



Estudios moleculares del Sistema Rh

Dr. Cotorruelo, Carlos*

Genética del Sistema Rh

El Sistema Rh es el grupo sanguíneo más complejo y polimórfico de la membrana del glóbulo rojo. Está compuesto por más de 50 antígenos definidos por métodos serológicos siendo los más importantes los epitopes D, C, c, E y e. La presencia o ausencia del antígeno D en la membrana eritrocitaria define a un individuo como D positivo o D negativo. El Sistema Rh presenta un gran interés clínico en Obstetricia y Medicina Transfusional debido a la participación de sus aloanticuerpos en la destrucción inmune de los glóbulos rojos. Los antígenos de este Sistema son altamente inmunogénicos y juegan un papel central en la patogénesis de la Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal, en algunas Anemias Hemolíticas Autoinmunes y en reacciones hemolíticas transfusionales¹.

En 1991, Colin² estableció las bases genéticas asociadas a los fenotipos D positivo y D negativo (Figura 1). En resumen:

- El locus *RH* está compuesto por dos genes homólogos denominados *RHD* y *RHCE*.
- Los individuos caucásicos 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* (Figura 2).
- El gen *RHD* codifica la proteína RhD que expresa los epitopes del antígeno D.
- El gen *RHCE* posee cuatro formas alélicas más comunes: *RHcE*, *RHce*, *RHcE* y *RHCE* las cuales determinan la expresión combinada de los antígenos Ce, ce, cE y CE en la proteína RhCE.

- Existen más de 300 variantes alélicas para el locus *RH*.

El locus *RH* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 entre las posiciones 1p34.3 y 1p36.1. Los genes *RH* se encuentran dispuestos en *tandem*, separados por aproximadamente 30000 pb y enfrentados por sus extremos 3'. Constituyen una unidad génica y se heredan como haplotipos con frecuencias que varían en los distintos grupos étnicos. Ambos genes están compuestos por 10 exones cada uno y presentan una homología superior al 90% en las secuencias nucleotídicas codificantes indicando que surgieron de la duplicación de un gen ancestral común^{3,4,5,6}. La elevada homología junto con la disposición física que tienen estos genes en el cromosoma 1 contribuyen a la gran variabilidad alélica observada en este Sistema. El espacio intergénico está ocupado por el gen *SMP1* y una caja Rhesus.

El gen *RHD* está flanqueado por secuencias de ADN altamente homólogas denominadas cajas Rhesus que contienen una región de identidad de 1463 pb completamente iguales. La delección del gen *RHD* responsable del fenotipo D negativo es el resultado del entrecruzamiento desigual entre las regiones de identidad 5' y 3' con la formación de una caja Rhesus híbrida. El análisis de cajas Rhesus híbridas es útil para determinar la cigocidad del gen *RHD*. La presencia de una copia es predictiva de la hemicigocidad del gen *RHD*⁷ (Figura 2).

En nuestro Laboratorio determinamos la cigosidad *RHD* mediante una estrategia de PCR-RFLP. Este estudio se realiza en parejas de mujeres aloinmunizadas y permite brindar un asesoramiento genético con respecto a la probabilidad de tener un hijo D negativo.

*Laboratorio de Inmunoematología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET. Argentina. ccotorru@fbioyf.unr.edu.ar

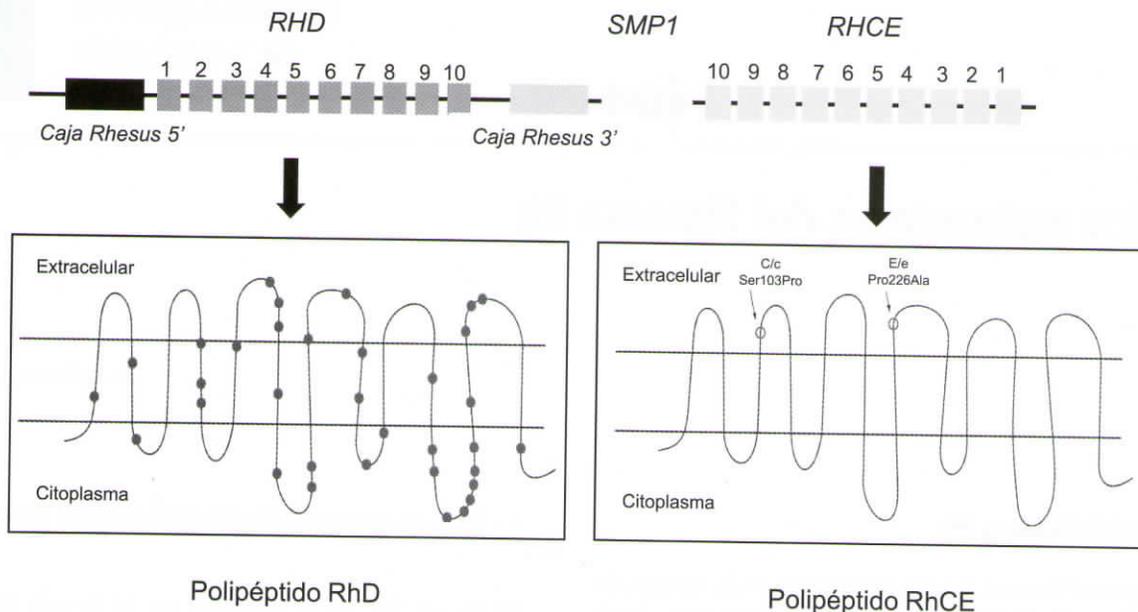


Figura 1. Organización genética del locus *RH* y producto de sus genes. Los dos genes *RH* tienen orientación opuesta y están enfrentados por sus extremos 3'. El gen *RHD* está flanqueado por las Cajas Rhesus. Las proteínas RhD y RhCE, producto de los genes *RHD* y *RHCE* respectivamente, presentan un 92% de homología y atraviesan la membrana eritrocitaria 12 veces formando 6 dominios extracelulares donde se expresan los diferentes antígenos Rh. Los aminoácidos que difieren entre las proteínas RhD y RhCE se muestran sobre el polipéptido RhD. Los cambios de aminoácidos responsables de la antigenicidad C/c y E/e se indican sobre la proteína RhCE.

