Sangre SIPROSA-Tucumán; Banco de Sangre-Instituto de Hematología y Hemoterapia-Córdoba; diferentes centros de hemoterapia de la ciudad de Rosario; Instituto de Hemoterapia de la Provincia de Buenos Aires-La Plata y Centro Regional de Hemoterapia Hospital Garrahan (CABA). Las muestras fueron derivadas al Laboratorio de Inmunohematología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario para su caracterización molecular. Los criterios de inclusión para la selección de las muestras fueron los siguientes:

- Muestras D negativas portadoras de los antígenos C y/o E (D negativo C/E positivo).
- Muestras con expresión débil del antígeno D (Dvar).

Las muestras analizadas en nuestro laboratorio fueron las siguientes:

- 796 muestras con fenotipo D negativo portadoras de los antígenos C y/o E:
 - ◆ 304 provenientes de Tucumán
 - ◆ 105 provenientes de Córdoba
 - ◆ 123 provenientes de Rosario
 - ◆ 109 provenientes de La Plata
 - ◆ 155 provenientes de CABA
- 324 muestras con fenotipo D variante:
 - ◆ 98 provenientes de Tucumán
 - ◆ 37 provenientes de Córdoba
 - ◆ 99 provenientes de Rosario
 - ◆ 41 provenientes de La Plata
 - ◆ 49 provenientes de CABA

Además, se estudiaron 221 muestras con fenotipo dccee derivadas de Tucumán y 1200 de Rosario.

Todas las muestras fueron recolectadas por punción venosa en tubos estériles conteniendo EDTA al 5% como anticoagulante y conservadas a 4°C.

Las extracciones se realizaron con el consentimiento previo de los donantes y todos los procedimientos fueron efectuados respetando las normas establecidas en la convención de Helsinki, previa aprobación de los protocolos de trabajo por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

1.2 Estudios serológicos

1.2.1 Determinación del antígeno D

1.2.1.1. Prueba directa en tubo

La determinación del fenotipo D se realizó mediante técnicas de hemaglutinación en tubos de Kahn utilizando un reactivo anti-D blend, mezcla de anticuerpos monoclonales IgG e IgM pertenecientes a los clones TH-28 (secretor de IgM, dirigido hacia los epitopes 6/7 de la proteína RhD) y MS-26 (secretor de IgG, dirigido hacia el epitope 9 de la proteína RhD). Además, las muestras fueron estudiadas utilizando antisueros anti-D monoclonales IgM clones MS-201, RUM-1 (dirigidos contra los epitopes 6/7) y LDM1+ESD1M (dirigidos contra los epitopes 6/7 y 9,

respectivamente). Se enfrentaron volúmenes iguales del reactivo con una suspensión de GRs a tipificar, preparada al 5% V/V en solución salina isotónica (NaCl 7,9 g/dl) a temperatura ambiente (TA). Los tubos se centrifugaron durante 1 minuto a 1000 rpm. Las muestras fueron clasificadas como D negativo cuando no se observó aglutinación y D variante cuando la aglutinación observada fue inferior a la obtenida para un fenotipo D positivo normal (68).

1.2.1.2 Prueba de la antiglobulina indirecta (PAI)

Las muestras se estudiaron mediante la PAI utilizando el antisuero anti-D blend citado en el ítem 1.2.1.1. Los tubos de reacción, con volúmenes iguales de GRs y reactivo anti-D, se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con solución salina isotónica. Luego, se adicionó el mismo volumen de antiglobulina humana poliespecífica (Reactivo de Coombs) y se centrifugaron durante 1 minuto a 1000 rpm. Se realizó la lectura macroscópica de aglutinación (68).

1.2.1.3. Prueba de la antiglobulina directa (PAD)

Las muestras con resultados positivos para la PAI se analizaron a través de la PAD para descartar la presencia de anticuerpos unidos *in vivo* a la membrana del GR. Una alícuota de la muestra de sangre entera fue lavada 3 veces con solución salina isotónica y se preparó una suspensión al 5% V/V. Posteriormente, se enfrentaron volúmenes iguales de dicha suspensión con antiglobulina humana poliespecífica en tubos de Kahn y se centrifugaron durante 1 minuto a 1000 rpm. Luego se realizó la lectura macroscópica de aglutinación (68).

1.2.1.4. Técnica de adsorción-elución

1.2.1.4.1 Adsorción

Se incubaron volúmenes iguales (1,5 ml) de una suspensión de GRs al 95% de las muestras a estudiar, previamente lavados 3 veces con solución salina isotónica, con un anti-D policlonal obtenido de la seroteca del laboratorio (título 1024) durante 30 minutos a 37°C. Los tubos de reacción se centrifugaron 5 minutos a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante y se recuperó el paquete de eritrocitos. Se realizaron 6 lavados con solución salina isotónica y se separó una alícuota del último lavado.

1.2.1.4.2. Elución por Glicina-HCl/EDTA

Para realizar la elución se mezcló 1 ml de la suspensión globular obtenida anteriormente con 2 ml de glicina-HCl (0,1 M, pH 1,5) y 1 ml de EDTA (10% P/V). La mezcla fue incubada 2 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugada a 1000 rpm durante 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se ajustó el pH a 7,5 con Tris base (1 M). Los tubos se centrifugaron nuevamente a 1000 rpm durante 3 minutos. Se investigó la presencia de anticuerpos anti-D con el Panel Globular Identificador en el eluido y en la alícuota del último lavado (68).

1.2.1.5. Otros estudios serológicos

En algunos casos se investigó también la presencia de epitopes D específicos utilizando un equipo comercial compuesto por 12 anticuerpos monoclonales de clase IgG, como se describe en los ítems 1.2.1.1 y 1.2.1.2. Los anticuerpos utilizados son obtenidos a partir de heterohibridomas de humano y de ratón y están dirigidos contra diferentes epitopes del antígeno D (68).

1.2.2. Determinación de los antígenos C, c, E, e

1.2.2.1. Prueba directa en tubo

Se determinó el fenotipo Rh completo en todas las muestras estudiadas. Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos anti-C (clon MS24), anti-c (clon MS33), anti-E (clon MS260) y anti-e (clones MS16 + MS21 + MS63) para la tipificación de los antígenos C, c, E y e respectivamente, siguiendo el procedimiento descrito en el ítem 1.2.1.1 (68).

En todos los protocolos de tipificación serológicos realizados en el presente trabajo se respetaron estrictamente las instrucciones del fabricante.

1.3. Estudios moleculares

1.3.1. Obtención de ADN genómico a partir de sangre periférica: micro método de *salting-out* modificado

En tubos de microcentrífuga se colocó 500 µl de sangre periférica anticoagulada con EDTA al 5% y 700 µl de una solución amortiguadora TE (Tris-HCl pH= 7,3, 10 mM, EDTA 1 mM). Se agitó vigorosamente, se centrifugó durante 2 minutos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. El

lavado se repitió con 1 ml de solución amortiguadora TE hasta obtener un botón celular limpio, libre de GRs. El botón celular fue resuspendido mediante agitación vigorosa y se mezcló por inversión con 500 µl de una solución de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 2% P/V NaCl 1,4 M, βmercapto-etanol 0,2% P/V, EDTA 20mM, Tris-HCl 100mM, pH= 7,5. Posteriormente, se incubó 12 horas a 56°C. Se agregó 500 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa superior obtenida se transfirió a un nuevo microtubo conteniendo 500 µl de isopropanol y se mezcló suavemente por inversión hasta obtener el precipitado de ADN. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se agregó 500 µl de etanol 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente. El precipitado obtenido fue resuspendido en un volumen de 50 µl de agua destilada estéril (168).

Para la obtención del ADN de muestras con fenotipo dcce, se colocaron 100 µl de sangre entera de 5 donantes en un tubo de microcentrífuga y se procedió según lo descrito anteriormente. Esta estrategia permitió disminuir el número de reacciones de PCR para la detección del gen *RHD*.

1.3.1.1. Control de la extracción de ADN

Para evaluar la cantidad de ADN genómico extraído, se determinó su concentración mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer® D30 siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para las mediciones se mezclaron 5 µl del ADN obtenido con 495 µl de H₂O destilada. La concentración de ADN fue calculada mediante la siguiente ecuación, donde Abs₂₆₀ representa la absorbancia a 260 nm y 50 mg ADN/ml es un factor de conversión.

$$\mu\text{g/ml de ADN} = (\text{Abs}_{260} \times \text{Factor Dilución} \times 50 \text{ mg ADN/ml})$$

Por otro lado, se evaluó la calidad del ADN genómico mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% P/V en solución amortiguadora TBE 0,5X (Tris 135 mM, Ácido Bórico 45 mM, EDTA 2,5 mM), teñidos con el colorante SYBR Safe 0,5X. Para la preparación de estos geles se disolvieron por calentamiento 0,3 g de agarosa en 30 ml de TBE 0,5X. Luego se agregó 1 µl de SYBR Safe, se homogeneizó la solución por agitación suave y se colocó en un soporte de acrílico

para gelificar. Se sembró una alícuota de 1 µl de cada una de las muestras de ADN en el gel sumergido en buffer de electroforesis TBE 0,5X en un equipo de electroforesis horizontal, utilizando como buffer de siembra 1 µl de una solución conteniendo ficoll 10%, azul de bromofenol 0,25%, Tris-HCl (pH = 7,5) 10 mM y EDTA 50 mM. Se realizó la electroforesis durante 30 minutos a 1 V/cm a TA. Los geles fueron visualizados en un transiluminador Invitrogen safe imager 2.0 de luz azul (169).

1.3.2. Detección del gen *RHD*

1.3.2.1. PCR multiplex: amplificación enzimática del intrón 4 y de la región 3' no codificante del gen *RHD*

Las muestras derivadas al laboratorio para su caracterización molecular fueron analizadas mediante una estrategia de PCR multiplex que permite la detección del gen *RHD*. Este estudio consiste en el análisis simultáneo de dos regiones diferentes de dicho gen, permitiendo identificar la presencia del mismo en base al polimorfismo de longitud del intrón 4 y a una secuencia específica en la región 3' no codificante del gen *RHD*. El intrón 4 del gen *RHD* posee una deleción de 651 pb que permite diferenciarlo del intrón 4 del gen *RHCE* al generar por PCR un producto de amplificación de menor peso molecular. Los cebadores utilizados son complementarios a secuencias nucleotídicas consenso presentes en los exones 4 y 5 de ambos genes. La región 3' no codificante del gen *RHD* contiene una secuencia nucleotídica de aproximadamente 1500 pb ausente en el gen *RHCE*. La utilización de un oligonucleótido cebador reverso complementario a una secuencia específica de esta región permite la obtención de un producto de PCR únicamente en individuos portadores del gen *RHD*. El intrón 4 y la región 3' no codificante se encuentran distantes dentro del gen *RHD* permitiendo analizar la posible presencia de genes híbridos *RHD-CE-D* (170).

El intrón 4 de los genes *RHCE* y *RHD* se amplificó utilizando los siguientes oligonucleótidos cebadores:

- **Rh607:** oligonucleótido cebador 5' complementario a una secuencia nucleotídica presente en el exón 4 de ambos genes: 5' ACGATACCCAGTTTGTCT 3', posición 607 a 624, tomando como posición número 1 al primer residuo del codón iniciador AUG del ARNm de los genes *RHCE* y *RHD*.

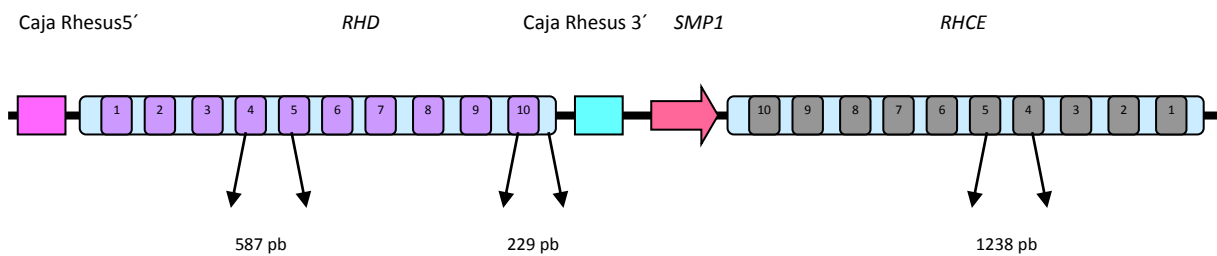
- **Rh768:** oligonucleótido cebador 3' complementario a una secuencia nucleotídica presente en el exón 5 de ambos genes: 5' TGACCCTGAGATGGCTGT 3', posición 768 a 751.

Para el estudio de la región 3' no codificante del gen *RHD* se diseñaron un par de oligonucleótidos cebadores compatibles con los descritos anteriormente (Rh607 y Rh768) para ser utilizados en el sistema de PCR multiplex.

- **RHexón10for:** oligonucleótido cebador 5' complementario a una secuencia nucleotídica del exón 10 de ambos genes: 5' CCTCATTTGGCTGTTGGATTTTA 3', posición 1231 a 1253.
- **D(3):** oligonucleótido cebador 3' complementario a una secuencia nucleotídica de la región 3' no codificante del gen *RHD*: 5' GTATTCTACAGTGCATAATAAATGGTG 3', posición 1432 a 1458.

En la Figura 9 se muestra la estructura de los genes *RHD* y *RHCE*, los sitios de unión de los cebadores y se indica el producto de amplificación obtenido.

Individuo *RHD+*



Individuo *RHD-*

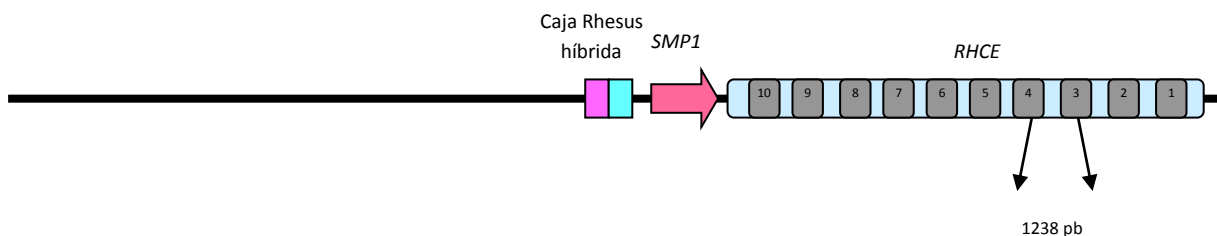


Figura 9. Estrategia de PCR Multiplex para la genotipificación *RHD*. Se representan los sitios de unión de los oligonucleótidos cebadores y los pesos moleculares de los productos de amplificación obtenidos a partir de los genes *RHD* y *RHCE* para un individuo *RHD+* y uno *RHD-*.

En un único tubo de reacción se amplificaron simultáneamente las dos regiones del locus *RH* utilizando los oligonucleótidos cebadores Rh607, Rh768, RHexón10for y D(3).

La PCR fue realizada con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 20 µl conteniendo los 4 cebadores a una concentración de 0,4 µM cada uno, dNTPs 200 mM cada uno, MgCl₂ 1,5mM y 1,5 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón 5X Green Go Taq (Promega) compuesto de Tris-HCl 10 mM (pH=9 a 25°C), 50 mM KCl, 7,5 mM MgCl₂ y 0,1% Triton X-100. La reacción se realizó en un termociclador Labnet.

Condiciones del ciclado:

- Desnaturalización inicial del ADN molde: 2 minutos a 94°C
- 30 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 1 minuto a 59°C
 - Extensión de la reacción: 2 minutos a 72°C
- Extensión final: 10 minutos a 72°C

El fragmento de ADN amplificado de 1238 pb, correspondiente al intrón 4 del gen *RHCE*, está presente en todas las muestras independientemente del genotipo *RHD*. Dicho producto de amplificación permite evaluar la eficiencia de la enzima Taq ADN polimerasa sin necesidad de incorporar otro par de oligonucleótidos cebadores como control interno de la reacción. En todas las amplificaciones realizadas se incorporó como control positivo de reacción una muestra *RHD* positivo y como control negativo una muestra *RHD* negativo.

1.3.2.2. Control de la amplificación enzimática por electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR fueron examinados por electroforesis en geles de agarosa al 2% P/V teñidos con el colorante SYBR Safe 0,5X, en solución amortiguadora TBE 0,5X (169). Para la preparación de estos geles se disolvieron por calentamiento 0,6 g de agarosa en 30 ml de TBE 0,5X. Luego se agregó 1 µl del colorante SYBR Safe. Se homogeneizó la solución por agitación suave y se colocó en un soporte de acrílico para su gelificación. Una alícuota de cada producto de amplificación se sembró en un gel de tipo submarino junto a un marcador de peso molecular. Las muestras se corrieron durante 20 minutos a 5 V/cm a TA. Posteriormente los fragmentos de PCR se visualizaron en un transiluminador Invitrogen safe imager 2.0 de luz azul.

1.3.3. Estudio de muestras con fenotipo D negativo C/E positivo

Se diseñó un diagrama de flujo para el análisis de las muestras con fenotipo D negativo C/E positivo utilizando técnicas de biología molecular. En la Figura 10 se muestra la estrategia de trabajo llevada a cabo.

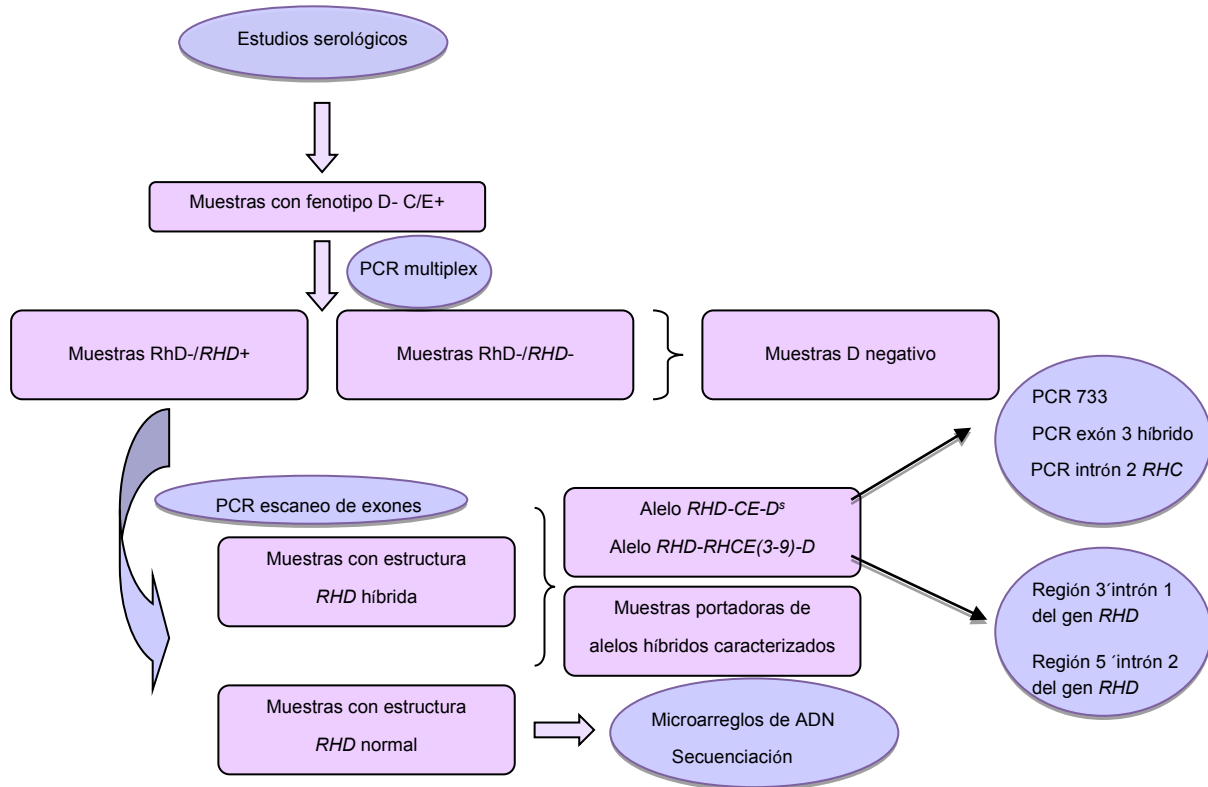


Figura 10. Esquema de la estrategia para la genotipificación *RHD* en muestras con fenotipo D negativo C/E positivo.

1.3.3.1. PCR SSP: Escaneo de exones

Las muestras RhD-/RHD+ que expresaban el antígeno C y/o E fueron estudiadas en una primera etapa mediante una estrategia de escaneo de exones. Esta metodología, basada en la descrita por Gassner y col (66), consta de 10 reacciones de PCR independientes que permiten detectar la presencia de los 10 exones *RHD*, utilizando oligonucleótidos específicos de secuencia. Se realizaron algunas modificaciones con respecto a la técnica original. Se incorporaron dos reacciones para detectar polimorfismos asociados a los exones 1 y 8 del gen *RHD*. Debido a que no existen cambios nucleotídicos entre en el gen *RHD* y *RHCE* en dichos exones, se utilizaron polimorfismos localizados en los intrones adyacentes. Además se realizaron modificaciones en las reacciones descritas para los exones 3 y 9 (Tabla IV). La reacción de amplificación del exón 2

es específica para el gen *RHD* y para las variantes C del gen *RHCE*, debido a que los alelos presentan identidad de secuencia en este exón. Las reacciones de PCR se realizaron con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 10 µl conteniendo los cebadores específicos del gen *RHD* y de control interno en una concentración de 0,2 µM y 0,1 µM respectivamente, dNTPs 200 mM cada uno, glicerol 5%, 0,1 mg/ml de Rojo Cresol, MgCl₂ (ver concentraciones para cada reacción en Tabla IV) y 0,5 unidades de enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón de PCR (Invitrogen) compuesto por Tris-HCl 200 mM (pH = 8,4), KCl 500 mM. El par de cebadores utilizados para la obtención del control interno permitió confirmar el correcto funcionamiento de cada reacción de PCR. Estos oligonucleótidos amplifican una secuencia consenso del gen correspondiente a la Hormona de Crecimiento Humana (*HGH*) (ver secuencia en la Tabla IV). El producto de amplificación resultante de 434 pb permitió validar el resultado negativo en aquellas reacciones donde no se observan amplificaciones específicas de exones. En las mezclas de reacción se incorporaron glicerol y el colorante Rojo Cresol para optimizar y agilizar la obtención de los resultados. El glicerol, además de otorgar la densidad adecuada para la siembra, se utilizó como adyuvante para mejorar el rendimiento y especificidad de las reacciones de amplificación. El colorante permitió colocar los productos de amplificación directamente en un gel de agarosa al 2%, sin necesidad del agregado de un tampón de siembra. La PCR se realizó en un termociclador Labnet.

Condiciones del ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 3 minutos a 94°C
- ✓ 10 ciclos de:
 - Desnaturalización: 10 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores y extensión: 1 minuto a 65°C
- ✓ 20 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 1 minuto a 61°C
 - Extensión: 30 segundos a 72°C

En todas las amplificaciones realizadas se incorporó como control positivo de reacción una muestra *RHD* positivo y como control negativo una muestra *RHD* negativo. Los productos de PCR fueron examinados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2. En la Tabla IV se detallan

los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada uno de los 10 exones del gen *RHD* así como también para el control interno, el polimorfismo analizado, las concentraciones de $MgCl_2$ óptimas para cada reacción y el tamaño de los productos de amplificación correspondientes.

Tabla IV. Estrategia de escaneo de exones

Exón	Cebador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Polimorfismo analizado	MgCl ₂ (mM)	Pdto PCR (bp)
1	48gfor	CGCTGCCTGCCCTCTGG	Consenso	1,5	244
	Dint1rev	agatgggggaatcttttcctt	+106A, +114A		
2	D-2-201	GCTTGGGCTTCTCACCTCG	201G	1,2	148
	D-2-307	CAGTGTGATGACCACCTCCAG <u>A</u>	307T		
3	RHDEx3F	TCGGTGCTGATCTCAG <u>IGGA</u>	380T, 383A	1,5	161
	Ds3a	ctttctcccaggtccctcct	Consenso		
4	D-4-527	ACATGATGCACATCTACGTGTTCCGC	505A, 509T, 514A	1,5	122
	D-4-602	CAGACAACTGGGTATCGTTGCTG	602C		
5	D-5-676	ATGTTCTGGCCAAGT <u>G</u> TCAACTCTG	667G	1,2	157
	D-5-787	ctgctcacC <u>IT</u> GCTGATCTTCC <u>C</u>	787G, 800A		
6	D-6-826	TTATGTGCACAGTGC GGTTGG	Consenso	1	132
	D-6-916	CAGGTACTTGGCTCCCCGAC	916G, 932A		
7	D-7-967	GTTGTAACCGAGTGTGGGGATTC	Consenso	1,5	122
	D-7-1048	TGCCGGCTCCGACGGTATC	1048G, 1053C, 1057G, 1059A, 1060G, 1061C		
8	Ds8s	ggtcaggagttcgagatcac	-546A, -542C	1,5	857
	RHint8R	cctgccctggcctcacagtc	Consenso		
9	WD2for	tgtccaggaatgacagggt	-132T	1,5	231
	D-9-1193	AGAAA <u>ACTTGGTCATCAAATATTTAGCCT</u>	1193A		
10	D-10-1255	TCCTCATTTGGCTGTTGGATTtaag	Consenso	1,5	147
	D-10-1358	cagtgccctgcggaacattg	región 3'NC		
<i>HGH</i>	HGH1	CAGTGCCTTCCAACCATTCCTTA			434
	HGH2	ATCCA <u>CTCACGGATT</u> CTGTTGTGTTTC			

Las secuencias nucleotídicas exónicas se indican en mayúscula y las secuencias intrónicas en minúscula. Los nucleótidos polimórficos están subrayados. NC: no codificante

1.3.3.2. Caracterización de la estructura molecular de los exones 3 y 5 del gen *RHD* y del intrón 2 del gen *RHCE*

En aquellas muestras donde únicamente se observó amplificación de los exones 1, 2, 8, 9 y 10 del gen *RHD* se continuaron los estudios moleculares mediante el análisis de los exones 3 y 5 de dicho gen para confirmar la presencia del alelo *RHD-CE-D^s* (122, 171, 172).

1.3.3.2.1. Detección de exón 3 híbrido: *5'RHD-RHCE3'*

Se diseñó una PCR SSP para detectar un exón 3 híbrido *5'RHD-RHCE3'* utilizando un oligonucleótido cebador sentido *RHD* específico (RHDexon3F) junto con otro *RHCE* específico como cebador antisentido (RHCEexon3R).

Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados fueron:

- ✓ **RHDexon3F:** cebador sentido específico para el exón 3 del gen *RHD*,
5'TCGGTGCTGATCTCAGTGGA 3'
- ✓ **RHCEexon3R:** cebador reverso específico para el exón 3 del gen *RHCE*,
5'ACTGATGACCATCCTCAGGG 3'

La amplificación de un producto de PCR de 110 pb confirma la existencia de un exón 3 híbrido *5'RHD-RHCE3'*, característico del alelo *RHD-CE-D^s*.

La PCR fue realizada con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 10 µl conteniendo los cebadores específicos y los oligonucleótidos de control interno a una concentración de 0,5 µM y 0,02 µM respectivamente, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM y 1 unidad de la enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón de reacción (Invitrogen). La PCR se realizó en un termociclador Labnet.

Condiciones del ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 2 minutos a 94°C
- ✓ 30 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 40 segundos a 62°C
 - Extensión de la reacción: 40 segundos a 72°C
- ✓ Extensión final: 10 minutos a 72°C

Como control interno de reacción se utilizaron los oligonucleótidos que amplifican una secuencia consenso del gen correspondiente a la *HGH*. En todas las reacciones de PCR se incorporaron como controles negativos una muestra *RHD* positivo y una muestra *RHD* negativo. También se amplificó como control positivo una muestra de ADN portadora de un exón 3 híbrido 5'*RHD-RHCE*3' obtenida por intercambio con laboratorios de Inmunohematología del exterior.

Los productos de PCR fueron analizados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.3.3.2.2. Detección del polimorfismo *c.733C>G*

Se analizó el polimorfismo *c.733C>G* presente en el exón 5 del gen *RHCE* mediante una reacción de PCR SSP. Se empleó un oligonucleótido cebador 5' complementario a una secuencia específica del intrón 4 del gen *RHCE* (5' Hyb), que se encuentra delecionada en el intrón 4 del gen *RHD*. El oligonucleótido reverso empleado es complementario a una secuencia específica del exón 5 del gen *RHD* (3' Hyb). Esta secuencia se diferencia de la correspondiente en el exón 5 del gen *RHCE* en dos nucleótidos, siendo uno de ellos el nucleótido polimórfico 733 ubicado en el extremo 3' del cebador antisentido.

Las secuencias de los cebadores utilizados en esta estrategia de PCR fueron las siguientes:

- ✓ **5' Hyb:** cebador sentido específico para el intrón 4 *RHCE*, 5'gactgctgggagaggctaataat 3'
- ✓ **3' Hyb:** cebador antisentido específico para el exón 5 *RHD*, 5'CACCACGCTGACTGCTAC 3'

La amplificación de un producto de 807 pb indica la presencia del sitio polimórfico 733G en el exón 5 del gen *RHD*.

La PCR fue realizada con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 20 µl conteniendo los 2 cebadores específicos y los oligonucleótidos para el control interno a una concentración de 0,5 µM y 0,04 µM respectivamente, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM y 1,5 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón (Invitrogen). La PCR se realizó en un termociclador Labnet.

Condiciones del ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 2 minutos a 94°C
- ✓ 30 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 1 minuto a 60°C
 - Extensión de la reacción: 1 minuto a 72°C
- ✓ Extensión final: 15 minutos a 72°C

Como control interno de reacción se utilizaron los oligonucleótidos cebadores complementarios a secuencias consenso del gen correspondiente a la *HGH*. En todas las amplificaciones realizadas se incorporaron como controles negativos una muestra *RHD* positivo y una muestra *RHD* negativo. También se amplificó como control positivo una muestra de ADN portadora del SNP analizada obtenida por intercambio con laboratorios de Inmunohematología del exterior. Los productos de PCR fueron analizados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.3.3.2.3. Detección de la presencia del alelo *RHC*

Se diseñó una PCR SSP para detectar el polimorfismo molecular asociado al alelo *RHC*. Las muestras portadoras del alelo C presentan una inserción de 109 pb en el intrón 2 del gen *RHCE*.

Se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

- ✓ **C-In2-s:** cebador sentido complementario a una secuencia del intrón 2 de ambos genes *RH*, 5'gctctgtgcccagctctgaagtg 3'
- ✓ **C-In2-as:** cebador antisentido complementario a una secuencia específica de la inserción de 109 pb presente en el intrón 2 del gen *RHCE*,
5'ccactgggaagtgacaaagggc 3'

La amplificación de un producto de 137 pb indica la presencia del alelo *RHC*. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las descritas en el ítem 1.3.3.1.

En todas las reacciones de PCR se ensayó en paralelo una muestra con fenotipo homocigota para el alelo *RHCE*c* como control negativo de reacción. También se amplificó un control positivo utilizando ADN portador del alelo *RHCE*C*. Como control interno se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar la secuencia consenso del gen *HGH*. Los productos de PCR fueron examinados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.3.3.3. Estudio de alelos *RHD* nulos no caracterizados

1.3.3.3.1. Análisis por microarreglos de ADN

Se seleccionaron al azar 30 muestras no caracterizadas mediante las estrategias de PCR descritas anteriormente para ser analizadas por una técnica de microarreglos de ADN. Esta metodología permite la identificación de más de 100 alelos *RHD* y está basada en la hibridación de sondas de oligonucleótidos alelo específicas con el ADN en estudio (173, 174).

Se amplificaron los fragmentos de ADN genómico que contienen las principales variantes alélicas con una estrategia de PCR multiplex. Estos productos de PCR fueron fragmentados y marcados con dos fluoróforos diferentes (Cy3 y Cy5) para la detección específica de los genes *RHD* y *RHCE*. Los productos marcados se hibridaron sobre un chip de ADN (plataforma) que contiene las sondas específicas. En cada chip se midió la intensidad de fluorescencia mediante un escáner confocal. Los datos fueron analizados con el software de BLOODchip® que genera un informe automáticamente. Estos estudios fueron realizados en el Laboratorio de Inmunoematología del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona, España.

1.3.3.3.2. Secuenciación del gen *RHD*

Las muestras D-/*RHD*+ C/E positivo no caracterizadas mediante las estrategias moleculares descritas anteriormente fueron secuenciadas. Se amplificó cada uno de los 10 exones del gen *RHD* a partir de ADN genómico utilizando oligonucleótidos cebadores intrónicos. Posteriormente, cada producto de amplificación fue secuenciado con 2 cebadores internos, uno sentido y otro antisentido.

Se diseñaron estrategias de PCR SSP, basadas en las descritas por Legler (139), para la amplificación de cada uno de los 10 exones del gen *RHD*. Se realizaron modificaciones en los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los exones 2, 3, 4, 6, 8 y 9. Las amplificaciones fueron realizadas con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 25 µl conteniendo los dos oligonucleótidos cebadores a una concentración de 0,32 µM cada uno, dNTPs 0,2 mM de cada uno y 1,5 unidad de la enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón 5X Colorless Go Taq (Promega) compuesto de Tris-HCl 10 mM (pH = 9 a 25°C), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ y 0,1% Triton X-100. La PCR se realizó en un termociclador Labnet.

Los productos de amplificación fueron controlados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2. utilizando un buffer de siembra. En la Tabla V se detallan los oligonucleótidos empleados y las condiciones de reacción.

Tabla V. Oligonucleótidos cebadores y condiciones de PCR para la amplificación de los 10 exones del gen *RHD*

Exón	Cebador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Condiciones de ciclado	Pdto. de PCR (pb)
1	Ds1s	tcaacpggagtcag	2' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C,	767
	Ds1a	gctatttgctcctgtgaccactt	1' a 62°C, 1'30'' a 72°C; 15' a 72°C	
2	5'exón2RHD	tgcccctccagctgccatttag	2' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C,	1606
	Ds2a	ggcatgtctatttctctgtctaat	1' a 60°C, 1' a 72°C; 10' a 72°C	
3	Ds3s	gtcgtcctggctctccctctct	2' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C,	490
	Ex3rev	ccagctcggctccaactcc	40'' a 64°C, 40'' a 72°C; 7' a 72°C	
4	RHint3F	gccgacactcactgctcttac	2' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C,	381
	RHDint4R	tcctgaacctgctctgtgaagtgc	40'' a 62°C, 40'' a 72°C; 10' a 72°C	
5	Ds5s	tacctttgaattaagcacttcacag	2' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C,	1458
	Ds5a	ttattggctacttgggtgcc	1' a 62°C, 1'30'' a 72°C; 15' a 72°C	
6	ex6F	agtagtgagctggcccatca	2' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C	371
	ex6R	cttcagccaagcagaggag	40'' a 62°C, 40'' a 72°C; 10' a 72°C	
7	Ds7s	catcccccttgggtggcc	2' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C,	405
	Ds7a	aaggtaggggctggacag	1' a 62°C, 1' a 72°C; 10' a 72°C	
8	Ds8s	ggtcaggagtctcgatcac	2' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C,	857
	RHint8R	cctggcctggcctcacagtc	1' a 62°C, 1' a 72°C; 10' a 72°C	
9	WD2for	tggccaggaatgacagggtct	2' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C,	557
	Ds9a	caccgcatgtcagactatttggc	1' a 62°C, 1'30'' a 72°C; 15' a 72°C	
10	Ds10s	caagagatcaagccaaaatcagt	2' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C,	381
	Ds10a	agcttactggatgaccacca	40'' a 62°C, 40'' a 72°C; 10' a 72°C	

Las secuencias nucleotídicas exónicas se indican en mayúscula y las secuencias intrónicas en minúscula.

1.3.3.3.2.1. Purificación de los productos amplificados

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el equipo comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Este sistema está basado en la capacidad del ADN de unirse a membranas de sílica en presencia de agentes salinos caotrópicos. Los fragmentos de ADN retenidos en la superficie de la sílica son eluidos con agua libre de DNAsas luego de varios lavados (175). Una vez obtenido el producto fue almacenado a -20°C.

1.3.3.3.2.2. Determinación de la concentración de ADN

Se determinó la concentración de ADN de los productos purificados mediante la técnica descrita en el ítem 1.3.1.1. Para las mediciones se mezclaron 5 µl del producto de PCR purificado con 495 µl de H₂O destilada.

1.3.3.3.2.3. Preparación de los productos de amplificación para secuenciar

Se prepararon soluciones de las muestras a la concentración requerida para la secuenciación de acuerdo al tamaño del ADN molde. Los pesos moleculares del ADN a secuenciar y la concentración requerida se detallan en la Tabla VI.

Tabla VI. Concentración requerida del ADN molde para la secuenciación

Molde ADN	Concentración requerida
100-200 pb	5 ng/μl
200-500 pb	15 ng/μl
500-1000 pb	30 ng/μl
1000-2000 pb	60 ng/μl

Los productos purificados fueron enviados, junto con oligonucleótidos específicos para la región a secuenciar, al Instituto de Biotecnología-Unidad de Genómica, INTA Castelar. En la Tabla VII se describen las secuencias nucleotídicas de los cebadores enviados para la secuenciación de cada uno de los exones del gen *RHD*.

Tabla VII. Cebadores utilizados para las reacciones de secuenciación

Exón	Cebador	Orientación	Secuencia nucleotídica (5'-3')
1	Ds1seq	sentido	tccatagagaggccagcaca
	Ds1a	antisentido	gctatttgctcctgtgaccactt
2	re13	sentido	actctaatttcataccacc
	Ex2seq	antisentido	aaatattgcacagcactgg
3	Ds3s	sentido	gtcgtcctggctctcctctct
	Ex3seq	antisentido	agtgatcttctcctcagc
4	RHint3F	sentido	gccgacctcactgctcttac
	Ds4seq	antisentido	gggagatttttcagccag
5	Ex5seq	sentido	acgtgacttcccatactaac
	Ds5a	antisentido	ttattggctacttgggtgcc
6	rb25	sentido	agcagggaggatgttacag
	ex6R	antisentido	cttcagccaagcagaggag
7	Ds7s	sentido	ggtctcacctgccaatctg
	3'exón7	antisentido	agccagtgaccctcAT
8	Ds8seq	sentido	agtcctttttgtcctgatgacc
	RHint8R	antisentido	cctgccctggcctcagctc
9	Ds9seq	sentido	gagattaaaaatcctgtgctcacaac
	Ex9seq	antisentido	tgctcctactccattttg
10	Ds10s	sentido	caagagatcaagccaaatcagt
	Ex10seq	antisentido	tggcagagaaggattcaac

Todas las secuencias nucleotídicas corresponden a regiones intrónicas del gen *RHD*.

1.3.3.3.2.4. Interpretación de los resultados

El análisis de las secuencias se realizó mediante el software CHROMAS[®]. Las secuencias consenso se obtuvieron de la página de Internet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=search&db=nucleotide>. Para la comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias consenso se utilizó el programa DNASTAR[®].

1.3.3.4. Otros estudios moleculares

1.3.3.4.1. Caracterización molecular de los intrones 1 y 2 en muestras con estructura *RHD-CE(3-9)-D*

Se estudiaron las regiones de los intrones 1 y 2 que flanquean el exón 2 del gen *RHD* mediante estrategias de PCR RFLP para investigar el sitio de recombinación entre los genes *RHD* y *RHCE* en muestras portadoras del alelo híbrido *RHD-CE(3-9)-D*.

1.3.3.4.1.1. Estudio de la región 3' del intrón 1 del gen *RHD*

La región 3' del intrón 1 se analizó mediante una estrategia de PCR RFLP utilizando la enzima de restricción TaqI (176). Para la reacción de amplificación se utilizaron los siguientes oligonucleótidos cebadores:

- ✓ **T1**: cebador sentido, 5'GTTTAAATCTTGGCTGTAGGC 3'
- ✓ **T2**: cebador antisentido, 5'CAGCTTGAGCTCCAGAACG 3'

Estos oligonucleótidos permiten la amplificación de la región 3' del intrón 1 de ambos genes *RH*. La PCR fue realizada con aproximadamente 50 ng de ADN genómico en un volumen final de 50 µl conteniendo los cebadores específicos a una concentración de 0,2 µM, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM y 1 unidad de la enzima Taq ADN polimerasa en su tampón 5X Colorless Go Taq (Promega). La reacción se realizó en un termociclador Labnet.