Proteínas Rh

Las proteínas Rh (RhD y RhCE) presentan un 92% de homología y están compuestas por una única cadena polipeptídica de 417 residuos de aminoácidos. Este polipéptido atraviesa la membrana eritrocitaria 12 veces, formando 6 dominios extracelulares y posee los extremos amino terminal y carboxilo terminal orientados hacia el citoplasma³.

La expresión de los antígenos del Sistema Rh en la membrana eritrocitaria requiere la presencia de una glicoproteína asociada, denominada RhAG. Las proteínas Rh, la glicoproteína RhAG y otras proteínas accesorias (LW, CD47, GPB y Banda 3) se asocian en la membrana del glóbulo rojo formando el complejo Rh. El núcleo central de este complejo está compuesto por un trímero formado por 2 moléculas RhAG y 1 monómero RhD o RhCE estabilizado por asociaciones entre los dominios amino terminal y carboxilo terminal. Las proteínas accesorias se asocian a este tetrámero por uniones no covalentes^{3,6,8}.

El antígeno D es un mosaico compuesto por numerosos epitopes diferentes expresados sobre las regiones extracelulares del polipéptido RhD y que dependen de la estructura conformacional de esta proteína en la membrana eritrocitaria. El modelo inicial sugiere la existencia de 9 epitopes (epD1 a epD9), mientras que otros autores han propuesto la presencia de 16, 30

y 37 epitopes. El polimorfismo C/c está asociado principalmente a la sustitución del aminoácido Ser por Pro en la posición 103 presente en el segundo dominio extracelular mientras que el polimorfismo E/e está asociado a una sustitución del aminoácido Pro por Ala en la posición 226 en el cuarto dominio extracelular de la proteína RhCE^{3,4} (Figura 1).

Los antígenos del Sistema Rh pueden presentar alteraciones en su expresión dando origen a fenotipos débiles, parciales o delecionados. Estos fenotipos son los productos de las variantes alélicas de los genes *RH*.

Alelos *RHD* y fenotipos D variante

El gen *RHD* posee un alelo de alta frecuencia responsable del fenotipo D positivo y mas de 200 variantes alélicas que dan origen a fenotipos con expresión alterada del antígeno D (D parcial, D débil y DEL) y a proteínas RhD que no expresan epitopes D o que no se integran en la membrana eritrocitaria^{9,10,11}. Estas variantes alélicas han surgido por diferentes mecanismos genéticos: mutación puntual única, mutaciones puntuales dispersas, recombinación homóloga, inserción o deleción (figura 3).

Los glóbulos rojos con fenotipo D débil presentan una expresión cuantitativamente menor del antígeno D que los eritrocitos D positivo. El fenotipo D parcial se

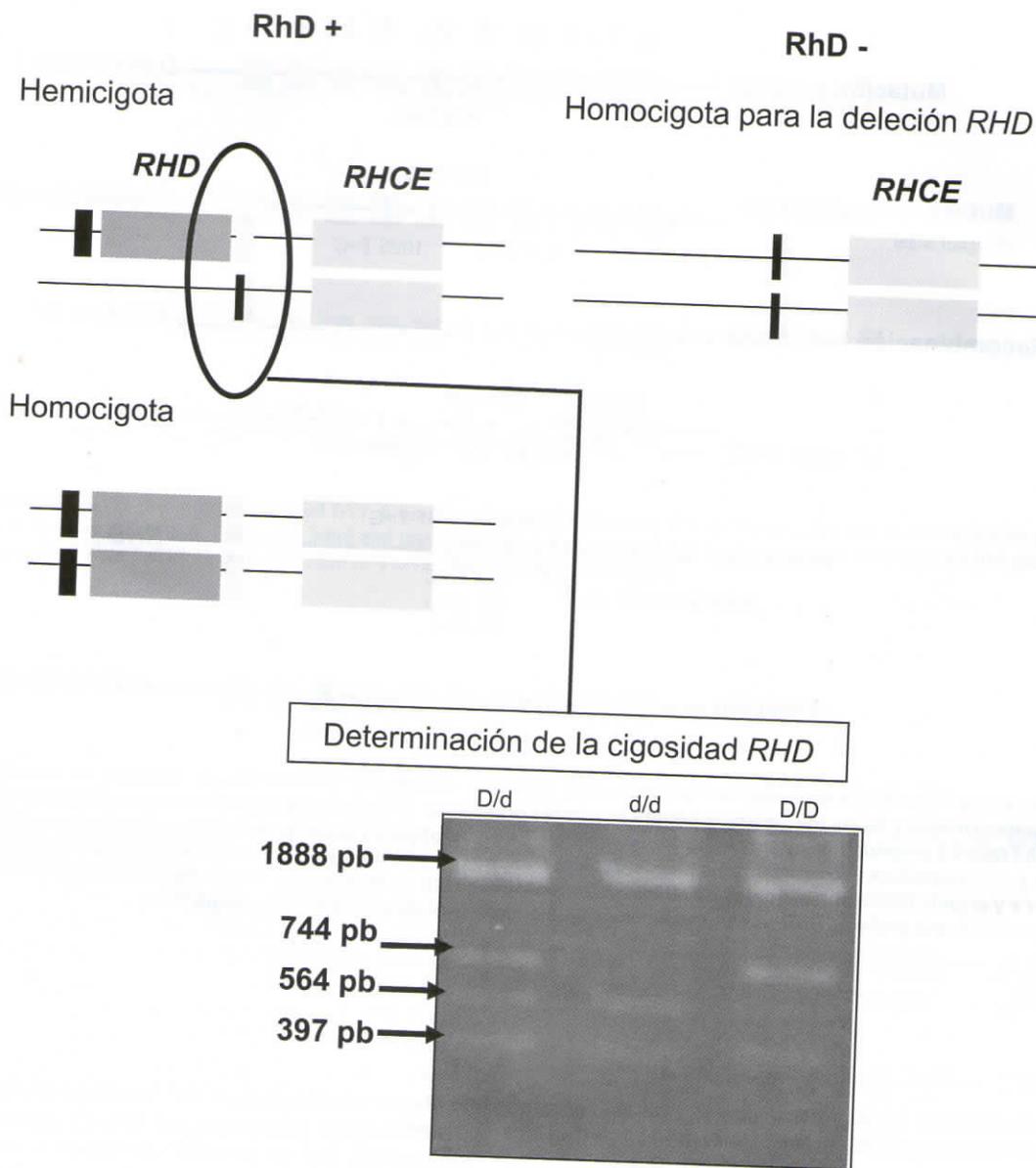


Figura 2. Cajas Rhesus y cigosidad *RHD*. El estudio de la cigosidad *RHD* se realiza con una estrategia de PCR-RFLP. En la reacción de PCR se utiliza un par de oligonucleótidos cebadores que permiten la amplificación de regiones de ADN correspondientes a la caja Rhesus 5' y a la caja Rhesus híbrida. Posteriormente, el producto de PCR es digerido con la enzima de restricción *Pst*I. La existencia de un sitio de restricción presente solo en la caja Rhesus híbrida genera un fragmento de 564 pb que indica la delección del gen *RHD* (individuo hemicigota).

caracteriza por la ausencia de uno o más epitopes del antígeno D, asociado, en algunos casos, con una expresión antigénica débil. Estas variantes no reaccionan con algunos anticuerpos anti-D monoclonales o son identificadas porque los individuos son capaces de producir aloanticuerpos contra los epitopes que no poseen¹. Los eritrocitos con fenotipo DEL aparentan ser D negativo, sin embargo expresan una mínima cantidad del antígeno D que sólo es detectada por técnicas especializadas de adsorción y elusión¹. La correcta identificación del fenotipo D débil, D parcial y DEL por métodos serológicos es muy difícil. Por este motivo, a to-

dos los fenotipos caracterizados por una expresión disminuida del antígeno D se los agrupa bajo la denominación "variante D". Esta clasificación serológica resulta útil para establecer una conducta transfusional u obstétrica en pacientes portadores de estos fenotipos con expresión alterada del antígeno D. Actualmente, los receptores y embarazadas con fenotipo "D variante" son considerados D negativo para evitar una posible aloinmunización. Por el contrario, en el contexto de donantes, toda expresión débil del antígeno D debe ser considerada capaz de inmunizar a pacientes D negativo.

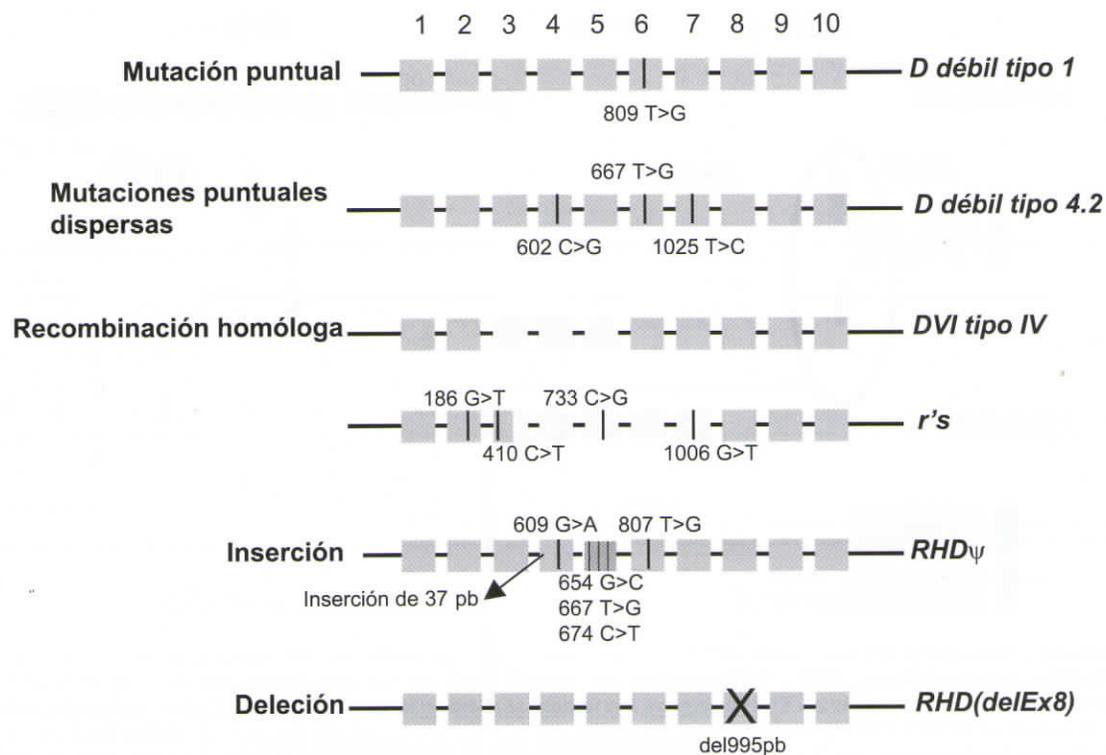


Figura 3. Mecanismos genéticos que originan las diferentes variantes alélicas del Sistema Rh. En la figura se muestran ejemplos de algunas variantes alélicas y de los mecanismos genéticos que las originaron. El alelo *D débil tipo 1* es responsable de un fenotipo D débil. El alelo *D débil tipo 4.2* es actualmente considerado responsable de un fenotipo D parcial ya que se han reportado casos de inmunización anti-D en pacientes portadores de esta variante alélica. El alelo *DVI tipo IV* es frecuente en población española y origina el fenotipo parcial DVI. El alelo *r's* y el alelo *RHDψ* son ejemplos de alelos *RHD* nulos responsables del fenotipo D negativo en poblaciones africanas. El alelo *RHD(delEx8)* origina una proteína RhD que presenta una mínima expresión de epítopes D (fenotipo DEL).