Condiciones de ciclado:

- ✓ Desnaturalización: 3 minutos a 95°C
- ✓ 30 ciclos de:
 - Desnaturalización: 40 segundos a 95°C
 - Anillado: 1 minuto a 60°C
 - Extensión: 2 minutos a 72°C
- ✓ Extensión final: 5 minutos a 72°C

En todas las reacciones de PCR se ensayó en paralelo una muestra control *RHD* negativo y una muestra control *RHD* positivo. Una alícuota de los productos de amplificación fue examinada en geles de agarosa al 2% de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

Se realizó la digestión de los productos de amplificación con la enzima de restricción TaqI durante 3 horas a 37°C. El peso molecular del producto de amplificación para ambos genes es de 604 pb. La región 3' del intrón 1 del gen *RHD* posee dos sitios de reconocimiento para la enzima TaqI que generan tres fragmentos de 203, 305 y 96 pb. Por otro lado, en la región 3' del intrón 1 del gen *RHCE* no existen sitios de corte para esta enzima.

1.3.3.4.1.2. Estudio de la región 5' del intrón 2 del gen *RHD*

Se analizaron los polimorfismos asociados a los alelos *RHD*, *RHCE**C** y *RHCE*c* presentes en la región 5' del intrón 2 mediante una estrategia de PCR RFLP (177). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR fueron los siguientes:

- **P1:** cebador sentido, 5' GTGCCACTTGACTTGGGACT 3'
- **P2:** cebador antisentido, 5' GTGGACCCAATGCCTCTG 3'

Estos oligonucleótidos permiten la amplificación de la región 5' del intrón 2 de ambos genes *RH*. La PCR fue realizada con aproximadamente 50 ng de ADN genómico en un volumen final de 50 µl conteniendo los cebadores específicos a una concentración de 0,2 µM, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM y 1 unidad de la enzima Taq ADN polimerasa en su tampón 5X Colorless Go Taq (Promega). La reacción se realizó en un termociclador Labnet.

Condiciones de ciclado:

- ✓ Desnaturalización: 3 minutos a 95°C
- ✓ 30 ciclos de:
 - Desnaturalización: 40 segundos a 95°C
 - Anillado: 1 minuto a 60°C
 - Extensión: 2 minutos a 72°C
- ✓ Extensión final: 5 minutos a 72°C

En todas las reacciones de PCR se ensayó en paralelo una muestra control *RHD* negativo portadora de los alelos *RHCE**C** y *RHCE*c*, una muestra control *RHD* positivo homocigota para el alelo *RHCE*c* y una muestra control *RHD* positivo homocigota para el alelo *RHCE**C**. En las

muestras *RHD* negativo homocigotas para el alelo *RHCE**C** se observó la presencia de un fragmento de 1177 pb, en las muestras *RHD* positivo homocigotas para el alelo *RHCE**c** se detectó un segmento génico de 1068 pb mientras que en las *RHD* positivo homocigotas para el alelo *RHCE**C**, ambos fragmentos fueron detectados. La diferencia en el tamaño de los productos de amplificación se debe a la inserción de 109 pb presente en el alelo *RHCE**C**. Una alícuota de los productos de PCR fue examinada en geles de agarosa al 2% de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

Se realizó la digestión con la enzima de restricción PstI durante 3 horas a 37°C. Los productos de la reacción fueron analizados en un gel de agarosa al 2% de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2. En todos los genotipos se obtienen fragmentos de 322 pb y 250 pb aproximadamente. En las muestras *RHD* negativo portadoras del alelo *RHCE**C** se produce además un segmento génico de 148 pb mientras que en el caso de muestras *RHD* positivo homocigotas para el alelo *RHCE**c** se observa un fragmento de 640 pb. En las muestras *RHD* positivo con genotipo *RHCE**C*/RHCE**c** se observan ambas bandas en el patrón de corte con la enzima. Por lo tanto, esta técnica permite detectar tanto la inserción de 109 pb en el intrón 2 del gen *RHCE*, característica de la presencia del alelo *RHCE**C**, como la presencia del gen *RHD*.

1.3.3.5. Diseño de estrategias de PCR

1.3.3.5.1 PCR SSP para la detección del alelo *RHD*46C*

Se diseñó una estrategia de PCR SSP para identificar el alelo *RHD*46C*, utilizando un cebador sentido específico para la región promotora del gen *RHD* y uno reverso conteniendo el nucleótido polimórfico 46C en el extremo 3´.

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

- **Prom-46Afor:** cebador sentido, 5´ actccatagagaggccagcaca 3´
- **Exon1+46Crev:** cebador antisentido, 5´ GCTTCCAGTGTTAGGGCCCG 3´

El producto de amplificación de 219 pb indica la presencia del alelo *RHD*46C*. Las reacciones se realizaron en las mismas condiciones que las empleadas para la técnica de escaneo de exones (ítem 1.3.3.1).

Condiciones del ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 2 minutos a 94°C
- ✓ 30 ciclos de:

- Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 40 segundos a 67°C
 - Extensión: 40 segundos a 72°C
- ✓ Extensión final: 5 minutos a 72°C

En todas las reacciones de PCR se amplificó como control positivo una muestra portadora del alelo *RHD*46C*, detectado por secuenciación, y una muestra *RHD* positiva como control negativo. Se incorporaron oligonucleótidos que amplifican la secuencia consenso del gen *HGH* utilizada como control interno de reacción. Los productos de PCR fueron examinados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.3.3.5.2. PCR SSP para la detección del alelo *RHD*581insG*

Se desarrolló una estrategia de PCR alelo específica para identificar la presencia del alelo *RHD*581insG* utilizando un oligonucleótido cebador sentido específico conteniendo la inserción de la G característica de este alelo en la penúltima base y un oligonucleótido reverso específico para el intrón 4 del gen *RHD*.

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

- **RHD*581insGFw**: cebador sentido, 5'AAAGCCTCTACCCGAGTGG 3'
- **RHD*581insGRv**: cebador antisentido, 5'cttcagacaccagggaac 3'

El producto de amplificación de 185 pb indica la presencia del alelo *RHD*581insG*. La reacción de PCR fue realizada con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 10 µl conteniendo los 2 cebadores a una concentración de 0,2 µM cada uno, 0,1 µM de cada cebador de control interno, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM, 1 unidad de la enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón 5X Green Go Taq (Promega). La reacción se realizó en un termociclador Labnet.

Condiciones del ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 3 minutos a 94°C
- ✓ 10 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 40 segundos a 62°C
 - Extensión: 30 segundos a 72°C

✓ 20 ciclos de:

- Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
- Anillado de cebadores: 40 segundos a 58°C
- Extensión: 30 segundos a 72°C

En todas las reacciones de PCR se amplificó una muestra portadora del alelo *RHD*581insG* como control positivo identificado por secuenciación y una muestra *RHD* positiva como control negativo. Se incorporaron oligonucleótidos que amplifican la secuencia consenso del gen *HGH* utilizada como control interno de reacción. Los productos de PCR fueron examinados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.3.3.5.3. PCR SSP para la detección del alelo *RHD(IVS3+1g>a)*

Se diseñó una estrategia de PCR alelo específica para identificar la presencia del alelo *RHD(IVS3+1g>a)* utilizando un cebador sentido específico para el extremo 3' del intrón 2 del gen *RHD* y un oligonucleótido reverso específico conteniendo en el extremo 3' el nucleótido T, complementario a la base polimórfica del alelo *RHD(IVS3+1g>a)*. Con el objeto de incrementar la especificidad alélica del cebador 3' se introdujo un desapareamiento adicional en el nucleótido ubicado en la antepenúltima posición de la secuencia del mismo.

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

- **Ds3s**: cebador sentido, 5' gtcgtcctggctctccctctct 3'
- **RHD(IVS3+1) Rv mut**: cebador antisentido, 5' CTCCTCCCAGCACCATGACTAAT 3'

El producto de amplificación de 203 pb indica la presencia del alelo *RHD(IVS3+1g>a)*. La reacción de PCR fue realizada con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 10 µl conteniendo los 2 cebadores a una concentración de 0,3 µM cada uno, 0,075 µM de cada cebador de control interno, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM, 1 unidad de la enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón 5X Green Go Taq. La reacción se realizó en un termociclador Labnet.

Condiciones del ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 3 minutos a 94°C
- ✓ 10 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C

- Anillado de cebadores: 40 segundos a 67°C
- Extensión: 30 segundos a 72°C
- ✓ 20 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 40 segundos a 60°C
 - Extensión: 30 segundos a 72°C
- ✓ Extensión final: 5 minutos a 72°C

En las reacciones de PCR se amplificó una muestra portadora del alelo *RHD(IVS3+1g>a)* identificada por la técnica de microarreglos de ADN como control positivo y una muestra *RHD* positiva como control negativo. Se incorporaron oligonucleótidos que amplifican la secuencia consenso del gen *HGH* utilizada como control interno de reacción. Los productos de PCR fueron examinados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.3.3.5.4. PCR RFLP para la detección del alelo *RHD*M295I*

Se desarrolló una estrategia de PCR RFLP para detectar la presencia del polimorfismo 885T característico del alelo *RHD*M295I*. Se amplificó la región del exón 6 del gen *RHD* con los cebadores específicos ex6F y ex6R. Las condiciones de reacción y de ciclado fueron las descritas en el ítem 1.3.3.3.2. y la tabla V. Ambos oligonucleótidos flanquean sitios de reconocimiento para la enzima *NlaIII* presentes en el exón 6 del gen *RHD*. En todas las determinaciones de PCR realizadas se estudió una muestra *RHD* negativo y una muestra *RHD* positivo como controles de especificidad. Además se analizó una muestra portadora del alelo *RHD*M295I* detectada por la técnica de microarreglos de ADN como control positivo. Una alícuota de los productos de PCR fue examinada en geles de agarosa de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

Se realizó la digestión de los productos de amplificación con la endonucleasa *NlaIII* durante 3 horas a 37°C. El peso molecular del producto de amplificación para muestras *RHD* positivo es de 371 pb. En alelos *RHD* normales existen dos sitios de reconocimiento de la enzima *NlaIII* que generan tres fragmentos de 254, 95 y 22 pb. En las muestras portadoras del alelo *RHD*M295I* existe sólo un sitio de digestión de la enzima y los productos obtenidos son de 349 y 22 pb.

1.3.3.6. Estudios de modelización del complejo Rh

Considerando que la proteína RhD se expresa en la membrana del GR formando el trímero RhD-RhCE-RhAG, se realizó la modelización del complejo Rh con el polipéptido RhD producto de la variante alélica *RHD*46C*. Para ello se obtuvo la secuencia aminoacídica *wild type* de los polipéptidos Rh y RhAG de la base de datos PDB (Protein Data Bank) (178), se introdujo el cambio *p.Trp16Arg* en la proteína RhD y se utilizó el visor molecular Pymol® como herramienta para la visualización de la estructura tridimensional (179).

1.3.4. Estudio de muestras con fenotipo D variante

Se diseñó un diagrama de flujo para el análisis de las muestras con fenotipo Dvar utilizando técnicas de biología molecular. El esquema de la estrategia llevada a cabo se muestra en la Figura 11.

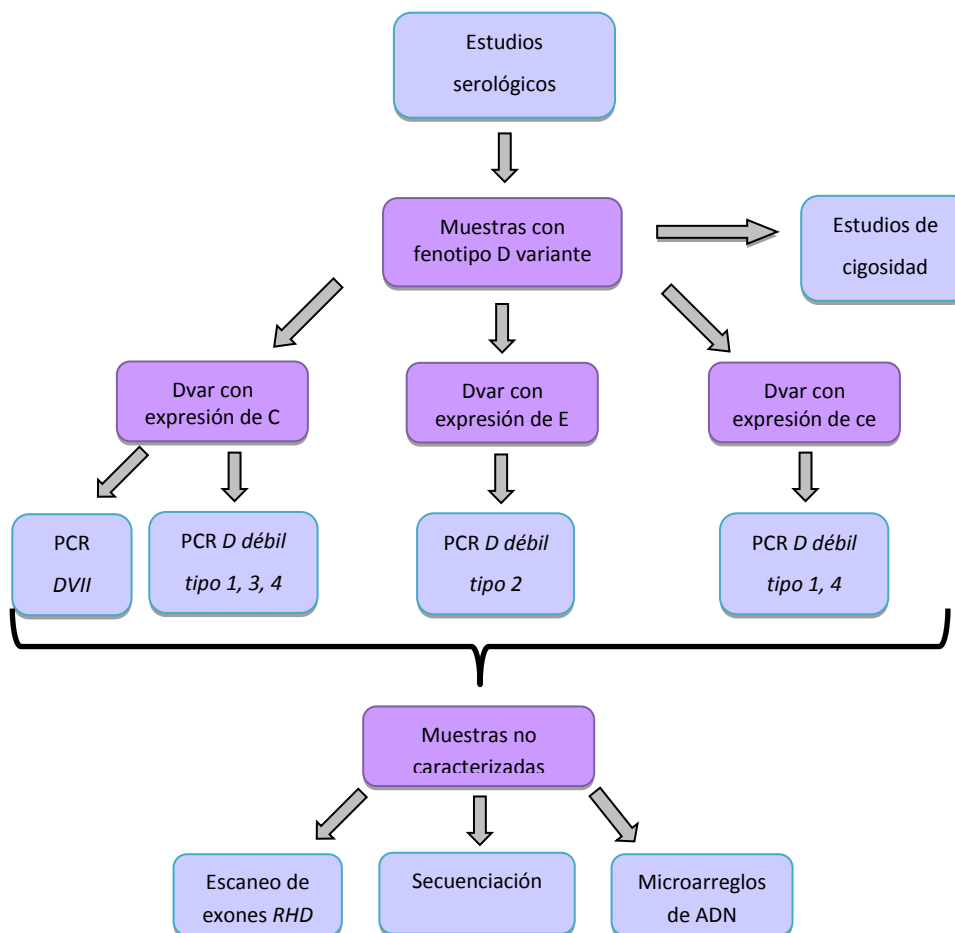


Figura 11. Esquema de la estrategia para la genotipificación *RHD* en muestras con fenotipo D variante.

1.3.4.1 Estudio de cigosidad *RHD*

Se analizó el estado homocigota o hemicigota del gen *RHD* en cada una de las muestras con fenotipo Dvar. Para ello se utilizó una estrategia de amplificación de las cajas Rhesus seguida de la digestión enzimática con la endonucleasa PstI. En las cajas Rhesus híbridas existe un sitio de restricción adicional (5275G) que produce un fragmento de 564pb característico de la delección del gen *RHD* (35). Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

- **rez7**: cebador sentido, 5' TGAGCCTATAAAATCCAAAGCAAGTTAG 3'
- **rnb31**: cebador antisentido, 5' CCTTTTTTTGTTTGTGTTTTGGCGGTGC 3'

La amplificación fue realizada utilizando aproximadamente 50 ng de ADN genómico en un volumen final de 25 µl conteniendo una concentración de 0,32 µM de cada uno de los cebadores específicos para las cajas Rhesus híbridas, 0,2 mM de cada uno de los dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ y 1 unidad de Taq DNA polimerasa en su tampón 5X Colorless Go Taq (Promega). La reacción se realizó en un temociclador Labnet.

Condiciones de ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 4 minutos a 94°C
- ✓ 35 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado: 1 minuto a 65°C
 - Extensión: 3 minutos a 72°C
- ✓ Extensión final: 10 minutos a 72°C

En todas las determinaciones de PCR realizadas se estudiaron como controles una muestra *RHD* homocigota, una hemicigota y una muestra *RHD* negativo. Una alícuota del fragmento amplificado (2778 pb) fue controlado en un gel de agarosa de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

Se realizó la digestión de los productos de amplificación con la endonucleasa PstI durante 3 horas a 37°C. En individuos *RHD* homocigotas existen dos sitios de reconocimiento de la enzima PstI que generan tres fragmentos de 1888, 744 y 397 pb. En las muestras hemicigotas para el gen *RHD* la digestión con la enzima genera los productos de 1888, 744, 564, 397 y 179 pb. En muestras *RHD* negativo el fragmento de 744 pb está ausente y sólo se observan los productos de digestión de 1888, 564, 397 y 179 pb.

1.3.4.2. PCR SSP la detección de alelos *D débil tipo 1, 2, 3 y 4*

Se utilizaron estrategias de PCR alelo específicas para analizar la presencia de las variantes alélicas *D débil tipo 1, 2, 3 y 4* en las muestras con expresión disminuida del antígeno D. Se diseñaron oligonucleótidos cebadores específicos para los diferentes polimorfismos presentes en los distintos alelos *D débiles*. En el estudio de la variante *D débil tipo 3* se introdujo un desapareamiento adicional en el antepenúltimo nucleótido de la secuencia del cebador 5' con el objeto de incrementar la especificidad alélica del mismo. En la Tabla VIII se detallan las secuencias de los cebadores, el polimorfismo analizado, el exón involucrado y el tamaño del producto de amplificación.

Tabla VIII. Estrategia de genotipificación de alelos *D débil*

Alelo identificado	Cebador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Polimorfismo analizado	Exón	Pdto. de PCR (pb)
<i>D débil tipo 1</i>	RHDW1F	acacgctatttctttgcagACTTATGG	<i>c.809T>G</i>	6	198
	Ds6a	Cttcagccaaagcagaggagg			
<i>D débil tipo 2</i>	WD2for	Tggtccaggaatgacagggct	<i>c.1154G>C</i>	9	203
	RHDW2R	GCTTTCATATTTTAAGATTTAGGAGCAAAG			
<i>D débil tipo 3</i>	WD3formut	acagagacggacacaggATGAGATG	<i>c.8C>G</i>	1	166
	RHDW3R	CTTGATAGGATGCCACGAGCCC			
<i>D débil tipo 4</i>	RHDW4F	AGACTACCACATGAACATGATGCACA	<i>c.602C>G</i>	4	136
	RHDW4R	CAGACAAACTGGGTA TCGTTGCTC			

Las secuencias nucleotídicas exónicas se indican en mayúscula y en minúscula las intrónicas. Los nucleótidos polimórficos se encuentran subrayados.

Las reacciones se realizaron en las mismas condiciones que las empleadas para la técnica de escaneo de exones (ítem 1.3.3.1), incluyendo el par de cebadores que amplifican la secuencia consenso del gen *HGH*, utilizada como control interno de amplificación. En todas las reacciones de PCR se amplificó en paralelo una muestra *RHD* positivo, utilizada como control negativo de reacción, y una muestra de ADN portadora del alelo *D débil* en estudio utilizada como control positivo. Los productos de PCR obtenidos fueron examinados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.3.4.3. PCR SSP para la detección del alelo *RHD*DVII*

Se investigó la presencia del alelo *RHD*DVII* en las muestras portadoras del antígeno C no caracterizadas por las técnicas de PCR descritas en el ítem anterior. Se diseñó una estrategia de PCR SSP que detecta la mutación puntual de cambio de sentido *c.329T>C* presente en el exón 2 del gen *RHD*, característica de esta variante alélica. Esta PCR utiliza un cebador sentido conteniendo el nucleótido polimórfico 329C en el extremo 3' y uno reverso específico para el intrón 2 del gen *RHD*. Con el objeto de incrementar la especificidad alélica del cebador 5', se introdujo un desapareamiento adicional en el antepenúltimo nucleótido de la secuencia del mismo.

Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados fueron las siguientes:

- **DVIIa mut:** cebador sentido, 5' TCTGGGAAGGTGGTCATCACGC 3'
- **re23:** cebador antisentido, 5' aaaggatgcaggaggaatgtaggc 3'

El producto de amplificación de 279 pb indica la presencia de un alelo *RHD*DVII*. La reacción de PCR fue realizada con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 10 µl conteniendo los 2 cebadores a una concentración de 0,2 µM cada uno, 0,1 µM de cada oligonucleótido de control interno, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM, 1 unidad de la enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón 5X Green Go Taq. La reacción se realizó en un termociclador Labnet.

Condiciones del ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 2 minutos a 94°C
- ✓ 30 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 40 segundos a 68°C
 - Extensión: 40 segundos a 72°C
- ✓ Extensión final: 10 minutos a 72°C

En todas las reacciones de PCR se amplificó en paralelo una muestra *RHD* positivo como control negativo y una muestra portadora del alelo *RHD*DVII*, identificada previamente por secuenciación, como control positivo. Se incorporaron oligonucleótidos que amplifican la secuencia consenso del gen *HGH* utilizada como control interno. Los productos de PCR fueron examinados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.3.4.4. Estudio de los alelos no caracterizados

1.3.4.4.1. PCR SSP: Escaneo de exones

Las muestras con expresión disminuida del antígeno D no caracterizadas mediante las técnicas de PCR anteriormente descritas fueron analizadas utilizando la estrategia de escaneo de exones (ítem 1.3.3.1). Esta metodología permite detectar algunas variantes D parcial (66).

1.3.4.4.2. Microarreglos de ADN

Se seleccionaron al azar 30 muestras pendientes de caracterización para ser analizadas por la técnica basada en microarreglos de ADN descrita en el ítem 1.3.3.3.1.

1.3.4.4.3. Secuenciación de los exones del gen *RHD*

Las muestras no identificadas por los estudios moleculares anteriores fueron secuenciadas utilizando la estrategia detallada en el ítem 1.3.3.3.2. Se amplificaron cada uno de los 10 exones del gen *RHD* y las regiones intrónicas adyacentes. Los productos purificados fueron enviados para su secuenciación al Instituto de Biotecnología-Unidad de Genómica, INTA Castelar.

1.3.4.5. Diseño de estrategias de PCR

1.3.4.5.1. PCR SSP para la detección del alelo *D débil tipo 93*

Se diseñó una PCR alelo específica para detectar el SNP *c.359C>A*, localizado en el exón 3 del gen *RHD*. Mediante esta estrategia se estudiaron las muestras con expresión del antígeno E que mostraron un resultado negativo para el alelo *D débil tipo 2*. Se utilizó un oligonucleótido sentido específico para el intrón 2 del gen *RHD* y uno antisentido conteniendo el nucleótido polimórfico 359A en el extremo 3'. Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados fueron las siguientes:

- **RHD*359AFw**: cebador sentido, 5' tgggtagaaatcttgtcttctattc 3'
- **RHD*359ARv**: cebador antisentido, 5' TGAGATCAGCACCGACAAAI 3'

El producto de amplificación de 190 pb indica la presencia del alelo *RHD*359A*. La reacción de PCR fue realizada con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 10 µl conteniendo los 2 cebadores a una concentración de 0,2 µM cada uno, 0,1 µM de cada cebador de control interno, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM, 1 unidad de la enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón 5X Green Go Taq.

Condiciones del ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 3 minutos a 94°C
- ✓ 10 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 40 segundos a 61°C
 - Extensión: 30 segundos a 72°C
- ✓ 20 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 40 segundos a 56°C
 - Extensión de la reacción: 30 segundos a 72°C
- ✓ Extensión final: 5 minutos a 72°C

En todas las reacciones de PCR se amplificó una muestra *RHD* positivo como control negativo y una muestra portadora del alelo *RHD*359A*, obtenida mediante estudios de secuenciación, como control positivo. Se incorporaron oligonucleótidos que amplifican la secuencia consenso del gen *HGH* utilizada como control interno de reacción. Los productos de PCR fueron examinados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.3.4.6. Estudios de modelización del complejo Rh

Se modelizó el complejo Rh con el polipéptido RhD producto de la variante alélica *D débil tipo 93* mediante la estrategia descrita en el ítem 1.3.3.6. Para ello se obtuvo la secuencia aminoacídica *wild type* de los polipéptos Rh y RhAG de la base de datos PDB (Protein Data Bank) (178), se introdujo el cambio aminoacídico *p.Ala120Asp* en la proteína RhD y se utilizó el visor molecular Pymol® como herramienta para la visualización de la estructura tridimensional (179).

1.3.4.7. Estudio de los niveles de expresión del antígeno D

Se realizó el análisis de los niveles de expresión del antígeno D en la membrana eritrocitaria en muestras portadoras de la nueva variante alélica *D débil tipo 93* mediante citometría de flujo. En simultáneo, se analizaron como controles de comparación muestras portadoras de alelos *D débil tipo 1* y *3*, y como controles positivo y negativo una muestra con fenotipo DCcEe y dcce, respectivamente.

Una alícuota de cada muestra de sangre entera fue lavada 3 veces con solución amortiguadora de fosfato salino (PBS). Luego, se preparó una suspensión de GRs al 0,2% V/V. Posteriormente, se incubaron 50 µl de la suspensión de GRs con 50 µl de los anticuerpos anti-D monoclonales de clase IgM descritos en el ítem 1.2.1.1 durante una hora a TA. Las suspensiones fueron lavadas con PBS e incubadas 30 minutos con 1 µl del anticuerpo secundario anti-µ conjugado con alofocianina (APC) (BD Biosciencias). Luego de un lavado con PBS, las muestras se resuspendieron en 0,5 ml de diluyente para citometría (FACSFlow BD Biosciencias) y fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSAria II (BD Biosciencias). Se adquirieron 100.000 eventos por muestra. El análisis de las muestras se realizó con el programa FACSDiva (BD Biosciencias). La población de GRs fue seleccionada en base a los parámetros de dispersión de luz (FSC Forward scatter y SSC Side scatter). Los valores de mediana de la intensidad de fluorescencia están relacionados con el nivel de expresión del antígeno D en la superficie de la membrana eritrocitaria. La densidad relativa de epitopes D expresada en porcentaje fue calculada utilizando una plantilla de Excel confeccionada por Flegel *y col* (180). Los resultados obtenidos para las muestras portadoras del alelo *D débil tipo 93* fueron posteriormente comparados con los observados para las muestras control (180, 181).

1.4. Estudios moleculares complementarios

1.4.1. Detección del alelo *RHDψ*

En muestras RhD-/RHD+ con fenotipo ccee (Tucumán n=221; Rosario n=1200) se investigó la presencia del alelo *RHDψ* mediante una estrategia de PCR. En esta variante alélica existe una duplicación de 37 pb entre el intrón 3 y el exón 4 del gen *RHD* que permite diferenciar los alelos *RHDψ* y *RHD* normal al generar un producto de amplificación de mayor peso molecular. Esta metodología utiliza oligonucleótidos cebadores complementarios a secuencias nucleotídicas consenso presentes en los intrones 3 y 4 del gen *RHD* (115).

- **RHDint3F**: cebador sentido, 5' gccgacactcactgctcttac 3'
- **RHDint4R**: cebador antisentido, 5' tcctgaacctgctctgtgaagtgc 3'

La PCR fue realizada con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 20 µl conteniendo los 2 cebadores a una concentración de 0,5 µM cada uno, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM y 1,5 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón 5X Green Go Taq (Promega). La reacción se realizó en un termociclador Labnet.

Condiciones del ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 2 minutos a 94°C
- ✓ 29 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 40 segundos a 62°C
 - Extensión de la reacción: 40 segundos a 72°C
- ✓ Extensión final: 10 minutos a 72°C

Para controlar la eficiencia de la reacción de PCR se incorporó como control interno un par de oligonucleótidos cebadores complementarios a secuencias consenso del exón 2 del gen *DRB1* del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II, que permiten la obtención de un fragmento de 270 pb en todas las muestras.

Los oligonucleótidos cebadores empleados como control interno fueron los siguientes:

- **2DRBAmpA**: cebador degenerado 5', 5' CCCCACAGCACGTTTCT(C)TG 3'
- **2DRBAmpB**: cebador 3', 5' CCGCTGCACTGTGAAGCTCTA 3'

La concentración de los mismos en el medio de reacción fue de 0,04 µM.

En todas las amplificaciones realizadas se incorporaron como controles negativos una muestra *RHD* positivo y una muestra *RHD* negativo. Además se amplificó un control positivo utilizando ADN de un individuo portador de la duplicación de 37 nucleótidos. Los productos de PCR fueron examinados en geles de agarosa de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.4.2. Genotipificación del grupo sanguíneo Diego

Se utilizaron estrategias de PCR SSP (182) para investigar la presencia de los alelos *DI*A* y *DI*B* del grupo sanguíneo Diego en 178 muestras derivadas de Tucumán y 150 provenientes de Rosario. Estos alelos se diferencian por un SNP en la posición 2561 del exón 19 del gen *SLC4A1*. Para la caracterización de muestras portadoras del alelo *DI*A* se utilizó el cebador sentido F1 específico para una secuencia presente en el exón 18 del gen *SLC4A1* y el cebador reverso AR cuyo extremo 3' contiene una A complementaria a la T específica del alelo *DI*A*. Para investigar la presencia de la variante alélica *DI*B* se empleó un cebador sentido BF específico que contiene en el extremo 3' una C característica de este alelo y uno antisentido complementario a una secuencia del intrón 19 del gen *SLC4A1*.

Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la identificación del alelo *DI*A* fueron las siguientes:

- **F1**: cebador sentido, 5' GGTCACGTCGCTCAGCGG 3'
- **AR**: cebador antisentido, 5' CAGGGCCAGGGAGGCCA 3'

Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la identificación del alelo *DI*B* fueron las siguientes:

- **BF**: cebador sentido, 5' GGTGGTGAAGTCCACGCCC 3'
- **R**: cebador antisentido, 5' ccaggcagccactcacAC 3'

El producto de amplificación de 276 pb indica la presencia de un alelo *DI*A* y un producto de 129 pb evidencia la variante alélica *DI*B*. La reacción de PCR fue realizada con aproximadamente 0,2 µg de ADN genómico en un volumen final de 10 µl conteniendo los 2 cebadores a una concentración de 0,5 µM cada uno, 0,2 µM de cada cebador de control interno, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl₂ (0,75 mM para *DI*A* y 1.5 mM *DI*B*), 0,5 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa en su respectivo tampón Invitrogen. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un termociclador Labnet.

Condiciones del ciclado:

- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 3 minutos a 94°C
- ✓ 10 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 40 segundos a 61°C
 - Extensión: 30 segundos a 72°C
- ✓ 20 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - Anillado de cebadores: 40 segundos a 56°C
 - Extensión de la reacción: 30 segundos a 72°C
- ✓ Extensión final: 5 minutos a 72°C

En todas las reacciones de PCR se amplificaron muestras con genotipos *DI*A/DI*A*, *DI*A/DI*B* y *DI*B/DI*B* como controles positivos y negativos. Se incorporaron oligonucleótidos que

amplifican la secuencia consenso del gen *HGH* utilizada como control interno de reacción. Los productos de PCR fueron examinados de acuerdo a la técnica descrita en el ítem 1.3.2.2.

1.4.3. Determinación prenatal del genotipo *RHD*

Se estudiaron 296 muestras de sangre periférica de mujeres D negativo con embarazo único (rango de gestación 19 y 28 semanas) provenientes de la ciudad de Rosario. La sangre fue recolectada en tubos estériles conteniendo EDTA al 5% como anticoagulante. En algunos casos también se obtuvo sangre paterna para realizar estudios serológicos y moleculares. Por otro lado, la sangre de cordón de los neonatos fue recogida en tubos conteniendo EDTA al 5% para su posterior estudio serológico y molecular.

1.4.3.1. Estudios serológicos

1.4.3.1.1. Determinación del fenotipo RhD

Se analizó el fenotipo RhD materno, paterno y de los recién nacidos utilizando el reactivo anti-D blend monoclonal mediante las técnicas de hemaglutinación citadas en el ítem 1.2.1.1. Ante un resultado negativo, el fenotipo RhD fue confirmado mediante la PAI.

1.4.3.2. Estudios moleculares

1.4.3.2.1. Extracción de ADN genómico

Se realizó la extracción del ADN genómico materno a través del micro método de *salting-out* modificado descrito en el ítem 1.3.1. En algunos casos, también se obtuvo el ADN paterno y de sangre de cordón utilizando el mismo procedimiento.

1.4.3.2.2. Estudios moleculares en muestras de ADN materno

Se investigó la presencia del gen *RHD* en el ADN materno mediante la estrategia de PCR multiplex descrita en el ítem 1.3.2.1. En las muestras donde se observó amplificación de ambos fragmentos *RHD* específicos se analizó la presencia del alelo *RHD ψ* como se detalla en el ítem 1.4.1. Por otro lado, en casos donde sólo se detectó el fragmento de amplificación correspondiente al extremo 3'UTR se investigó la presencia del alelo *RHD-CE-D^s* (ítem 1.3.3.2.).

1.4.3.2.3. Separación del plasma materno

Se centrifugaron los tubos conteniendo 10 ml de sangre materna durante 7 minutos a 3000 rpm dentro de las 12 horas de extracción de la muestra. Se transfirieron alícuotas de 1,2 ml de plasma a microtubos limpios sin alterar la capa leucocitaria y se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm. Posteriormente, se recolectó 1,1 ml de sobrenadante en tubos de microcentrífuga y fueron almacenados a -20°C (183, 184).

1.4.3.2.4. Extracción de ADN fetal libre en plasma materno

El aislamiento de ADN libre se realizó a partir de una alícuota de 1,1 ml de plasma materno. Se descongeló la muestra y fue centrifugada durante 5 minutos a 10000 rpm para aislar los crioprecipitados. Luego, se extrajo el ADN libre a partir de 1 ml de plasma utilizando el equipo comercial QIAmp Blood Mini Kit (Qiagen, Hiden, Germany) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Este sistema está basado en la capacidad del ADN de unirse a membranas de sílica gel. Posteriormente, el ADN libre retenido en la superficie de la sílica fue eluido en un volumen final de 65 µl de la solución tampón de elución. Una vez obtenido el producto fue almacenado a -20°C (183, 184).

1.4.3.2.5. Genotipificación *RHD* fetal

Se investigó la presencia de secuencias *RHD* en el ADN libre a través de estrategias de PCR en tiempo real. Se utilizaron cebadores alelo específicos para amplificar regiones de los exones 4, 5, 7 y 10 del gen *RHD* y un fragmento del gen *SRY*, junto con sondas fluorogénicas TaqMan® (185, 186, 187). Se amplificaron el exón 10 y el gen *SRY* en un sistema de PCR dúplex por triplicado y se utilizaron para su detección sondas FAM y VIC, respectivamente. Los exones 4 y 7 del gen *RHD* fueron también amplificados en una PCR dúplex por duplicado, utilizando sondas FAM y VIC, respectivamente. Además, el exón 5 fue estudiado en un sistema monoplex por duplicado y para su detección se utilizó una sonda FAM.

Los estudios de PCR en tiempo real fueron realizados en un termociclador Stratagene Mx3000P. En las reacciones de PCR se colocaron 9 µL de ADN en un volumen final de 20 µl en un medio de reacción conteniendo Universal Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA) junto con cebadores y sondas en concentración 0,3 µM y 0,2 µM, respectivamente (Tabla IX).

Tabla IX. Oligonucleótidos cebadores y sondas utilizados para la genotipificación *RHD* prenatal

	Nombre	Secuencia (5' to 3')
EXON 4	RHDEX4F	CTGCCAAAGCCTCTACACG
	RHDEX4R	ATGGCAGACAAACTGGGTGTC
	RHDEX4 Sonda	FAM-TTGCTGTCTGATCTTTATCCTCCGTTCCCT-TAMRA
EXON 5	RHDEX5F	CGCCCTCTTCTGTGGATG
	RHDEX5R	GAACACGGCATTCTTCCTTTC
	RHDEX5 Sonda	FAM-TCTGGCCAAGTTTCAACTCTGCTCTGCT-TAMRA
EXON 7	RHD7F*	GGATTCCCACAGCTCCA
	RHD7R*	CCGGCTCCGACGGTATC
	Exn7 Sonda*	VIC-ATGGGCTACAACCTC-MGB
EXON 10	RHD10F*	TGCCTGCATTTGTATGTGAGA
	Exn10R*	AGTGCCTGCGGAACATT
	RHD10 Sonda*	FAM-CATGACAGCAAAGTC-MGB
SRY	SRYF*	GAGCAGCCAGGGAGGCAGAT
	SRYR*	GCAAAACATGGTAATTTAGTAACGTT
	SRY Sonda*	VIC-ACTACTTGCCCTGCT-MGB

Condiciones del ciclado:

- ✓ Incubación inicial: 2 minutos a 50°C
- ✓ Desnaturalización inicial del ADN molde: 10 minutos a 95°C
- ✓ 45 ciclos de:
 - Desnaturalización: 15 segundos a 95°C
 - Anillado de cebadores: 1 minuto a 60°C

1.4.3.2.6. Genotipificación *RHD* de muestras paternas

En aquellos casos donde no se obtuvieron resultados concluyentes para asignar el estatus *RHD* fetal, se investigó el genotipo *RHD* paterno. Se utilizaron las estrategias descritas en los ítems 1.4.1. y 1.3.3.2.1. para establecer los genotipos *RHD/RHD Ψ* , *RHD-/RHD Ψ* , *RHD/RHD-CE-D^s*, y *RHD-/RHD-CE-D^s*.

1.4.3.2.7 Criterios para inferir el genotipo *RHD* fetal

- Se consideró un estatus *RHD* positivo cuando:
 - se observaron al menos 2 señales de amplificación para exón 10 del gen *RHD* junto con al menos 5 señales de amplificación para los exones 4, 5 y 7 y

- todas las señales presentaron valores de Ct dentro del rango esperado para el ADN fetal ($35 < Ct < 42$).
- Se consideró un estatus *RHD* negativo cuando:
 - se observaron señales negativas para todos los exones *RHD* y al menos dos señales positivas para el gen *SRY* y/o
 - una señal positiva para cualquier exón *RHD* y al menos dos señales positivas para el gen *SRY* o
 - señales negativas para todos los exones *RHD* y para el gen *SRY* en dos muestras independientes de la paciente tomadas con tres semanas de diferencia.

Las escasas situaciones en las que no se cumplieron los criterios descritos anteriormente fueron analizadas teniendo en cuenta el genotipo materno y paterno. En las Figuras 12 y 13 se detallan los diagramas de flujo utilizados para inferir el genotipo *RHD* fetal.

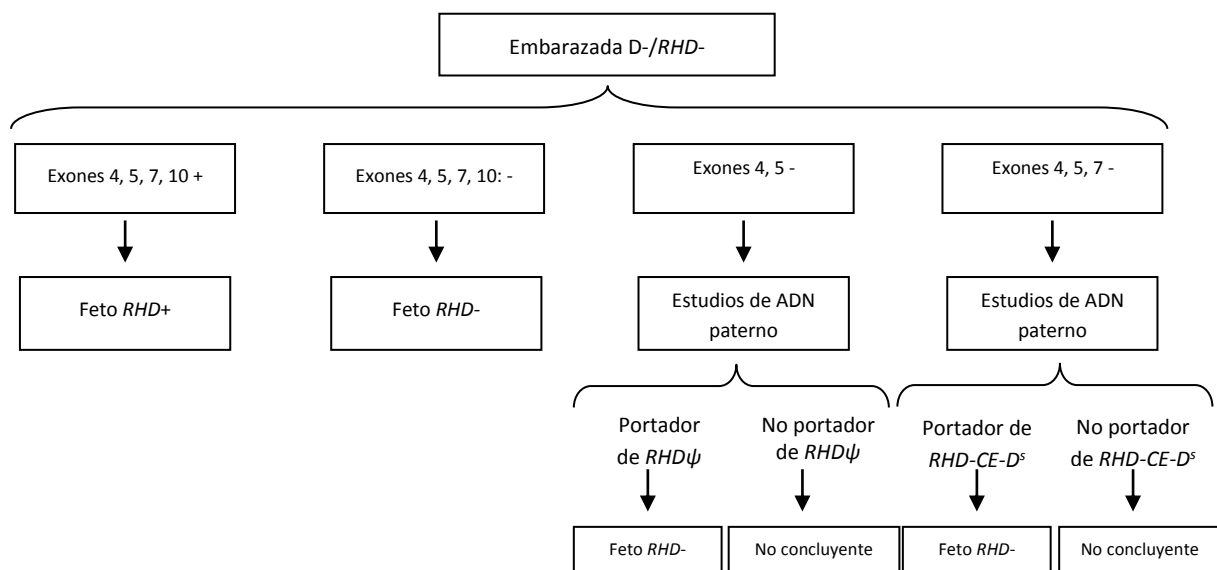


Figura 12. Diagrama de trabajo para la estrategia de genotipificación *RHD* fetal en embarazadas *D-/RHD-*.

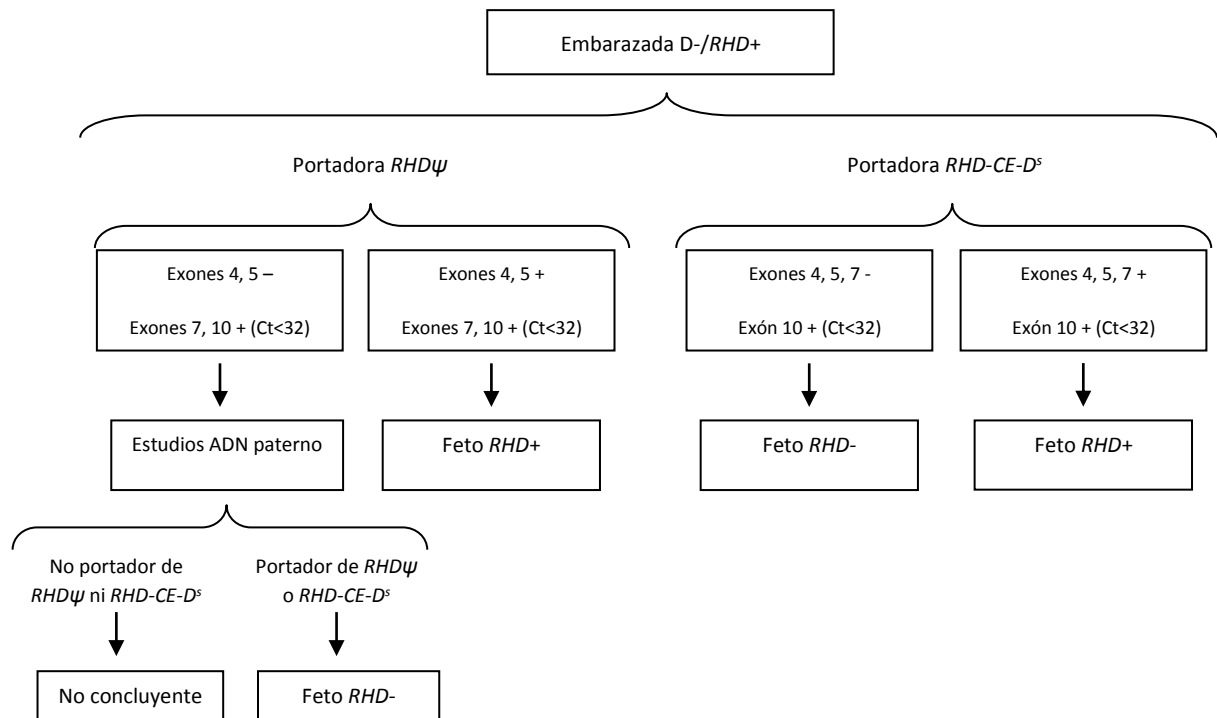


Figura 13. Diagrama de trabajo para la estrategia de genotipificación *RHD* fetal en embarazadas *D-/RHD+*.

1.4.3.3. Análisis serológicos y moleculares de muestras de sangre de cordón

Se investigó el fenotipo D de los recién nacidos utilizando el reactivo anti-D blend monoclonal mediante las técnicas de hemaglutinación citadas en el ítem 1.2.1.1. Ante un resultado negativo, el fenotipo fue confirmado mediante la PAI. El anticuerpo anti-D utilizado reacciona con la mayoría de las variantes D débiles y D parciales, incluyendo el DVI en la PAI. En algunos casos fue necesario realizar estudios moleculares para determinar el estatus *RHD* fetal.

1.5. Análisis estadísticos

Para comparar la distribución de los antígenos C y/o E en las muestras con fenotipo D negativo y Dvar en las 5 ciudades estudiadas en este trabajo de Tesis se empleó la Prueba Chi-cuadrado (χ^2). Este test también fue aplicado para analizar la proporción de muestras *D-/RHD+* y la distribución de los individuos portadores de los alelos *RHD nulos* y *DEL* en las 5 ciudades estudiadas.

La proporción de muestras en las que se identificaron los marcadores genéticos *RHDψ* y *DI*A* se estudió utilizando el test basado en la estadística Z.

El porcentaje de individuos con fenotipo Dvar portadores de los diferentes alelos hallados fue comparado con el test Chi-cuadrado (χ^2).

RESULTADOS

1. Determinación del antígeno D

El estudio de la presencia del antígeno D mediante las técnicas inmunohematológicas descritas en el ítem 1.2.1 del apartado Materiales y Métodos confirmó el fenotipo de las 796 muestras D negativo y las 324 muestras D variante derivadas al laboratorio para su caracterización molecular.

2. Estudio del fenotipo Rh completo y genotipo *RH* en muestras D negativo

2.1. Estudios serológicos

2.1.1. Determinación del fenotipo Rh completo

Se tipificaron los antígenos C, c, E y e en todas las muestras con fenotipo D negativo derivadas de los diferentes bancos de sangre y efectores de salud (ítem 1.2.2.1. de Materiales y Métodos). En la Figura 14 se representan los resultados obtenidos del estudio de los fenotipos Rh en el grupo de muestras D negativo C/E positivo.

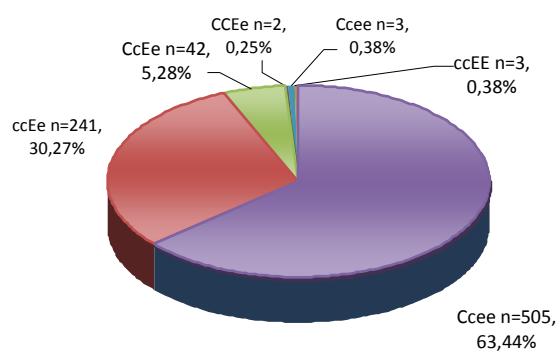


Figura 14. Distribución de los fenotipos Rh observados en las muestras D negativo C/E positivo

En la Tabla X se indica la frecuencia de los antígenos C y E en las muestras con fenotipo D negativo estudiadas.

Tabla X. Frecuencia de los antígenos C y E en muestras D negativo

Ciudad	Antígeno	
	C	E
Tucumán	66,12%	36,51%
Rosario	71,55%	35,77%
La Plata	73,39%	36,70%
Córdoba	74,29%	27,62%
CABA	70,97%	43,23%

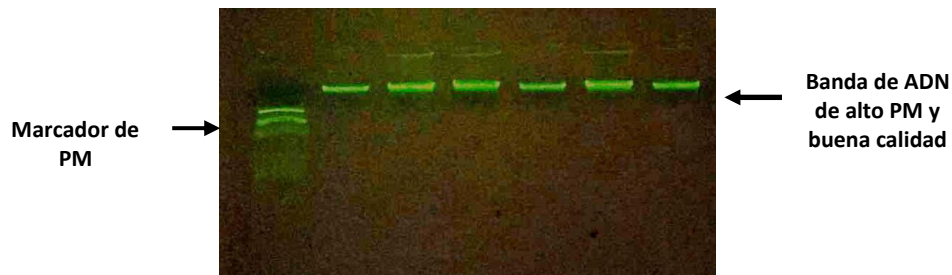
No se observaron diferencias significativas en las proporciones de muestras D negativo portadoras del antígeno C ni D negativo portadoras del antígeno E en las 5 regiones estudiadas ($p > 0,15$, prueba de Chi-cuadrado (χ^2)).

2.2. Estudios moleculares

2.2.1. Obtención de ADN genómico de sangre periférica

Se extrajo el ADN genómico de todas las muestras que presentaron un fenotipo D negativo C/E positivo mediante el micro-método de *salting out* modificado (ítem 1.3.1. de Materiales y Métodos). La calidad y cantidad del ADN fue controlada como se indicó en el ítem 1.3.1.1 de la sección Materiales y Métodos. Todas las muestras incluidas en este estudio presentaron una concentración entre 100 y 200 ng/ μ l y no mostraron degradación del ADN.

En la Fotografía 1 se observa el control de la calidad de la extracción del ADN genómico de muestras D negativo C/E positivo seleccionadas al azar.



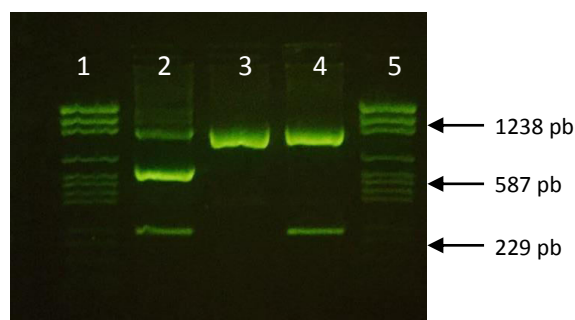
Fotografía 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe de ADN genómico obtenido a partir de sangre periférica.

Calle 1: marcador de peso molecular (pGEM DNA Markers, Promega). La banda de mayor peso molecular corresponde a un fragmento de ADN de 2645 pb. Luego se observan las bandas de 1605 pb, 1198 pb, 676 pb, 517 pb, 460 pb, 396 pb y 350 pb.

Calles 2 a 7: muestras de ADN obtenidas por el micrométodo de *salting out*.

2.2.2. PCR multiplex: amplificación del intrón 4 y de la región 3' no codificante del gen *RHD*

Se investigó la presencia del gen *RHD* en las muestras con fenotipo D negativo C/E positivo mediante la técnica de PCR multiplex. Esta estrategia permite la detección de secuencias *RHD* específicas correspondientes al intrón 4 y a la región 3' no codificante (ítem 1.3.2.1. de Materiales y Métodos). La obtención de 3 productos de amplificación (1 correspondiente al gen *RHCE* y 2 específicos *RHD*) de distintos pesos moleculares indica la presencia de un alelo *RHD* aparentemente normal. En la Fotografía 2 se observan los distintos resultados posibles de esta estrategia.



Fotografía 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe de los productos de amplificación obtenidos en la estrategia de PCR multiplex.

Calle 1 y 5: marcador de peso molecular (pGEM DNA Markers, Promega). La banda de mayor peso molecular corresponde a un fragmento de ADN de 2645 pb. Luego se observan las bandas de 1605 pb, 1198 pb, 676 pb, 517 pb, 460 pb, 396 pb y 350 pb.

Calle 2: muestra D negativo portadora de fragmentos *RHD* específicos. Se observan 3 productos de amplificación de 1238 pb, 587 pb y 229 pb.

Calle 3: muestra D negativo portadora de un fragmento *RHD* específico. Se observan 2 productos de amplificación de 1238 pb y 229 pb.

Calle 4: muestra D negativo sin amplificación de fragmentos *RHD*. Se visualiza un producto de amplificación de 1238pb correspondiente a la región del intrón 4 del gen *RHCE*.

La genotipificación *RHD* fue realizada en las 796 muestras con fenotipo D negativo C/E positivo de donantes provenientes de: Tucumán (n=304), Rosario (n=123), La Plata (n=109), Córdoba (n=105) y CABA (n=155). En 663 muestras se observó únicamente el producto de amplificación de 1238 pb, indicando la ausencia de fragmentos *RHD* específicos (muestras D-/RHD-). Por otro lado, en 57 de las muestras analizadas se observó la amplificación de los tres segmentos génicos (muestras D-/RHD+), confirmando la presencia de secuencias específicas del gen *RHD*. Además, se identificó un patrón de amplificación característico de alelos híbridos (1238 pb-229 pb) en 76 muestras. En la Tabla XI se detallan las muestras estudiadas, los fenotipos hallados y los resultados obtenidos con la estrategia de PCR multiplex.

Tabla XI. Fenotipo Rh completo y genotipificación *RHD* en muestras D negativo C/E positivo

D negativo (n=796)		
Fenotipo	n	PCR multiplex
	410	1238 pb
Ccee	21	1238 pb-587 pb-229 pb
	74	1238 pb-229 pb
	38	1238 pb
CcEe	3	1238 pb-587 pb-229 pb
	1	1238 pb-229 pb
	207	1238 pb
ccEe	33	1238 pb-587 pb-229 pb
	1	1238 pb-229 pb
	2	1238 pb
CCee	3	1238 pb
ccEE	3	1238 pb

En la Figura 15 se muestra la frecuencia de muestras D-/RHD+ en el grupo de muestras D negativo C/E positivo estudiadas.

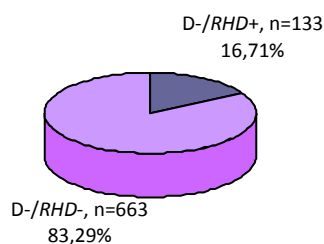


Figura 15: Frecuencia de muestras D-/RHD+

En las siguientes figuras se observan las frecuencias de muestras D-/RHD+ para cada una de las ciudades estudiadas.

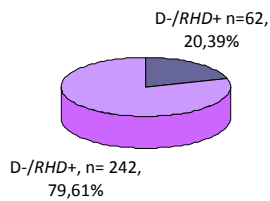


Figura 16: Frecuencia de muestras de Tucumán D-/RHD+

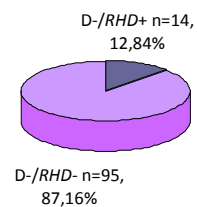


Figura 17: Frecuencia de muestras de La Plata D-/RHD+

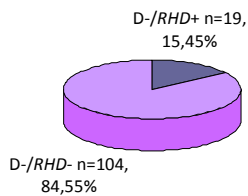


Figura 18: Frecuencia de muestras de Rosario D-/RHD+

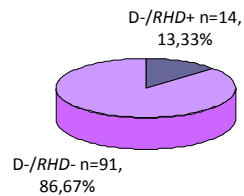


Figura 19: Frecuencia de muestras de Córdoba D-/RHD+

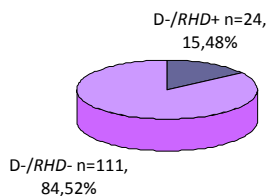


Figura 20: Frecuencia de muestras de CABA D-/RHD+

El porcentaje de muestras D-/RHD+ no difirió significativamente en los distintos grupos estudiados ($p > 0,25$, prueba de Chi-cuadrado (χ^2)).

2.2.3. Caracterización molecular de las variantes alélicas halladas

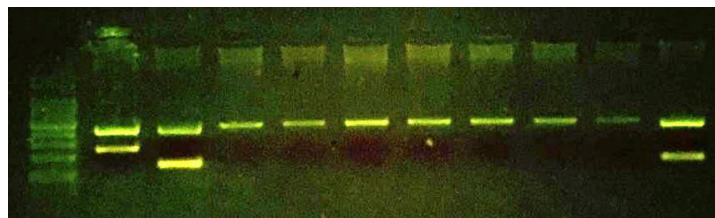
2.2.3.1. Escaneo de exones

Se analizaron las 133 muestras D-/RHD+ que expresaban los antígenos C y/o E mediante el estudio de polimorfismos RHD específicos que permiten detectar la presencia de los 10 exones

del gen *RHD* (ítem 1.3.3.1. de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos mostraron que 76 muestras presentaban un patrón de amplificación característico de variantes híbridas. Dentro de este grupo se caracterizaron 58 posibles variantes *RHD-CE-D^s* al detectarse sólo la presencia de los exones 1, 2, 8, 9, y 10 del gen *RHD*. Además se identificaron 15 alelos *RHD-CE(3-9)-D* y las variantes alélicas *RHD-CE(4-8)-D*, *RHD-CE(4-9)-D* y *RHD-CE(4-7)-D₂* en 3 muestras diferentes.

En las 57 muestras restantes se obtuvo un patrón de amplificación correspondiente a un gen *RHD* aparentemente normal.

En las Fotografías 3 y 4 se observan los resultados obtenidos en los estudios de escaneo de exones para una muestra portadora del alelo *RHD-CE(3-9)-D* y una con la variante alélica *RHD-CE-D^s*.



Fotografía 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe de los productos de amplificación obtenidos en la estrategia de PCR de escaneo de exones para una muestra portadora de un alelo *RHD-CE(3-9)-D*.

Calle 1: marcador de peso molecular elaborado en nuestro laboratorio con productos de PCR. La banda de mayor tamaño corresponde a un fragmento de ADN de 500 pb. Luego se observan las bandas de 400 pb, 300 pb, 200 pb y 100 pb.

Calle 2 a 11: productos de amplificación específicos para cada exón obtenidos en el escaneo de los 10 exones *RHD*. En la fotografía se evidencia la ausencia de los exones 2 al 9, característica de la variante alélica *RHD-CE(3-9)-D*.



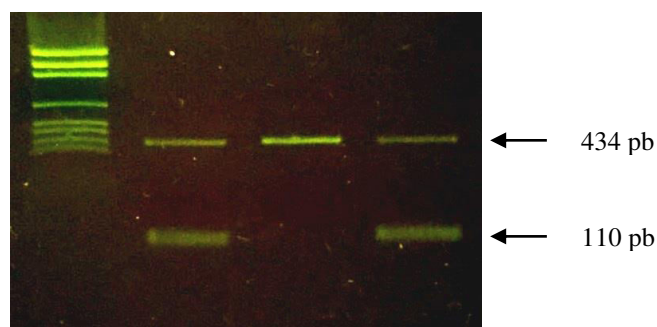
Fotografía 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe de los productos de amplificación obtenidos en la estrategia de PCR de escaneo de exones para una muestra portadora de un alelo *RHD-CE-D^s*.

Calle 1: marcador de peso molecular elaborado en nuestro laboratorio con productos de PCR. La banda de mayor tamaño corresponde a un fragmento de ADN de 500 pb. Luego se observan las bandas de 400 pb, 300 pb, 200 pb y 100 pb.

Calle 2 a 11: productos de amplificación específicos para cada exón obtenidos en el escaneo de los 10 exones *RHD*. En la fotografía se evidencia la ausencia de los exones 3 al 7 característica de la variante alélica *RHD-CE-D^s*.

2.2.3.2. Caracterización de la estructura molecular del alelo *RHD-CE-D^s*

Los estudios realizados utilizando la estrategia de escaneo de exones identificaron la amplificación de los exones 1, 2, 8, 9 y 10 del gen *RHD* en 58 muestras, sugiriendo la presencia de un alelo *RHD-CE-D^s*. Para confirmar la correcta caracterización de estas muestras se analizó el exón 3 utilizando un par de oligonucleótidos cebadores específicos para detectar el exón 3 híbrido *5'RHD-RHCE3'* (ítem 1.3.3.2.1. de Materiales y Métodos). Se obtuvo un producto de amplificación de PCR de 110 pb en todas las muestras estudiadas, confirmando la presencia de esta estructura híbrida (Fotografía 5).



Fotografía 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe de los productos de amplificación obtenidos en la estrategia de PCR exón 3 híbrido.

Calle 1: marcador de peso molecular (pGEM DNA Markers, Promega). La banda de mayor peso molecular corresponde a un fragmento de ADN de 2645 pb. Luego se observan las bandas de 1605 pb, 1198 pb, 676 pb, 517 pb, 460 pb, 396 pb y 350 pb.

Calle 2: muestra portadora del alelo *RHD-CE-D^s* utilizada como control positivo de reacción. Se observan los productos de amplificación de 434 pb correspondiente al control interno (*HGH*) y la banda específica de 110 pb correspondiente a un exón 3 híbrido.

Calle 3: muestra portadora de un alelo *RHD* positivo normal. Se observa sólo el fragmento de amplificación del control interno de reacción de 434 pb.

Calle 4: muestra portadora de un alelo *RHD-CE-D^s*. Se observan 2 productos de amplificación de 434 pb y 110 pb.

Posteriormente, se analizó el polimorfismo 733G presente en el exón 5 del gen *RHD* (ítem 1.3.3.2.2. de Materiales y Métodos). Se observó la presencia del producto de amplificación de 807 pb en todas las muestras indicando la presencia del sitio polimórfico 733G en el exón 5 del alelo híbrido. Además, el análisis del intrón 2 indicó la ausencia de un alelo *RHC* responsable de la expresión del antígeno C en todas las muestras estudiadas. La estructura molecular de los exones 3 y 5 y el estudio del intrón 2 del alelo híbrido permitieron confirmar la presencia de la variante *RHD-CE-D^s* en las 58 muestras analizadas.

Los resultados obtenidos con la estrategia de escaneo de exones junto a la caracterización de los exones 3 y 5 y del intrón 2 en muestras con fenotipo D negativo C/E positivo se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII. Variantes alélicas identificadas en las muestras D-/RHD+ mediante la estrategia de escaneo de exones

D negativo (n=133)		
Fenotipo	n	Alelo identificado
Ccee	15	RHD-CE(3-9)-D
	57	RHD-CE-D ^s
	1	RHD-CE(4-8)-D
	1	RHD-CE(4-9)-D
CcEe	1	RHD-CE-D ^s
ccEe	1	RHD-CE(4-7)-D ₂
	33	No caracterizado (presencia de los 10 exones)
CcEe	3	No caracterizado (presencia de los 10 exones)
Ccee	21	No caracterizado (presencia de los 10 exones)

2.2.4. Estudio de las muestras D-/RHD+ no caracterizadas

2.2.4.1. Análisis por microarreglos de ADN

Se seleccionaron al azar 30 de las 57 muestras D-/RHD+ C/E positivo no caracterizadas por los métodos moleculares utilizados anteriormente para ser analizadas por la técnica de microarreglos de ADN (ítem 1.3.3.3.1. de Materiales y Métodos). Esta estrategia de genotipificación permitió identificar dos muestras portadoras del alelo RHD*M295I al detectarse la mutación puntual de cambio de sentido c.885G>T, responsable de un fenotipo DEL. Por otro lado, en dos muestras se caracterizó el alelo RHD(IVS3+1g>a) al observarse el cambio nucleotídico de una G por una A en la primer base del intrón 3 del gen RHD que genera también un fenotipo DEL.

Además, se identificó un nuevo alelo producto de la combinación de dos mutaciones. Se detectó el polimorfismo c.361_371del11 responsable de un fenotipo D negativo junto con la ausencia de los exones 1 y 2 del gen RHD.

2.2.4.2. Secuenciación de los 10 exones del gen *RHD*

Los estudios de secuenciación fueron realizados en las 25 muestras D-/*RHD*+ no identificadas por microarreglos de ADN y en 5 muestras pendientes de caracterización seleccionadas al azar (ítem 1.3.3.3.2. de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos para una de las muestras con fenotipo Ccee mostraron la presencia de una duplicación de 37 pb característica del alelo *RHD* ψ , además de las mutaciones propias de dicha variante: *c.609 G>A*, *c.654G>C*, *c.667T>G*, *c.674C>T* y *c.807T>G*.

En la Figura 21 se muestra un fragmento del cromatograma obtenido de la secuenciación de la región del intrón 3/exón 4 de la muestra portadora del alelo *RHD* ψ donde se observa la duplicación de 37 pb y de una muestra *RHD* normal.

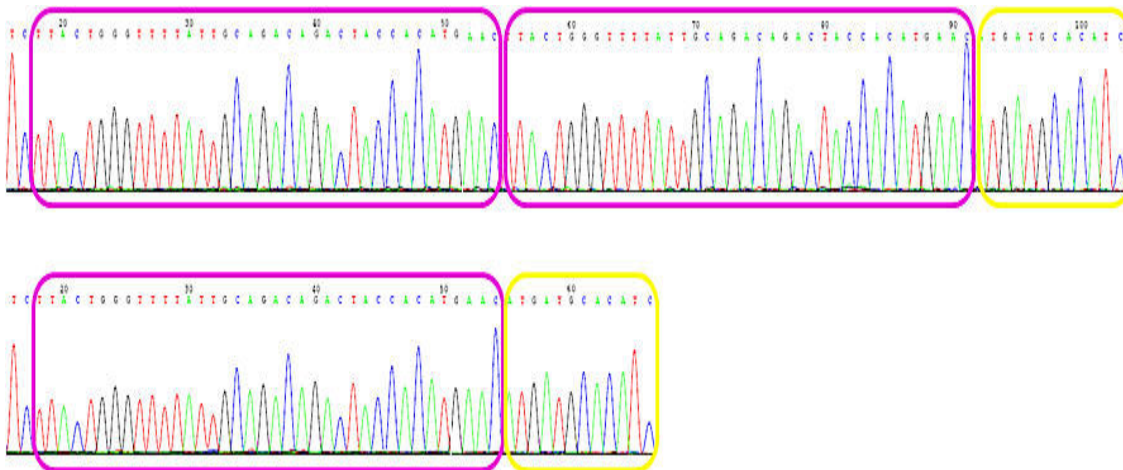


Figura 21. Cromatograma correspondiente a la región del intrón 3/exón 4 de la muestra portadora del alelo *RHD* ψ y de una muestra *RHD* normal, respectivamente. Los rectángulos color fucsia representan los 37 pb que se encuentran duplicados en la variante alélica *RHD* ψ . Los rectángulos color amarillo señalan la secuencia del exón 4 contigua a la región duplicada.

En la Figura 22 se observan fragmentos del cromatograma obtenido en los estudios de secuenciación de la muestra portadora del alelo *RHD* ψ y de una muestra con un alelo *RHD* normal, donde se indican las mutaciones puntuales correspondientes a las reportadas para esta variante.

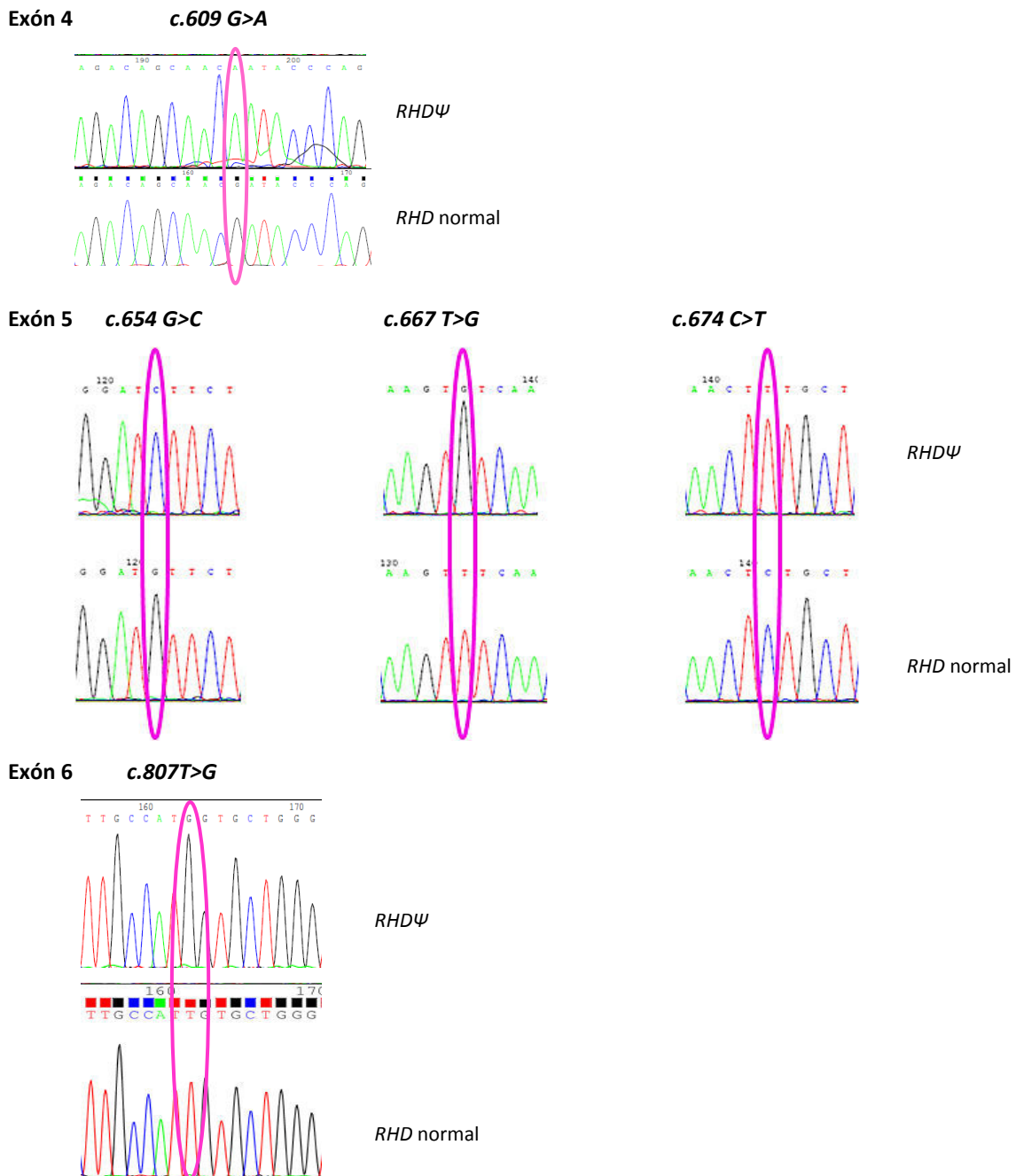


Figura 22. Fragmentos del cromatograma correspondiente a los exones 4, 5 y 6 del alelo *RHDψ* y de un alelo *RHD* normal. En la figura se muestran fragmentos de cromatogramas conteniendo los 5 SNPs en los exones 4, 5 y 6 del gen *RHD*, característicos de la variante alélica *RHDψ*.

Por otro lado, se identificó una nueva variante del gen *RHD* en 8 muestras D-/*RHD*+ con fenotipo ccEe. Este nuevo alelo se caracteriza por la inserción de una G entre los nucleótidos 581 y 582 del exón 4 del gen *RHD*. Este polimorfismo provoca un desplazamiento en el marco de lectura y la formación de un codón de terminación prematuro en la posición 198 del ARNm y la generación de una proteína RhD de 197 residuos de aminoácidos. Esta nueva variante alélica fue

registrada en GenBank (Accession Number KU899995), la base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos), y se denominó *RHD*581insG*. En la Figura 23 se muestra un fragmento del cromatograma obtenido en los estudios de secuenciación del exón 4 de una muestra portadora del alelo *RHD*581insG* y de una muestra *RHD* normal.

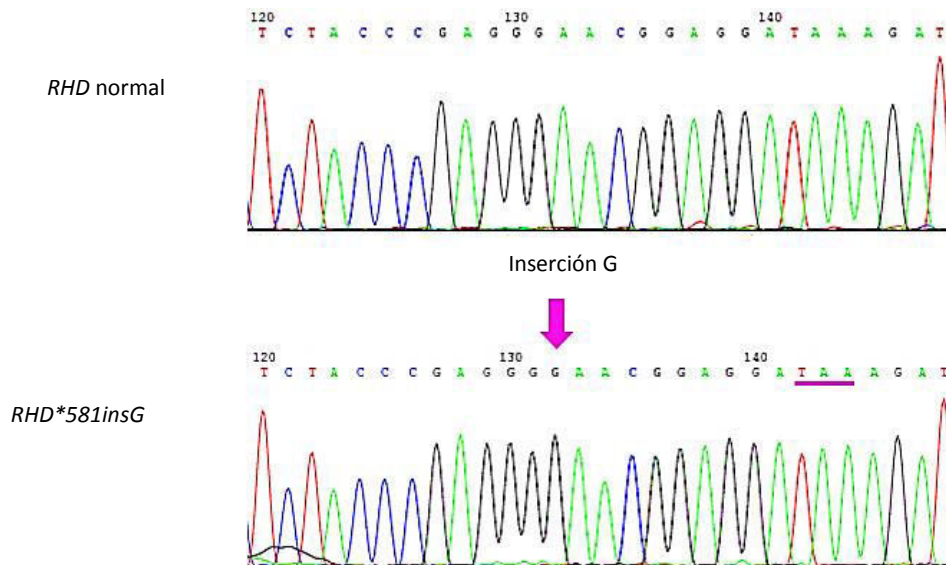


Figura 23. Cromatograma correspondiente al exón 4 de un alelo *RHD* normal y de la variante *RHD*581insG*. En la parte superior de la figura se muestra un fragmento del exón 4 del alelo *RHD* normal. En la parte inferior del gráfico se muestra el cromatograma obtenido para el alelo *RHD*581insG* y subrayado se señala el codón de terminación prematuro generado. La flecha indica la inserción nucleotídica de una G entre los nucleótidos 581 y 582 del gen *RHD*.

Además, en 7 muestras con fenotipo D negativo y expresión del antígeno E se identificó el polimorfismo 46C en el exón 1 del gen *RHD*. Este cambio nucleotídico conduce a la sustitución de la T presente en la posición 46 por una C. En la Figura 24 se muestra un fragmento del cromatograma obtenido de la secuenciación del exón 1 del gen *RHD* en una muestra portadora del alelo denominado *RHD*46C* y en una muestra *RHD* normal. Este SNP genera el cambio aminoacídico *p.Trp16Arg*.

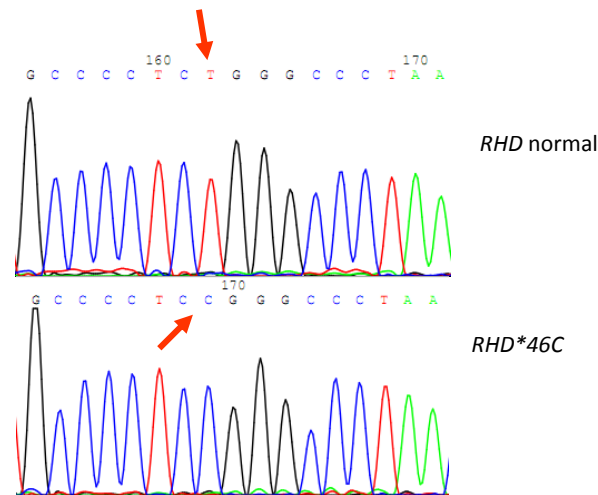


Figura 24. Cromatograma correspondiente al exón 1 de un alelo *RHD* normal y del alelo *RHD*46C*. En la parte superior de la figura se muestra una fracción de la secuencia del exón 1 de un alelo *RHD* normal y en la parte inferior el correspondiente al alelo *RHD*46C*. Las flechas rojas indican el cambio nucleotídico en la posición 46 del gen *RHD*.

Los análisis de secuenciación permitieron también identificar un nuevo polimorfismo no reportado anteriormente en una muestra con expresión del antígeno E. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de la mutación puntual sin sentido *c.1001T>A* en el exón 7 del gen *RHD*. Esta nueva variante alélica es responsable de la generación de un codón de terminación prematuro en la posición 344 del ARNm, produciéndose una proteína RhD truncada.

Por otro lado, los estudios de secuenciación también permitieron detectar el alelo *RHD*1248insG*. La inserción de una G entre las posiciones 1247 y 1248 del gen *RHD* provoca la eliminación del codón de finalización de la traducción de la proteína RhD y la generación de un nuevo codón de terminación corriente arriba en la posición 489 del ARNm. La nueva variante alélica origina una proteína de 488 residuos aminoacídicos. En la siguiente figura se observa un fragmento del cromatograma obtenido de la secuenciación del exón 10 del gen *RHD* en una muestra portadora de este alelo, denominado *RHD*1248insG* y en una muestra *RHD* normal.

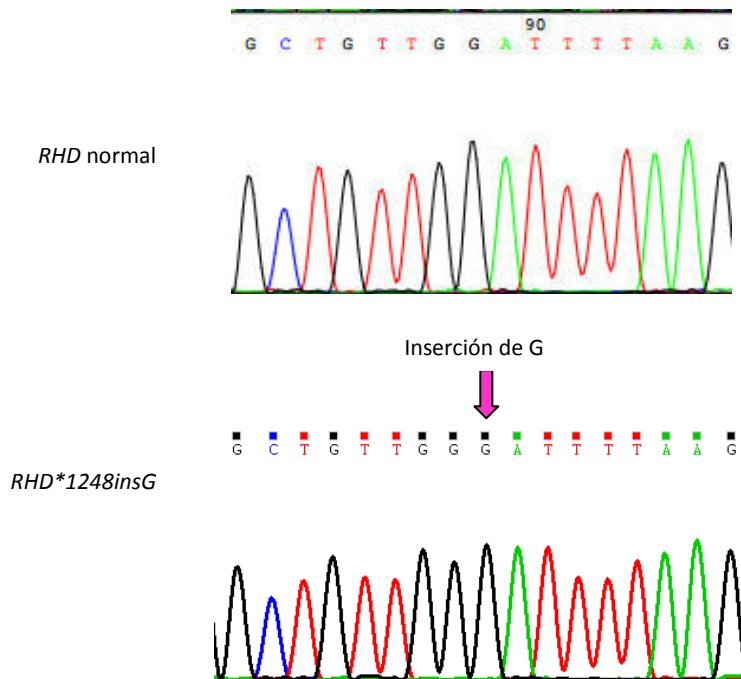


Figura 25. Cromatograma correspondiente al exón 10 de un alelo *RHD* normal y del alelo *RHD*1258insG*. En la parte superior de la figura se muestra una fracción de la secuencia del exón 10 de un alelo *RHD* normal y en la parte inferior el correspondiente al alelo *RHD*1248insG*. La flecha indica la inserción nucleotídica de una G entre los nucleótidos 1247 y 1248 del gen *RHD*.

Debido a que las variantes alélicas *RHD(IVS3+1g>a)*, *RHD*581insG*, *RHD*M295I* y *RHD*46C* fueron halladas en más de dos muestras con fenotipo D negativo, se desarrollaron estrategias de PCR alelo específicas y PCR RFLP (ítem 1.3.3.5. de la sección Materiales y Métodos) para investigar la presencia de dichos alelos en las 35 muestras pendientes de caracterización. Estas estrategias permitieron identificar 5 muestras portadoras de la variante alélica *RHD*46C* y 11 con el alelo *RHD*581insG*. Además, utilizando la estrategia de PCR RFLP se caracterizaron 2 muestras portadoras del alelo *RHD*M295I*.

Posteriormente, las 16 muestras no caracterizadas fueron secuenciadas y no se hallaron mutaciones en las secuencias nucleotídicas codificantes ni en las regiones de unión exón-intrón.

2.2.5. Otros estudios moleculares

2.2.5.1. Caracterización de la estructura genética del alelo *RHD-CE(3-9)-D*

A través de la estrategia de escaneo de exones se identificaron 15 muestras con fenotipo D negativo portadoras del alelo *RHD-CE(3-9)-D*. Se investigaron los polimorfismos de los intrones 1 y 2 para identificar el sitio de recombinación de los genes *RHD* y *RHCE* en esta variante, debido a que la región de intercambio génico en este alelo aún no ha sido dilucidada (ítem 1.3.3.4.1. de

Materiales y Métodos). Los análisis con enzimas de restricción detectaron la presencia de una secuencia *RHD* específica en el intrón 1 y un polimorfismo *RHC* en el intrón 2 (Figura 26).

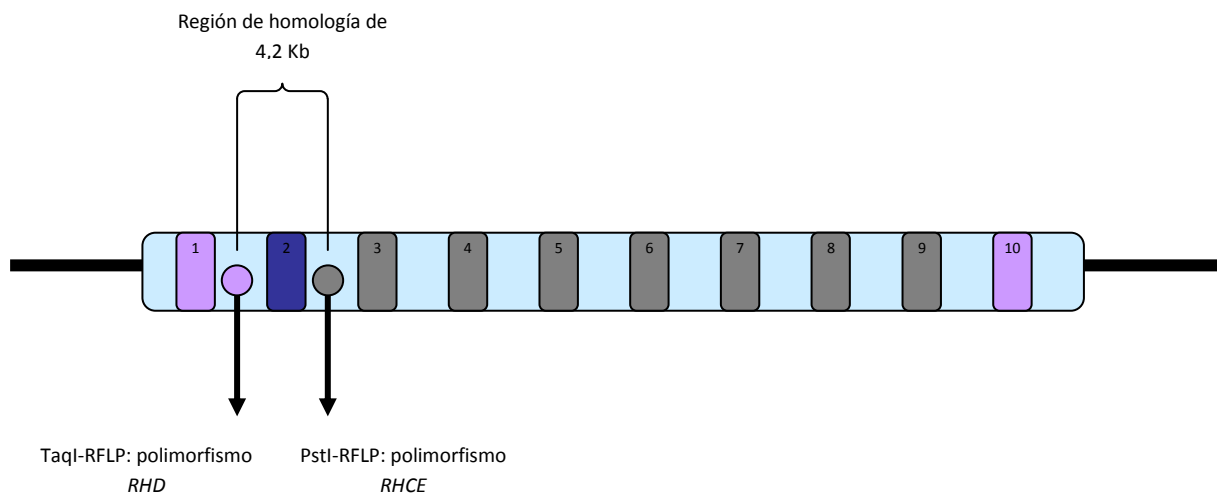


Figura 26: Representación esquemática de la estructura molecular de los polimorfismos hallados en los alelos estudiados. Los rectángulos lilas representan exones del gen *RHD*, los grises corresponden a exones del gen *RHCE* y el rectángulo azul representa la región de homología identificada en el exón 2. Las esferas lilas y grises representan las regiones de los intrones 1 y 2 analizadas por PCR RFLP, respectivamente.

Los resultados obtenidos en los análisis realizados por PCR RFLP sugieren que el sitio de recombinación se encuentra en una región de homología de 4,2 Kb que separa ambos polimorfismos.

Para completar el estudio del origen del exón 2 de este alelo híbrido se secuenció la región de este exón del gen *RHD* en las muestras portadoras de este alelo. Los estudios de secuenciación mostraron la presencia de la mutación puntual de cambio de sentido *c.329T>C* en 7 de las muestras estudiadas. Este polimorfismo es característico del alelo parcial *RHD*DVII*, sugiriendo que la variante encontrada podría ser resultado de un evento de recombinación homóloga entre un alelo *RHD*DVII* y secuencias *RHCE*. Esta nueva estructura híbrida fue denominada *RHD(329T>C)-CE(3-9)-D*. Los alelos hallados en las 8 muestras restantes probablemente correspondan a la variante *RHD-CE(2-9)-D* ya descrita (Figura 27).