Los estudios de biología molecular aplicados a las variantes D han permitido establecer que los alelos del gen *RHD* que conducen a los fenotipos D parcial producen la sustitución de aminoácidos localizados en dominios extracelulares de la proteína RhD modificando uno o varios epítopes antigénicos⁹. El fenotipo DVI es el más frecuente de todos los fenotipos D parcial reportados, teniendo una incidencia que varía entre 1:2000 y 1:5000 en poblaciones europeas. La mayoría de los individuos que producen anti-D de importancia clínica pertenecen a la categoría DVI. Estos aloanticuerpos pueden provocar una Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal grave e incluso muerte neonatal. Los eritrocitos con fenotipo DVI no reaccionan generalmente con anticuerpos anti-D policlonales en pruebas directas debido, probablemente, a la presencia en estas células de solamente 3 epítopes del antígeno D. Este patrón de reacción es característico del fenotipo D débil. Por otro lado, dependiendo de la especificidad del anticuerpo monoclonal utilizado para la tipificación, algunos fenotipos DVI pueden reaccionar como los eritrocitos D positivo normales. Para una

correcta identificación del fenotipo DVI se debe utilizar 2 antisueros distintos, un anti-D que reaccione con eritrocitos DVI en pruebas directas y un anti-D que no detecte esta variante pero que reaccione con los glóbulos rojos con fenotipo D débil. La identificación de este fenotipo en receptores es importante ya que deben recibir sangre D negativo para evitar la formación de aloanticuerpos anti-D. Por esta misma razón, las mujeres embarazadas con fenotipo DVI deben recibir la profilaxis con inmunoglobulina anti-D¹ (Figura 4). Es importante destacar que algunos eritrocitos con fenotipo D parcial presentan también una disminución cuantitativa del antígeno D siendo clasificados como D débil cuando en realidad pertenecen a variantes cualitativas del antígeno D. Por otro lado, dependiendo del antisero utilizado, algunos eritrocitos con fenotipo D parcial pueden reaccionar como los fenotipos D positivo.

Por el contrario, los alelos que generan el fenotipo D débil son responsables de sustituciones de aminoácidos en los dominios intracelulares o transmembranales de la proteína RhD¹². Estos cambios

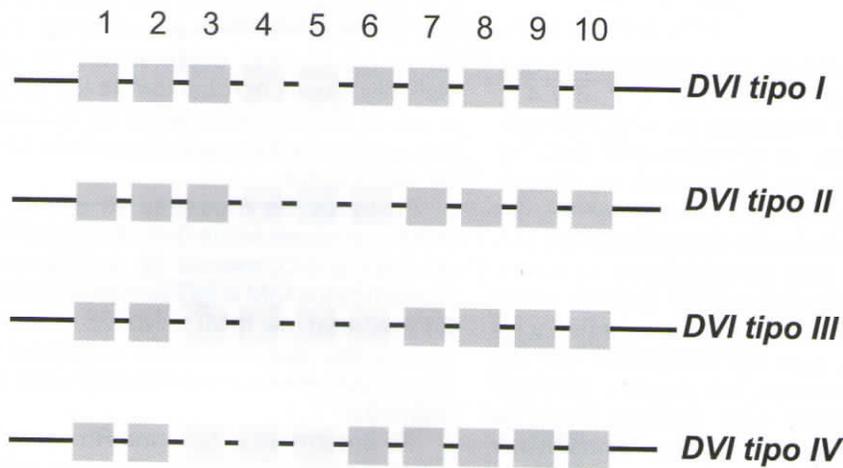


Figura 4. Bases moleculares del fenotipo parcial DVI. A nivel molecular, el fenotipo DVI se caracteriza por la presencia de genes híbridos en los cuales los exones 4-5, 4-5-6, 3-4-5-6 ó 3-4-5 del gen *RHD* fueron reemplazados por los exones homólogos del gen *RHCE* dando origen a los alelos *DVI Tipo I*, *DVI Tipo II*, *DVI Tipo III* y *DVI Tipo IV* respectivamente.

de aminoácidos modificarían la estructura secundaria y terciaria del polipéptido RhD o alterarían su integración a la membrana celular provocando una disminución en la expresión de todos los epitopes D. Aunque se observa una reducción cuantitativa en las reacciones de hemaglutinación, no existen diferencias cualitativas en el antígeno D. En la actualidad hay descriptos más de 80 variantes alélicas responsables de fenotipos D débil¹⁰. Tanto los alelos *D débil* como los fenotipos que originan se clasifican en diferentes "tipos" siendo las variantes D débil tipo 1, tipo 2, tipo 3 y tipo 4 las más frecuentes dentro del conjunto de los D débil (Figura 5).

Se ha observado en individuos D negativo, generalmente pertenecientes a poblaciones no caucásicas, la presencia de secuencias específicas del gen *RHD* en el locus *RH*. La variante alélica *RHD ψ* , también llamada pseudogen *RHD*, se caracteriza por una duplicación de 37 pb en la región comprendida entre el extremo 3' del intrón 3 y el comienzo del exón 4, un codón stop en el exón 6 y múltiples mutaciones con cambio de sentido. En algunas poblaciones africanas, esta variante alélica presenta una frecuencia similar a la delección del gen *RHD* en los individuos caucásicos D negativo¹³. También se han reportado recombinaciones entre los genes *RH* que originan formas aberrantes de la proteína RhD que no expresan epitopes D. El alelo denominado *r's*, cuya estructura molecular se caracteriza por la presencia de un segmento *RHCE* específico en un alelo *RHD*, *RHD-CE(3-7)-D*, es la tercera causa más frecuente del fenotipo D negativo en africanos^{14,15} (Figura 3).