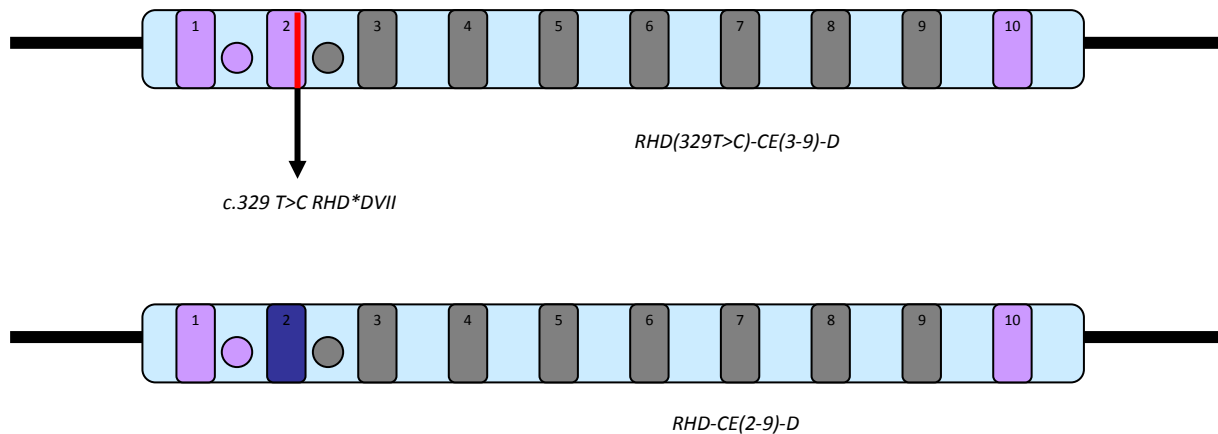


Figura 27: Representación esquemática de las estructuras moleculares de los alelos hallados. Los rectángulos lilas representan exones del gen *RHD*, los grises corresponden a exones del gen *RHCE* y el rectángulo azul representa la región de homología identificada en el exón 2. Las esferas lilas y grises representan las regiones de los intrones 1 y 2 analizadas por PCR RFLP, respectivamente. La línea roja señala el SNP *c.329T>C*.

2.2.5.2. Caracterización molecular del alelo *RHCE(1-2)-RHD(3_{361_371del11}-10)*

Los resultados obtenidos por la estrategia de microarreglos de ADN mostraron la ausencia de los exones 1 y 2 del gen *RHD* y el polimorfismo *c.361_371del11* en una muestra con expresión del antígeno C. Estos hallazgos sugieren que este alelo es una nueva estructura híbrida que resulta de la recombinación homóloga entre el alelo nulo *RHD(361_371del11)* y secuencias *RHCE*. La nueva variante *RHD* fue denominada *RHCE(1-2)-RHD(3_{361_371del11}-10)*. En la siguiente figura se observa una representación del alelo producto de ambas mutaciones.

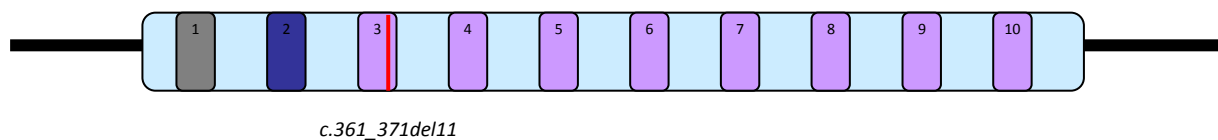


Figura 28: Representación esquemática de la estructura molecular del nuevo alelo *RHCE(1-2)-RHD(3_{361_371del11}-10)*. El rectángulo color gris representa el exón 1 del gen *RHCE*, los rectángulos lilas los exones del gen *RHD* y el rectángulo azul representa la región de homología identificada en el exón 2. La línea roja señala el sitio donde ocurre la deleción de 11 nucleótidos característica de este alelo.

Además, se analizó el sitio de recombinación entre los genes *RHD* y *RHCE* estudiando los polimorfismos presentes en los intrones 1 y 2, como se describe en los ítems 1.3.3.4.1.1. y 1.3.3.4.1.2. de Materiales y Métodos. Los resultados indicaron nuevamente que la recombinación entre ambos genes ocurre en la región de homología de 4,2 Kb ubicada entre los polimorfismos analizados. En la región del intrón 1 se hallaron secuencias *RHCE* específicas mientras que los estudios del intrón 2 revelaron la presencia de un polimorfismo *RHD* específico,

al igual que en los alelos *RHD-CE(3-9)-D*. En la Figura 29 se muestra el resultado del estudio de los polimorfismos de los intrones 1 y 2 en la muestra analizada.

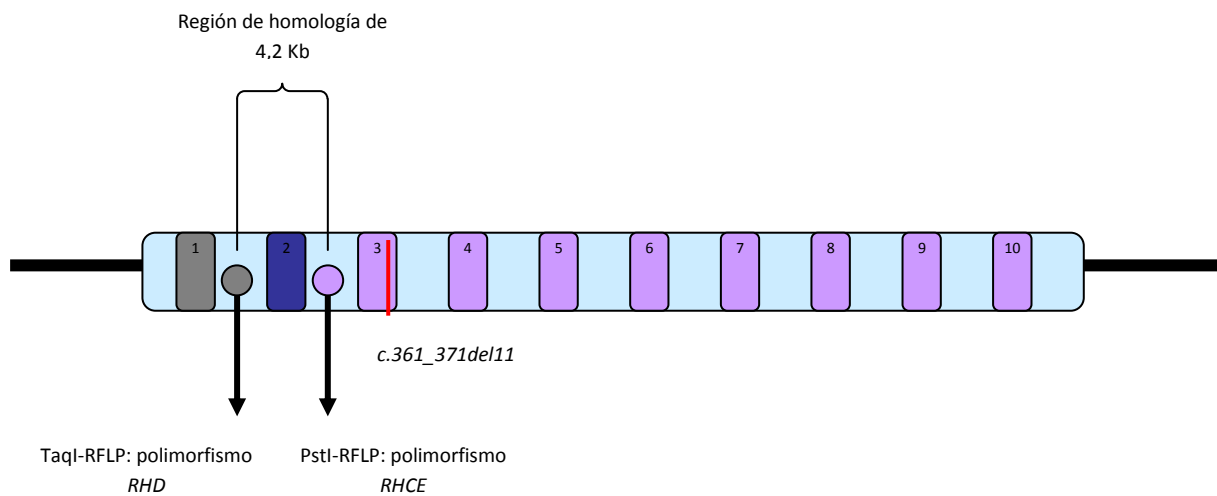


Figura 29: Representación esquemática de la estructura molecular de los polimorfismos hallados en el alelo *RHCE(1-2)-RHD(3_{361_371del11}-10)*. Los rectángulos lilas representan exones del gen *RHD*, los grises corresponden a exones del gen *RHCE* y el rectángulo azul representa la región de homología de 4,2 Kb. La línea roja señala el polimorfismo *c.361_371del11*. Las esferas gris y lila representan los polimorfismos *RHCE* y *RHD* hallados en los intrones 1 y 2 del gen *RHD*, respectivamente.

2.2.6. Estudios complementarios en las muestras portadoras de alelos nuevos

2.2.6.1. Nuevos estudios serológicos

Se realizaron nuevos estudios serológicos en muestras portadoras de los alelos *RHD*581insG*, *RHD*46C*, *RHD*1001A*, *RHCE(1-2)-RHD(3_{361_371del11}-10)* y *RHD*1248insG* utilizando los anticuerpos anti-D descritos en el ítem 1.2.1.1 de Materiales y Métodos y ensayos de adsorción y elución. El análisis con diferentes clones mostró una expresión extremadamente débil del antígeno D en muestras con las variantes alélicas *RHD*46C* y *RHD*1248insG*. Por otro lado, los ensayos de adsorción y elución confirmaron la presencia de anti-D en el eluato en portadores de estas dos variantes. Estos resultados demostraron que la mutación puntual de cambio de sentido *c.46T>C* y la inserción de la G en la posición 1248 del gen *RHD* eran responsables de la generación de un fenotipo DEL. Los resultados de estos análisis pueden observarse en la Tabla XIII.

Tabla XIII: Estudios serológicos del antígeno D en las muestras D negativo portadoras de los alelo *RHD*581insG*, *RHD*46C*, *RHD*1001A*, *RHCE(1-2)-RHD(3_{361-371del11}-10)* y *RHD*1248insG*

Reactividad anti-D					Alelo <i>RH</i>
IgM+IgG TH28+MS26	IgM MS201	IgM RUM1	IgM LDM+ESD1M	AE	
-	-	NT	NT	-	<i>RHD*581insG</i> Delección <i>RHD</i>
-	w	-	-	+	<i>RHD*46C</i> Delección <i>RHD</i>
-	-	-	-	-	<i>RHD*1001A</i> Delección <i>RHD</i>
-	-	-	-	-	<i>RHCE(1-2)-RHD(3_{361-371del11}-10)</i> Delección <i>RHD</i>
-	-	w	NT	+	<i>RHD*1248insG</i> Delección <i>RHD</i>

NT: no testeado. AE: técnica de adsorción-elución. w: expresión antigénica débil.

2.2.6.2. Estudio de muestras portadoras del alelo *RHD*46C*

Por otro lado, se analizaron 5 muestras portadoras del alelo *RHD*46C* con un panel de 12 viales con anticuerpos monoclonales anti-D de clase IgG dirigidos contra diferentes epitopes del antígeno D. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla XIV.

Tabla XIV: Estudio serológico de las muestras D negativo portadoras del alelo *RHD*46C* con anticuerpos monoclonales anti-D IgG

Muestras <i>RHD*46C</i>	Reactividad anti-D											
	LHM76/ 58	LHM76/ 59	LHM174 /102	LHM50/ 2B	LHM169 /81	ESD1	LHM76/ 55	LHM77/ 64	LHM70/ 45	LHM59/ 19	LHM169 /80	LHM57/ 17
1	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los resultados de los estudios serológicos realizados en las muestras portadoras del alelo *RHD*46C* con el panel de anticuerpos monoclonales mostraron un patrón de aglutinación extremadamente débil para 3 muestras con el reactivo anti-D clon LHM50/2B y resultados negativos en el resto de las muestras con todos los antiseros anti-D utilizados.

2.2.6.3. Modelo de la estructura tridimensional del trímero RhD-RhCE-RhAG

La proteína RhD se encuentra anclada a la membrana eritrocitaria formando un complejo trimérico junto con las proteínas RhCE y RhAG, llamado complejo Rh. Los extremos amino y carboxilo terminales de estas proteínas se encuentran orientados hacia la región intracelular del GR. El polimorfismo 46C en el gen *RHD* genera el cambio aminoacídico en la posición 16 de la proteína RhD de un Trp por una Arg. En la Figura 30 puede observarse un modelo del complejo Rh donde se señala la sustitución *p.Trp16Arg* en la proteína RhD.

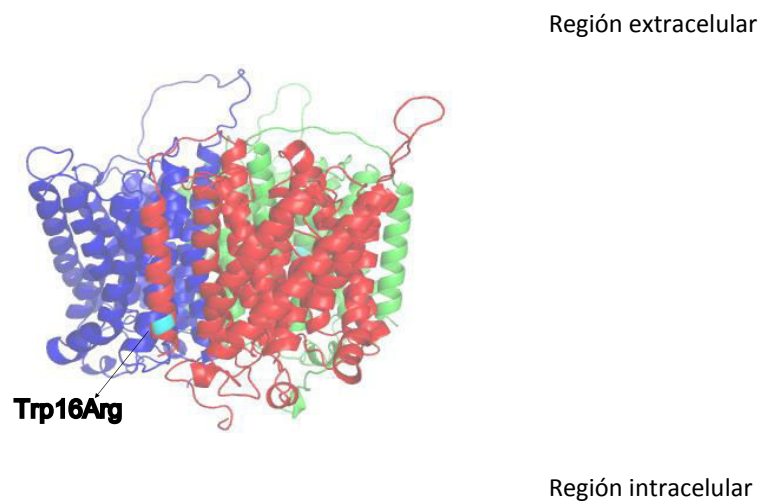


Figura 30: Complejo Rh: Proteína RhD-RhCE-RhAG. La proteína RhD está representada en color rojo, la proteína RhCE en color verde y la glicoproteína RhAG en color azul. El cambio de aminoácido *p.Trp16Arg* en la proteína RhD, señalado en color celeste, se encuentra en un segmento transmembrana cerca de la región intracelular del GR.

La modelización del complejo Rh con la introducción del cambio aminoacídico *p.Trp16Arg* en la proteína RhD permitió determinar que dicha mutación se encuentra en el primer dominio transmembrana del polipéptido, cerca de la región intracelular del GR. La sustitución *p.Trp16Arg* genera la introducción de un residuo cargado positivamente. Probablemente este cambio aminoacídico provoca la desestabilización de la estructura del polipéptido, debido a la carga de la Arg y al ambiente hidrofóbico de la membrana, afectando el correcto plegamiento de la proteína RhD y alterando en consecuencia la expresión del antígeno D en la superficie eritrocitaria.

En la Tabla XV se resumen los alelos encontrados en las muestras con fenotipo D negativo C/E positivo.

Tabla XV. Alelos *RHD* hallados en las muestras D-/*RHD*+ con expresión de los antígenos C y/o E

Muestras D negativo				
Alelo <i>RHD</i>	Polimorfismo detectado	n=133	Frecuencia	Fenotipo observado
	Inserción 37 pb			
<i>RHD</i> ψ	<i>c.609G>A, c.654G>C, c.667T>G, c.674C>T, c.807T>G</i>	1	0,75%	Ccee
<i>RHD-CE-D</i> ⁵	Escaneo de exones: 3-7 negativos, exón 3 híbrido , 733 C>G (exón 5)	57	42,86%	Ccee
		1	0,75%	CcEe
<i>RHD*46C</i>	<i>c.46T>C</i>	12	9,03%	ccEe
<i>RHD*581insG</i>	Inserción de G en posición 581 del gen <i>RHD</i>	19	14,29%	ccEe
<i>RHD*M295I</i>	<i>c.885G>T</i>	4	3,01%	Ccee
<i>RHD(329T>C)-CE(3-9)-D</i>	Escaneo de exones 3-9 negativos <i>c.329T>C</i>	7	5,26%	Ccee
<i>RHD-CE(2-9)-D</i>	Escaneo de exones 2-9 negativos	8	6,02%	Ccee
<i>RHD-CE(4-8)-D</i>	Escaneo de exones 4-8 negativos	1	0,75%	Ccee
<i>RHD-CE(4-7)-D₂</i>	Escaneo de exones 4-7 negativos	1	0,75%	ccEe
<i>RHD-CE(4-9)-D</i>	Escaneo de exones 4-9 negativos	1	0,75%	Ccee
<i>RHD(IVS3+1G>A)</i>	<i>c.IVS3+1g>a</i>	2	1,50%	Ccee
<i>RHD*1001A</i>	<i>c.1001T>A</i>	1	0,75%	ccEe
<i>RHCE(1-2)-RHD(3_{361_371del11}-10)</i>	<i>c.361_371del11</i> Ausencia de exones 1 y 2 del gen <i>RHD</i>	1	0,75%	Ccee
<i>RHD*1248insG</i>	Inserción de G en posición 1248 del gen <i>RHD</i>	1	0,75%	Ccee
Sin identificar		16	12,03%	Ccee (n=13), ccEe (n=2), CcEe (n=1)

*Frecuencia de muestra

Los estudios moleculares realizados en este trabajo de Tesis permitieron detectar 98 muestras (12,31%) portadoras de alelos silentes y 19 (2,39%) portadoras de alelos DEL.

En las siguientes figuras se muestran los alelos *RHD* identificados en las muestras de las distintas regiones del país estudiadas.

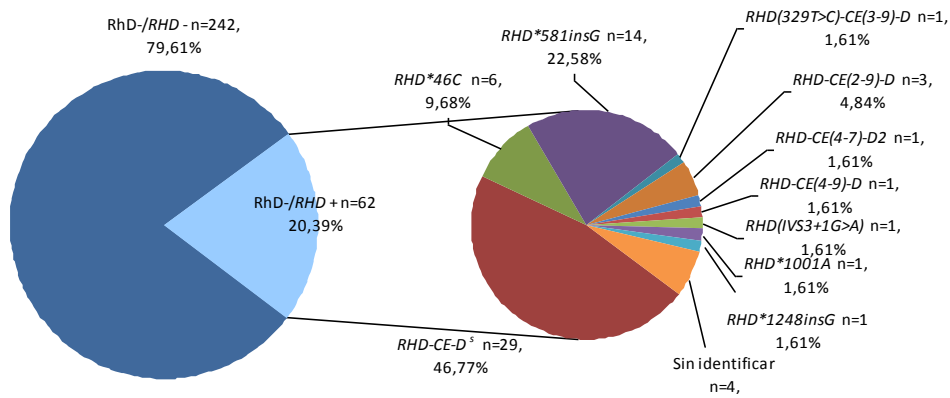


Figura 31. Distribución de individuos con fenotipo D negativo portadores de variantes alélicas RHD provenientes de Tucumán

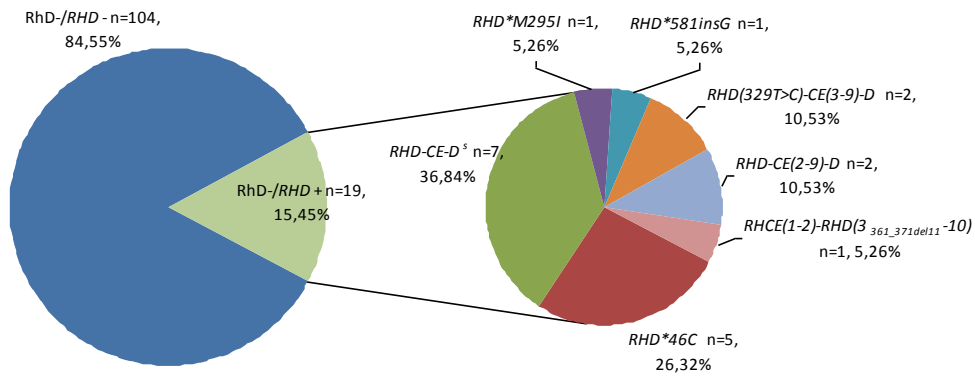


Figura 32. Distribución de individuos con fenotipo D negativo portadores de variantes alélicas RHD provenientes de Rosario

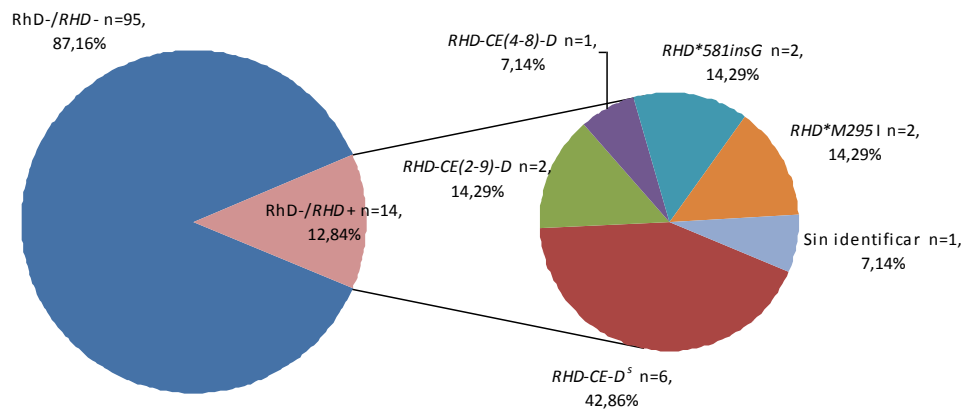


Figura 33. Distribución de individuos con fenotipo D negativo portadores de variantes alélicas *RHD* provenientes de La Plata

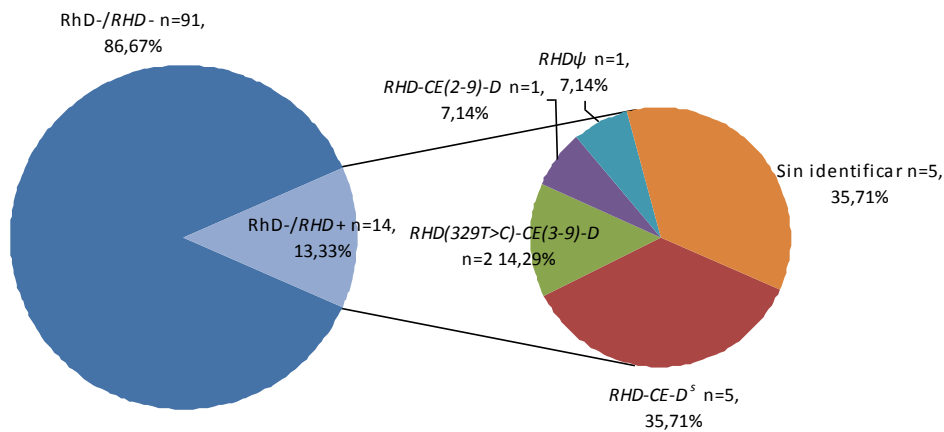


Figura 34. Distribución de individuos con fenotipo D negativo portadores de variantes alélicas *RHD* provenientes de Córdoba

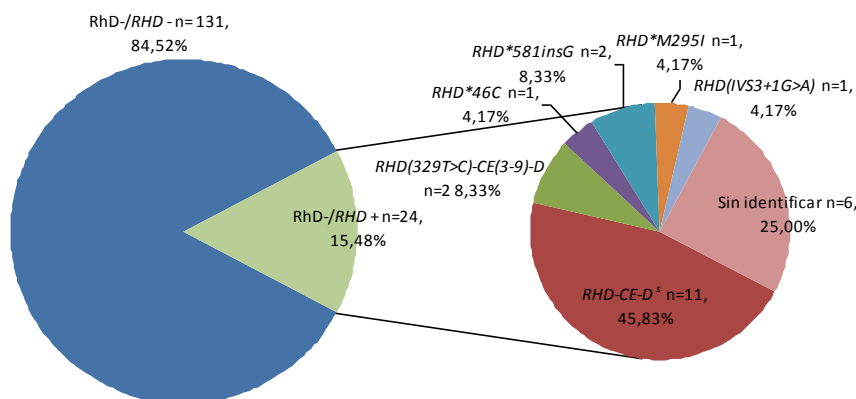


Figura 35. Distribución de individuos con fenotipo D negativo portadores de variantes alélicas *RHD* provenientes de CABA

Los resultados obtenidos mostraron que la proporción de individuos portadores del nuevo alelo nulo *RHD*581insG* difiere significativamente ($p < 0,05$) en las ciudades estudiadas, siendo la proporción de individuos portadores de esta variante significativamente mayor ($p < 0,05$) en Tucumán que en las otras 4 ciudades donde no difieren entre sí.

Considerando los individuos *D-/RHD+*, los resultados obtenidos mostraron que la proporción de portadores del alelo *RHD*581insG* fue significativamente mayor en la ciudad de Tucumán (22,58%) que la proporción promedio en las 4 otras ciudades (7,04%), $p < 0,05$.

Al comparar las proporciones de individuos portadores del alelo *RHD-CE-D^s* en las 5 ciudades no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, $p > 0,30$.

3. Estudio del fenotipo Rh completo y genotipo *RH* en muestras con expresión disminuida del antígeno D

3.1. Estudios serológicos

3.1.1. Determinación del fenotipo Rh completo

Se tipificaron los antígenos C, c, E y e en todas las muestras con fenotipo D variante mediante la técnica descrita en el ítem 1.2.2.1. del apartado Materiales y Métodos.

En la Figura 36 se muestran los resultados obtenidos del estudio del fenotipo Rh completo para las muestras con expresión disminuida del antígeno D.

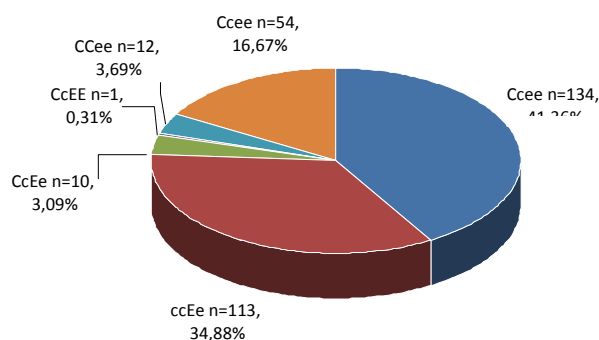


Figura 36. Distribución de los fenotipos Rh observados en las muestras con expresión débil del antígeno D

La Tabla XVI muestra la frecuencia de los antígenos C y E en las muestras con fenotipo Dvar estudiadas.

Tabla XVI. Frecuencia de los antígenos C y E en las muestras con fenotipo D variante

Ciudad	Antígeno	
	C	E
Tucumán	46,94%	35,71%
Rosario	58,58%	34,34%
La Plata	46,34%	51,22%
Córdoba	54,05%	32,43%
CABA	53,06%	46,94%

No se observaron diferencias significativas en las proporciones de muestras con fenotipo Dvar portadoras del antígeno C ni Dvar con expresión del antígeno E en las 5 regiones estudiadas ($p > 0,21$, prueba de Chi-cuadrado (χ^2)).

3.2. Estudios moleculares

3.2.1. Obtención de ADN genómico de sangre periférica

Se extrajo el ADN genómico de todas las muestras que presentaron un fenotipo D variante mediante el micro-método de *salting out* modificado (ítem 1.3.1. de Materiales y Métodos). La calidad y cantidad del ADN fue controlada como se indicó en el ítem 1.3.1.1 de la sección Materiales y Métodos. Todas las muestras incluidas en este estudio presentaron una concentración entre 100 y 200 ng/ μ l y no mostraron degradación del ADN.

3.2.2. PCR multiplex: amplificación del intrón 4 y de la región 3' no codificante del gen *RHD*

Los estudios de detección del gen *RHD* utilizando la estrategia de PCR multiplex (ítem 1.3.2.1. de Materiales y Métodos) mostraron amplificación de los 3 fragmentos génicos (1238 pb y 587 pb correspondientes al intrón 4 de ambos genes *RHCE* y *RHD* y el segmento de 229 pb específico del extremo 3' no codificante del gen *RHD*) en 309 de las muestras con fenotipo Dvar estudiadas. Por otro lado, en 15 muestras se observaron sólo los productos de 1238 pb y 229 pb, patrón de amplificación característico de alelos híbridos.

En la Tabla XVII se detalla el número de muestras estudiado, los fenotipos hallados y los resultados obtenidos utilizando la estrategia de PCR multiplex.

Tabla XVII. Fenotipo Rh completo y genotipificación *RHD* en muestras con fenotipo Dvar

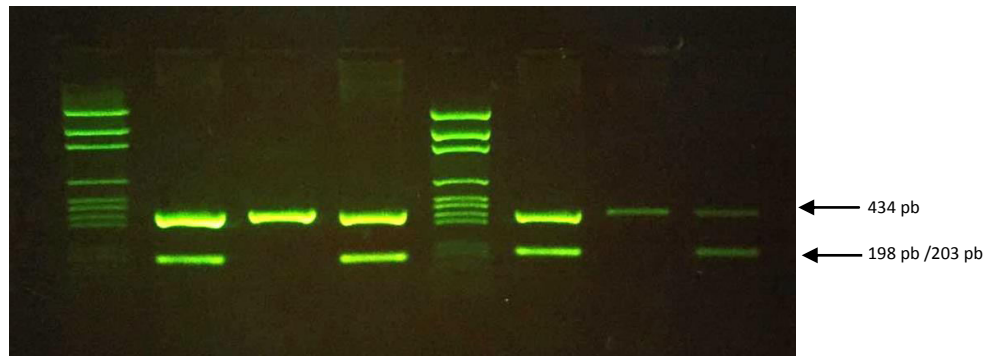
Dvar (n=324)		
Fenotipo	n	PCR multiplex
Ccee	120	1238 pb - 587 pb - 229 pb
	14	1238 pb- 229 pb
CcEe	10	1238 pb - 587 pb - 229 pb
ccEe	112	1238 pb - 587 pb - 229 pb
	1	1238 pb -229 pb
ccee	54	1238 pb - 587 pb - 229 pb
CCee	12	1238 pb - 587 pb - 229 pb
CcEE	1	1238 pb - 587 pb - 229 pb

3.2.3 Estudios de cigosidad

El estudio del estado homocigota o hemicigota del gen *RHD* en las muestras con fenotipo Dvar permitió identificar la presencia de una única caja Rhesus híbrida en 323 muestras, demostrando la presencia de una sola copia del gen *RHD* (hemicigosis). Además, los resultados obtenidos indicaron que en la muestra restante, el gen *RHD* se encontraba en homocigosis.

3.2.4. PCR SSP para la detección de alelos *D débil tipo 1, 2, 3 y 4*

Los resultados obtenidos del estudio de los alelos *D débil tipo 1, 2, 3 y 4* en las muestras con expresión disminuida del antígeno D se describen en la Tabla XVIII. En la Fotografía 6 se observa el resultado obtenido para una muestra portadora de un alelo *D débil tipo 1* y una portadora de un alelo *D débil tipo 2*.



Fotografía 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe de los productos de amplificación obtenidos en la estrategia de PCR SSP para los alelos *D débil tipo 1* y *D débil tipo 2*.

Calle 1 y 5: marcador de peso molecular (pGEM DNA Markers, Promega). La banda de mayor peso molecular corresponde a un fragmento de ADN de 2645 pb. Luego se observan bandas de 1605 pb, 1198 pb, 676 pb, 517 pb, 460 pb, 396 pb y 350 pb.

Calle 2: control positivo de la variante alélica *D débil tipo 1*. Se observan 2 productos de amplificación, uno de 434 pb correspondiente al control interno de reacción *HGH* y uno de 198 pb correspondiente al producto específico del alelo *D débil tipo 1*.

Calle 3: control negativo de la variante alélica *D débil tipo 1*. Se observa un producto de amplificación de 434 pb correspondiente al control interno de reacción.

Calle 4: muestra portadora de un alelo *D débil tipo 1*.

Calle 6: control positivo de la variante alélica *D débil tipo 2*. Se observan 2 productos de amplificación de 434 pb y 203 pb correspondientes al control interno de reacción y al alelo *D débil tipo 2* respectivamente.

Calle 7: control negativo de la variante alélica *D débil tipo 2*. Se observa el producto de amplificación correspondiente al control interno de reacción.

Calle 8: muestra portadora del alelo *D débil tipo 2*.

3.2.5. PCR SSP para la detección del alelo *RHD*DVII*

En estudios previos se ha reportado una alta frecuencia de muestras con fenotipo D variante portadoras del alelo parcial *RHD*DVII* en nuestra población (98). Las muestras no caracterizadas asociadas a la expresión del antígeno C fueron estudiadas a través de una estrategia de PCR SSP cuyo producto de amplificación de 279 pb refleja la presencia de dicho alelo. Los resultados obtenidos revelaron que sólo 5 de las muestras analizadas eran portadoras de esta variante alélica.

En la Tabla XVIII se detallan las muestras portadoras de alelos *D débiles* y *RHD*DVII* halladas utilizando las estrategias de PCR SSP.

Tabla XVIII. Alelos D débil y D parcial detectados por estrategias de PCR SSP

Muestras con fenotipo D variante (n=324)		
Alelo	n=324	Fenotipo
<i>D débil tipo 1</i>	82	Ccee (n=68)
		CCee (n=3)
		CcEe (n=2)
		ccee (n=9)
<i>D débil tipo 2</i>	77	ccEe (n=75)
		CcEE (n=1)
		CcEe (n=1)
<i>D débil tipo 3</i>	29	Ccee (n=26)
		CCee (n=2)
		CcEe (n=1)
<i>D débil tipo 4</i>	48	ccee (n=41)
		Ccee (n=5)
		CcEe (n=1)
<i>RHD*DVII</i>	5	Ccee (n=4)
		CcEe (n=1)
Muestras no caracterizadas	83	Ccee (n=32)
		ccee (n=3)
		CcEe (n=4)
		ccEe (n=38)
		CCee (n=6)

3.2.6. Estudio de muestras no caracterizadas

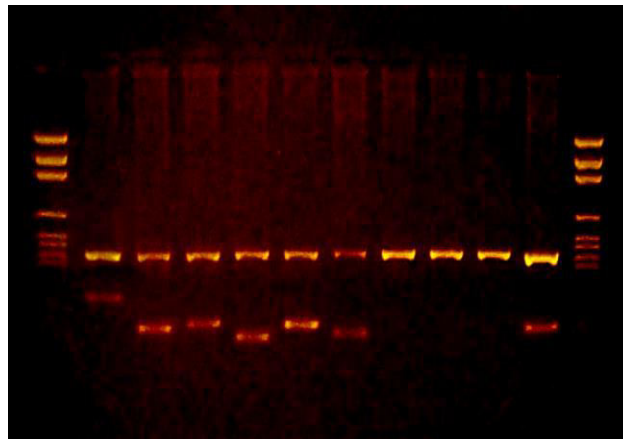
3.2.6.1. Escaneo de exones

Mediante esta estrategia se analizaron las 83 muestras con fenotipo Dvar no caracterizadas por las técnicas moleculares descritas anteriormente. Los resultados obtenidos permitieron identificar 10 muestras con fenotipo Ccee portadoras del alelo híbrido *RHD*DIVI tipo 4*, caracterizado por la ausencia de los exones 3, 4 y 5 del gen *RHD*. Además, se detectaron los siguientes alelos híbridos: *RHD*DIVI tipo 5* (fenotipo Ccee; n=1), *RHD*DIVI tipo 1* (fenotipo: ccEe; n=1) y *RHD*DIVI tipo 2* (fenotipo Ccee; n=4). Por otro lado, esta estrategia evidenció la ausencia del exón 4 del gen *RHD* en tres muestras (fenotipos: CcEe n=2; Ccee n=1), sin embargo el alelo responsable de la expresión aberrante del antígeno D no pudo ser identificado. Además, este estudio reveló la ausencia del exón 5 del gen *RHD* en otra de las muestras analizadas (fenotipo CCee). El genotipo identificado es característico de los alelos pertenecientes al clúster *RHD*DV*.

Estas últimas cuatro muestras fueron posteriormente estudiadas mediante técnicas de microarreglos de ADN.

Las 63 muestras restantes presentaron un patrón de amplificación que correspondería a un gen *RHD* aparentemente normal.

En la Fotografía 7 se observa el resultado del escaneo de exones para una muestra portadora de un alelo *RHD*DIV tipo 5*.



Fotografía 7. Patrón de amplificación de una muestra portadora del alelo *RHD*DIV tipo 5*.

Calle 1 y 12: marcador de peso molecular (pGEM DNA Markers, Promega). La banda de mayor peso molecular corresponde a un fragmento de ADN de 2645 pb. Luego se observan bandas de 1605 pb, 1198 pb, 676 pb, 517 pb, 460 pb, 396 pb y 350 pb.

Calle 2 a 11: se observan los productos de amplificación específicos para cada exón obtenidos en el escaneo de los 10 exones del gen *RHD*. En la fotografía se evidencia la ausencia de amplificación de los exones 7, 8 y 9, característica de la variante alélica *RHD*DIV tipo 5*.

3.2.6.2. Análisis por microarreglos de ADN

Se seleccionaron al azar 25 de las muestras pendientes de caracterización junto con las 3 muestras en las cuales no se detectó el exón 4 en los estudios de escaneo de exones, la muestra portadora de un alelo del clúster *RHD*DV* y la muestra que se encontraba en estado de homocigosis, para ser analizadas por la estrategia de microarreglos de ADN. Se identificaron 2 alelos *D débil tipo 5* (polimorfismo *c.446C>A*, exón 3, *p.Ala149Asp*) y 1 *D débil tipo 15* (polimorfismo *c.845G>A*, exón 6, *p.Gly282Asp*) en 3 muestras con fenotipo ccEe. Además, en la muestra en donde no se detectó el exón 5 se caracterizó al alelo híbrido *RHD*DVa* (polimorfismos *c.667T>G*, *c.697G>C*; exón 5). Por otro lado, en aquellas muestras (n=3) donde se obtuvo un resultado negativo para el exón 4 en la estrategia de escaneo de exones se identificó la presencia del alelo *RHD*DFR-2*. Por último, mediante estos estudios se logró caracterizar el

genotipo *RHD* de la muestra homocigota. Las variantes alélicas identificadas en esta muestra correspondían a un alelo *D débil tipo 1* y un alelo híbrido *RHD-CE-D^s*. Por lo tanto, esta muestra con fenotipo Dvar resultó portadora de un genotipo heterocigota *D débil tipo 1/RHD-CE-D^s*.

3.2.6.3. Secuenciación de los 10 exones del gen *RHD*

Las 22 muestras no caracterizadas por microarreglos de ADN fueron investigadas mediante estudios de secuenciación.

Los resultados mostraron que 2 muestras con fenotipo ccee y Ccee eran portadoras del alelo *RHD*DMH* (polimorfismo *c.161T>C*, exón 2, *p.Leu54Pro*), responsable de un fenotipo D parcial. Por otro lado, se detectó la presencia de los siguientes alelos *D débil*: *D débil tipo 45* (fenotipo CCee, n=1, polimorfismo *c.1195G>A*, exón 8, *p.Ala399Thr*); *D débil tipo 59* (fenotipo Ccee, n=2, *c.1148T>C*, exón 8, *p.Leu383Pro*) y *D débil tipo 48* (fenotipo Ccee, n=1, *c.182G>T*, exón 2, *p.Gly61Val*).

En la siguiente figura se observa un fragmento del cromatograma obtenido para una muestra portadora de un alelo *D débil tipo 59*.

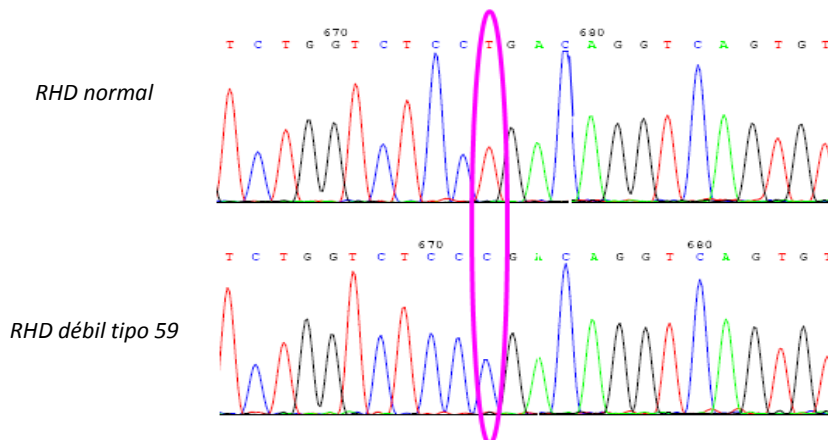


Figura 37. Fragmento del cromatograma correspondiente el exón 8 de una muestra portadora de un alelo *RHD* normal y del alelo *D débil tipo 59*. En la parte superior de la figura se muestra una fracción del cromatograma de la secuencia del exón 8 de un alelo *RHD* normal y en la parte inferior el correspondiente al alelo *D débil tipo 59*. Se indica el cambio nucleotídico T>C en la posición 1148 del gen *RHD*.

Los análisis de secuenciación permitieron además identificar 4 mutaciones puntuales no reportadas anteriormente en 4 muestras diferentes. Los polimorfismos detectados fueron *c.763G>A* (fenotipo Ccee), *c.764G>A* (fenotipo Ccee), *c.325A>G* (fenotipo CCee) y *c.911T>A* (ccEe), responsables de las sustituciones aminoacídicas *p.Gly255Arg*, *p.Gly255Glu*, *p.Thr109Ala* y *p.Ile304Asn*, respectivamente. En las Figuras 38, 39, 40 y 41 se observa un fragmento del

cromatograma obtenido de la secuenciación de los exones 2, 5 y 6 de las muestras portadoras de los alelos *RHD**325G, *RHD**763A, *RHD**764A, y *RHD**911A respectivamente y de una muestra *RHD* normal.

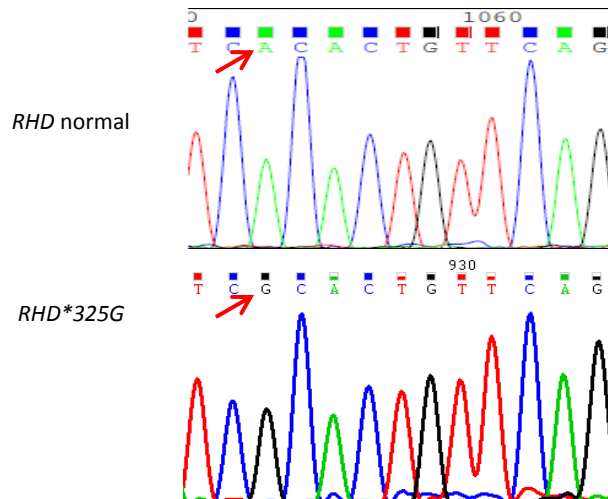


Figura 38. Cromatograma correspondiente al exón 5 del alelo *RHD325G.** En la parte superior de la figura se muestra una fracción del cromatograma de la secuencia del exón 2 de un alelo *RHD* normal y en la parte inferior el correspondiente al alelo *RHD**325G. Las flechas rojas indican el cambio nucleotídico en la posición 325 del gen *RHD*.

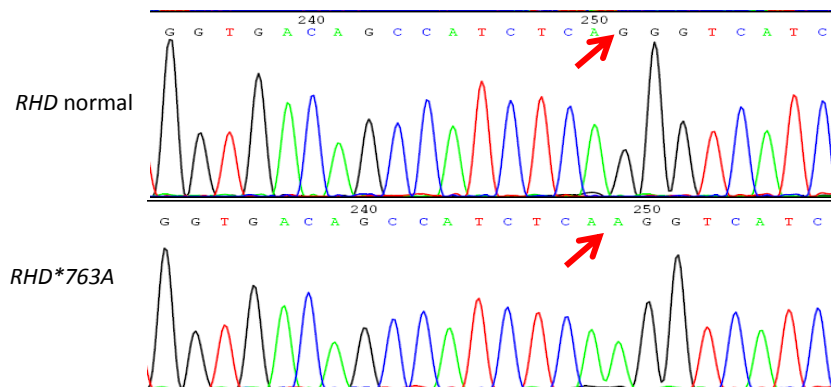


Figura 39. Cromatograma correspondiente al exón 5 del alelo *RHD763A.** En la parte superior de la figura se muestra una fracción del cromatograma de la secuencia del exón 5 de un alelo *RHD* normal y en la parte inferior el correspondiente al alelo *RHD**763A. Las flechas rojas indican el cambio nucleotídico en la posición 763 del gen *RHD*.

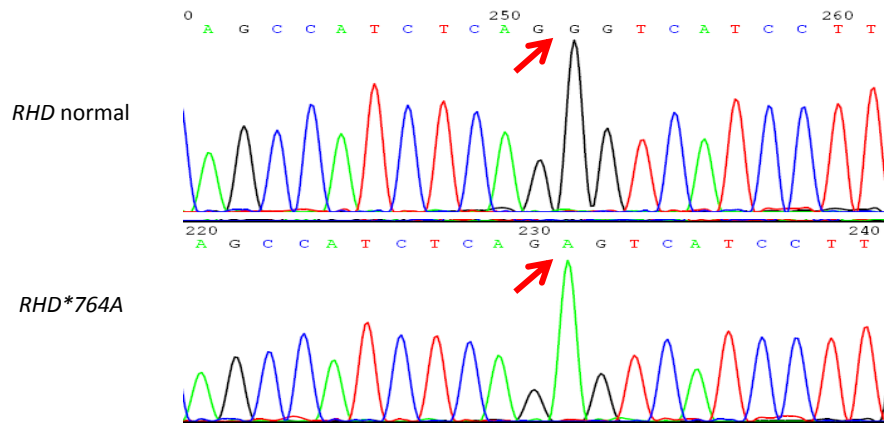


Figura 40. Cromatograma correspondiente al exón 5 del alelo *RHD*764A*. En la parte superior de la figura se muestra una fracción del cromatograma de la secuencia del exón 5 de un alelo *RHD* normal y en la parte inferior el correspondiente al alelo *RHD*764A*. Las flechas rojas indican el cambio nucleotídico en la posición 764 del gen *RHD*.

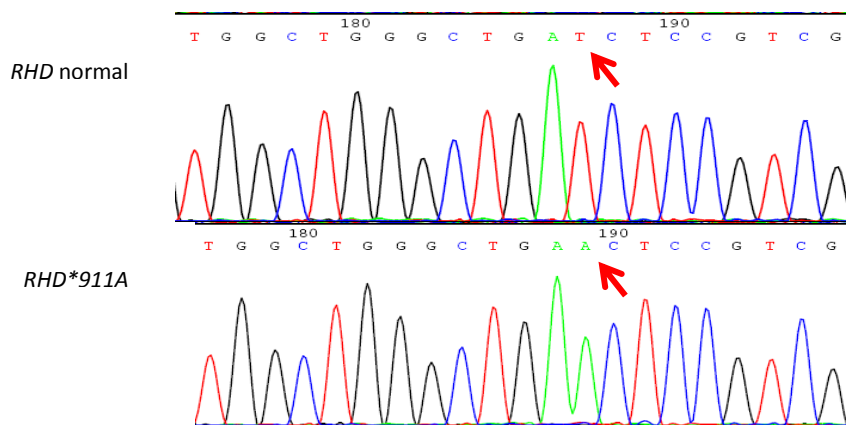


Figura 41. Cromatograma correspondiente al exón 6 del alelo *RHD*911A*. En la parte superior de la figura se muestra una fracción del cromatograma de la secuencia del exón 6 de un alelo *RHD* normal y en la parte inferior el correspondiente al alelo *RHD*911A*. Las flechas rojas indican el cambio nucleotídico en la posición 911 del gen *RHD*.

Además, los estudios de secuenciación permitieron identificar un nuevo alelo *RHD*359A*, caracterizado por la mutación puntual de cambio de sentido *c.359C>A* en el exón 3 del gen *RHD*, en 8 muestras con expresión del antígeno E. Este polimorfismo produce el cambio de una Ala por un Asp en la posición 120 ubicada en la cuarta región transmembrana de la proteína RhD. Esta nueva variante alélica fue registrada en GenBank (Accession Number KU847398) y denominada *D débil tipo 93* por la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (ISBT). En la siguiente figura se observa un fragmento del cromatograma obtenido de la secuenciación del exón 3 del gen *RHD* de una muestra portadora del polimorfismo 359A y de una muestra *RHD* normal.

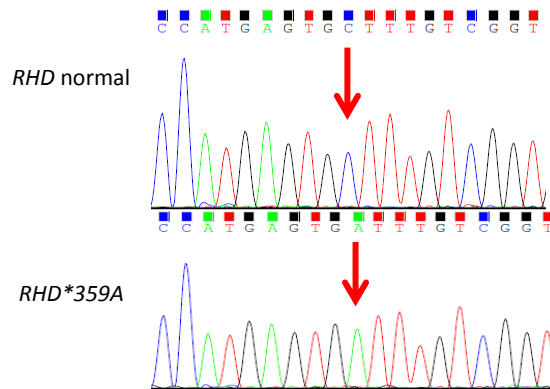


Figura 42. Cromatograma correspondiente al exón 3 del alelo *RHD*359A*. En la parte superior de la figura se muestra una fracción del cromatograma de la secuencia del exón 3 de un alelo *RHD* normal y en la parte inferior el correspondiente al alelo *RHD*359A*. Las flechas rojas indican el cambio nucleotídico en la posición 359 del gen *RHD*.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos a partir de los estudios de secuenciación, se diseñó una PCR SSP (ítem 1.3.4.5.1 de Materiales y Métodos) para la caracterización del nuevo alelo *D débil tipo 93* en muestras Dvar con fenotipo ccEe. Utilizando esta estrategia se identificaron 23 nuevas muestras portadoras de la nueva variante alélica en el grupo de las 37 muestras pendientes de caracterización.

Posteriormente, las 18 muestras no caracterizadas fueron secuenciadas y no se hallaron mutaciones en las secuencias nucleotídicas codificantes ni en las regiones de uniones exón-intrón.

3.2.7. Frecuencias de muestras con fenotipo D variante

Las frecuencias de individuos portadores de los alelos hallados en las muestras con expresión disminuida del antígeno D fueron calculadas por conteo directo. En la Tabla XIX se detallan las variantes alélicas responsables del fenotipo Dvar en las 324 muestras estudiadas.

Tabla XIX. Alelos caracterizados en las muestras con fenotipo Dvar

Alelo RHD	Polimorfismo detectado	n=324	Frecuencia*	Fenotipo Rh observado
<i>D</i> débil tipo 1	c.809 T>C (exón 6)	82	25,31%	Ccee (n=68), ccee (n=9) CCee (n=3), CcEe (n=2)
<i>D</i> débil tipo 2	c.1154 G>C (exón 9)	77	23,76%	ccEe (n=75), CcEe (n=1) CcEE (n=1)
<i>D</i> débil tipo 3	c.8 C>G (exón 1)	29	8,95%	Ccee (n=25), CCee (n=3) CcEe (n=1)
<i>D</i> débil tipo 4	c.602 C>G (exón 4)	48	14,81%	ccee (n=42), Ccee (n=5) CcEe (n=1)
<i>D</i> débil tipo 5	c.446 C>A (exón 3)	2	0,62%	ccEe
<i>D</i> débil tipo 15	c.845G>A (exón 6)	1	0,31%	ccEe
<i>D</i> débil tipo 45	c.1195G>A (exón 8)	1	0,31%	CCee
<i>D</i> débil tipo 48	c.182G>T (exón 2)	1	0,31%	Ccee
<i>D</i> débil tipo 59	c.1148T>C (exón 8)	2	0,62%	Ccee
<i>D</i> débil tipo 93	c.359C>A	31	9,57%	ccEe
RHD*DIV tipo 5	Escaneo de exones RHD: exones 7,8 y 9 negativos	1	0,31%	Ccee
RHD*DVII	c.329 T>C (exón 2)	5	1,54%	Ccee (n=4), CcEe (n=1)
RHD*DVa	Escaneo de exones RHD: exón 5 negativo	1	0,31%	CCee
RHD*DVI tipo 1	Escaneo de exones RHD: exones 4 y 5 negativos	1	0,31%	ccEe
RHD*DVI tipo 2	Escaneo de exones RHD: exones 4, 5 y 6 negativos	4	1,23%	Ccee
RHD*DVI tipo 4	Escaneo de exones RHD: exones 3, 4 y 5 negativos	10	3,09%	Ccee
RHD*DMH	c.161T>C (exón 2)	2	0,62%	Ccee (n=1), Ccee (n=1)
RHD*DFR-2	c.505 A>C, c.509 T>G, c.514 A>T, c.544 T>A, c.577 G>A, c.594 A>T, c.602 C>G	3	0,92%	CcEe (n=2), Ccee (n=1)
<i>D</i> débil tipo 1/ RHD-CE-D ^s	c.809 T>C (exón 6) Escaneo de exones RHD: exones 4, 5, 6 y 7 negativos	1	0,31%	Ccee
RHD*325G	c.325A>G (exón 2)	1	0,31%	CCee
RHD*763A	c.763G>A	1	0,31%	Ccee
RHD*764A	c.764G>A	1	0,31%	Ccee
RHD*911A	c.911T>A	1	0,31%	ccEe
Sin identificar		18	5,55%	Ccee (n=9), CCee (n=3), CcEe (n=2), ccEe (n=2), ccee (n=2)

*Frecuencia de muestra

El análisis de las muestras con fenotipo D variante permitió determinar que el 58,02% de las mismas son portadoras de alelos *D débil tipo 1, 2 y 3*, para los cuales no se ha reportado aloinmunización anti-D.

En las siguientes figuras se presentan las frecuencias de los individuos portadores de los alelos responsables de un fenotipo Dvar hallados en las diferentes zonas del país.

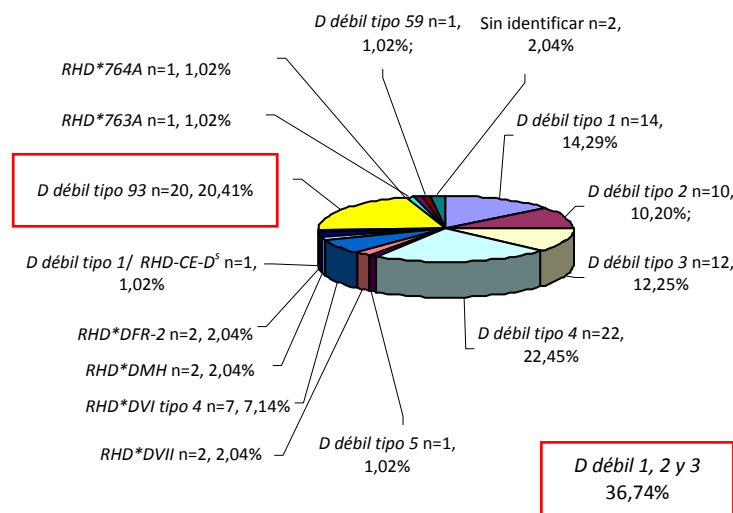


Figura 43. Distribución de individuos portadores de variantes alélicas *RHD* responsables de fenotipos D variante provenientes de Tucumán

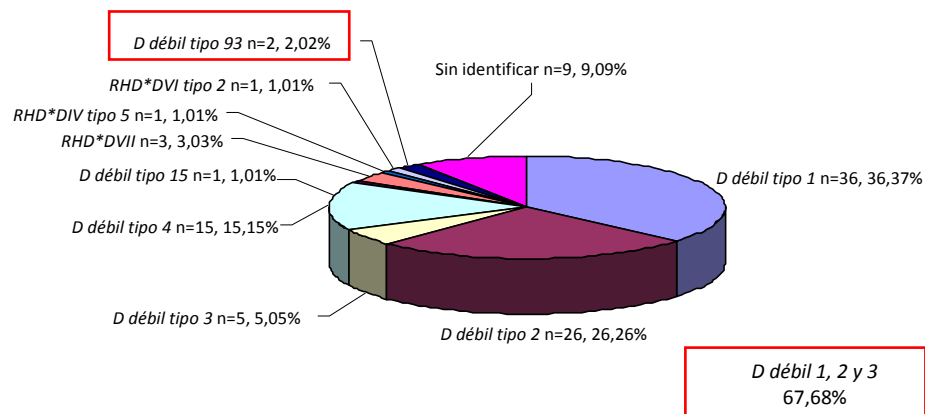


Figura 44. Distribución de individuos portadores de variantes alélicas *RHD* responsables de fenotipos D variante provenientes de Rosario

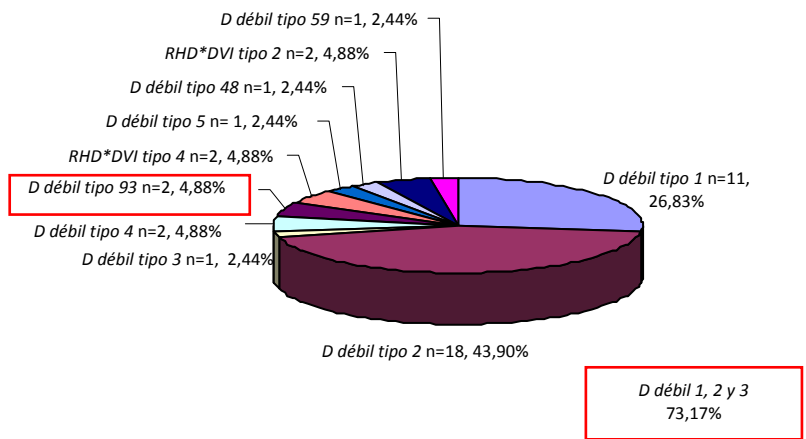


Figura 45. Distribución de individuos portadores de variantes alélicas *RHD* responsables de fenotipos D variante provenientes de La Plata

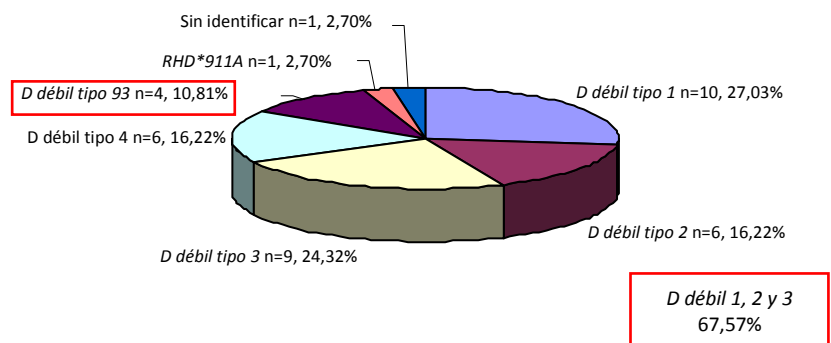


Figura 46. Distribución de individuos portadores de variantes alélicas *RHD* responsables de fenotipos D variante provenientes de Córdoba

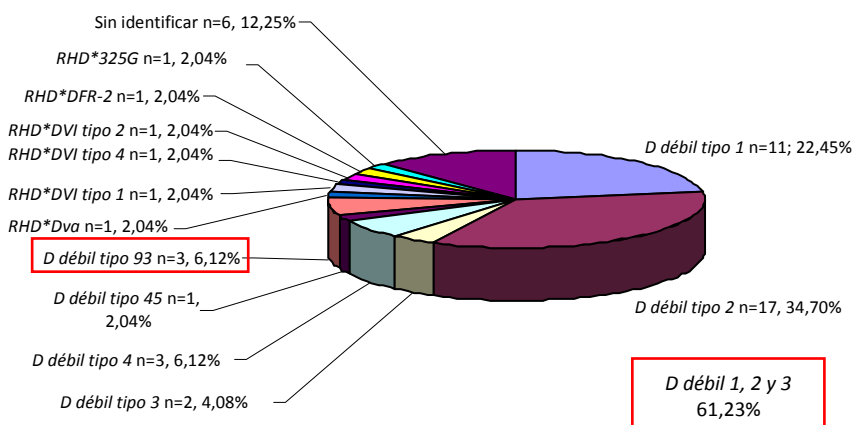


Figura 47. Distribución de individuos portadores de variantes alélicas *RHD* responsables de fenotipos D variante provenientes de CABA

La proporción de individuos portadores de alelos D variante en las distintas regiones del país estudiadas difieren significativamente ($p < 0,0005$).

Los resultados obtenidos mostraron que la probabilidad de encontrar un individuo portador de alelos *D débil tipo 1, 2 o 3* en las muestras Dvar provenientes de Tucumán (36,74%) fue significativamente menor ($p < 0,05$) que para las otras 4 ciudades analizadas (67,26%) donde esta proporción no mostró diferencias significativas.

Por otro lado, de los resultados obtenidos puede destacarse que entre los individuos con las variantes alélicas *D débil tipo 4* ($n=24$) y *D débil tipo 93* ($n=31$), la mayor frecuencia de portadores fue hallada en la ciudad de Tucumán (45,83% y 64,52% respectivamente).

3.3. Estudios complementarios en las muestras portadoras del alelo *D débil tipo 93*

3.3.1. Modelo de la estructura tridimensional del complejo RhD-RhCE-RhAG

Como se mencionó en el ítem 2.2.6.3. de este apartado, la proteína RhD se encuentra anclada a la membrana eritrocitaria formando un complejo trimérico con las proteínas RhCE y RhAG, llamado complejo Rh. Debido a la elevada frecuencia hallada de individuos portadores de la variante alélica *D débil tipo 93*, se modelizó el complejo Rh con el objetivo de identificar si el cambio aminoacídico *p.Ala120Asp* se produce en regiones transmembranales o intracelulares de la proteína RhD. En la Figura 48 puede observarse un modelo del trímero realizado utilizando la información obtenida del PDB en donde se introdujo el cambio *p.Ala120Asp*, generado por el polimorfismo *c.359C>A*, en el polipéptido RhD utilizando el visor molecular Pymol®.

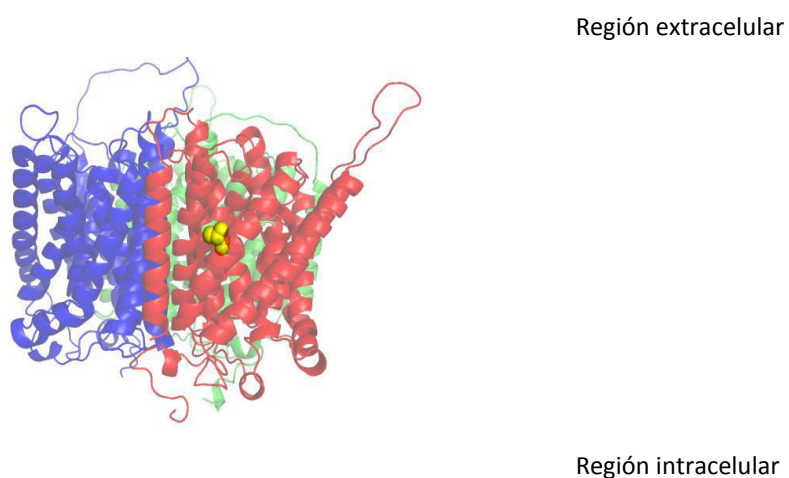


Figura 48: Complejo Rh: Proteína RhD-RhCE-RhAG. La proteína RhD está representada en color rojo, el polipéptido RhCE en color verde y la glicoproteína RhAG en color azul. El cambio de aminoácido *p.Ala120Asp* en la proteína RhD se observa en forma de esferas amarillas en la región transmembrana del GR.

La modelización del complejo Rh con la introducción del cambio aminoacídico *p.Ala120Asp* en la proteína RhD permitió determinar que dicha sustitución se localiza en el cuarto dominio transmembrana del polipéptido. La introducción de un residuo cargado negativamente (Asp) en el ambiente hidrofóbico de la membrana citoplasmática probablemente provocaría una desestabilización de la estructura del polipéptido, afectando el correcto plegamiento de la proteína RhD y alterando en consecuencia la expresión del antígeno D en la superficie eritrocitaria.

3.3.2. Estudio de los niveles de expresión del antígeno D

Para completar los estudios sobre la nueva variante alélica *D débil tipo 93* se realizaron análisis de los niveles de expresión del antígeno D en la membrana eritrocitaria mediante citometría de flujo (ítem 1.3.4.7. de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos mostraron una densidad relativa de epitopes D entre 4,1% y 14,2%. En simultáneo, a modo de controles de comparación, se analizaron muestras portadoras de alelos *D débil tipo 1* y *3*. Las muestras control presentaron rangos similares de densidad relativa de epitopes D a los observados para la nueva variante alélica. En las siguientes figuras se observan los histogramas obtenidos para todas las muestras estudiadas con los dos anticuerpos anti-D IgM utilizados.

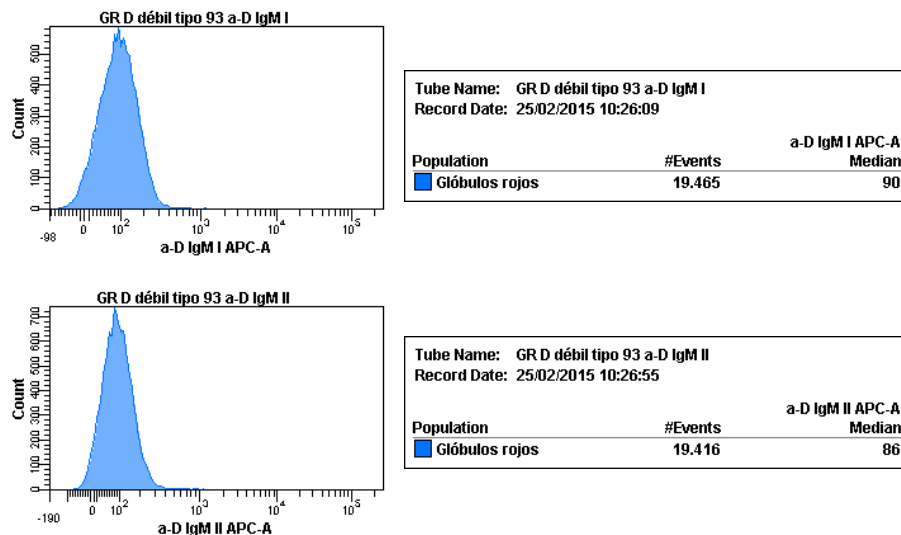


Figura 49. Histogramas obtenidos para GRs D débil tipo 93

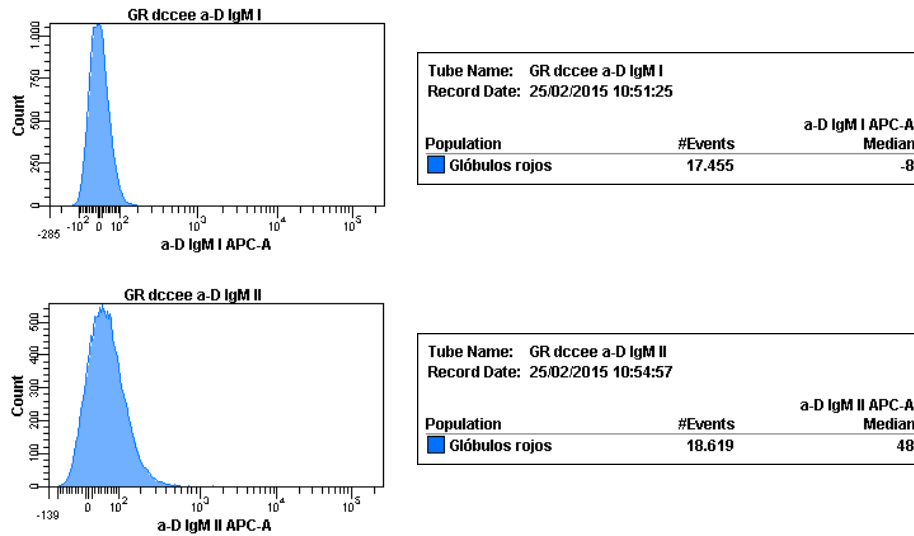


Figura 50. Histogramas obtenidos para GRs dccee

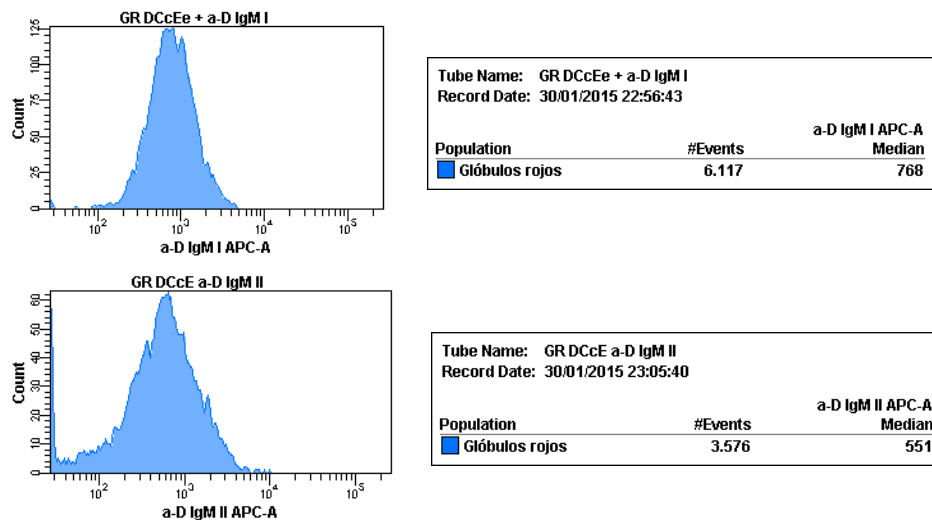


Figura 51. Histogramas obtenidos para GRs DCcEe

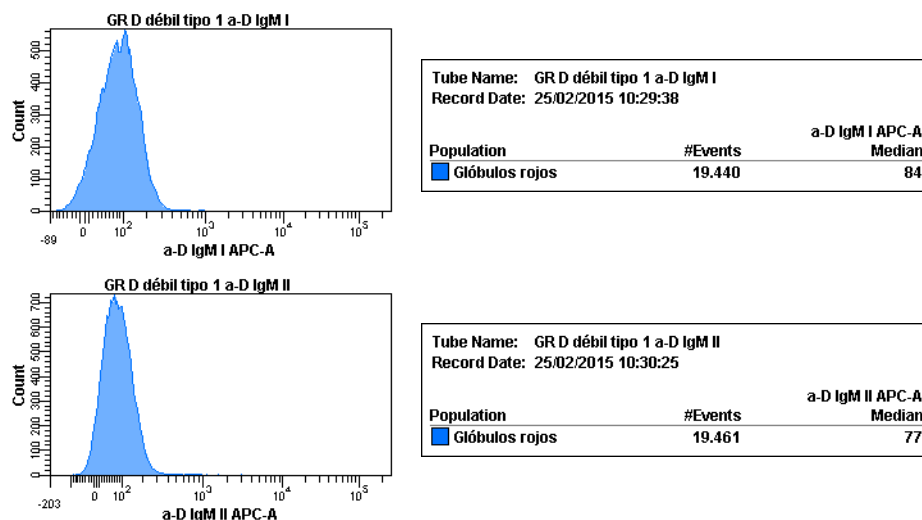


Figura 52. Histogramas obtenidos para GRs D débil tipo 1

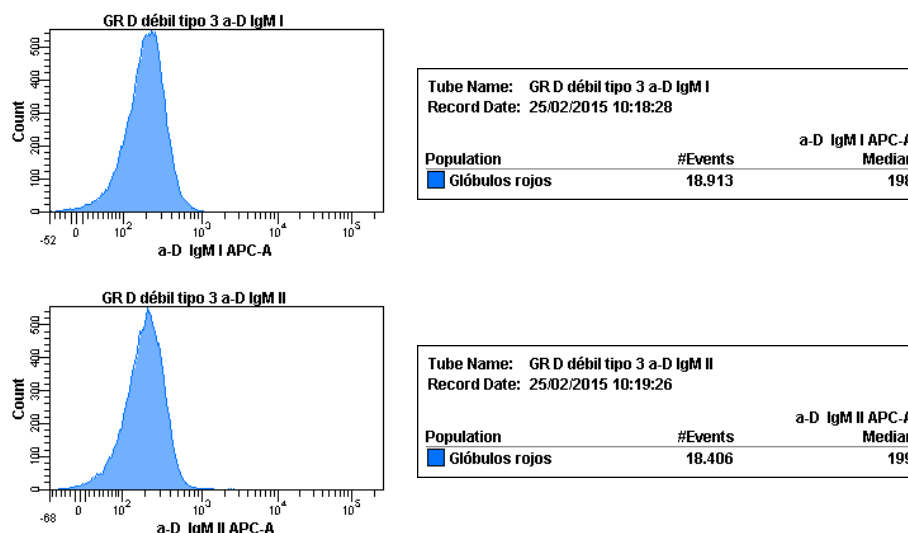


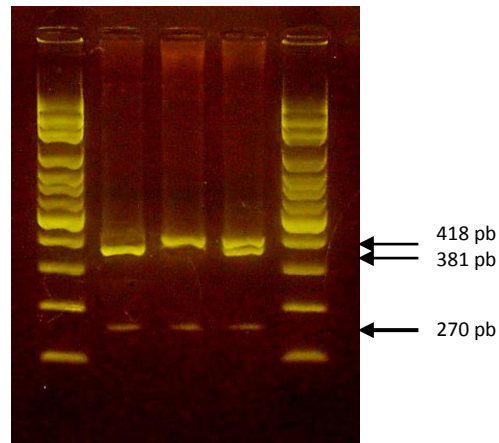
Figura 53. Histogramas obtenidos para GRs D débil tipo 3

3.4. Estudios moleculares complementarios

Debido a que los resultados obtenidos mostraron una gran variabilidad alélica del locus *RH* y una mayor prevalencia de alelos no reportados anteriormente en las muestras provenientes de Tucumán, se investigó el acervo genético de esta población analizando los marcadores moleculares *RHD* ψ y *DI**A. El alelo *RHD* ψ es característico de individuos del África subsahariana mientras que el alelo *DI**A muestra una alta prevalencia en la población amerindia. También se estudiaron las frecuencias de individuos portadores de dichos marcadores en muestras provenientes de la ciudad de Rosario y luego se compararon los datos obtenidos.

3.4.1. Detección del alelo pseudogen *RHD* ψ

Se investigó la presencia del alelo nulo *RHD* ψ en muestras D-/RHD+ de donantes provenientes de Rosario (n=1200) y Tucumán (n=221) con fenotipo ccee (ítem 1.4.1. de Materiales y Métodos). Estas muestras fueron analizadas mediante una estrategia de PCR que utiliza un par de cebadores que amplifican un producto de 381 pb en presencia de un alelo *RHD* normal y de 418 pb en presencia de un alelo *RHD* ψ , como se muestra en la Fotografía 8.



Fotografía 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe de los productos de amplificación obtenidos en la estrategia de PCR SSP para el alelo *RHDψ*.

Calle 1 y 5: marcador de peso molecular (qLadder 100 pb *Presicion*, PB-L). La banda de mayor peso molecular corresponde a un fragmento de ADN de 2000 pb. Luego se observan las bandas de 1500 pb, 1000 pb, 900 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb y 100 pb.

Calle 2: muestra portadora de un alelo *RHD* normal.

Calle 3: muestra portadora de un alelo *RHDψ*.

Calle 4: muestra portadora de un alelo *RHD* normal y un alelo *RHDψ*.

En la Figura 54 se indican las frecuencias de muestras portadoras del alelo *RHDψ* para los dos grupos estudiados.

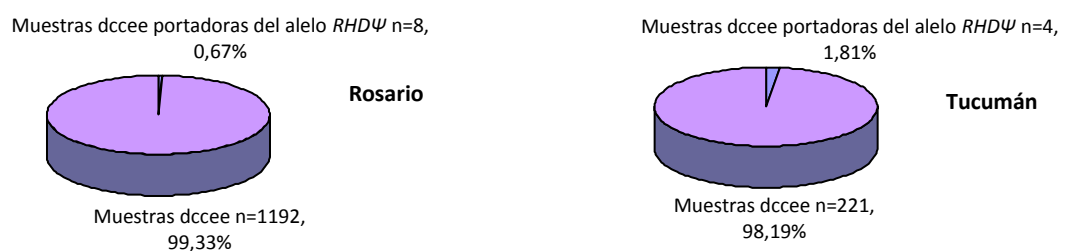


Figura 54. Frecuencia de individuos portadores del alelo *RHDψ* en muestras provenientes de Rosario y Tucumán

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la proporción de muestras portadoras del alelo *RHDψ* en los grupos estudiados ($p < 0,05$), siendo superior en las muestras provenientes de Tucumán. Estos resultados sugieren un mayor aporte de la etnia africana al acervo genético de esta población.

3.4.2. Genotipificación del grupo sanguíneo Diego

Se investigó la presencia de los alelos DI^*A y DI^*B en 178 muestras provenientes de donantes de Tucumán y 150 provenientes de Rosario (ítem 1.4.2. de Materiales y Métodos). En la siguiente figura se observan las frecuencias de muestras con los genotipos DI^*A/DI^*B y DI^*B/DI^*B en los dos grupos poblacionales analizados.

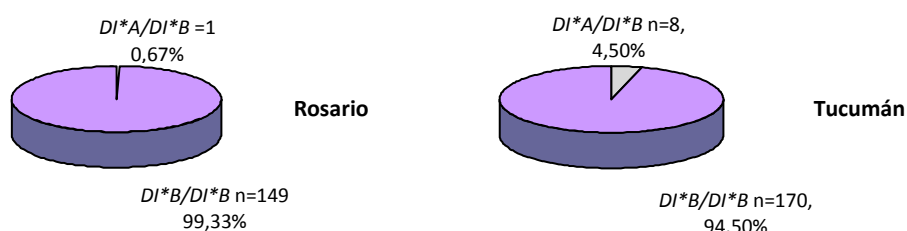


Figura 55. Frecuencia de individuos con los genotipos DI^*A/DI^*B y DI^*B/DI^*B en muestras provenientes de Rosario y Tucumán

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la distribución de muestras portadoras del genotipo DI^*A/DI^*B en los grupos estudiados ($p < 0,05$), siendo superior para las muestras provenientes de Tucumán. Estos hallazgos sugieren un mayor aporte de la etnia amerindia a esta población.

4. Determinación prenatal del genotipo *RHD*

Se estudiaron 296 muestras de sangre periférica de mujeres embarazadas D negativo.

4.1. Estudios moleculares

4.1.1. Obtención de ADN genómico de sangre periférica

Se obtuvo el ADN genómico de todas las muestras de sangre materna mediante el micro-método de *salting out* modificado. La calidad y cantidad del ADN fue controlada como se indicó en el ítem 1.3.1.1. de la sección Materiales y Métodos.

4.1.2. Análisis de la presencia de variantes *RHD* en ADN materno

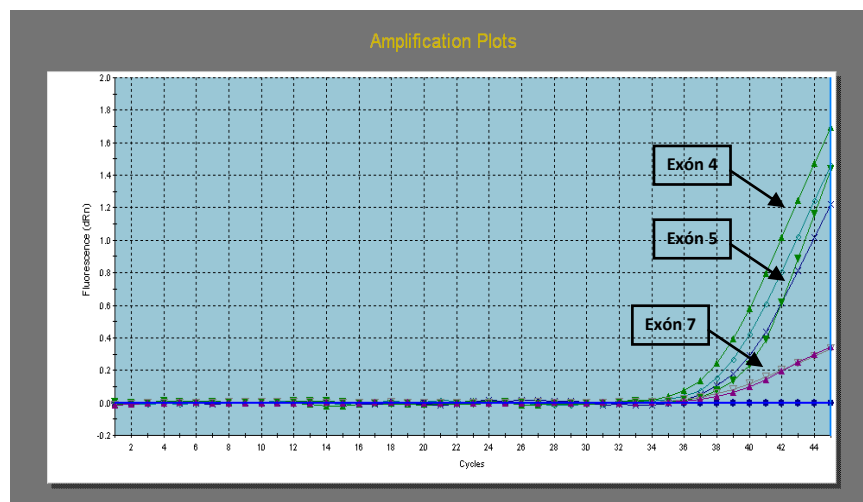
Se investigó la presencia del gen *RHD* en las 296 muestras de ADN genómico materno mediante la estrategia de PCR multiplex. En 288 de las muestras analizadas (97,30%) se observó sólo el producto de amplificación de 1238 pb correspondiente al intrón 4 del gen *RHCE*, indicando la ausencia de fragmentos *RHD* específicos (muestras D-/RHD-). En las 8 muestras restantes (2,70%) se obtuvo amplificación de segmentos génicos *RHD* específicos (muestras D-/RHD+). Los

estudios moleculares de estas muestras permitieron identificar 5 embarazadas portadoras del alelo *RHD-CE-D^s* y 3 de la variante *RHD Ψ* .

4.1.3. Genotipificación *RHD* fetal

4.1.3.1. Estudio de plasmas de embarazadas D-/*RHD*-

Los estudios realizados por PCR en tiempo real permitieron asignar el genotipo *RHD* fetal en 281 de las 288 muestras de plasma materno siguiendo los criterios descritos en el ítem 1.4.3.2.7 del apartado Materiales y Métodos. Se identificaron 205 fetos *RHD* positivo al observarse señales de amplificación para los exones 4, 5, 7 y 10 del gen *RHD* con los valores de Ct esperados para el ADN fetal (Figura 56). Por otro lado, se identificaron 76 fetos *RHD* negativo al no observarse señales para ninguno de los exones del gen *RHD*. Dentro de este último grupo, se confirmó la presencia de ADN fetal en 45 muestras al detectarse señales para el gen *SRY* (al menos 2 de 3 réplicas) (Figura 57). En los 31 plasmas restantes no se observó amplificación del gen *RHD* ni del marcador *SRY*. En estos casos, se realizó una nueva genotipificación *RHD* prenatal en una muestra de plasma obtenida 3 semanas después del primer análisis. Los resultados obtenidos fueron coincidentes con los del primer estudio permitiendo inferir un genotipo fetal *RHD* negativo.



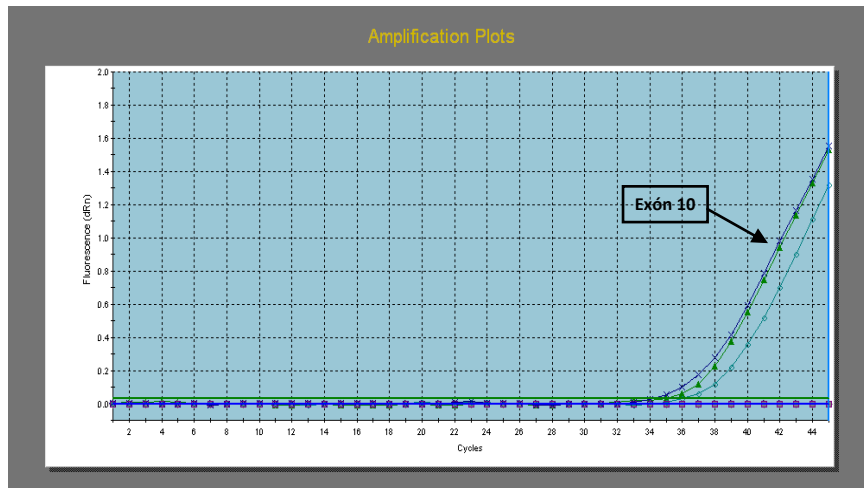


Figura 56. Gráficos de amplificación para los exones 4, 5, 7 y 10 del gen *RHD* y el gen *SRY*. En el gráfico superior pueden observarse señales de amplificación para los exones 4, 5 y 7 del gen *RHD* con los valores de Ct esperados para ADN fetal. En el gráfico inferior se observan señales para el exón 10 con valores de Ct esperados para ADN fetal.