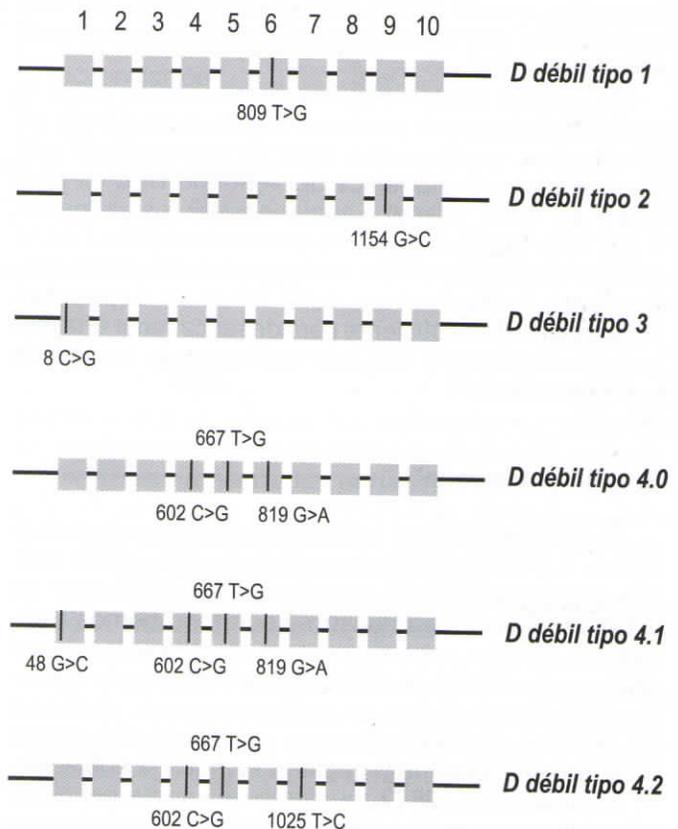


Figura 5. Las variantes D débil tipo 1, tipo 2, tipo 3 y tipo 4 representan el 95% dentro del conjunto de los fenotipos D débil. El alelo *D débil tipo 4.2* es actualmente considerado responsable de un fenotipo D parcial ya que se han reportado casos de inmunización anti-D en pacientes portadores de esta variante alélica.

Evidencias clínicas

Numerosos estudios clínicos han demostrado que los pacientes con fenotipo D débil tipo 1, 2, 3 y 4.1, independientemente de la intensidad de la reacción de hemaglutinación observada en la tipificación RhD, no desarrollan aloanticuerpos anti-D luego de transfusiones de unidades de glóbulos rojos D positivo^{9,16,17}. Teniendo en cuenta que actualmente, estos pacientes son considerados D negativo para transfusiones, la caracterización molecular de las variantes D permite racionalizar el uso de las escasas unidades D negativo y reservarlas exclusivamente para los individuos que las requieren. De la misma manera, las mujeres portadoras de estos fenotipos no son susceptibles de aloinmunización ante embarazos de fetos D positivo, y por esta razón no es necesaria la administración de la inmunoglobulina anti-D, evitando, en las gestantes los posibles efectos secundarios y el alto costo de esta terapéutica. La genotipificación *RHD* permite un mejor manejo de la profilaxis anti-D, restringiendo su uso exclusivamente a embarazadas en riesgo de aloinmunización.

Por otro lado se han reportado numerosos casos de inmunización anti-D en pacientes y embarazadas portadores de alelos que originan fenotipos D parcial¹⁰. La detección, a nivel molecular, de estos alelos permite implementar una correcta terapia transfusional o conducta obstétrica.

Por último, existen algunas controversias sobre la posibilidad de que un paciente se inmunice cuando es transfundido con hematíes DEL. Se ha reportado que la capacidad inmunogénica del fenotipo DEL es muy baja y, sin duda, inferior a la que poseen los antígenos E o K, que habitualmente no son contemplados en la práctica transfusional. Sin embargo, en individuos previamente inmunizados, esta limitada capacidad inmunogénica es suficiente para desencadenar una respuesta secundaria y provocar una reacción hemolítica postransfusional¹⁸.

Estudio poblacional

Teniendo en cuenta la importancia clínica de las variantes D y los beneficios que obtiene el Banco de Sangre implementando la caracterización molecular de estas variantes D, en nuestro laboratorio hemos realizado un estudio poblacional para identificar los alelos *RHD* responsables de fenotipos con expresión alterada del antígeno D que se encuentran en la población de Rosario. También hemos analizado las bases genéticas del fenotipo D negativo en nuestra población.

Se analizaron 12672 muestras de sangre periférica obtenidas por punción venosa de pacientes que concurren al Hospital Provincial del Centenario (HPC). Además, se estudiaron 5707 muestras provenientes de un laboratorio privado (LP). Todas las muestras fueron recolectadas en tubos estériles conteniendo EDTA al 5% como anticoagulante para los estudios serológicos

y la obtención de ADN. Las muestras fueron tomadas con el consentimiento previo de los pacientes y 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.

En todas las muestras se evaluó el fenotipo RhD mediante técnicas de hemaglutinación en tubo con un reactivo anti-D, mezcla de anticuerpos monoclonales humanizados IgM e IgG pertenecientes a los clones TH-28 (secretor de IgM) y MS-26 (secretor de IgG). Las reacciones que resultaron negativas en medio salino fueron estudiadas mediante la prueba de la antiglobulina indirecta.

Se determinó el fenotipo Rh completo en las muestras D negativo y en aquellas que presentaron una expresión débil del antígeno D (fenotipo D variante). Se utilizaron anticuerpos monoclonales 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. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

La frecuencia de fenotipos D positivo, D negativo y D variante difirió significativamente entre ambos grupos ($p < 0.0001$, prueba chi-cuadrado). La incidencia de individuos D negativo y portadores de fenotipos con expresión disminuida del antígeno D fue significativamente menor en el grupo HPC que en el LP, mientras que en el grupo HPC la frecuencia de individuos D positivo fue significativamente mayor ($p < 0.0002$, medias comparadas por el test z).

La distribución de frecuencias encontrada en el grupo LP se asemeja a la reportada para poblaciones europeas mientras que los valores hallados en el grupo HPC podrían explicarse por una mayor influencia amerindia y africana en el acervo genético de este estrato poblacional.

Tabla 1. Frecuencias del fenotipo RhD

	D positivo	D variante	D negativo
HPC (n=12672)	11974 (94.49%)	45 (0.36%)	653 (5.15%)
LP (n=5707)	5003 (87.66%)	43 (0.75%)	661 (11.58%)

❖ Estudio molecular de las muestras con fenotipo D variante

Posteriormente, se analizaron por diferentes estrategias moleculares las 88 muestras que presentaron una expresión disminuida del antígeno D. Los métodos utilizados y las variantes D halladas se muestran en la figura 6.