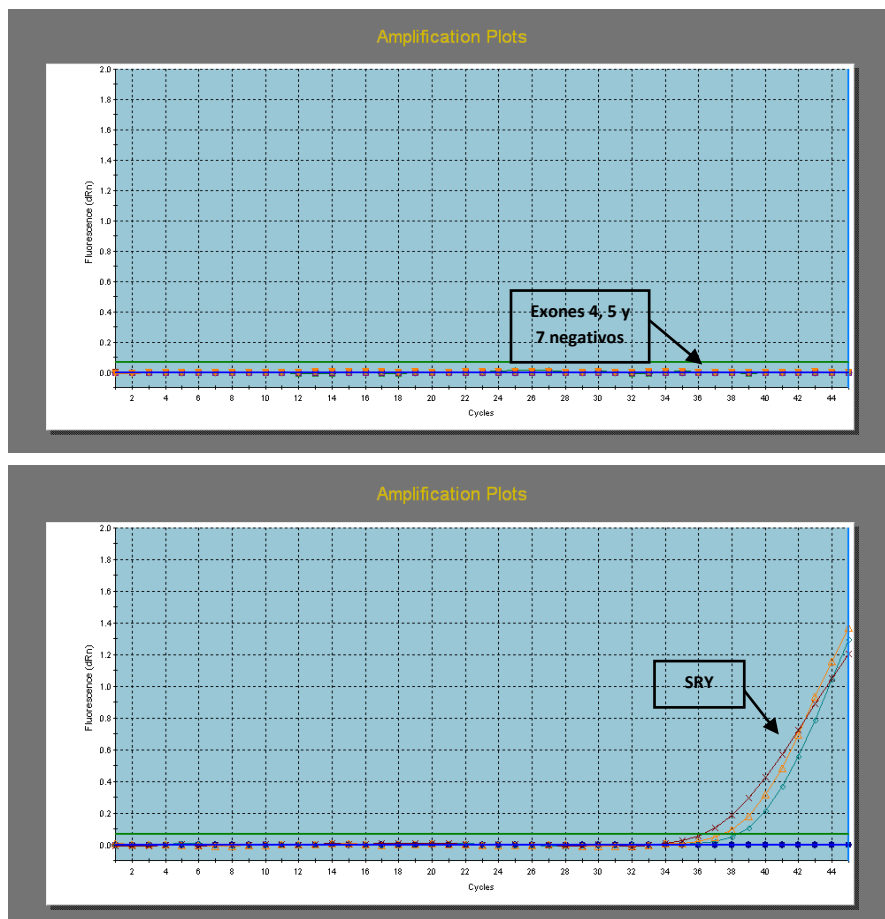


Figura 57. Gráficos de amplificación para los exones 4, 5, 7 y 10 del gen *RHD* y el gen *SRY*. En el gráfico superior no se detectan señales de amplificación para los exones 4, 5 y 7 del gen *RHD*. En el gráfico inferior se observan señales para el gen *SRY*.

Las 7 muestras restantes fueron enmarcadas en cuatro situaciones diferentes:

Situación 1

En 4 casos sólo se obtuvieron señales de amplificación para los exones 7 y 10 del gen *RHD* (2 de 2 y 3 de 3 réplicas, respectivamente). Los estudios serológicos y moleculares mostraron que los padres eran portadores del genotipo *RHD/RHDψ*, sugiriendo que los fetos heredaron el alelo *RHDψ* del padre. Estos hallazgos permitieron inferir un fenotipo fetal D negativo. Los análisis serológicos y moleculares de la sangre de cordón confirmaron que los recién nacidos eran portadores de un fenotipo D negativo y de la variante alélica *RHDψ*.

Situación 2

Los resultados obtenidos por PCR en tiempo real mostraron señales de amplificación sólo para el exón 10 del gen *RHD* (3 de 3 réplicas) en una de las muestras. Los estudios serológicos y moleculares revelaron que el padre era portador del genotipo *RHD/RHD-CE-D^s*, sugiriendo que el alelo *RHD-CE-D^s* fue heredado por el feto. Estos hallazgos permitieron inferir un fenotipo fetal D negativo. Los análisis serológicos y moleculares de la sangre de cordón confirmaron que el recién nacido era portador de un fenotipo D negativo y de la variante alélica *RHD-CE-D^s*.

Situación 3

En otro de los casos sólo se observaron señales de amplificación para el exón 10 del gen *RHD* (3 de 3 réplicas). Sin embargo, los estudios del ADN paterno descartaron la presencia de los alelos *RHDψ* y *RHD-CE-D^s*, sugiriendo que el feto habría heredado un alelo *RHD* diferente. Los análisis realizados en el ADN fetal y paterno no permitieron inferir el fenotipo D fetal (resultado no concluyente). Los estudios serológicos y moleculares de la sangre de cordón confirmaron que el recién nacido era portador de un fenotipo D negativo y de la variante alélica *RHD-CE(3-9)-D*.

Situación 4

En la muestra de plasma restante se observaron señales de amplificación para los exones 7 y 10 del gen *RHD* (2 de 2 y 3 de 3 réplicas, respectivamente). Los estudios del ADN paterno descartaron la presencia del alelo *RHDψ*, sugiriendo que el feto habría heredado una variante alélica *RHD* diferente. Los análisis realizados en el ADN fetal y paterno no permitieron inferir el fenotipo D fetal (resultado no concluyente). Los estudios serológicos y moleculares de la sangre de cordón identificaron un fenotipo DVI en el recién nacido.

4.1.3.2. Estudio de plasmas de embarazadas RhD-/RHD+

Los estudios moleculares del ADN materno revelaron que 8 mujeres embarazadas eran portadoras de variantes alélicas *RHD*. Estas muestras fueron enmarcadas en cuatro situaciones diferentes:

Situación A

Los estudios moleculares realizados en el plasma de dos embarazadas portadoras del alelo *RHD-CE-D^s* mostraron sólo señales de amplificación para el exón 10 del gen *RHD* con un Ct menor al esperado para ADN fetal (Ct<30). Esta señal fue atribuida a la presencia de ADN materno. Los resultados obtenidos permitieron inferir un fenotipo fetal D negativo en ambos casos.

Situación B

La genotipificación prenatal en 3 muestras de embarazadas portadoras del alelo *RHD-CE-D^s* mostró señales de amplificación con los valores de Ct esperados para el rango de ADN fetal para los exones 4, 5 y 7 del gen *RHD*. Además, se observaron señales para el exón 10 con un Ct menor al esperado para ADN fetal (Ct<30) que fueron atribuidas a la presencia de ADN materno. Los resultados obtenidos permitieron inferir un fenotipo fetal D positivo en todos los casos (Figura 58).

Situación C

Los resultados de PCR en tiempo real en 2 muestras de embarazadas portadoras del alelo *RHD Ψ* mostraron señales de amplificación con valores Ct correspondientes a la presencia de ADN materno para los exones 7 y 10 del gen *RHD*. Por otro lado, las señales obtenidas para los exones 4 y 5 presentaron valores de Ct dentro del rango esperado para el ADN fetal. Estos hallazgos permitieron inferir un fenotipo fetal D positivo en ambos casos.

Situación D

La genotipificación prenatal para una muestra de plasma de una mujer embarazada portadora del alelo *RHD Ψ* sólo presentó señales de amplificación para los exones 7 y 10 del gen *RHD* y con valores de Ct atribuidos al ADN materno. Los estudios del ADN paterno descartaron la presencia de los alelos *RHD Ψ* y *RHD-CE-D^s*. Estos resultados no permitieron inferir el fenotipo D fetal

(resultado no concluyente). Los estudios serológicos y moleculares de la sangre de cordón identificaron un fenotipo DVI en el recién nacido.

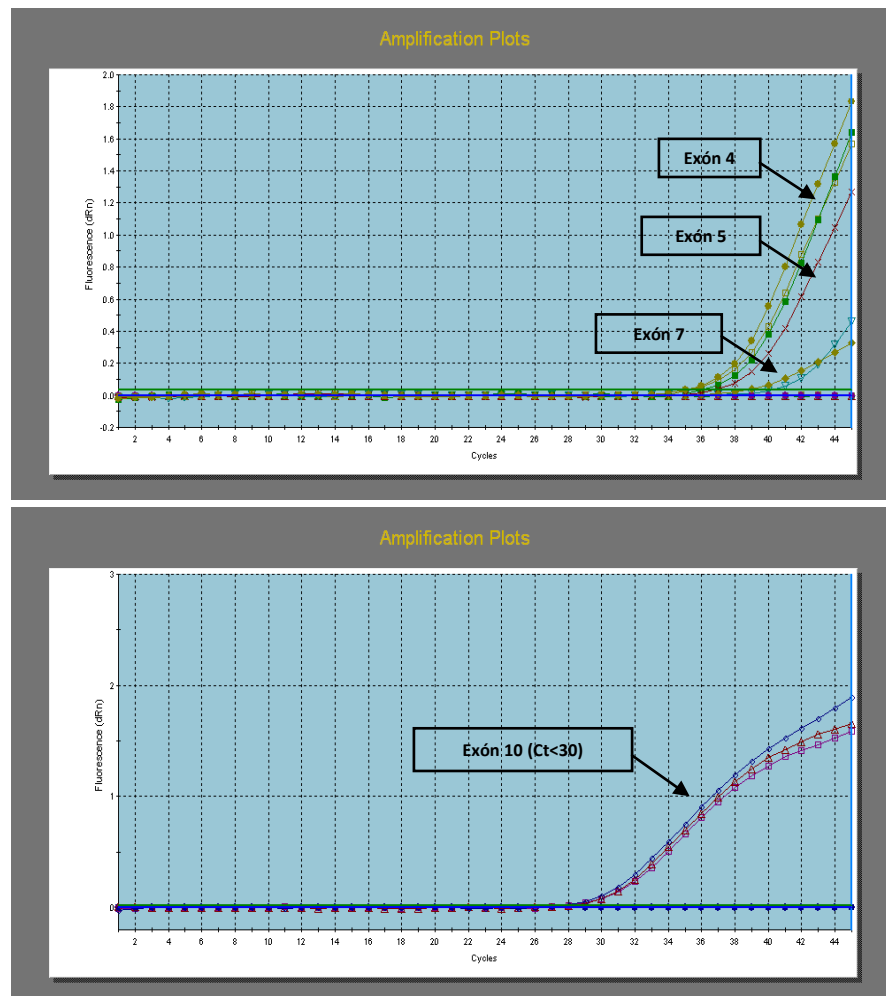


Figura 58. Gráficos de amplificación para los exones 4, 5, 7 y 10 del gen *RHD* y el gen *SRY*. En el gráfico superior pueden observarse señales de amplificación para los exones 4, 5 y 7 del gen *RHD* con los valores de Ct esperados para ADN fetal. En el gráfico inferior sólo se observan señales para el exón 10 del gen *RHD* con Ct<30.

En la siguiente tabla se observa un resumen de los resultados obtenidos en los estudios del ADN fetal, materno y paterno para la genotipificación *RHD* prenatal no invasiva.

Tabla XX: Resultados obtenidos en los estudios moleculares de las muestras de ADN maternas, paternas y en la estrategia de PCR en tiempo real

Madre	E4	E5	E7	E10	Feto	Padre	n
RHD Negativo	+	+	+	+	D+	NT	205
RHD Negativo	-	-	-	-	D-	NT	76
RHD Negativo	-	-	+	+	D-	RHDψ	4
RHD Negativo	-	-	-	+	D-	RHD-CE-Ds	1
RHD Negativo	-	-	-	+	NC	No RHDψ No RHD-CE-Ds	1
RHD Negativo	-	-	+	+	NC	No RHDψ No RHD-CE-Ds	1
RHD-CE-Ds	-	-	-	+	D-	NT	2
RHD-CE-Ds	+	+	+	+	D+	NT	3
RHDψ	+	+	+	+	D+	NT	2
RHDψ	-	-	+	+	NC	No RHDψ No RHD-CE-Ds	1

NT= no testeado. NC= no concluyente. D-=D negativo. D+=D positivo. Ct<30, corresponde a ADN materno.

4.1.3.3. Estudios de sangre de cordón de recién nacido

Los resultados obtenidos en los estudios en sangre de cordón mostraron sólo un resultado falso positivo en la genotipificación RHD prenatal. Los análisis moleculares realizados en el ADN genómico del recién nacido permitieron caracterizar al alelo nulo RHD*581insG responsable del fenotipo D negativo en la muestra.

En la Tabla XXI se muestran los resultados obtenidos en el estudio del plasma materno y de la sangre de cordón. A partir de estos datos se calculó la exactitud, especificidad y sensibilidad del método desarrollado para la genotipificación RHD prenatal.

Tabla XXI. Análisis del gen RHD en plasma materno y fenotipo Rh del recién nacido

		Recién nacido		
		RhD+	RhD-	
Plasma materno	RHD+	208	1	209
	RHD-	0	83	83
		208	84	292

Los resultados obtenidos en los estudios de ADN fetal libre en plasma materno mostraron una exactitud del 99,66% al identificarse correctamente 208 fetos *RHD* positivos y 83 *RHD* negativos. Además, esta estrategia presentó una sensibilidad del 100% al no obtener resultados falsos negativos y una especificidad del 98,81% al detectarse sólo un falso positivo, debido a la presencia de una variante alélica responsable de un fenotipo D negativo. La estrategia utilizada posee un valor predictivo del estatus RhD del recién nacido del 99,52% para fenotipos D positivo y del 100% para fenotipos D negativo.

DISCUSIÓN

El sistema Rh es el grupo sanguíneo más complejo y polimórfico de la membrana del GR. La elevada inmunogenicidad de sus antígenos puede provocar fenómenos de aloinmunización responsables de Reacciones Hemolíticas Postransfusionales, EHFN y algunas AHAI (8).

El locus *RH* está integrado por dos genes organizados en tándem denominados *RHD* y *RHCE*. Estos genes están compuestos por 10 exones cada uno, los cuales comparten un 93,8% de homología y codifican para las proteínas RhD y RhCE, que expresan los antígenos D, C, c, E y e en la membrana eritrocitaria. Los genes *RH* segregan como haplotipos con frecuencias que varían en los distintos grupos étnicos (10, 20, 28, 31, 32).

Las bases moleculares del polimorfismo asociado al sistema Rh están determinadas por mutaciones de cambio de sentido, mutaciones sin sentido, inserciones o deleciones de nucleótidos, eventos de recombinación homóloga y de conversión génica entre los genes *RHD* y *RHCE*. Una deleción homocigota para el gen *RHD* completo resulta en un fenotipo D negativo, mientras que el fenotipo D positivo es determinado por la presencia de una o dos copias del gen *RHD* normal. Sin embargo, se ha reportado la presencia alelos *RHD* en el locus *RH* de individuos

con fenotipo D negativo. Por otro lado, se han descrito fenotipos D positivo en los cuales el gen *RHD* carece de ciertos exones o presenta mutaciones, que modifican en forma cuantitativa y/o cualitativa la expresión de los epitopes D en la membrana eritrocitaria originando un fenotipo D variante caracterizado por una expresión disminuida del antígeno D (11, 27, 35). Considerando la elevada variabilidad en los patrones de reactividad que éstos presentan con los antisueros monoclonales hemoclasificadores, la aplicación de los métodos inmunohematológicos convencionales presenta limitaciones para realizar una correcta determinación del fenotipo D. La implementación de estudios moleculares resulta un recurso apropiado para identificar un gran número de antígenos y permite resolver polimorfismos con gran precisión en casos donde la caracterización serológica no es concluyente (108, 114, 139).

El elevado polimorfismo del sistema Rh ha sido estudiado en distintas poblaciones, sin embargo, las bases moleculares responsables de su gran diversidad alélica aún no han sido completamente dilucidadas. La frecuencia de las variantes *RHD* difiere ampliamente en los diferentes grupos étnicos. Se considera que una variante alélica contribuye al polimorfismo del locus *RH* cuando la misma es detectada en más del 1% de los individuos de la población (7). El conocimiento de las bases moleculares y la distribución poblacional de los alelos del locus *RH* permite realizar una correcta genotipificación *RHD* aportando al desarrollo de estrategias de diagnóstico efectivas en los servicios de Medicina Transfusional y de Obstetricia. Debido a la gran heterogeneidad del sistema Rh, en este trabajo de Tesis hemos investigado los eventos genéticos responsables de la variabilidad en la expresión del antígeno D en nuestra población. Para ello hemos analizado muestras de sangre de donantes y pacientes provenientes de bancos de sangre y efectores de salud de diferentes zonas de nuestro país derivadas al Laboratorio de Inmunohematología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario para su caracterización molecular. Hemos considerado de interés realizar este estudio en individuos de distintas regiones de nuestro país teniendo en cuenta que el grado de aporte de las etnias que forman la población actual varía en las diferentes zonas geográficas.

1. Estudio de muestras con fenotipo D negativo C/E positivo

En individuos caucásicos, el fenotipo D negativo se origina principalmente por un proceso de delección completa del gen *RHD*, siendo las personas D negativo homocigotas para esta delección. Sin embargo, se ha identificado la presencia de alelos *RHD* en individuos D negativo de diferentes etnias (29, 106, 111-114, 188).

Numerosos trabajos han demostrado la importancia de estudiar muestras D negativo con expresión de los antígenos C y/o E, ya que las mismas podrían portar alelos *RHD* aberrantes (66, 106, 111, 114). Dentro de estas variantes, los alelos nulos o silentes son responsables de un fenotipo D negativo (29, 112-114) mientras que los alelos *DEL* originan un fenotipo caracterizado por una expresión mínima del antígeno D en la membrana eritrocitaria, resultando en aparentes D negativo (77).

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue caracterizar las variantes alélicas que originan el fenotipo D negativo en la población de nuestro país, en una primera etapa, hemos estudiado mediante una estrategia de PCR multiplex las muestras con fenotipo D negativo C/E positivo. Esta metodología analiza en forma simultánea dos regiones diferentes del gen *RHD*, basada en el polimorfismo de longitud del intrón 4 y en la presencia de una secuencia específica en el extremo 3' no codificante del gen *RHD* (Figura 9). Estas regiones se encuentran distantes dentro del gen, permitiendo identificar fragmentos incompletos o alelos híbridos *RHD-CE-D*. Mediante esta estrategia molecular se analizaron 796 muestras D negativo C/E positivo (Tabla XI). Los resultados obtenidos mostraron la presencia de alelos *RHD* en 133 (16,71%) de las 796 muestras estudiadas (Figura 15). Las muestras D-/RHD+ (n=133) fueron analizadas utilizando diferentes estrategias moleculares para identificar los mecanismos moleculares responsables del fenotipo D negativo. Los estudios realizados detectaron 98 individuos (12,31%) portadores de alelos silentes y 19 (2,39%) portadores de alelos *DEL*. Dentro del grupo de muestras D-/RHD+, los alelos *RHD*581insG*, *RHD-CE-D^S*, *RHD-CE(3-9)-D* y *RHD*46C* fueron identificados en más del 1% de los individuos estudiados, contribuyendo al polimorfismo molecular del locus *RHD*. Si bien la proporción de individuos D-/RHD+ no difirió significativamente en los grupos analizados, se observó que la prevalencia de portadores del nuevo alelo *RHD*581insG* fue significativamente mayor en las muestras provenientes de Tucumán (22,58%) que en las del resto de las regiones analizadas (7,04%) (Figuras 31 a 35). Esta variante alélica se caracteriza por la inserción de una G entre las posiciones 581 y 582 del exón 4 del gen *RHD*. La inserción de este nucleótido produce el corrimiento del marco de lectura conduciendo a la generación de un codón de terminación prematuro de la traducción en la posición 198 del ARNm (Figura 23). En consecuencia, el alelo *RHD*581insG* se traduce en una proteína RhD truncada de 197 residuos aminoacídicos que sería incapaz de integrarse a la membrana eritrocitaria y formar parte del complejo Rh. Estudios serológicos posteriores permitieron confirmar que la nueva variante *RHD*581insG* es un alelo *RHD* nulo al no detectar

expresión del antígeno D por técnicas especializadas. Cabe destacar que las 19 muestras portadoras de esta variante expresaban el antígeno E sugiriendo un desequilibrio de ligamiento con el alelo *RHCE*cE*. La nueva variante alélica *RHD*581insG* formaría el haplotipo $D^{581insG}cE$, el cual habría segregado junto a un haplotipo *dce*, es decir, los individuos estudiados portarían el genotipo $D^{581insG}cE/dce$. Por otro lado, en este trabajo de Tesis se analizó la distribución del marcador genético *DI*A*, característico de la etnia amerindia con ascendencia asiática, en muestras provenientes de Tucumán y de Rosario. Los resultados mostraron una diferencia significativa en la proporción de individuos portadores de la variante *DI*A* en muestras provenientes de Tucumán con respecto a la hallada en Rosario ($p < 0,05$) (Figura 55), sugiriendo un mayor aporte amerindio a la población del norte del país. Considerando que el nuevo alelo *RHD*581insG* no ha sido reportado en poblaciones caucásicas europeas, africanas ni asiáticas y que fue detectado con una alta prevalencia en una región donde el aporte amerindio al acervo genético de la población es mayor que en otras áreas geográficas, la nueva variante *RHD*581insG* podría asociarse a la etnia amerindia.

Por otra parte, la variante alélica *RHD-CE-D^s* fue detectada en el 43,61% de las muestras *D-/RHD+* de todas las regiones estudiadas, siendo Tucumán la región con el mayor porcentaje observado (Figura 31). Esta variante, de alta prevalencia en individuos D negativo de la etnia africana (117, 119-122), genera una proteína híbrida que no expresa epitopes D. El alelo *RHD-CE-D^s* fue encontrado sólo en muestras D negativo portadoras del antígeno C. Sin embargo, el análisis de la estructura molecular del intrón 2 del gen *RHCE* demostró que estas muestras no son portadoras de un alelo *RHCE*Ce*. El antígeno C se localizaría en la proteína híbrida codificada por el alelo *RHD-CE(3-7)-D*. La expresión de este antígeno resultaría de la interacción de la Ser103, aminoácido responsable de la generación del epítopo C y codificado por la porción *RHD* del alelo híbrido, con las estructuras conformacionales resultantes del fragmento *RHCE* (117, 120). Los resultados del análisis de esta variante alélica en las muestras con fenotipo D negativo confirman el aporte genético de individuos del África Subsahariana al acervo molecular de nuestra población.

Para analizar con mayor profundidad el aporte genético de la etnia africana en la población del norte de nuestro país, se estudió el marcador molecular *RHD ψ* . Se ha reportado que dos tercios de los individuos D negativo de origen africano son portadores de este alelo (115, 116, 118, 121, 170). La variante *RHD ψ* presenta una inserción de 37 pb que genera un codón prematuro de terminación de la traducción responsable de la ausencia de la proteína RhD

en la membrana eritrocitaria. Los estudios en esta variante alélica muestran que segrega exclusivamente con el alelo *RHCE*ce* (115, 118). Para investigar la distribución del marcador en la población se analizaron muestras D-/RHD+ con fenotipo ccee provenientes de Tucumán y Rosario. Los resultados obtenidos mostraron que la proporción de individuos portadores de este marcador genético en la ciudad de Tucumán (1,81%) es significativamente mayor que para individuos de Rosario (0,67%) ($p < 0,05$) (Figura 54). Los análisis moleculares de los marcadores genéticos *DI*A* y *RHD ψ* muestran una mayor influencia de las etnias amerindia y africana al acervo molecular de la población de Tucumán. Cabe destacar que este trabajo hemos detectado una muestra D-/RHD+ con fenotipo Ccee portadora del alelo *RHD ψ* (Figuras 21 y 22). Esta es la primera descripción de un alelo *RHD ψ* asociado a la presencia del antígeno C. La variante *RHD ψ* formaría el haplotipo D ψ ce, el cual habría segregado junto a un haplotipo dCe, es decir, el individuo estudiado portaría el genotipo excepcional D ψ ce/dCe. Este hallazgo puede atribuirse a los efectos del mestizaje debido a que haplotipos africanos (D ψ ce) y caucásicos europeos (dCe) han sido identificados en un mismo locus.

Los análisis de secuenciación permitieron identificar 12 individuos portadores del alelo *RHD*46C* caracterizado por el SNP *c.46T>C* en el exón 1 del gen *RHD* en las muestras D-/RHD+ con expresión del antígeno E (Figura 24). Los ensayos serológicos de adsorción-elución demostraron que la mutación puntual de cambio de sentido, hallada en las muestras tipificadas como D negativo en ensayos serológicos convencionales, era responsable de la generación de un fenotipo DEL. Los estudios de modelización del complejo Rh permitieron demostrar que la sustitución *p.Trp16Arg* está localizada en el primer segmento transmembranal de la proteína RhD. El cambio de un aminoácido hidrofóbico (Trp) por otro cargado positivamente (Arg) en un fragmento de la proteína anclada en la membrana eritrocitaria conduciría a un plegamiento incorrecto del polipéptido RhD, que se traduciría en una disminución en la expresión de los epitopes D. Estos hallazgos demuestran la importancia del Trp16 para el correcto ensamblaje de la proteína RhD en el complejo Rh. Esta variante alélica fue detectada con mayor prevalencia en muestras provenientes de Rosario y Tucumán.

Por otro lado, los estudios de escaneo de exones detectaron la presencia de 15 individuos portadores del alelo *RHD-CE(3-9)-D*. Se ha reportado que, dentro del grupo de variantes con estructura molecular híbrida, este alelo es el más frecuentemente hallado en individuos caucásicos europeos (29, 106, 189, 190). Si bien está claramente demostrado que el segmento génico que involucra los exones 3 a 9 está implicado en el fenómeno de conversión génica, aún

no se ha identificado el sitio de recombinación 5' de los genes *RHD* y *RHCE* responsables de la generación de la variante alélica híbrida. En este trabajo de Tesis realizamos estudios moleculares de los intrones 1 y 2 del gen *RHD* utilizando estrategias de PCR RFLP para caracterizar el sitio de recombinación de los genes *RHD* y *RHCE* en esta variante. Los resultados obtenidos mostraron polimorfismos *RHD* específicos en el intrón 1 y *RHCE* específicos en el intrón 2. Estos hallazgos sugieren que el sitio de recombinación se encuentra en una región de homología de 4,2 Kb que existe entre los polimorfismos intrónicos analizados. Con el objetivo de detectar la especificidad alélica del exón 2 de esta variante, se secuenciaron dichos exones en todas las muestras. Estos estudios permitieron identificar el SNP responsable del alelo parcial *RHD*DVII* en 7 de las muestras estudiadas. La variante cualitativa encontrada es frecuentemente hallada en individuos europeos con fenotipo D parcial (29, 191, 192). Estos hallazgos demuestran que el exón analizado es *RHD* específico y sugieren que el sitio de recombinación (*hot spot*) de esta variante alélica se encuentra corriente arriba del exón 2 y antes del primer polimorfismo *RHCE* del intrón 2. Los resultados obtenidos permiten suponer que la nueva variante híbrida *RHD(329T>C)-CE(3-9)-D* es producto de una conversión génica entre los alelos *RHD*DVII* y *RHCE*Ce* característicos de la etnia caucásica europea. Si bien en las 8 muestras restantes no se detectaron polimorfismos que permitan inferir la especificidad alélica del exón 2, resulta lógico pensar que el evento de recombinación ocurre en la misma región. Teniendo en cuenta las muestras D-/RHD+ (n=133), hemos observado que el 11,28% (Tabla XV) de las mismas resultaron portadoras de estos alelos híbridos característicos de la población caucásica europea, demostrando una vez más el aporte de esta etnia al acervo molecular de la población en estudio.

Los estudios de biología molecular realizados en este trabajo de Tesis permitieron detectar otros 3 polimorfismos no reportados anteriormente. En una de las muestras se identificó, mediante la técnica basada en microarreglos de ADN, una variante alélica *RHD* caracterizada por la ausencia de los exones 1 y 2 del gen *RHD* y por una delección de 11 nucleótidos a partir de la posición 361 del exón 3. La falta de los exones 1 y 2, no descrita anteriormente, fue confirmada por reacciones de PCR SSP. La delección de 11 nucleótidos en el exón 3 genera un corrimiento en el marco de lectura y la formación de un codón de terminación prematuro (TAA) en la posición 155 del ARNm. Esta mutación fue identificada previamente en individuos españoles, en un estudio realizado en el año 2007 por Nogués y col (193). Sin embargo, no existen evidencias de la presencia de estos dos eventos genéticos en un mismo alelo. Es probable que esta nueva variante haya surgido por un proceso de conversión génica

mediante el cual fragmentos del alelo *RHD* que comprenden los exones 1 y 2 fueron reemplazados por sus homólogos del alelo *RHCE*. Este fenómeno habría ocurrido en un alelo *RHD* que, durante el proceso evolutivo, habría perdido, por un evento de delección, los 11 nucleótidos en el exón 3 generando un codón de terminación prematuro. A esta nueva variante se la denominó *RHCE(1-2)-RHD(3_{361-371del11-10})* (Figura 28). Estos eventos genéticos impedirían la síntesis de una proteína RhD normal y, por lo tanto, su integración en la membrana eritrocitaria y consecuente expresión de epitopes D.

Por otra parte, los estudios de secuenciación detectaron el SNP *c.1001T>A* responsable de la generación de un codón prematuro de la terminación en la posición 344 del ARNm. Esta mutación sin sentido se traduciría nuevamente en una proteína truncada incapaz de formar parte del complejo Rh y por lo tanto, no se expresaría el antígeno D en la membrana del GR. Las nuevas variantes alélicas *RHCE(1-2)-RHD(3_{361-371del11-10})* y *RHD*1001A*, caracterizadas en este trabajo de Tesis, codifican polipéptidos aberrantes responsables de un fenotipo D negativo el cual fue demostrado por estudios de adsorción-elución. Estas variantes fueron incorporadas al grupo de los alelos *RHD* silentes.

Además, también se caracterizó al alelo no reportado *RHD*1248insG* utilizando estrategias de secuenciación. La inserción de una G entre los nucleótidos 1247 y 1248 del gen *RHD* provoca la eliminación del codón de finalización de la traducción de la proteína RhD y la generación de un nuevo codón de terminación corriente arriba en la posición 489 del ARNm. Este polimorfismo origina una proteína de 488 residuos aminoacídicos. Estudios serológicos posteriores de adsorción-elución permitieron confirmar que la nueva variante alélica identificada es responsable de un fenotipo DEL, sugiriendo que la proteína RhD de mayor tamaño sería capaz de integrarse en la membrana eritrocitaria y expresar epitopes D.

Los resultados obtenidos para las 796 muestras D negativo analizadas mostraron que el 16,71% son portadoras de alelos *RHD*. Esto confirma que el fenotipo D negativo no se origina exclusivamente por un proceso de delección génica sino que existen alelos silentes generados por distintos eventos moleculares que son responsables de un fenotipo D negativo. Estos hallazgos demuestran la importancia de conocer la variabilidad alélica que subyace en el locus *RH* de individuos de nuestra población para desarrollar estrategias de genotipificación *RHD* que disminuyan la posibilidad de obtener resultados falsos positivos. El diseño de estudios moleculares que incluyan la caracterización de alelos silentes optimizará el diagnóstico prenatal

no invasivo del genotipo *RHD*, asegurando una estricta correlación entre el genotipo y el fenotipo fetal.

Si bien la inmunogenicidad del antígeno D depende principalmente de la cantidad de epitopes D en la superficie de los GRs, existen evidencias de respuestas anti-D generadas por eritrocitos con fenotipos DEL cuando son transfundidos a individuos D negativo. Wagner y Körmöczsi observaron fenómenos de inmunización anti-D primaria en pacientes transfundidos con unidades tipificadas serológicamente como D negativo. Estudios posteriores realizados en los donantes de las unidades transfundidas permitieron demostrar que las mismas presentaban un fenotipo DEL generado por el alelo *RHD(IVS5-38del4)* (194). Poco después, Yasuda y *col* demostraron el desarrollo de una respuesta anti-D secundaria en un receptor D negativo aloinmunizado transfundido dos veces con unidades de sangre proveniente de un dador erróneamente tipificado D negativo y portador del alelo *DEL RHD(K409K)* (104). Posteriormente, Kim y *col* reportaron en 2009 el primer caso de aloinmunización anti-D primaria inducida por el alelo *RHD(K409K)* en Korea (195). Teniendo en cuenta estos reportes que demuestran que GRs DEL pueden causar aloinmunización primaria o desencadenar una respuesta secundaria, algunos servicios transfusionales de Europa han implementado la genotipificación *RHD* en donantes D negativo C/E positivo, evitando de esta manera la transfusión de unidades DEL a pacientes susceptibles de desarrollar una aloinmunización anti-D (103). Sin embargo, las normas nacionales de transfusión de numerosos países no reglamentan la obligatoriedad de la detección del fenotipo DEL en las unidades tipificadas serológicamente como D negativo.

El conocimiento de las bases moleculares de los alelos *DEL* asociados a los diferentes grupos étnicos resulta de fundamental importancia para desarrollar estrategias de genotipificación en individuos D negativo. Las mismas deben contemplar la detección de las variantes alélicas representativas de cada población en estudio. En este trabajo de Tesis hemos identificado a los alelos *DEL RHD*46C*, *RHD*M295I*, *RHD(IVS3+1G>A)* y *RHD*1248insG*, producto de diferentes mecanismos moleculares. Las variantes *RHD*46C* y *RHD*M295I* fueron halladas en más de un 1% de las muestras con fenotipo D negativo confirmando su aporte a la variabilidad del locus *RH* en nuestra población. La identificación de un 2,39% de individuos portadores de alelos *DEL* en el grupo de muestras D negativo que expresan los antígenos C y/o E revela la importancia de implementar el estudio molecular en las muestras D negativo C/E positivo para detectar un posible fenotipo DEL. La caracterización de los polimorfismos responsables de una expresión disminuida de los epitopes antigénicos D en dadores de sangre considerados

serológicamente como D negativo evitará la transfusión de estas unidades a pacientes con riesgo de aloinmunización.

2. Estudio de muestras con expresión débil del antígeno D

Se ha reportado que entre el 1% y 2% de los individuos caucásicos son portadores de alelos *RHD* que codifican para un fenotipo D variante caracterizado por una expresión disminuida del antígeno D (77). Este fenotipo puede presentar variaciones cualitativas y/o cuantitativas de los epitopes D en la membrana eritrocitaria. Los individuos portadores de variantes cualitativas son susceptibles de desarrollar una aloinmunización hacia los epitopes ausentes del antígeno D cuando son expuestos a GRs D positivo, mientras que aquellos portadores de variantes cuantitativas no se encuentran en riesgo de aloinmunización (76). En el laboratorio clínico los antígenos del sistema Rh son detectados por técnicas de hemaglutinación utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales. Sin embargo, los métodos inmunohematológicos convencionales presentan limitaciones para discriminar entre variantes cuantitativas y cualitativas (77). Los estudios de biología molecular permiten resolver la complejidad fenotípica del sistema Rh y resulta una herramienta útil para superar los problemas planteados por la serología (130-132).

En una segunda etapa de este trabajo de Tesis nos propusimos investigar el polimorfismo del locus *RH* en individuos portadores de variantes alélicas *RHD* responsables de fenotipos con expresión disminuida del antígeno D en nuestra población. Dentro del grupo de muestras con fenotipo Dvar, los alelos *D débil tipo 1*, *D débil tipo 2*, *D débil tipo 3*, *D débil tipo 4*, *RHD*DVI*, y *D débil tipo 93* fueron identificados en más del 1% de los individuos estudiados contribuyendo al polimorfismo molecular del locus *RHD*.

Teniendo en cuenta los distintos trabajos que reportaron una asociación entre alelos que codifican para fenotipos Dvar y haplotipos específicos (96, 97, 88), se continuó el análisis molecular de las muestras según el fenotipo Rh completo hallado. Se investigó la presencia de las variantes alélicas *D débil tipo 1* y *D débil tipo 3* en las muestras portadoras del antígeno C (genotipo $D^{var}Ce/dce$), la variante *D débil tipo 2* en las muestras que expresaban el antígeno E (genotipo $D^{var}cE/dce$) y el alelo *D débil tipo 4* en los fenotipos ccee (genotipo $D^{var}ce/dce$).

Debido a la dificultad para discriminar serológicamente las variantes cualitativas del antígeno D, actualmente se considera que los pacientes portadores del fenotipo Dvar están en riesgo de desarrollar una inmunización anti-D cuando son transfundidos con GRs D positivo (68,

77, 88, 196). Sin embargo, evidencias clínicas han demostrado que individuos con expresión débil del antígeno D portadores de los alelos *D débil tipo 1, 2 y 3* no son susceptibles de aloinmunización anti-D ante una exposición a GRs D positivo (8, 76, 96, 111, 197-199). El estudio molecular de las muestras con fenotipo Dvar mostró que el 58,02% (Tabla XIX) de las mismas son portadoras de alelos *D débil tipo 1, 2 o 3*. Hemos observado que la proporción de individuos portadores de alelos *D débiles tipo 1, 2 y 3* en las distintas regiones estudiadas difieren significativamente ($p < 0,0001$). La probabilidad de encontrar un individuo portador de alguna de estas variantes alélicas en las muestras provenientes de Tucumán (36,74%) fue significativamente menor ($p < 0,05$) que para las otras 4 ciudades analizadas (67,26%) donde esta proporción no mostró diferencias significativas. Considerando que numerosos estudios han reportado que estas variantes son responsables de aproximadamente el 90% de los fenotipos D variante encontrados en poblaciones caucásicas europeas (188, 191), los hallazgos obtenidos sugieren que el aporte de esta etnia al locus *RH* es mayor en la región central del país. Por otro lado, teniendo en cuenta todas las muestras con fenotipo D variante ($n=324$), hemos observado que el 14,81% (Tabla XIX) de las mismas resultaron portadoras del alelo *D débil tipo 4*, característico de la población del África subsahariana, demostrando una vez más el aporte de la etnia negra al acervo genético de la población en estudio. De los resultados obtenidos puede destacarse que, entre los individuos con la variante alélica *D débil tipo 4* ($n=24$), la mayor frecuencia de portadores fue hallada en la ciudad de Tucumán (45,83%).

Como se mencionó anteriormente, el alelo *D débil tipo 1* está asociado al haplotipo $D^{\text{débil tipo 1}}\text{Ce}$ en caucásicos europeos. Sin embargo, en los estudios realizados hemos observado que en nuestra población este alelo no se encuentra asociado exclusivamente a la expresión del antígeno C. Se identificaron 9 muestras con fenotipo ccee portadoras de esta variante alélica (Tabla XIX). La presencia del alelo *D débil tipo 1* en el haplotipo R_0 ($D^{\text{débil tipo 1}}\text{ce}$) podría atribuirse a un evento de recombinación génica entre este haplotipo, característico de etnias africanas, con haplotipos caucásicos aportados por la gran inmigración europea.

Como se mencionó anteriormente, los individuos portadores de los alelos *D débil tipo 1, 2 y 3* no son susceptibles de desarrollar una aloinmunización hacia el antígeno D ante una exposición con GRs D positivo, por lo tanto, teniendo en cuenta los hallazgos de este trabajo de Tesis, más del 50% de los pacientes que actualmente son transfundidos con unidades D negativo por presentar un fenotipo Dvar podrían recibir sangre D positivo. En la ciudad de Rosario se transfunden aproximadamente 20000 pacientes por año en los hospitales públicos. En estudios

previos (98) hemos reportado que el 1,2% de la población tiene un fenotipo D variante y en este trabajo de Tesis hemos observado que el 67,68% de los individuos Dvar son portadores de alelos *D débil tipo 1, 2 o 3* (Figura 44). Considerando estos hallazgos, es de esperar que 162 pacientes no requieran las unidades D negativo debido a que expresan un fenotipo Dvar no susceptible de aloinmunización. Teniendo en cuenta que cada receptor transfusional recibe en promedio dos unidades de sangre, la utilización de estrategias moleculares para estudiar pacientes que presentan un fenotipo D variante implicaría un ahorro de 324 unidades D negativo por año. Los estudios moleculares permitirán implementar un uso más racional de las escasas unidades D negativo disponibles en los servicios de Medicina Transfusional y reservarlas exclusivamente para los pacientes que se encuentran en riesgo real de desarrollar una respuesta aloinmune hacia antígeno D.

Por otro lado, en este trabajo de Tesis se identificaron variantes D parcial en el grupo de muestras con fenotipo Dvar. La estrategia de escaneo de exones permitió caracterizar 15 muestras portadoras de alelos *RHD*DVI* (4,63%). Dentro de las variantes D, el alelo *RHD*DVI* representa el fenotipo D parcial clínicamente más importante en individuos caucásicos. Los GRs portadores de esta variante carecen de la mayoría de los epitopes D (epD1, 2, 5-8, según el modelo de los 9 epitopes), entre ellos el epD6/7, el cual se caracteriza por ser altamente inmunogénico (85-87). Numerosos investigadores han analizado la prevalencia de individuos portadores de este alelo para distintas regiones de Europa, registrando frecuencias poblacionales que varían entre el 0,02% y el 0,05% (83, 84, 200). Además, estudios realizados en el Laboratorio de Inmunohematología del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona mostraron que el alelo *RHD*DVI tipo 4* es la estructura genética responsable del fenotipo DVI más frecuentemente hallada en individuos españoles (87). En este trabajo de Tesis el alelo *RHD*DVI tipo 4* también fue la variante más frecuente responsable del fenotipo D parcial. Este hallazgo podría explicarse por el aporte de la población española a nuestro acervo genético. Debido a que los portadores de variantes D parcial carecen de algunos epitopes D, la identificación de los mismos es de fundamental importancia en el campo de la Medicina Transfusional ya que son susceptibles de desarrollar aloanticuerpos anti-D hacia los epitopes ausentes del antígeno D frente a una exposición con GRs D positivo. Por lo tanto, individuos con fenotipo D parcial deben ser considerados D negativo para transfusiones y embarazos. Considerando las limitaciones que presentan los métodos serológicos para identificar el fenotipo D parcial y teniendo en cuenta la prevalencia del mismo en nuestra población, resulta de fundamental importancia utilizar

estrategias de genotipificación *RHD* que permitan identificar inequívocamente estas variantes para optimizar la compatibilidad transfusional y la administración de la inmunoprofilaxis.

Los estudios de secuenciación también permitieron identificar en 31 muestras con expresión del antígeno E una nueva variante D portadora de la mutación de cambio de sentido *c.359C>A* en el exón 3 del gen *RHD* (Figura 42). Este SNP es responsable de la sustitución aminoacídica *p.Ala120Asp*. La modelización del complejo Rh con la proteína RhD mutada permitió establecer que la sustitución se encuentra en el cuarto dominio transmembrana del polipéptido (Figura 48). Además, estudios de los niveles de expresión del antígeno D en la membrana eritrocitaria realizados utilizando citometría de flujo mostraron una densidad relativa de epítopes D con valores similares a los observados para variantes con fenotipo D débil (Figuras 49 a 53). Los análisis serológicos reflejaron que las muestras portadoras del nuevo alelo, denominado por la ISBT como *D débil tipo 93*, presentaron reacciones de aglutinación débil con todos los anticuerpos monoclonales anti-D de clase IgM en medio salino. Además, los estudios de modelización mostraron que la sustitución aminoacídica ocurre en un dominio transmembrana de la proteína RhD y no en regiones extracelulares. Estas observaciones junto a los resultados obtenidos por citometría de flujo sugieren que el nuevo alelo hallado no es responsable de un fenotipo D parcial (201). Cabe destacar que de las 31 muestras portadoras de la variante *RHD*359A* halladas en este trabajo de Tesis, 20 (64,52%) corresponden a donantes provenientes de Tucumán. Considerando que esta nueva variante alélica no ha sido descrita en otras poblaciones y teniendo en cuenta que el marcador genético *DI*A* demostró una mayor influencia amerindia en la región norte del país, la presencia de este alelo podría atribuirse al aporte de esta etnia al acervo genético de esta población. Además, los resultados muestran que esta variante sólo fue identificada en muestras con fenotipo ccEe lo que permite inferir una asociación genética *en cis* del alelo *D débil tipo 93* con el alelo *RHCE*cE*.

Por otro lado, se identificaron por secuenciación 4 SNPs no reportados anteriormente dentro del grupo de muestras no caracterizadas por PCRs convencionales. Se detectaron las siguientes mutaciones de cambio de sentido: *c.325.A>G*, *c.763G>A*, *c.764G>A* y *c.911T>A*, responsables de las sustituciones de aminoácidos *p.Thr109Ala*, *p.Gly255Arg*, *p.Gly255Glu* y *p.Ile304Asn* respectivamente. Los resultados sugieren que el cambio de un residuo polar (Thr) por uno hidrofóbico (Ala), de un aminoácido polar (Gly) por residuos cargados (Glu ó Arg) y de un residuo apolar (Ile) por otro polar (Asn) provocaría alteraciones en el plegamiento de la proteína

RhD que modificarían el correcto ensamblaje del polipéptido RhD en el complejo Rh alterando la expresión de los epitopes D.

La discriminación entre variantes cuantitativas y cualitativas es de fundamental importancia en los bancos de sangre para optimizar la compatibilidad transfusional y garantizar la provisión de sangre segura, y en Obstetricia para definir estrategias de intervención médica en las embarazadas. Las determinaciones inmunohematológicas clásicas no permiten resolver la complejidad fenotípica del sistema Rh, y en este contexto el estudio a nivel del ADN se presenta como un recurso apropiado para superar las limitaciones serológicas (130-132). Los hallazgos obtenidos en este trabajo de Tesis sobre la variabilidad alélica del locus *RH* en la población argentina, tendrán su correlato en la implementación de estrategias moleculares como herramientas de laboratorio para la asignación precisa e inequívoca de las variantes antigénicas de importancia clínica.

3. Genotipificación *RHD* prenatal

La EHFN es un desorden causado por aloanticuerpos IgG maternos, presentes en la circulación fetal a través de un transporte activo transplacentario, dirigidos contra un antígeno paterno presente en las células fetales y ausente en las maternas, siendo el más frecuente el antígeno D del sistema Rh. Estos anticuerpos se forman en respuesta a una aloinmunización provocada por la presencia de eritrocitos incompatibles en la circulación materna, causada principalmente por embarazos y transfusiones previas (144).

La administración de inmunoglobulina anti-D (IgG humana enriquecida en anticuerpos anti-D) en pacientes D negativo previene el desarrollo de eventos de sensibilización al antígeno D cuando son expuestos a GRs D positivo y la subsecuente producción de anticuerpos anti-D. La incidencia de aloinmunización por antígeno D ha disminuido, aproximadamente en un 90% en regiones como Estados Unidos y Europa, debido al uso prenatal de la profilaxis anti-D en todas las mujeres embarazadas con fenotipo D negativo y por su administración luego del nacimiento de un hijo D positivo. Actualmente este tratamiento es considerado una aplicación médica rutinaria en estas pacientes (202).

La inmunoglobulina anti-D es elaborada a partir de una mezcla de plasmas humanos obtenidos de donantes inmunizados al antígeno D que poseen títulos altos de aloanticuerpos específicos. En el pasado los donantes solían ser mujeres D negativo sensibilizadas durante un embarazo de un feto D positivo que ya no se encontraban en edad reproductiva.

Paradójicamente, este tipo de donantes ahora es escaso debido al éxito de los programas de prevención de aloinmunización utilizando la profilaxis anti-D. Actualmente, los donantes son hombres D negativo, quienes voluntariamente acceden a ser inmunizados y luego estimulados repetidas veces mediante la inyección de eritrocitos D positivo (202).

El protocolo de profilaxis anti-D indica que la aplicación debe ser administrada a todas las mujeres embarazadas D negativo a las 28 semanas de gestación y luego, si el recién nacido tiene fenotipo D positivo, debe realizarse una segunda administración dentro de las 72 horas posparto. El inconveniente de la aplicación prenatal es no conocer el fenotipo D fetal ya que las gestantes de fetos D negativo no necesitarían el tratamiento con inmunoglobulina anti-D. Considerando la creciente dificultad a nivel mundial para producir este hemoderivado debido a la escasez de donantes voluntarios inmunizados, y su consecuente elevado costo comercial, es imprescindible implementar un uso racional de la inmunoprofilaxis (202).

Durante el embarazo tres determinaciones inmunohematológicas contribuyen al diagnóstico de la EHFN. La determinación del grupo sanguíneo ABO y fenotipo Rh para analizar una posible incompatibilidad ABO e identificar embarazadas D negativo potenciales productoras de anti-D y la detección de anticuerpos irregulares que permite evaluar una aloinmunización (203). La caracterización de expresiones aberrantes del antígeno D es de fundamental importancia en Obstetricia para definir estrategias de intervención médica en las embarazadas. Las determinaciones inmunohematológicas clásicas no permiten resolver la complejidad fenotípica del sistema Rh, siendo las gestantes portadoras de un fenotipo D variante consideradas D negativo e incorporadas al protocolo de profilaxis anti-D en la semana 28 de gestación y a la dosis posparto si el recién nacido es D positivo. Numerosas evidencias clínicas han demostrado que los pacientes portadores de los alelos *D débil tipo 1, 2 y 3* no desarrollan aloanticuerpos anti-D cuando son transfundidos con unidades de GRs D positivo. Del mismo modo, las gestantes con fenotipo D variante originado por alguno de estos alelos no se encuentran en riesgo de aloinmunización hacia el antígeno D fetal. Debido a que los estudios serológicos no permiten discriminar estas variantes y determinar el riesgo real de sensibilización al antígeno D, la aplicación de estrategias moleculares que permitan la genotipificación *RHD* resulta útil para identificar a embarazadas susceptibles de desarrollar una aloinmunización anti-D. La identificación de las variantes *D débil tipo 1, 2 ó 3* del gen *RHD* en mujeres embarazadas tendrá su correlato en la definición de las estrategias de intervención médica. La caracterización molecular de los alelos responsables de fenotipos que expresan todos los epitopes D, aunque en

baja densidad, permitirá optimizar la administración de la profilaxis con inmunoglobulina anti-D y reservar dosis exclusivamente para embarazadas en riesgo de desencadenar una respuesta inmune hacia el antígeno D. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis respecto de la distribución de frecuencias de individuos con variantes alélicas *RHD* en la ciudad de Rosario, se estima que más del 65% de las pacientes embarazadas con fenotipo D variante sean portadoras de alelos *D débil tipo 1, 2 o 3* (Figura 44) y no requieran la profilaxis con inmunoglobulina anti-D. En el Centro Regional de Hemoterapia se tipifican aproximadamente 14000 embarazadas por año que concurren a los efectores municipales de salud (204). Como se comentó anteriormente, teniendo en cuenta que el 1,2% de la población de Rosario expresa un fenotipo D variante, es de esperar que 114 gestantes no requieran la inmunoprofilaxis prenatal que actualmente se les administra innecesariamente. Además, a estas pacientes, no se les aplicaría la dosis postnatal cuando el hijo resulta D positivo (aproximadamente en 100 casos considerando que la frecuencia poblacional de individuos D negativo es 12%). Por lo tanto, la caracterización molecular de alelos *RHD* en este grupo de pacientes conducirá a un ahorro de 214 dosis de gammaglobulina anti-D por año, permitiendo optimizar los recursos disponibles en la Salud Pública y redundando en un beneficio concreto para las pacientes.

Por otro lado, las pruebas inmunohematológicas realizadas durante el embarazo no permiten determinar el fenotipo D fetal y por lo tanto, evaluar el riesgo de EHFN en embarazadas sensibilizadas. En este sentido, la genotipificación *RHD* fetal no invasiva resulta una herramienta útil que contribuye al diagnóstico de la EHFN permitiendo implementar en las primeras etapas del embarazo el protocolo de seguimiento de alto riesgo de la gestante cuando el feto resulta D positivo. Algunos Servicios llevan adelante tratamientos para suprimir la aloinmunización materna, o al menos, evitar el aumento del título de anticuerpos en la embarazada. Estos consisten en intercambio plasmático intensivo y/o administración de inmunoglobulina hiperinmune intravenosa. El intercambio de plasma puede reducir los niveles de anticuerpos en un 75%, pero frecuentemente se produce un rebote. Se ha propuesto este procedimiento como una forma de demorar la necesidad de una intervención fetal cuando ha existido *hydrops fetalis* antes de las 22 semanas de gestación en un embarazo previo. La utilización de inmunoglobulina intravenosa ha reducido también los títulos de anti-D, con mejores resultados obtenidos al comenzar antes de las 28 semanas de gestación y cuando el feto no es hidrópico. Por el contrario, en aquellas situaciones en las cuales la genotipificación *RHD* prenatal permite inferir un fenotipo fetal D negativo, se evita la utilización de estas estrategias

terapéuticas expansivas y costosas y se previene la exposición a los numerosos efectos secundarios de este tratamiento (205). Además, las estrategias de genotipificación *RHD* fetal son utilizadas a nivel mundial para determinar el fenotipo D fetal en mujeres embarazadas no sensibilizadas y restringir la administración de la inmunoglobulina anti-D prenatal únicamente a aquellas gestantes de un feto D positivo. Esta determinación evita una exposición innecesaria a las gestantes que no requieran esta profilaxis y permite la optimización de las escasas unidades disponibles de inmunoglobulina anti-D.

Teniendo en cuenta los estudios sobre el polimorfismo molecular del locus *RH* en nuestra población realizados en este trabajo de Tesis, se diseñó y evaluó un protocolo de genotipificación *RHD* fetal no invasivo con el objetivo de implementar a futuro una estrategia que contribuya al diagnóstico de la EHFN en embarazadas aloimmunizadas con anti-D y que permita optimizar el uso de la inmunoprofilaxis en mujeres D negativo no sensibilizadas.

Considerando la alta prevalencia de alelos *RHD* silentes y *DEL* en nuestra población, el diseño de la estrategia de genotipificación prenatal debe tener en cuenta la variabilidad alélica del locus *RH* para asignar un correcto fenotipo. De esta manera, el estudio de cuatro regiones polimórficas *RHD* específicas en el algoritmo de trabajo planteado reduce la posibilidad de obtener resultados falsos positivos. En el protocolo diseñado se propone estudiar en una primera etapa el ADN genómico materno para detectar mujeres portadoras de alelos *RHD*. La identificación de embarazadas D-/*RHD*+ permite una correcta interpretación de los patrones de amplificación obtenidos en el estudio por PCR en tiempo real del ADN libre en plasma materno. El algoritmo planteado también propone analizar el ADN genómico paterno en aquellas situaciones donde los resultado obtenidos en el estudio del ADN libre no son concluyentes.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis permitieron asignar el genotipo *RHD* fetal en 293 de 296 (98,99%) muestras de plasma materno estudiadas. En tres muestras no se obtuvieron resultados concluyentes ya que los patrones de amplificación obtenidos por PCR en tiempo real y el estudio del ADN genómico materno y paterno no permitieron discriminar si el feto era *RHD* positivo o *RHD* negativo. Estudios serológicos y moleculares posteriores realizados en sangre de cordón revelaron que los recién nacidos eran portadores de variantes alélicas que carecen de la mayoría de los exones *RHD*.

La correlación entre los resultados moleculares y serológicos mostró que la estrategia de genotipificación prenatal presenta una sensibilidad del 100% al no obtener resultados falsos negativos y una especificidad del 98,81% al detectarse sólo un falso positivo, debido a la

presencia de una variante alélica responsable de un fenotipo D negativo. La estrategia utilizada posee un valor predictivo del estatus RhD fetal del 99,52% para fenotipos D positivo y del 100% para fenotipos D negativo. El protocolo diseñado para la detección del gen *RHD* en ADN fetal libre en plasma materno demostró ser una herramienta útil para la determinación del estatus D del feto en nuestra población. La correcta genotipificación *RHD* prenatal permitirá diagnosticar fetos en riesgo real de EHFN y definir estrategias de administración de la profilaxis con inmunoglobulina anti-D exclusivamente a embarazadas cuyos fetos son D positivo.

4. Mecanismos moleculares pendientes de caracterización

Las estrategias moleculares utilizadas en este trabajo de Tesis no permitieron identificar los mecanismos genéticos responsables de variantes alélicas *RHD* en 34 muestras, 16 con fenotipo D negativo y 18 con fenotipo Dvar. Los estudios implementados mostraron secuencias análogas al alelo *RHD* normal en todas las muestras. Teniendo en cuenta que 28 de los individuos expresaban el antígeno C, podríamos atribuir la baja reactividad del antígeno D hallada en estas muestras a un efecto supresor del antígeno C, como ha sido observado en diversos estudios (10, 69, 206, 207). Se ha reportado que durante la eritropoyesis la proteína RhCE compite por la unión a la glicoproteína RhAG con el polipéptido RhD. Existen evidencias, basadas en estudios por citometría de flujo, que los eritrocitos de individuos con fenotipo homocigota DcE (genotipo DcE/DcE) expresan mayor número de sitios antigénicos D (30000 sitios D por célula) que los GRs de individuos portadores de los genotipos DcE/DcE (23000 antígenos D célula) y DcE/dce (13000 sitios D por célula) (12, 96). En base a estos hallazgos y a los estudios de modelización del complejo Rh (50, 52, 208), se postula que la variante RhCe se uniría a la glicoproteína RhAG con mayor afinidad que el polipéptido RhD. Esta competencia se debería, probablemente, a que la cadena polipeptídica RhCe comparte un mayor grado de homología que RhcE con la proteína RhD (58, 64).

Por otra parte, la expresión alterada o supresión del antígeno D también podría atribuirse a eventos genéticos pretranscripcionales. Se ha reportado que SNPs en la región promotora *en cis* afectarían la interacción con los factores reguladores de la transcripción y por lo tanto alterarían la correcta actividad transcripcional. Asimismo, modificaciones postranscripcionales en la proteína RhAG pueden provocar una disminución o la no expresión del polipéptido RhD en la membrana eritrocitaria. Teniendo en cuenta que la expresión normal de los antígenos del sistema Rh en la membrana del GR depende de una correcta integración de la glicoproteína

RhAG (44, 47, 48), es probable también que mutaciones presentes en el gen *RHAG* o en su región promotora puedan resultar en una disminución cuantitativa de la expresión de esta glicoproteína o alterar los sitios de interacción con el polipéptido RhD, exacerbando la expresión de la variante RhCe en detrimento de la proteína RhD.

En una etapa posterior a este trabajo de Tesis se realizará la caracterización de los mecanismos moleculares responsables de las variantes alélicas *RHD* en las muestras en las que no se hallaron mutaciones en las secuencias nucleotídicas codificantes ni en las regiones de unión exón-intrón.

CONCLUSIÓN

El sistema Rh es el grupo sanguíneo más complejo y polimórfico de la membrana del GR. Presenta un gran interés clínico debido a la participación de sus antígenos en reacciones hemolíticas postransfusionales, en algunas AHAI y en la patogénesis de la EHFN. El elevado polimorfismo molecular del sistema Rh genera una gran variabilidad alélica en los diferentes grupos étnicos. En este trabajo de Tesis hemos investigado el polimorfismo molecular del locus *RH* en nuestra población y hemos establecido las bases genéticas que originan el fenotipo D negativo y fenotipos D variante. Además hemos desarrollado estrategias moleculares para la caracterización de alelos *RHD* silentes, *DEL* y de variantes alélicas responsables de una expresión alterada del antígeno D.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis permitieron identificar los mecanismos moleculares responsables de la generación de alelos *RHD* silentes y alelos *DEL* en muestras D negativo. Hemos caracterizado variantes alélicas producto de eventos de conversión génica, deleciones e inserciones de nucleótidos, mutaciones de cambio de sentido y mutaciones sin sentido. Estos hallazgos señalan que, en nuestra población, el fenotipo D negativo no se origina únicamente por un proceso de deleción completa del gen *RHD*. Hemos establecido la

importancia de caracterizar por métodos moleculares las muestras D negativo que expresan los antígenos C y/o E para una correcta asignación del fenotipo D. Los resultados obtenidos indican que es fundamental considerar los alelos *RHD* silentes hallados en nuestra población en el desarrollo de estrategias para la genotipificación *RHD* que disminuyan la posibilidad de obtener resultados falsos positivos. Asimismo, la identificación de alelos *DEL* responsables de fenotipos aparentes D negativo, muestra la importancia de la detección de estas variantes capaces de inducir una aloinmunización anti-D al ser transfundidos a pacientes D negativo.

Además, en este trabajo de Tesis hemos investigado las bases genéticas responsables de fenotipos D variante. Los estudios moleculares permitieron discriminar variantes D cuantitativas y cualitativas, identificando aquellos individuos susceptibles de desarrollar una aloinmunización anti-D. La detección de las variantes alélicas *D débil tipo 1, 2 y 3* en nuestra población destaca la importancia de la implementación de los análisis de biología molecular en los bancos de sangre para establecer políticas transfusionales y de manejo clínico tendientes a optimizar el uso de las escasas unidades D negativo. Además la genotipificación *RHD* en pacientes embarazadas permitirá racionalizar la administración de la profilaxis con gammaglobulina anti-D.

Los estudios moleculares realizados en este trabajo de Tesis han permitido caracterizar variantes alélicas asociadas a etnias del África Subsahariana y a poblaciones amerindias. Además, se identificaron alelos vinculados a poblaciones de origen europeo. El análisis de muestras provenientes de bancos de sangre y efectores de salud de diferentes regiones del país permitió establecer diferencias en la distribución de frecuencias de individuos portadores de algunos alelos. Estos hallazgos apoyan las teorías que indican que el grado de aporte de las diferentes etnias que forman la población actual de nuestro país, surgida del mestizaje entre europeos, poblaciones originarias e individuos de origen africano, varía en las distintas zonas geográficas.

La genotipificación de grupos sanguíneos eritrocitarios requiere de un conocimiento previo exhaustivo de las bases moleculares responsables de los diferentes fenotipos de importancia clínica. El desarrollo de las estrategias de genotipificación molecular implementadas en este trabajo de Tesis resulta adecuado para determinar el fenotipo Rh en pacientes recientemente transfundidos donde las técnicas de hemaglutinación detectarían los antígenos presentes en los eritrocitos del dador y del receptor. Además, la caracterización molecular de alelos *RH* aumentará la disponibilidad de unidades hemocompatibles beneficiando principalmente a los pacientes que requieren transfusiones crónicas como tratamiento para su patología primaria. La implementación de las pruebas de compatibilidad a nivel molecular en

pacientes aloimmunizados mejorará la eficacia de la terapia transfusional aumentando la supervivencia de los GR transfundidos y manteniendo valores óptimos de hemoglobina sostenidos en el tiempo. Además, el abordaje molecular del sistema Rh posibilitará su correcta tipificación en pacientes con AHAI cuando los autoanticuerpos unidos al GR dificultan la determinación serológica. La genotipificación de pacientes y donantes representará un paso importante en emprendimientos de Medicina Traslacional.

Por otro lado, teniendo en cuenta los estudios sobre el polimorfismo molecular del locus *RH* en nuestra población, en este trabajo de Tesis hemos diseñado y evaluado un protocolo de genotipificación *RHD* fetal no invasivo con el objetivo de implementar a futuro una estrategia que contribuya al diagnóstico de la EHFN en embarazadas aloimmunizadas con anti-D y que permita optimizar el uso de la inmunoprofilaxis en mujeres D negativo no sensibilizadas. Los resultados obtenidos mostraron que la estrategia desarrollada resulta útil para establecer en etapas tempranas del embarazo el genotipo *RHD* fetal. Hemos demostrado que, debido a la gran heterogeneidad molecular del sistema Rh, es de fundamental importancia conocer las principales variantes *RHD* en la población a estudiar para diseñar estrategias de genotipificación *RHD* que disminuyan la posibilidad de resultados falsos positivos y falsos negativos para un manejo adecuado del embarazo. Las pruebas inmunohematológicas realizadas durante el embarazo no permiten determinar el fenotipo D fetal y por lo tanto, evaluar el riesgo de EHFN en embarazadas sensibilizadas. En este sentido, la genotipificación *RHD* fetal no invasiva resulta una herramienta útil que contribuye al diagnóstico de la EHFN permitiendo implementar en las primeras etapas del embarazo el protocolo de seguimiento de alto riesgo de la gestante cuando el feto resulta D positivo. Algunos servicios de Obstetricia utilizan como tratamiento para suprimir la aloimmunización el intercambio plasmático intensivo y/o administración de inmunoglobulina hiperinmune intravenosa. La implementación de la genotipificación *RHD* prenatal no invasiva permitirá evitar la utilización de estas estrategias terapéuticas expansivas y costosas en aquellas situaciones en las cuales el fenotipo fetal es D negativo. Por otro lado, la implementación de la estrategia de genotipificación *RHD* prenatal desarrollada en este trabajo de Tesis en el estudio de las embarazadas D negativo no sensibilizadas permitirá restringir la administración de la inmunoglobulina anti-D prenatal únicamente a aquellas gestantes de un feto D positivo evitando la exposición innecesaria a este hemoderivado.

El conocimiento del polimorfismo genético que subyace en el locus *RHD* en individuos de nuestra población sentará las bases para el desarrollo de herramientas de tipificación molecular

de antígenos eritrocitarios. Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis podrán ser transferidos a la industria nacional de producción de reactivos para bancos de sangre, con el fin de desarrollar equipos comerciales de tipificación molecular adaptados a las características genéticas de nuestra población. La implementación en el Área Salud de nuevas metodologías acrecentará la participación de la Ciencia y la Tecnología en el desarrollo económico y social del país.

RESUMEN

El sistema Rh es el grupo sanguíneo más complejo y polimórfico de la membrana eritrocitaria. Presenta un gran interés clínico en Medicina Transfusional, Obstetricia y Hematología, debido a la participación de sus anticuerpos en los procesos de destrucción inmune de los glóbulos rojos. Los antígenos Rh desempeñan un papel central en las reacciones hemolíticas transfusionales, en la inmunización de pacientes politransfundidos, en la patogénesis de la Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal y en algunas Anemias Hemolíticas Autoinmunes.

El locus *RH* está compuesto por dos genes denominados *RHD* y *RHCE* que codifican para las proteínas transmembranales RhD y RhCE portadoras de los antígenos D y C, c, E, e, respectivamente. La presencia o ausencia del gen *RHD* en el ADN humano determina las bases moleculares del polimorfismo asociado a los fenotipos D positivo y D negativo. Los individuos D positivo poseen uno o dos genes *RHD* por célula; mientras que el fenotipo D negativo resulta de la ausencia del gen *RHD*, siendo las personas D negativo homocigotas

para la delección de este gen. Sin embargo, se ha reportado que existen numerosas variantes alélicas responsables de un fenotipo D negativo que dan origen a proteínas RhD que no expresan los epitopes del antígeno D o no se ensamblan en la membrana eritrocitaria. Además, se han descrito fenotipos D variante (Dvar) generados por distintos eventos moleculares que conducen a una expresión alterada de la proteína RhD. Dentro del fenotipo Dvar, las variantes cualitativas o fenotipo D parcial se caracterizan por la ausencia de algunos epitopes D mientras que las variantes cuantitativas, fenotipo D débil, presentan una expresión disminuida de todos los epitopes D. Los individuos con fenotipo D parcial pueden desarrollar aloanticuerpos anti-D hacia los epitopes que no poseen si son desafiados con eritrocitos D positivo. Por el contrario, las personas con fenotipo D débil no son susceptibles de desencadenar eventos de aloinmunización. Debido a la incapacidad de los métodos serológicos para discriminar entre fenotipo D parcial y D débil, los pacientes con un fenotipo Dvar deben ser considerados D negativo para transfusiones o embarazos. Por otro lado, el fenotipo DEL se caracteriza por presentar una expresión mínima del antígeno D en la membrana del glóbulo rojo. Debido a la dificultad para identificar el fenotipo DEL mediante las técnicas serológicas convencionales, la mayoría de los donantes portadores de estas variantes son tipificados erróneamente como D negativo, con el riesgo potencial de inducir una aloinmunización en receptores D negativo.

El gran número de variantes fenotípicas descritas y la elevada variabilidad en los patrones de reactividad que éstas presentan con los antisueros monoclonales restringen la aplicación de métodos serológicos para su correcta determinación. La caracterización molecular de las variantes alélicas resulta un recurso apropiado para resolver los problemas en aquellas situaciones clínicas donde la serología presenta limitaciones. Debido a la elevada variabilidad genética interpoblacional del sistema Rh, es de fundamental importancia establecer el polimorfismo molecular del locus *RH* en individuos de nuestro país con miras a implementar un abordaje inmunohematológico basado en estudios moleculares.

En este trabajo de Tesis hemos investigado las bases genéticas del locus *RH* en nuestra población para aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares responsables del fenotipo D negativo y fenotipos con expresión débil del antígeno D. Se analizaron 1120 muestras de donantes que concurrieron a bancos de sangre y efectores de salud de Tucumán, Córdoba, Rosario, La Plata y CABA. Dentro de este grupo, se estudiaron

796 muestras con fenotipo D negativo portadoras de los antígenos C y/o E y 324 muestras con fenotipo D variante. Además, se investigó la presencia del marcador genético *RHD Ψ* , característico de individuos de la etnia africana, en 221 muestras con fenotipo dcee provenientes de Tucumán y 1200 de Rosario, y el alelo *DI* A* , marcador genético de la etnia amerindia en 178 muestras de Tucumán y 150 provenientes de Rosario. En todas las muestras se realizaron estudios serológicos y moleculares. Se evaluó la presencia de los antígenos del sistema Rh mediante técnicas de hemaglutinación. Los fenotipos DEL fueron identificados por ensayos de adsorción y elución. Además, se realizaron estudios de los niveles de expresión del antígeno D por citometría de flujo. Se investigó la presencia del gen *RHD* mediante una estrategia de PCR multiplex basada en el polimorfismo de longitud del intrón 4 y en la presencia de una secuencia específica en la región 3' no codificante del gen *RHD*. Se diseñaron diferentes estrategias moleculares de PCR para caracterizar los mecanismos moleculares responsables de los fenotipos D observados. También se utilizaron técnicas de microarreglos de ADN y secuenciación para definir nuevos polimorfismos.

Los estudios de detección del gen *RHD* por la estrategia de PCR multiplex realizados en este trabajo de Tesis permitieron identificar la presencia de fragmentos del gen *RHD* en 133 (16,71%) de las 796 muestras con fenotipo D negativo estudiadas (muestras D-/*RHD*+). Estos resultados mostraron que el fenotipo D negativo no es generado sólo por un evento de delección del gen *RHD* en individuos de nuestra población. A través de las distintas estrategias moleculares utilizadas en este trabajo se caracterizaron variantes *RHD* nulas y *DEL* generadas por eventos de conversión génica entre alelos *RHD* y *RHCE*, delección e inserción de nucleótidos, mutaciones de cambio de sentido y mutaciones sin sentido en muestras D negativo C/E positivo. Los estudios realizados detectaron 98 individuos (12,31%) portadores de alelos *RHD* nulos y 19 (2,39%) portadores de alelos *DEL*. Dentro de este grupo se caracterizaron las variantes alélicas no reportadas *RHCE(1-2)-RHD(3_{361-371del11}-10)*, *RHD(329T>C)-CE(3-9)-D*, *RHD(581insG)* y *RHD(1001T>A)* responsables de un fenotipo D negativo y el alelo *RHD*1248insG* que origina un fenotipo DEL. Se observó que la prevalencia de individuos portadores del nuevo alelo nulo *RHD*581insG*, responsable de la generación de la una proteína RhD truncada que no expresa epitopes D en la membrana eritrocitaria, fue significativamente mayor en las muestras provenientes de Tucumán que en las del resto de las regiones analizadas. Por otro lado, en este trabajo de Tesis se analizó la distribución

del marcador genético *DI*A*, característico de la etnia amerindia con ascendencia asiática, en muestras provenientes de Tucumán y de Rosario. Los resultados mostraron una proporción significativamente mayor de individuos portadores de la variante *DI*A* en muestras de Tucumán, sugiriendo un aporte superior de la etnia amerindia a esta población. Considerando que la variante *RHD*581insG* no ha sido reportada en poblaciones caucásicas europeas, africanas ni asiáticas y que fue detectada con una alta prevalencia en una región donde el aporte amerindio al acervo genético de la población es mayor que en otras áreas geográficas, el nuevo alelo *RHD*581insG* podría asociarse a la etnia amerindia. Por otro lado, la variante alélica híbrida *RHD-CE-D⁵*, característica de individuos de la etnia africana, fue detectada en el 43,61% de las muestras D-/RHD+ de todas las regiones estudiadas, siendo Tucumán la región con el mayor porcentaje observado. Además, los estudios de secuenciación permitieron caracterizar los mecanismos moleculares responsables del alelo *DEL RHD*46C* en muestras con expresión del antígeno E. Esta variante alélica fue detectada con mayor prevalencia en muestras provenientes de Rosario y Tucumán. En el grupo de muestras con fenotipo D negativo C/E positivo se detectaron también 15 portadoras del alelo híbrido *RHD-CE(3-9)-D*. En 7 de estas muestras se identificó el SNP característico del alelo *RHD*DVII*. Estos hallazgos permiten suponer que la nueva variante híbrida *RHD(329T>C)-CE(3-9)-D* es producto de una conversión génica entre los alelos *RHD*DVII* y *RHCE*Ce*. Debido a que ambas variantes son características de individuos caucásicos, los resultados sugieren que el nuevo alelo surge del aporte europeo a la población de nuestro país. Por otro lado, en este trabajo de Tesis se caracterizaron los eventos moleculares responsables de la generación de las nuevas variantes alélicas *RHCE(1-2)-RHD(3₃₆₁_371del11-10)* y *RHD*1001A*, responsables de un fenotipo D negativo. Hemos demostrado por estudios de adsorción-elución que ambas variantes codifican para un polipéptido RhD aberrante y no expresan epitopes D. Estos nuevos alelos fueron incorporados al grupo de las variantes *RHD* nulas. Además, se identificó una muestra portadora del nuevo alelo *RHD*1248insG* responsable de un fenotipo DEL. Esta variante alélica genera una proteína RhD de mayor tamaño. Estudios de adsorción-elución permitieron detectar cantidades mínimas del antígeno D en la membrana eritrocitaria. Estos hallazgos sugieren que la proteína RhD aberrante sería capaz de integrarse en la membrana del glóbulo rojo y expresar epitopes D.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran la importancia de conocer la variabilidad alélica que subyace en el locus *RH* de individuos de nuestra población para desarrollar estrategias de genotipificación *RHD* que disminuyan la posibilidad de obtener resultados falsos positivos. El diseño de estudios moleculares que incluyan la caracterización de alelos *RHD* nulos optimizará el diagnóstico prenatal no invasivo del genotipo *RHD*, asegurando una estricta correlación entre el genotipo y el fenotipo fetal. Además, el conocimiento de las bases moleculares de los alelos *DEL* asociados a los diferentes grupos étnicos resulta fundamental para desarrollar estrategias de genotipificación en individuos D negativo. En este trabajo de Tesis hemos identificado un 2,39% de individuos portadores de alelos *DEL*. Estos hallazgos demuestran la importancia de implementar estrategias moleculares en las muestras D negativo C/E positivo para detectar polimorfismos responsables de fenotipos aparentes D negativo capaces de generar una aloinmunización en receptores D negativo.

Por otro lado, hemos investigado los mecanismos moleculares del polimorfismo del locus *RH* en individuos portadores de variantes alélicas *RHD* responsables de fenotipos con expresión débil del antígeno D en nuestra población. Utilizando estrategias de biología molecular se identificaron alelos D parcial generados por conversión génica entre alelos *RHD* y *RHCE* o por SNPs y alelos D débil producto de mutaciones de cambio de sentido. Debido a la dificultad para discriminar serológicamente a las variantes cualitativas, actualmente los pacientes portadores de un fenotipo Dvar se consideran en riesgo de desarrollar una inmunización anti-D y por lo tanto, son tratados como D negativo para transfusiones o embarazos. Sin embargo, numerosas evidencias clínicas han demostrado que individuos portadores de los alelos *D débil tipo 1, 2 y 3* no son susceptibles de aloinmunización anti-D ante una exposición a glóbulos rojos D positivo. Los estudios moleculares de las muestras con fenotipo Dvar mostraron que un 58,02% de los individuos resultaron portadores de alelos *D débil tipo 1, 2 o 3*. Los resultados indican que más del 60% de los individuos pertenecientes a las ciudades de la región central del país presentaron una expresión aberrante del antígeno D producto de estas variantes alélicas. Sin embargo, en Tucumán la distribución fue menor al 37%. Los análisis estadísticos indicaron que la probabilidad de encontrar un individuo portador de estos alelos en las muestras provenientes de Tucumán fue significativamente menor que para las otras 4 ciudades analizadas donde esta

proporción no mostró diferencias significativas. El predominio de alelos *D débil tipo 1, 2 y 3*, característicos de caucásicos, indicaría un mayor aporte de europeos al acervo genético de la población de la región central del país. La implementación de estrategias moleculares que permitan detectar estas variantes en pacientes que presentan un fenotipo Dvar permitirá optimizar el uso de las escasas unidades D negativo disponibles en los servicios de Medicina Transfusional y reservarlas exclusivamente para los pacientes que se encuentran en riesgo real de desarrollar una respuesta aloinmune hacia el antígeno D.

Además, en el grupo de muestras con fenotipo Dvar se caracterizaron los mecanismos moleculares responsables de variantes alélicas D parcial. Los resultados obtenidos mostraron una alta prevalencia de individuos portadores de alelos *RHD* parcial *RHD*DVI* (4,63%). Debido a que estas variantes alélicas generan una proteína RhD que carece de algunos epitopes D, los individuos portadores de estos alelos son susceptibles de desarrollar aloinmunización anti-D. La caracterización molecular de las variantes cualitativas en los servicios de Medicina Transfusional de nuestra población evitará posibles incompatibilidades Rh.

Por otro lado, se identificaron variantes genéticas *RHD* producto de mutaciones de cambio de sentido no reportadas. Uno de los nuevos alelos identificados fue registrado y denominado *D débil tipo 93* por la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (ISBT). Cabe destacar que, de las 31 muestras portadoras de la nueva variante hallada en este trabajo de Tesis, 20 (64,52%) corresponden a donantes provenientes de Tucumán. Teniendo en cuenta que el marcador genético *DI*A* demostró una mayor influencia amerindia en la región norte del país, la presencia de este alelo podría atribuirse al aporte de esta etnia al acervo genético de la población tucumana. Además, se identificaron 4 nuevas variantes alélicas *RHD*325G*, *RHD*763A*, *RHD*764A* y *RHD*911A*. Las sustituciones aminoacídicas generadas por estos SNPs provocarían alteraciones en el plegamiento de la proteína RhD que modificarían el correcto ensamblaje del polipéptido RhD en el complejo Rh alterando la expresión de los epitopes D.

La discriminación entre variantes cuantitativas y cualitativas es de fundamental importancia en los bancos de sangre para optimizar la compatibilidad transfusional y garantizar la provisión de sangre segura, y en Obstetricia para definir estrategias de intervención médica en las embarazadas. Los hallazgos obtenidos en este trabajo de tesis

sobre los mecanismos genéticos responsables de la variabilidad alélica del locus *RH* en la población argentina, tendrán su correlato en la implementación de estrategias moleculares como herramientas de laboratorio para la asignación precisa e inequívoca de las variantes antigénicas de importancia clínica.

Teniendo en cuenta los estudios sobre el polimorfismo molecular del locus *RH* en nuestra población realizados en este trabajo de Tesis, se diseñó y evaluó un protocolo de genotipificación *RHD* fetal no invasivo con el objetivo de implementar a futuro una estrategia que contribuya al diagnóstico de la EHFN en embarazadas aloinmunizadas con anti-D y que permita optimizar el uso de la inmunoprofilaxis en mujeres D negativo no sensibilizadas.