Los estudios moleculares permitieron determinar que 11 alelos diferentes fueron responsables de la expresión débil del antígeno D (Figura 7). Es importante destacar que aproximadamente el 45% de las muestras con fenotipo D variante son portadoras de alelos D

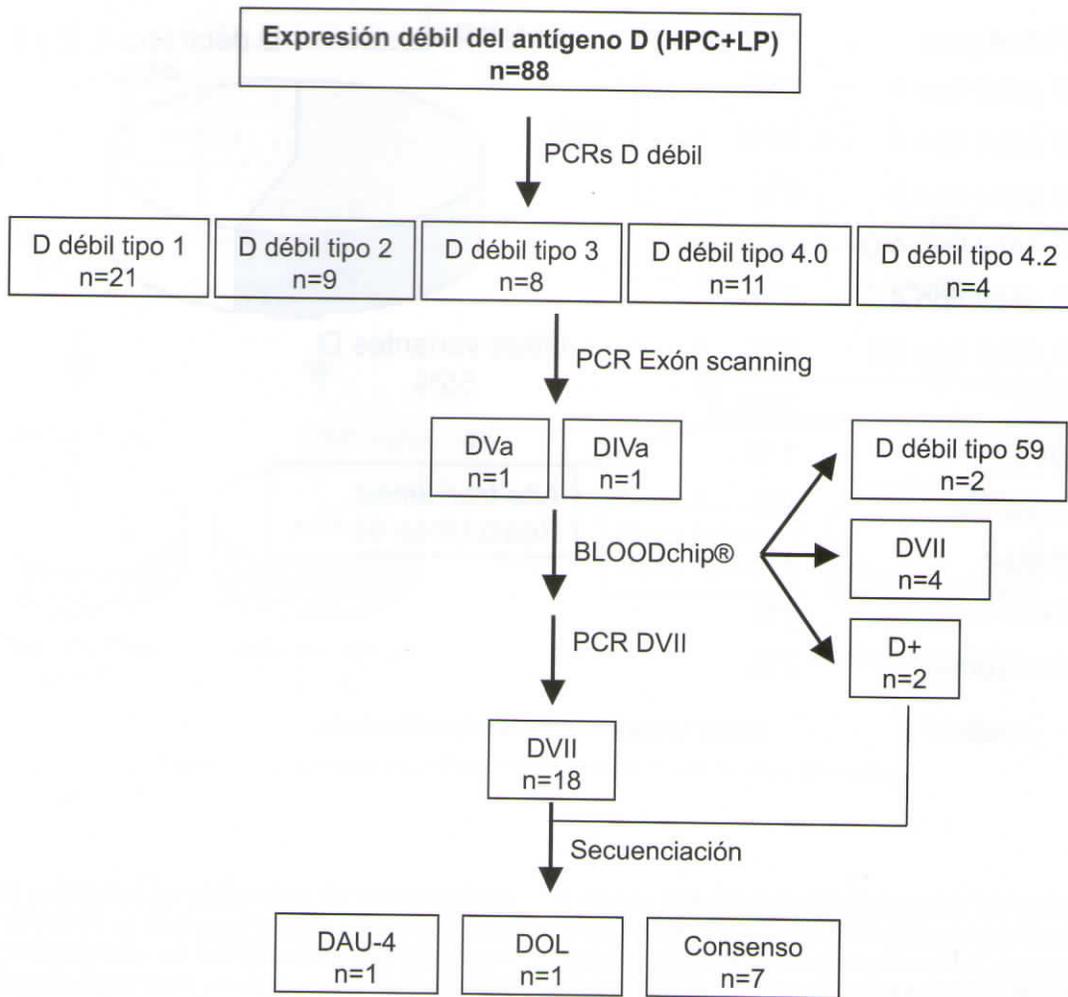


Figura 6. Estrategia de genotipificación *RHD* y alelos hallados.

débil tipo 1, D débil tipo 2 ó D débil tipo 3. Como se mencionó anteriormente, los pacientes portadores de estas variantes alélicas no desarrollan una respuesta inmune al antígeno D. Teniendo en cuenta que los pacientes con fenotipos D variante que presentan reacciones serológicas débiles con reactivos anti-D son considerados D negativo para transfusiones o embarazos, se estimó la frecuencia de individuos que recibirían innecesariamente unidades D negativo o la inmunoprofilaxis anti-D. El análisis de las 1402 muestras estudiadas (1314 D negativo más 88 con fenotipo D variante) indica que 1 de cada 37 pacientes que actualmente son considerados D negativo en la práctica transfusional y obstétrica, podrían ser tratados como D positivo. Considerando que cada receptor transfusional recibe en promedio dos unidades de sangre, la implementación de estrategias moleculares que detecten alelos *D débil* permitiría preservar más del 5% de las unidades D negativo. De esta manera, los Bancos de Sangre podrían utilizar las escasas unidades D ne-

gativo exclusivamente en los pacientes que presentan un verdadero riesgo de aloinmunización anti-D. Además, las mujeres embarazadas portadoras de estas variantes D débil no necesitarán la profilaxis con inmunoglobulina anti-D, evitando los efectos secundarios y el alto costo de esta terapéutica.

Los resultados de los estudios realizados mostraron una alta frecuencia de muestras con fenotipo D variante portadoras de alelos *DVII* en la población estudiada (25,00%) (Figura 7). Aunque la frecuencia de aloinmunización reportada para pacientes con este fenotipo D parcial es baja, se recomienda el uso de unidades D negativo y la administración de la inmunoprofilaxis anti-D principalmente en mujeres en edad fértil. Debido al comportamiento serológico de esta variante parcial, que aglutina con una intensidad apenas inferior a la esperada para un fenotipo D positivo, la caracterización molecular es de gran utilidad para un correcto manejo transfusional y obstétrico¹⁹.