Considerando la alta prevalencia de alelos *RHD* silentes y *DEL* en nuestra población, el diseño de la estrategia de genotipificación prenatal debe tener en cuenta la variabilidad alélica del locus *RH* para asignar un correcto fenotipo. El algoritmo diseñado en este trabajo propone el estudio del ADN genómico materno para detectar mujeres embarazadas portadoras de alelos *RHD* y el análisis del ADN genómico paterno en aquellas situaciones donde los resultados obtenidos en el estudio del ADN libre por PCR en tiempo real no son concluyentes. Se realizaron estudios serológicos y moleculares en la sangre de los recién nacidos para correlacionar con los hallazgos moleculares obtenidos en el ADN libre con el fenotipo D eritrocitario de los neonatos. Los resultados obtenidos permitieron asignar el genotipo *RHD* fetal en el 98,99% de las muestras de plasma materno estudiadas. La correlación entre los resultados moleculares y serológicos mostró que la estrategia de genotipificación *RHD* prenatal presenta una sensibilidad del 100% al no obtener resultados falsos negativos y una especificidad del 98,81% al detectarse sólo un falso positivo, debido a la presencia de una variante alélica responsable de un fenotipo D negativo. El protocolo diseñado para la detección del gen *RHD* en ADN fetal libre en plasma materno demostró ser una herramienta útil para la determinación del estatus D del feto en nuestra población. La correcta genotipificación *RHD* prenatal permitirá diagnosticar fetos en riesgo real de EHFN y definir estrategias de administración de la profilaxis con inmunoglobulina anti-D exclusivamente a embarazadas cuyos fetos son D positivo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Daniels G. Human Blood groups. (2013). 3° edición. Wiley-Blackwell.
- 2) Daniels G, Bromilow I. Essential guide to blood groups. (2014). 3° edición. Wiley-Blackwell.
- 3) Reid M., Lomas-Francis C. (2002). Molecular approaches to blood group identification. *Curr Opin Hematol*, 9: 152-159.
- 4) Daniels G. (2001). A century of human blood groups. *Wien Klin Wochenschr*, 30: 781-78.
- 5) Daniels G, Reid M. (2010). Blood groups: the past 50 years. *Transfusion*, 50: 281-289.
- 6) National Center for Biotechnology Information. The Blood Group Antigen Gene Mutation Database: Alleles of the Rh Blood Group System. (2014). Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/systemalleles&system=rh>.
- 7) Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (ISBT). (2016). Disponible en:
<http://www.isbtweb.org>
- 8) Flegel, W. (2011) Molecular genetics and clinical applications for *RH*. *Transfus Apher Sci*, 44: 81-91.

- 9) International Society of Blood Transfusion (ISBT). Nombres para los alelos del grupo sanguíneo *RH* (ISBT 004). (2014). Disponible en:
<http://www.isbtweb.org/workingparties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/blood-group-terminology/blood-group-allele-terminology/>
- 10) Mollison P, Engelfreit C Contreras P. (1993). *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 9th edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- 11) Wagner F, Flegel W. (2004). Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology*, 20: 23-36.
- 12) Avent N. (2007). New insight in the Rh system: structure and function. *Vox Sang, ISBT Science Series*, 2: 35-43.
- 13) Westhoff C. (2007). The structure and function of the Rh antigen complex. *Semin Hematol*, 44 (1): 42-50.
- 14) Daniels G. (2013). *Human Blood Groups*. 3rd Edn. Wiley Blackwell, Oxford, UK.
- 15) Schenkel-Brunner H. (2000). *Human Blood Groups: chemical and biochemical basis of antigen specificity*, 2nd edn. Vienna, Austria.
- 16) Levine P, Stetson R. (1939). An unusual case of intragroup agglutination. *J Am Med Ass*, 113: 126-127.
- 17) Landsteiner K, Wiener A. (1940). An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med*, 43: 223-224.
- 18) Levine P, Celano M, Wallace J, Sanger R. (1963). A human D-like antibody. *Nature*, 198: 596-597.
- 19) Grandstaff Moulds M. (2011). The LW blood group system: a review. *Immunohematology*, 27 (4): 136-142.
- 20) Cherif-Zahar B, Mattei M, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron J, Colin Y. (1991). Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome 1p34.3-1p36.1 region by in situ hybridization. *Hum Genet*, 86: 398-400.
- 21) Arce M, Thompson E, Wagner S, Coyne K, Ferdman B, Lublin D. (1993). Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD positive, but not RhD negative individuals. *Blood*, 82: 651-655.
- 22) Simsek S, de Jong C, Cuijpers H, Bleeker P, Westers T, Overbeeke M, Goldschmeding R, van der Schoot C, von dem Borne A. (1994). Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte

- mRNAs coding for Rh polypeptides and demonstration of E/e and C/c polymorphism. *Vox Sang*, 67: 203-209.
- 23) Fisher R, Race R. (1946). Rh gene frequencies in Britain. *Nature*, 157: 48-52.
- 24) Wiener A. (1951). Rh-Hr blood types: serology, genetics and nomenclature. *Trans NY Acad Sci*, 13: 198-204.
- 25) Rosenfield R, Allen F, Swisher S, Kochwa S. (1962). A review of Rh serology and presentation of new terminology. *Transfusion*, 2: 287-312.
- 26) Tippett P. (1986). A speculative model for the Rh blood groups. *Ann Hum Genet*, 50: 241-247.
- 27) Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron J. (1991). Genetic basis of the RhD positive and RhD negative blood group polymorphism as determined by southern analysis. *Blood*, 78: 2747-2752.
- 28) Le Van Kim C, Mouro I, Chérif-Zahar B, Raynal V, Cherrier C, Cartron J, Colin Y. (1992). Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 10925-10929.
- 29) Wagner F, Frohmajer A, Flegel W. (2001). *RHD* positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet*, 2: 10-25.
- 30) Daniels G, Anstee D, Cartron J, Dahr W, Jørgensen J, Kornstad L, Levene C, Lomas-Francis C, Lubenko A, Mallory D, Moulds J, Okubo Y, Overbeeke M, Reid M, Rouger P, Seidl S, Sistonen P, Wendel S, Woodfield G, Zelinski T. (1995). Blood Group Terminology 1995: ISBT Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens. *Vox Sang*, 69: 265–279.
- 31) McGeoch C, Mitchell C, Carritt B, Avent N, Ridgwell K, Tanner M, Spurr N. (1992). Assignment of the chromosomal locus of the human 30 kDa Rh (rhesus) blood group-antigen-related protein (Rh30A) to chromosome region 1p36.13-p34. *Cytogenet Cell Genet*, 59: 261-263.
- 32) Okuda H, Suganuma H, Tsudo N, Omi T, Iwamoto S, Kajii E. (1999). Sequence Analysis of the Spacer Region between the *RHD* and *RHCE* Genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263: 378–383.
- 33) Wagner F, Flegel W. (2002). *RHCE* represents the ancestral *RH* position, while *RHD* is the duplicated gene. *Blood*, 99: 2272-2273.
- 34) Salmon C, Cartron J, Rouger P. (1991). *Les groupes sanguins chez l' homme*. Chap 3, 2^e Edition, Masson, Paris.
- 35) Wagner F, Flegel W. (2000). *RHD* gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*, 95: 3662-3668.

-
- 36) Okuda H, Suganuma H, Kamesaki T, Kumada M, Tsudo N, Omi T, Iwamoto S, Kajii E. (2000). The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and recombination events between *RHD* and *RHCE* genes through complete sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*, 274: 670-683.
- 37) Huang C, Liu P, Cheng J. (2000). Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. *Semin Hematol*, 37: 450-465.
- 38) Okuda H, Kajii E. (2002). The evolution and formation of *RH* genes. *Leg Med*, 4(3): 139-55.
- 39) Flegel W, Wagner F, Müller T, Gassner C. (1998). Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med*, 8: 281-302.
- 40) Daniels G. (2009). The molecular genetics of blood Group polymorphism. *Hum Genet*, 126(6): 729-42.
- 41) den Dunnen J, Antonarakis S. (2000). Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion. *Human Mutations*, 15: 7-12.
- 42) Anstee D. (2011). The functional importance of blood group-active molecules in human red blood cells. *Vox Sang*, 100: 140–149.
- 43) Matassi G, Cherif Zahar B, Raynal V, Rouger P, Cartron J. (1998). Organization of the human *RH50A* gene (*RHAG*) and evolution of base composition of *RH* gene family. *Genomics*, 47: 286-293.
- 44) Huang C. (1998). The human Rh50 glycoprotein gene, structural organization and associated splicing defect resulting in Rhnull disease. *J Biol Chem*, 273: 2207-2213
- 45) Iwamoto S, Omi T, Yamasaki M, Okuda H, Kawano M, Kajii E. (1998). Identification of 5' flanking sequence of *RH50* gene and the core region for erythroid-specific expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 24(1): 233-234.
- 46) Burton N, Anstee D. (2008). Structure, function and significance of Rh proteins in red cells. *Curr Opin Hematol*, 15(6): 625-30.
- 47) Tilley L, Green C, Poole J, Gaskell A, Ridgwell K, Burton N. (2010). A new blood group system, *RHAG*: three antigens resulting from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Vox Sang*, 98(2): 151–9.
- 48) Huang C, Ye M. (2010). The Rh protein family: gene evolution, membrane biology and disease association. *Cell Mol Life Sci*, 67(8): 1203-18.
- 49) Cartron J, Bailly P, Le Van Kim C. (1998). Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens. *Vox Sang*, 74: 29-64.

- 50) Conroy M, Bullough P, Merrick M, Avent N. (2005). Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *Br J Haematol*, 131: 543-51.
- 51) Gruswitz F, Chaudhary S, Ho J, Schlessinger A, Pezeshki B, Ho C, Sali A, Westhoff C, Stroud R. (2010). Function of human Rh based on structure of RhCG at 2.1 Å. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107: 9638-9643.
- 52) Burton N, Daniels G. (2011). Structural modelling of red cell surface proteins. *Vox Sang*, 100: 129-39.
- 53) Merrick M, Javelle A, Durand A, Severi E, Thornton J, Avent N, Conroy M, Bullough P. (2006). The *Escherichia coli* AmtB protein as a model system for understanding ammonium transport by Amt and Rh proteins. *Transfus Clin Biol*, 13(1-2): 97-102.
- 54) Le van Kim C, Colin Y, Cartron J. (2006). Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev*, 20(2): 93-110.
- 55) Inwood W, Kustu S. (2004). Lack of the Rhesus protein Rh1 impairs growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at high CO₂. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(20): 7787-7792.
- 56) Biver S, Belge H, Bourgeois S, Van Vooren P, Nowik M, Scohy S, Houillier P, Szpirer J, Szpirer C, Wagner C, Devuyst O, Marini A. (2008) A role for Rhesus factor Rhcg in renal ammonium excretion and male fertility. *Nature* 456: 339–343.
- 57) Polin H, Pelc-Kopotowska M, Danzer M, Suessner S, Gabriel C, Wilflingseder J, Żmudzin A, Orzińska A, Guz K, Michalewska B, Brojer E (2016). Compound heterozygosity of two novel *RHAG* alleles leads to a considerable disruption of the Rh complex. *Transfusion*, 56(4): 950-5.
- 58) Chérif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C, Blanchard D, Bailly P, Hermand P, Salmon C, Cartron J, Colin Y. (1990). Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 6243-6247.
- 59) Avent N, Martinez A., Flegel W, Olsson M, Scott M, Noguez N, Pisacka M, Daniels G, van der Schoot E, Muniz-Diaz E, Madgett T, Storry J, Beiboer S, Maaskant-van Wijk P, von Zabern I, Jimenez E, Tejedor D, Lopez M, Camacho E, Cheroutre G, Hacker A, Jinoch P, Svobodova I, de Haas M. (2007). The BloodGen project: towards mass-scale comprehensive genotyping of blood donors in the European Union and beyond. *Transfusion*, 47(1S): 40S–46S.
- 60) Hartel-Schenk S, Agre P. (1992). Mammalian red cell membrane Rh polypeptides are selectively palmitoylated subunits of a macromolecular complex. *Biol Chem*, 267: 5569-74.
- 61) Agre P, Smith BL, Hartel-Schenk S. (1990). Biochemistry of the erythrocyte Rh polypeptides: a review. *Yale J Biol Med*, 63(5): 461-7.

- 62) Eyers S, Ridgwell K, Mawby W, Tanner M. (1994). Topology and organization of human Rh (rhesus) blood-group related polypeptides. *J Biol Chem*, 269: 6417-6223.
- 63) Mouro I, Colin Y, Chérif-Zahar B, Cartron J, Le Van Kin C. (1993). Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nat Genet*, 5: 62-65.
- 64) Simseck S, de Jong C, Cuijpers H, Bleeker P, Westers T, Overbeeke M, Goldschmeding R, van der Schoot C, von dem Borne A. (1994). Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNAs coding for Rh polypeptides and demonstration of C/c and E/e polymorphisms. *Vox Sang*, 67: 203-210.
- 65) Smythe J, Avent N, Judson P, Parsons S, Martín P, Anstee D. (1996). Expression of *RHD* and *RHCE* gene products using retroviral transduction of K562 cells establishes the molecular basis of Rh blood group antigens. *Blood*, 87: 2968-2973.
- 66) Gassner C, SchmarDA A, Kilga-Nogler S, Jenny-Feldkircher B, Rainer E, Müller T, Wagner F, Flegel W, Schönitzer D. (1997). *RHD/CE* typing by polymerase Chain reaction using sequence-specific primers. *Transfusion*, 37: 1020-6.
- 67) Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Rouillac C, Raynal V, Cartron J, Colin Y. (1994). Organization of the gene (*RHCE*) encoding the human blood group RhCcEe antigens and characterization of the promoter region. *Genomics*, 19: 68-74.
- 68) Brecher M. (2007). Manual Técnico. Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunología. 15º edn.
- 69) Beckers E, Faas B, Ligthart M, Overbeeke A, von dem Borne C, van der Schoot, van Rhenen D. (1997). Lower antigen site density and weak D immunogenicity cannot be explained by structural genomic abnormalities or regulatory defects of the *RHD* gene. *Transfus*, 37(6): 616-23.
- 70) Lomas C, Tippett P, Thompson K, Melamed M, Hughes-Jones N. (1989). Demonstration of nine epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang*, 57: 261-264.
- 71) Cartron J, Rouillac C, Le Van Kim C, Mouro I, Colin Y (1996). Tentative model for the zapping of D epitopes on the RhD polypeptide. *Transfus Clin Biol*, 3: 497-503.
- 72) Tippett P, Lomas C, Wallace M. (1996). The Rh antigen D: partial D antigen and associated low incidence antigens. *Vox Sang*, 70: 123-131.

- 73) Jones J, Scott M, Voak D. (1995). Monoclonal anti-D specificity and RhD structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. *Transfus Med*, 5: 171-184.
- 74) Scott M, Voak D, Jones J, Avent N, Liu W, Hughes-Jones N, Sonneborn H. (1996). A structural model for 30 Rh D epitopes based on serological and DNA sequence data from partial D phenotypes. *Transfus Clin Biol*, 3(6): 391-6.
- 75) Liu W, Avent N, Jones J, Scott M, Voak D. (1999). Molecular configuration of RhD epitopes as defined by site-directed mutagenesis and expression of mutant Rh constructs in K562 erythroleukemia cells. *Blood*, 94(12): 3986-96.
- 76) Daniels G. (2013). Variants of RhD. Current testing and clinical consequences. *Br J Haematol*, 161: 461-470.
- 77) Muñiz Diaz E, Cotorruelo C, Nogués N. (2014). *Inmunoematología básica y aplicada*, 1ra edn. GCIAMT, Cali, Colombia: 103-136.
- 78) Denomme G, Wagner F, Fernandes B, Li W, Flegel W. (2005). Partial D, weak D types, and novel *RHD* alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion*, 45: 1554-60.
- 79) Sandler S, Flegel W, Westhoff C, Denomme G, Delaney M, Keller M, Johnson S, Katz L, Queenan J, Vassallo R, Simon C. (2015). It's time to phase in *RHD* genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. *Transfusion*, 55: 680–689.
- 80) Tippett P, Sanger R. (1977). Further observation on subdivisions of the Rh antigen. *Das Arztliche Laboratorium*, 23: 476-480.
- 81) Judd W, Moulds M, Schlanser G. (2005). Reactivity of FDA-approved anti-D reagents with partial D red blood cells. *Immunohematology*, 21(4): 146.
- 82) Denomme G, Dake L, Vilensky D, Ramyar L, Judd W. (2008). Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion*, 48: 473–478.
- 83) Beckers E, Geraedts J, van Rhenen D. (1994). A study of the prevalence and pattern of inheritance of partial D antigen category VI in a white population. *Transfusion*, 34: 455-458.
- 84) Wagner F, Gassner C, Müller T, Schönitzer D, Schunter F, Flegel W. (1998) Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features. *Blood*, 91(6): 2157–68.

- 85) Avent N, Liu W, Jones J, Scott M, Voak D, Pisacka M, Watt J, Fletcher A. (1997). Molecular analysis of Rh transcripts and polypeptides from individuals expressing the DVI variant phenotype: An *RHD* gene deletion event does not generate all DVI ccEe phenotypes. *Blood*, 89: 1779-1785.
- 86) Huang C. (1997). Human DVI categories erythrocytes: Correlation of the phenotype with a novel hybrid *RhD-CE-D* gene but not an internally deleted RhD gene. *Blood*, 89, 1834-1840.
- 87) Esteban, R., Montero, R., Flegel, Willy A., Wagner, Franz F., Subirana, L., Parra, R., Ribera, A. and Nogués, N. (2006). The D category VI type 4 allele is prevalent in the Spanish population. *Transfusion*, 46: 616–623.
- 88) Flegel W. (2006). How I manage donors and patients with a weak D phenotype? *Current Opinion in Hematology*, 13: 476–483.
- 89) Flegel W, Wagner F. (2002). Molecular biology of Partial D and weak D. Implications for blood bank practice. *Clin Lab*, 48: 53-59.
- 90) Lejon Crottet S, Haer-Wigman L, Gowland P, Fontana S, Niederhauser C, Hustinx H. (2013). Serologic and molecular investigations of *DAR1 (weak D Type 4.2)*, *DAR1.2*, *DAR1.3*, *DAR2 (DARE)*, and *DARA*. *Transfusion*, 53(2): 3000-3008.
- 91) Orlando N, Putzulu R, Massini G, Scavone F, Piccirillo N, Maresca M, Zini G, Teofili L. (2015). *Weak D Type 4.2.2 (DAR1.2)* in an African child: Serology and molecular characterization. *Transfus Apher Sci*, 52(2): 217-9.
- 92) Wagner F, Flegel W. (2014). The Rhesus Site. *Transfus Med Hemother*, 5:357–363. Disponible en: <http://www.rhesusbase.info/>.
- 93) Rouillac C, Colin Y, Hughes-Jones N, Beolet M, D'Ambrosio A, Cartron J, Le Van Kim C. (1995). Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid Rh D-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood*, 85: 2937-2944.
- 94) von Zabern I, Wagner F, Moulds J, Moulds J, Flegel W. (2013). D category IV: a group of clinically relevant and phylogenetically diverse partial D. *Transfusion*, 53(11 Suppl 2): 2960-73.
- 95) Rouillac C, Le Van Kim C, Beolet M, Cartron J, Colin Y. (1995). Leu110Pro substitution in the RhD polypeptide is responsible for the DVII category blood group phenotype. *Am J Hematol*, 49(1): 87-8.
- 96) Wagner F, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher N, Lonicer C, Müller T, Siegel M, Flegel W. (2000). Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*, 96: 2699-2708.

- 97) Wagner F, Gassner C, Müller T, Schönitzer D, Schunter F, Flegel W. (1999). Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*, 93: 385–393.
- 98) Luján Brajovich M, Trucco Boggione C, Racca A, Marcel Tarragó, Nogués N, Muñiz-Díaz E, Cotorruelo C. (2012). Comprehensive analysis of *RHD* alleles in Argentineans with variant D phenotypes. *Transfusion*, 52(2): 389-96.
- 99) Flegel W, Denomme G, Yazer M. (2007). On the complexity of D antigen typing: a handy decision tree in the age of molecular blood group genetics. *Journal of Obstetrics & Gynaecology Canada*, 29: 746–752.
- 100) Körmöczi G, Gassner C, Shao C, Uchikawa M, Legler T. (2005). A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion*; 45: 1561–1567.
- 101) Okubo Y, Yamaguchi H, Tomita T, Nagao N. (1984). A D variant, Del? *Transfusion*, 24: 542.
- 102) Pornlada N, Jairak T, Apapan S, Usanee K, Virapong P. (2014). Clinical and Laboratory Update on the DEL Variant. *Lab Med Fall*, 45: 285-289.
- 103) Flegel W, von Zabern I, Wagner F. (2009). Six years' experience performing *RHD* genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion*, 49: 465-471.
- 104) Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. (2005). Secondary anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*, 45: 1581-1584.
- 105) Li Q, Ye L, Guo Z, Qian M, Zhu Z. (2006) Study on the molecular background of Del phenotype in Chinese population. *Chin J Med Genet*, 23: 486–491.
- 106) Gassner C, Doescher A, Drnovsek T, Rozman P, Eicher N, Legler T, Lukin S, Garritsen H, Kleinrath T, Egger B, Ehling R, Körmöczi G, Kilga-Nogler S, Schoenitzer D, Petershofen E. (2005). Presence of *RHD* in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*, 45: 527-538.
- 107) Li Q, Hou L, Guo Z, Ye L, Yue D, Zhu Z. (2009). Molecular basis of the *RHD* gene in blood donors with DEL phenotypes in Shanghai. *Vox Sang*, 97: 139–146.
- 108) Sun C, Liu J, Chen D, Wang W, Yang T. (2008). Use of real time PCR for rapid detection of Del phenotype in Taiwan, *Ann Clin Lab Sci*, 38: 258–263.
- 109) Chen J, Lin T, Chen Y, Wang Y, Jin Y, Yue C. (2004). *RHD* 1227A is an important genetic marker for RhD(e) individuals. *Am J Clin Pathol*, 122:193-8.

- 110) Yang Y, Wang Y, Chen J, Eng H, Lin T. (2007). Prevalence of *RHD* 1227A and hybrid Rhesus box in the general Chinese population. *Transl Res*, 149: 31-6.
- 111) Polin H, Danzer M, Gaszner W, Broda D, St-Louis M, Pröll J, Hofer K, Gabriel C. (2009). Identification of *RHD* alleles with the potential of anti-D immunization among seemingly D-blood donors in Upper Austria. *Transfusion*, 49: 676-681.
- 112) Kim J, Kim S, Kim C, Yon G, Park S. (2005). Molecular characterization of D-Korean persons: development of a diagnostic strategy. *Transfusion*, 45: 345-52.
- 113) Gowland P, Gassner C, Hustinx H, Stolz M, Gottschalk J, Tissot J, Thierbach J, Maier A, Sigurdardottir S, Still F, Fontana S, Frey B, Niederhauser C. (2014). Molecular *RHD* screening of RhD negative donors can replace standard serological testing for RhD negative donors. *Transf and Aph Science*, 50: 163-168.
- 114) Trucco Boggione C, Luján Brajovich M, Tarragó M, Mattaloni S, Biondi C, Muñiz-Díaz E, Nogués N, Cotorruelo C. (2014). Molecular structures identified in serologically D- samples of an admixed population. *Transfusion*, 54: 2456-2462.
- 115) Singleton B, Green C, Avent N, Martin P, Smart E, Daka A, Narter-Olaga E, Hawthorne L, Daniels G. (2000). The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 bp duplication and a nonsense mutation is present in most Africans with the RhD negative blood group phenotype. *Blood*, 95: 12-18.
- 116) Chen J, Fichou Y, Jamet D, Dupont I, Cooper D, Le Maréchal C, Férec C. (2013). Small deletions within the *RHD* coding sequence: a report of two novel mutational events and a survey of the underlying pathophysiologic mechanisms. *Transfusion*, 53: 206-210.
- 117) Pham B, Peyrard T, Juszczak G, Dubeaux I, Gien D, Blancher A, Cartron J, Rouger P, Le Pennec P. (2009). Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hr B-, Hr B- phenotype in black persons. *Transfusion*, 49: 495-504.
- 118) Rodrigues A, Rios M, Pellegrino J, Costa F, Castilho L. (2002). Presence of the *RHD* pseudogene and the hybrid *RHD-CE-D(s)* gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Braz J Med Biol Res*, 35: 767-773.
- 119) Faas B, Beckers S, Wildoer P, Ligthart P, Overbeeke M, Zondervan H, von dem Borne A, van der Schoot C. (1996). Weak RhC associated with VS expression in black donors results from a hybrid *D-CE-D* gene. *Vox Sang*, 74: 19-21.

- 120) Faas B, Beckers E, Wildoer P, Ligthart P, Overbeeke M, Zondervan H, von dem Borne A, van der Schoot C. (1997). Molecular background of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion*, 37: 38-44.
- 121) Daniels G, Green C, Smart E. (1997). Differences between RhD-negative Africans and RhD-negative Europeans. *Lancet*, 350: 862-863.
- 122) Daniels G, Faas B, Green C. (1998). The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serological and molecular analysis. *Transfusion*, 38: 951-958.
- 123) Avent N, Reid M. (2000). The Rh blood group system: a review. *Blood*, 95: 375-387.
- 124) Daniels G, Poole J, de Silva M, Callaghan T, MacLennan S, Smith N. (2002). The clinical significance of blood group antibodies. *Transfus Med*; 12: 287-95.
- 125) Flegel W. Homing in on D antigen immunogenicity. (2005). *Transfusion*, 45: 466-8.
- 126) Yazer M, Triulzi D. (2007). Detection of anti-D recipients transfused with D+ red blood cells. *Transfusion*, 47: 2197-201.
- 127) Gonzalez-Porrás J, Graciani I, Perez-Simon J, Martín-Sánchez J, Encinas C, Conde M, Nieto M, Corral M. (2008). Prosective evaluation of a transfusion policy of D+ red blood cells into D- patients. *Transfusion*, 48 : 1318-24.
- 128) Issitt P. (1996). Recent advances in the RH blood group system. *Vox Sang*, 70: 26-33.
- 129) Mota M, Fonseca N, Rodrigues A, Kutner J, Castilho L. (2005) Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang*, 88: 130-5.
- 130) Peyrard T. (2013). Use of genomics for decision-making in transfusion medicine: laboratory practice. *ISBT Science Series*, 8(1): 11-15.
- 131) Reid M, Denomme G. (2011). DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfusion and apheresis science*, 44(1): 65-72.
- 132) Arnoni C, Latini F, Muniz J, Gazito D, Person R, Vendrame P, Barreto J, Castilho L. (2014). How do we identify *RHD* variants using a practical molecular approach? *Transfusion*, 54(4): 962-969.
- 133) Garrathy G, Petz L. (1993). Transfusing patients with autoimmune haemolytic anaemia. *Lancet*, 341: 1220.
- 134) Westhoff C. (2006). Molecular testing for transfusion medicine. *Curr Opin Hematol*, 13: 471-5.
- 135) Reid M. (2007). Overview of molecular methods in immunohematology. *Transfusion*, 47: 10-16.

- 136) Reid M, Rios M, Powell V, Charles-Pierre D, Malavade V. (2000). DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion*, 40: 48-53.
- 137) Reid M. (2003). Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion*, 43: 1748-1757.
- 138) Bakanay S, Ozturk A, Ileri T, Ince E, Yavasoglu S, Akar N, Uysal Z, Arslan O. (2013). Blood group genotyping in multi-transfused patients. *Transfusion and Apheresis Science*, 48(2): 257-261.
- 139) Legler T, Maas J, Kölher M. (2001). *RHD* sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. *Transfus Med*, 11: 383-388.
- 140) Avent N. (2005). High variability of the *RH* locus in different ethnic backgrounds. *Transfusion*, 45: 293-294.
- 141) Catelli M, Alvarez-Iglesias V, Gómez-Carballa A, Mosquera-Miguel A, Romanini C, Borosky A, Amigo J, Carracedo A, Vullo C, Salas A. (2011). The impact of modern migrations on present-day multi-ethnic Argentina as recorded on the mitochondrial DNA genome. *BMC Genet* 2011; 12:77.
- 142) Avena S, Via M, Ziv E, Pérez-Stable E, Gignoux C, Dejean C, Huntsman S, Torres-Mejía G, Dutil J, Matta J, Beckman K, Burchard E, Parolin M, Goicoechea A, Acreche N, Boquet M, Ríos Part M, Fernández V, Rey J, Stern M, Carnese R, Fejerman L. (2012). Heterogeneity in genetic admixture across different regions of Argentina. *PloS One*, 7(4): e34695.
- 143) Moise K, Argoti P. (2012). Management and prevention of red cell alloimmunization in pregnancy: a systematic review. *Obstet Gynecol*, 120(5): 1132-9.
- 144) de Haas M, Thurik F, Koelewijn J, van der Schoot C. (2015). Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang*, 109(2): 99-113.
- 145) Walker R. Technical Manual, 11th Edition. (1993) American Association of Blood Banks: Bethesda.
- 146) Bennett P, Le Van Kim C, Colin Y, Warwick R, Path F, Chérif-Zahar B, Fisk N, Cartron J. (1993). Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med*, 329: 607-610.
- 147) Flegel W, Wagner F, Müller T, Gassner C. (1998). Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med*, 8: 281-302.

- 148) Nicolini U, Kochenour N, Greco P. (1998). Consequences of fetomaternal hemorrhage after intrauterine transfusion. *Br Med J*, 297: 1379-1381.
- 149) Geifman-Holtzman O, Bernstein I, Berry S, Holtzman E, Vadnais T, DeMaria M, Bianchi D. (1996). Fetal RhD genotyping in fetal cell flow sorted from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol*, 174: 818-822.
- 150) Bianchi D, Zickwolf G, Weil G, Sylvester S, DeMaria M. (1996). Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sc. USA*, 93: 705-708.
- 151) Lo Y, Corbetta M, Chamberlain F, Rai V, Sargent I, Redman C, Wainscoat J. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350(9076): 485-7.
- 152) Lo Y. (2000). Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic application. *Clin Chem*, 46: 1903-1906.
- 153) Daniels G, Finning K, Martin P, Summers J. (2006). Fetal blood group genotyping: present and future. *Ann NY Acad Sci*, 1075: 88-95.
- 154) Hyland C, Gardener G, Davies H, Ahvenainen M, Flower R, Irwin D, Morris J, Ward C, Hyett J. (2009). Evaluation of non-invasive prenatal *RHD* genotyping of the fetus. *Med J Aust*, 191(1): 21-5.
- 155) Scheffer P, van der Schoot C, Page-Christiaens G, de Haas M. (2011). Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *BJOG*, 118(11): 1340-8.
- 156) Clausen F, Damkjaer M, Dziegiel M. (2014). Noninvasive fetal RhD genotyping. *Transfus Apher Sci*, 50(2): 154-62.
- 157) Chitty L, Finning K, Wade A, Soothill P, Martin B, Oxenford K, Daniels G, Massey E. (2014). Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal *RHD* status across gestation: population based cohort study. *BMJ*, 349: g5243.
- 158) Levine P, Robinson E, Layrisse M, Arends T, Domingues Sisco R. (1956). The Diego blood factor. *Nature*, 177(4497): 40-1.
- 159) Layrisse M, Arends T. (1958). The Diego blood factor distribution; genetic, clinical and anthropological significance. *Bibl Haematol*, 7: 114-6.
- 160) Junqueira P, Castilho L. (2002). The history of the Diego blood group. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 24(1): 15-23.

- 161) Anstee D. (2010). The relationship between blood groups and disease. *Blood*, 115(23): 4635–43.
- 162) Bégat C, Bailly P, Chiaroni J, Mazières S. (2015). Revisiting the Diego Blood Group System in Amerindians: Evidence for Gene-Culture Comigration. *PLoS ONE*, 10(7): e0132211.
- 163) Jethava A, Olivares E, Shariatmadar S. (2015). A Case of Hemolytic Disease of the Newborn due to Di (a) Antibody. *Case Rep Pediatr*, 2015: 897803.
- 164) Mochizuki K, Ohto H, Hirai S, Ujiie N, Amanuma F, Kikuta A, Miura S, Yasuda H, Ishijima A, Suzuki H. (2006). Hemolytic disease of the newborn due to anti-Di: a case study and review of the literature. *Transfusion*, 46(3): 454-60.
- 165) Reid M, Lomas-Francis C, Olsson M. (2012). *The blood group antigen facts book*. Third Edition Elsevier: Academic Press.
- 166) Storry J, Castilho L, Daniels G, Flegel W, Garratty G, de Haas M, Hyland C, Lomas-Francis C, Moulds J, Noguez N, Olsson M, Poole J, Reid M, Rouger P, van der Schoot E, Scott M, Tani Y, Yu L, Wendel S, Westhoff C, Yahalom V, Zelinski T. (2014). International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Cancun report (2012). *Vox Sang*, 107(1): 90-6.
- 167) Spring F, Bruce L, Anstee D, Tanner M. (1992). A red cell band 3 variant with altered stilbene disulphonate binding is associated with the Diego (Di^a) blood group antigen. *Biochem J*, 288 (Pt 3): 713–6.
- 168) Miller S, Dykes D, Polesky H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 1215-1217.
- 169) Green M, Sambrook J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 170) Ekman G, Billingsly R, Hessner M. (2002). Rh genotyping: avoiding false-negative and false-positive results among individuals of African ancestry. *Am J Hematol*, 69: 34-40.
- 171) Moussa H, Ghommen N, Romdhane H, Abdelkefi S, Chakroun T, Houissa B, Jemni S. (2014). (C)ce(s) haplotype screening in Tunisian blood donors. *Blood Transfus*, 12(3):405-9.
- 172) Cotorruelo C, Fiori S, García Borrás S, Racca L, Biondi C, Racca A. (2008). Distribution of the *FYBES* and *RHCE*ce(733C>G)* alleles in an Argentinean population: Implications for transfusion medicine. *BMC Med Genet*, 9: 40-48.
- 173) Avent N, Martinez A, Flegel W. (2009). The Bloodgen Project of the European Union 2003-2009. *Transfus Med Hemother*, 36: 162-167.

- 174) López Marínez M, Chinnapapagari S, Olsson M. (2009). Mass-scale comprehensive *RHD* genotyping of 3000 samples using Bloodchip v 1.0. *Vox Sang*, 96: 449-453.
- 175) Protocolo del Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Disponible en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf>.
- 176) Kemp T, Poulter M, Carritt B. (1996). A recombination hot spot in the Rh genes revealed by analysis of unrelated donors with the rare D⁻ phenotype. *Am J Hum Genet*; 59(5): 1066–1073.
- 177) Poulter M, Kemp T, Carritt B. (1996). DNA-based rhesus typing: simultaneous determination of *RHC* and *RHD* status using the polymerase chain reaction. *Vox Sang*, 70(3): 164-8.
- 178) Berman H, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat T, Weissig H, Shindyalov I, Bourne R. (2000). The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242. Disponible en: <http://www.rcsb.org/>.
- 179) The PyMOL® Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC. Disponible en: <https://www.pymol.org/>.
- 180) Flegel W, Curin-Serbec V, Delamaire M, Donvito B, Ikeda H, Jørgensen J, Kumpel B, Le Pennec P, Písacka M, Tani Y, Uchikawa M, Wendel S, Wagner F. (2002). Section 1B: Rh flow cytometry Coordinator's report. Rhesus index and antigen density: an analysis of the reproducibility of flow cytometric determination. *Transfus Clin Biol*, 9: 33-42.
- 181) Gu J, Sun A, Wang X, Shao C, Li Z, Huang L, Pan Z, Wang Q, Sun G. (2014). Analysis of density and epitopes of D antigen on the surface of erythrocytes from DEL phenotypic individuals carrying the *RHD1227A* allele. *Blood Transfus*, 12(2): 244-9.
- 182) Guo-Guang W, Yu-Qing S, Qiong Y, Shi-Zheng J, Tong-Mao Z. (2002). Development of a DNA-based genotyping method for the Diego blood group system. *Transfusion*, 42: 1553-1556.
- 183) Tounta G, Vrettou C, Kolialexi A, Papantoniou N, Destouni A, Tsangaris G, Antsaklis A, Kanavakis E, Mavrou A. (2011). A multiplex PCR for non-invasive fetal *RHD* genotyping using cell-free fetal DNA. *In Vivo*, 25(3): 411–7.
- 184) Picchiassia E, Di Renzo G, Tarquinia F, Binib V, Centraa M, Pennacchia L, Galeonea F, Micantia M, Coata G. (2015). Non-Invasive Prenatal *RHD* Genotyping Using Cell-Free Fetal DNA from Maternal Plasma: An Italian Experience. *Transfus Med Hemother*, 42: 22–28.

- 185) Finning K, Martin P, Daniels G. (2009). The use of maternal plasma for prenatal RhD blood group genotyping. *Methods Mol Biol*, 496: 143-57.
- 186) Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Kulovany E, Vlk R. (2005). Non-invasive fetal *RHD* exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal diagnosis and therapy*, 20(4): 275-280.
- 187) Trucco Boggione C, Luján Brajovich M, Mattaloni S, Di Mónaco R, García Borrás S, Biondi C, Cotorruelo C. (2016). Genotyping approach for non-invasive foetal *RHD* detection in an admixed population. *Blood transfusion, Trasfusione del sangue*, 1-8.
- 188) Gassner C, Rozman P. (2006). *RHD* DNA screening for *weak D*, *DEL* and *D+/-* 'chimeras'. *Vox Sang*, 91: 184.
- 189) Orzińska A, Guz K, Polin H, Pelc-Kłopotowska M, Bednarz J, Gieleżyńska A, Sliwa B, Kowalewska M, Pawłowska E, Włodarczyk B, Malaga Alicja Żmudzin M, Krzemienowska M, Srivastava K, Michalewska B, Gabriel C, Flegel W, Brojer E. (2013). *RHD* variants in Polish blood donors routinely typed as D-. *Transfusion*, 53(11 Suppl 2): 2945-53.
- 190) Huang C. (1996). Alteration of *RH* gene structure and expression in human dCCee and DCW-red blood cells: phenotypic homozygosity versus genotypic heterozygosity. *Blood*, 88(6): 2326-33.
- 191) Müller T, Wagner F, Trockenbacher A, Eicher N, Flegel W, Schönitzer D, Schunter F, Gassner C. (2001) PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion*, 41: 45-52
- 192) Polin H, Danzer M, Hofer K, Gassner W, Gabriel C.(2007). Effective molecular *RHD* typing strategy for blood donations. *Transfusion*, 47(8): 1350-5.
- 193) Nogués N, Tarrago M, Subirana L, Boto N, Salgado M, Ibañez M, Montero R, Fornes G, Muñoz-Diaz E. (2007). *RHD* null alleles in the Spanish population. *Vox Sang*, 400: 205.
- 194) Wagner T, Körmöczy G, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr W, Legler T. (2005). Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*, 45: 520-526.
- 195) Kim K, Woo K, Han J, Kim J, Park K. (2009). Primary anti-D immunization by DEL red blood cells. *Korean J Lab Med*, 29: 361-365.
- 196) Noizat-Pirenne F, Verdier M, Lejealle A, Mercadier A, Bonin P, Peltier-Pujol F, Fialaire-Legendre A, Tournamille C, Bierling P, Ansart-Pirenne H. (2007). Weak D phenotypes and transfusion safety: where do we stand in daily practice? *Transfusion*, 47: 1616-1620.

- 197) Garraty G. (2005). Do we need to be more concerned about weak D antigens? *Transfusion*, 45: 1547-1551.
- 198) Pham B, Roussel M, Peyrard T, Beolet M, Jan-Lasserre V, Gien D, Ripaux M, Bourgouin S, Kappler-Gratias S, Rouger P, Pennec P. (2011). Anti-D investigations in individuals expressing weak D Type 1 or weak D Type 2: allo- or autoantibodies? *Transfusion*, 51(12): 2679-85.
- 199) Mota M, Fonseca N, Rodrigues A, Kutner J, Castilho L. (2005). Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang*, 88: 130-135.
- 200) Van Sandt V, Gassner C, Emonds M, Legler T, Mahieu S, Körmöczy G. (2015). *RHD* variants in Flanders, Belgium. *Transfusion*, 55(6 Pt 2): 1411-7.
- 201) Trucco Boggione C, Lujan Brajovich M, Gaspardi A, Sippert E, Mattaloni S, Leri M, Biondi C, Castilho L, Cotorruelo C. (2016). Weak D antigen expression caused by a novel *RHD* allele in Argentineans. *Transfusion*, 56:2895–2896.
- 202) Montaña R, Fuenmayor J, Torres O. (2014). *Inmunohematología básica y aplicada*, 1ra edn. GCIAMT, Cali, Colombia: 377-398.
- 203) Muñiz Díaz E. (2014). *Inmunohematología básica y aplicada*, 1ra edn. GCIAMT, Cali, Colombia: 399-412.
- 204) Indicadores demográficos. Municipalidad de Rosario, Sanat Fe, Argentina. Disponible en: http://www.rosario.gov.ar/sitio/caracteristicas/indicadores_ hechos.jsp.
- 205) Nogués N, Cotorruelo C. (2014). *Inmunohematología básica y aplicada*, 1ra edn. GCIAMT, Cali, Colombia: 447-452.
- 206) Araszkievicz P, Szymanski I. (1987). Quantitative studies on the Rh-antigen D. Effect of the C gene. *Transfusion*, 27: 257-261.
- 207) Cartron J. (1994). Defining the Rh blood group antigens. *Biochemistry and molecular genetics*. *Blood Reviews*, 8: 199-212.
- 208) Callebaut I, Dulin F, Bertrand O, Ripoche P, Mouro I, Colin Y, Mornon J, Cartron J. (2006). Hydrophobic cluster analysis and modeling of the human Rh protein three-dimensional structures. *Transfus Clin Biol*, 13: 70-84.