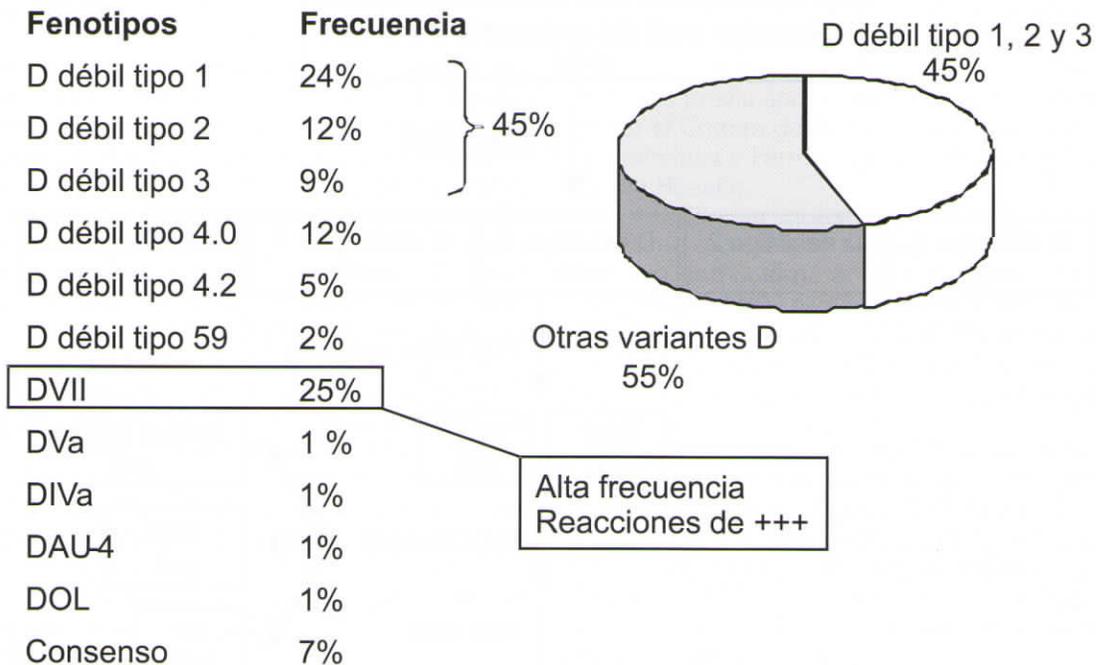


Figura 7. Frecuencias de fenotipos D variante.

Los estudios de secuenciación realizados en las 7 muestras restantes mostraron secuencias análogas al alelo *RHD* normal. Teniendo en cuenta que estos individuos expresaban el antígeno C, se podría atribuir la baja reactividad del antígeno D hallada en estas muestras a una exacerbación del efecto supresor del antígeno C, como ha sido observado en diversos estudios²⁰.

No se han identificado pacientes portadores del alelo *DVI* en las 18379 muestras analizadas durante este estudio. Probablemente, los eventos de hibridación y mestizaje ocurridos a comienzos del siglo XX, principalmente entre individuos de origen español e italiano con la población local de nuestro país, condujeron a una disminución de la incidencia de este fenotipo D parcial en nuestra población.

❖ *Estudio molecular de las muestras con fenotipo D negativo*

También se estudiaron mediante diferentes estrategias moleculares 1314 muestras D negativo, 653 provenientes del grupo HPC y 661 del grupo LP (Tabla 1). La variante *RHD* ψ fue hallada exclusivamente en el grupo HPC en el 1,17% de las muestras dcce (Figura 8).

Numerosos trabajos realizados principalmente en poblaciones europeas han demostrado la importancia de caracterizar las muestras D negativo que expresan los antígenos C y/o E, ya que aproximadamente el 20% de las mismas pueden ser portadoras de alelos *RHD* aberrantes²¹. Estas variantes presentan polimorfismos que suprimen la expresión del antígeno D o son res-

ponsables de la generación de fenotipos DEL. En este estudio hemos encontrado que el 17% y el 14% de las muestras que expresaban los antígenos C y/o E eran portadoras de fragmentos *RHD* específicos en los grupos HPC y LP, respectivamente (Figura 8). Aunque estas frecuencias no difirieron significativamente, en ambos grupos estudiados se hallaron diferentes alelos. Se observó que el 15% de estas muestras en el grupo HPC fueron portadoras de alelos silentes y el 2% presentaron alelos *DEL*. En cambio, en el grupo LP, el porcentaje de muestras con alelos nulos fue del 7% e igual porcentaje se encontró para las portadoras de alelos *DEL*.

Los resultados obtenidos demuestran que los métodos inmunohematológicos clásicos presentan limitaciones para la detección de las variantes D extremadamente débiles, generando una interpretación errónea de fenotipos DEL como D negativo. La identificación 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 del fenotipo Rh completo en la investigación de rutina de los dadores D negativo y la caracterización molecular de las muestras "D negativo - C y/o E positivo". Esta estrategia permitirá evitar los eventos de inmunización anti-D que generarían las variantes DEL al ser erróneamente tipificadas por las técnicas serológicas utilizadas en los Bancos de Sangre.

El hallazgo de alelos *RHD* nulos destaca la importancia de considerar estas variantes en las metodologías

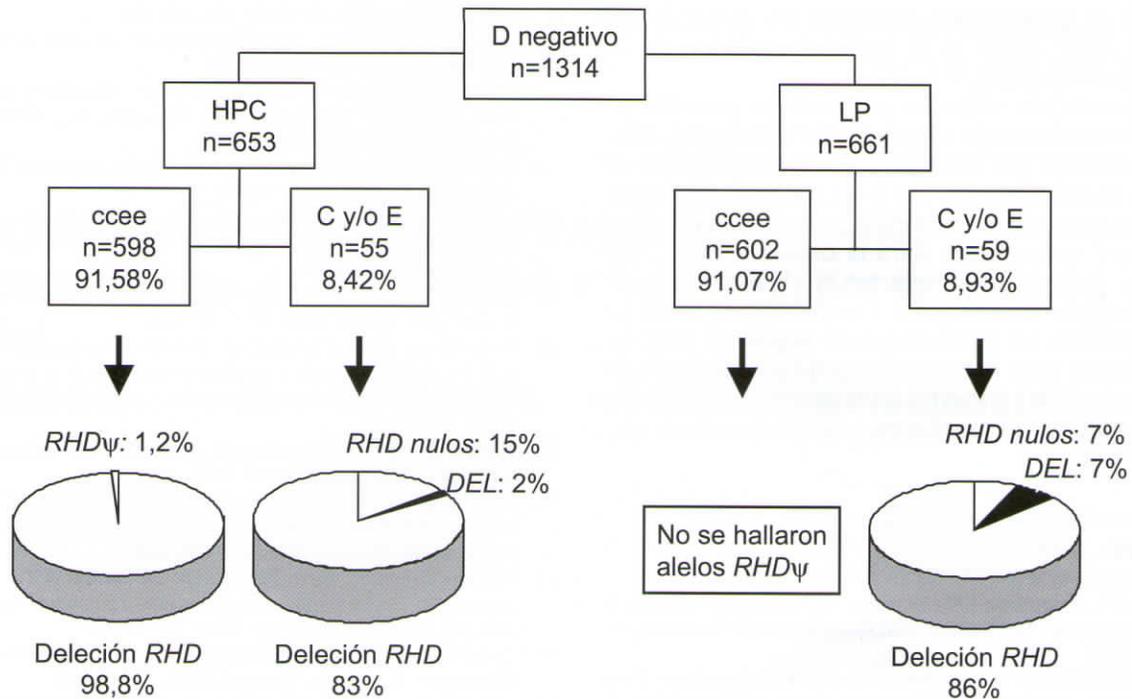


Figura 8. Caracterización molecular de las muestras con fenotipo D negativo.

de genotipificación *RHD*, ya que las mismas podrían conducir a resultados falsos positivos. El desarrollo de estrategias moleculares en las que se incluya 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. La correcta genotipificación *RHD* prenatal permitirá diagnosticar la Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal y administrar la profilaxis con inmunoglobulina anti-D exclusivamente a embarazadas cuyos fetos son D positivos.

Conclusiones

En este trabajo se realizaron estudios serológicos del fenotipo Rh a 18379 pacientes provenientes de dos servicios de salud de nuestra ciudad y se investigaron las bases genéticas que originan el fenotipo D variante y D negativo.

La selección de muestras provenientes de los dos servicios de salud permitió establecer que las frecuencias poblacionales de los distintos fenotipos D difieren incluso dentro de una misma ciudad. Estos hallazgos demuestran que para realizar una correcta caracterización molecular es necesario investigar previamente las variantes alélicas presentes en la población a estudiar. Los resultados obtenidos apoyan las teorías que indican que la composición étnica de nuestro país, surgida del aporte inmigratorio europeo en los siglos XIX y XX,

y de su mestizaje con pueblos originarios y etnias de origen africano, varía según la región y los estratos sociales analizados.

El análisis de las muestras con expresión alterada del antígeno D permitió la caracterización de variantes D débil y D parcial. La identificación de un alto porcentaje de individuos portadores de alelos *D débil tipo 1*, *D débil tipo 2* y *D débil tipo 3* destaca la importancia de la implementación de técnicas de biología molecular en los Bancos de Sangre para optimizar el uso de las escasas unidades D negativo almacenadas. Además, la genotipificación *RHD* en embarazadas contribuirá a racionalizar la inmunoprofilaxis, evitando los efectos secundarios y el alto costo de esta terapéutica.

La detección de una elevada incidencia del alelo *DVII* en el grupo de muestras con fenotipo D variante, señala que la identificación de estas variantes en los servicios de Medicina Transfusional de nuestra población evitará posibles incompatibilidades Rh.

La identificación de muestras D negativo portadoras de alelos *DEL* señala la importancia de investigar por biología molecular las muestras que expresan los antígenos C y/o E para una correcta asignación del fenotipo RhD. Esta estrategia evitará la transfusión de unidades *DEL* a pacientes con riesgo de aloinmunización.

La presencia de variantes nulas en nuestra población indica que es fundamental considerar estas variantes alélicas en la genotipificación *RHD*. La implementación de estos estudios moleculares

optimizará el diagnóstico prenatal no invasivo del genotipo *RHD* fetal y la administración de la inmunoglobulina anti-D.

La aplicación de métodos moleculares permite resolver las limitaciones de la tipificación serológica. Además, la predicción del fenotipo a partir del genotipo es más fiable cuando el antígeno D se expresa débilmente o en forma alterada. La combinación de las técnicas serológicas y moleculares para la determinación RhD en donadores y receptores mejorará la eficacia y seguridad de la terapia transfusional. La identificación de las variantes alélicas en pacientes que requieren transfusiones crónicas para el tratamiento de su patología de base, permitirá incrementar el número de unidades hemocompatibles en los Bancos de Sangre de la ciudad de Rosario.

Referencias

1. Mollison PL, Engelfreit CP, Contreras M. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th Edition, Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1997.
2. Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C y col. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by southern analysis. Blood 1991; 78: 2747-2752.
3. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood 2000; 95: 375-387.
4. Okuda H, Sukanuma H, Kamesaki T y col. The analysis of nucleotide substitutions, gaps and recombination events between *RHD* and *RHCE* genes through complete sequencing. Biochem Biophys Res Commun 2000; 274: 670-683.
5. Huang C, Liu P, Cheng J. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. Semin Hematol 2000; 37: 450-465.
6. Avent N. Molecular biology of the Rh blood group system. J Pediatr Hematol Oncol 2001; 23: 394-402.
7. Wagner FF, Flegel WA. *RHD* gene deletion occurred in the *Rhesus box*. Blood 2000; 95: 3662-3668.
8. Conroy M, Bullough P, Merrick M y col. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. Br J Haematol 2005; 131: 543-51.
9. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. Transfus Apher Sci 2011; 44: 81-91.
10. www.uni-ulm.de/%7Ewflflegel/RH/
11. www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/rbc/xslcgi.fcgi?cmd=bgmutsystems_info&system=rh
12. Wagner F, Gassner C, Müller T y col. Molecular basis of weak D phenotypes. Blood 1999; 93: 385-393.
13. Singleton B, Green C, Avent N. 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 2000; 95: 12-18.
14. Wagner F, Moulds J, Tounkara A y col. *RHD* allele distribution in Africans of Mali. BMC Genet 2003; 4:14.
15. Pham BN, Peyrard T, Juszczak G y col. Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hr B-, Hr B- phenotype in black persons. Transfusion 2009; 49: 495-504.
16. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec PY y col. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. Transfusion 2004; 44:1282-6.
17. Flegel WA. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. Curr Opin Hematol 2006; 13:476-83.
18. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S y col. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. Transfusion 2005; 45: 1581-1584.
19. Flegel W, Wagner F, Müller T y col. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. Transfus Med 1998; 8: 281-302.
20. Araszkievicz P, Szymanski IO. Quantitative studies on the Rh-antigen D. Effect of the C gene. Transfusion 1987; 27: 257-261.
21. Gassner C, Doescher A, Drnovsek T y col. Presence of *RHD* in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. Transfusion 2005; 45: 527-538.